

Содержание

К НАШИМ ЧИТАТЕЛЯМ

В.К. Шумный, И.К. Захаров 5

ЭВОЛЮЦИОННАЯ ЭКОЛОГИЯ ПЛОДОВИТОСТИ ЖИВОТНЫХ: 50 ЛЕТ ИЗУЧЕНИЯ РАЗМНОЖЕНИЯ КАК СВЯЗУЮЩЕГО ЗВЕНА ПОКОЛЕНИЙ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

В.И. Евсиков, М.А. Потапов 7

ЭВОЛЮЦИОННАЯ ЭКОЛОГИЯ ПЛОДОВИТОСТИ ЖИВОТНЫХ: ФАКТОРЫ ЭПИГАМ- НОГО ПОЛОВОГО ОТБОРА У ГРЫЗУНОВ

М.А. Потапов, В.И. Евсиков 22

ИССЛЕДОВАНИЯ СИНХРОНИЗАЦИИ ПОЛОВОГО ЦИКЛА У САМОК СЕРОЙ КРЫСЫ (*RATTUS NORVEGICUS*) ПРИ СОВМЕСТНОМ СОДЕРЖАНИИ

Ю.Н. Иванов, Д.В. Клочков, М.А. Поздняков 35

МОДЕЛЬ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ДЕТЕРМИНАЦИИ ЧИСЛА СОСКОВ У ДОМАШНИХ СВИНЕЙ

С.В. Никитин, С.П. Князев, В.И. Ермолаев 45

НЕОБЫЧНАЯ ДЕВИАЦИЯ РЕПРОДУКЦИИ В ДИНАСТИИ РОМАНОВЫХ: ПОВТОРНЫЕ РОЖДЕНИЯ ДЕВОЧЕК И ПРЯМОЕ ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПА ОТЦА

М.Д. Голубовский 56

АПОЗИГОТИЧЕСКИЙ СПОСОБ РЕПРОДУКЦИИ СЕМЯН В СИСТЕМЕ РОДА *BETA* (*CHENOPODIACEAE*) И ГОМОЛОГИЧЕСКИЕ РЯДЫ Н.И. ВАВИЛОВА

С.И. Малецкий, Е.И. Малецкая, С.С. Юданова 66

СУЩЕСТВУЕТ ЛИ ГАМЕТОФИТНЫЙ АПОМИКСИС У ДИПЛОИДНЫХ ЦВЕТКОВЫХ РАСТЕНИЙ?

В.А. Соколов, П.А. Панихин, Т.К. Тараканова 80

РЕДЕРИВАЦИЯ КАК СПОСОБ ОЧИСТКИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Е.Ю. Брусенцев, В.А. Напримеров, С.Я. Амстиславский 102

ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ВАКЦИН НОВОГО ПОКО- ЛЕНИЯ

С.И. Татьков, Е.В. Дейнеко, Д.П. Фурман 114

КОНСТИТУТИВНАЯ И ВАРИАБЕЛЬНАЯ КОМПОНЕНТЫ ПРОФИЛЕЙ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ ПЕЧЕНИ СВИНЕЙ <i>Н.С. Хлопова, Т.Т. Глазко, В.И. Глазко</i>	130
АНАЛИЗ ДУПЛИКАЦИИ ГЕНОВ миРНК В ГЕНОМЕ ЧЕЛОВЕКА И РОЛЬ ЭВОЛЮЦИИ ТРАНСПОЗОНОВ В ЭТОМ ПРОЦЕССЕ <i>И.И. Титов, П.С. Ворожейкин</i>	139
ВЛИЯНИЕ ГОЛОДАНИЯ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ И АПОПТОЗ В КЛЕТКАХ ЯИЧНИКОВ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> <i>М.В. Жукова, Е.В. Киселева</i>	148
ПОПУЛЯЦИОННАЯ ГЕНЕТИКА КОЛОРАДСКОГО ЖУКА: ОТ ГЕНОТИПА ДО ФЕНОТИПА <i>М.Б. Удалов, Г.В. Беньковская</i>	156
КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ АМАРАНТА (<i>AMARANTHUS L.</i>) <i>А.И. Стасюк, Н.Б. Железнова, А.В. Железнов</i>	173
ВАДИМ БОРИСОВИЧ ЕНКЕН: К 110-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ <i>Н.П. Гончаров</i>	183
К 100-ЛЕТИЮ СЕРГЕЯ СПИРИДОНОВИЧА ХОХЛОВА (29.09.1910–23.11.1974) <i>Н.А. Шишкинская</i>	198

Content

TO OUR READERS <i>V.K. Shumny, I.K. Zakharov</i>	5
EVOLUTIONARY ECOLOGY OF ANIMAL FERTILITY: 50-YEAR INVESTIGATION OF REPRODUCTION AS A LINK BETWEEN GENERATIONS IN MAMMALS <i>V.I. Evsikov, M.A. Potapov</i>	7
EVOLUTIONARY ECOLOGY OF ANIMAL FERTILITY: FACTORS OF EPIGAMIC SEXUAL SELECTION IN RODENTS <i>M.A. Potapov, V.I. Evsikov</i>	22
ESTROUS CYCLE SYNCHRONIZATION IN RAT (<i>RATTUS NORVEGICUS</i>) FEMALES KEPT TOGETHER <i>Yu.N. Ivanov, D.V. Klotchkov, M.A. Pozdnyakov</i>	35
MODEL OF PHENOTYPIC DETERMINATION OF THE NUMBER OF NIPPLES IN DOMESTIC PIGS <i>S.V. Nikitin, S.P. Knyazev, V.I. Ermolaev</i>	45
AN UNUSUAL REPRODUCTIVE ODDITY IN THE ROMANOV DYNASTY: THE CONSECUTIVE BIRTH OF GIRLS AND THE DIRECT PATERNAL EFFECT <i>M.D. Golubovsky</i>	56
APOZYGOUS SEED PRODUCTION IN THE SYSTEM OF THE GENUS <i>BETA</i> (CHENOPODIACEAE) AND VAVILOV'S HOMOLOGY SERIES <i>S.I. Maletsky, E.I. Maletskaya, S.S. Yudanova</i>	66
IS GAMETOPHYTIC APOMIXIS PRESENT IN DIPLOID FLOWERING PLANTS? <i>V.A. Sokolov, P.A. Panikhin, T.K. Tarakanova</i>	80
REDERIVATION AS A MEANS FOR LABORATORY ANIMAL PURIFICATION <i>E.Yu. Brusentsev, V.A. Naprimerov, S.Ya. Amstislavsky</i>	102
PROSPECTS FOR DESIGNING A NEW GENERATION OF ANTI-TUBERCULOSIS VACCINES <i>S.I. Tat'kov, E.V. Deineko, D.P. Furman</i>	114

CONSTITUTIVE AND VARIABLE COMPONENTS OF GENE EXPRESSION PROFILES IN PIG LIVER	
<i>N.S. Khlopova, T.T. Glazko, V.I. Glazko</i>	130
THE ANALYSIS OF miRNA DUPLICATION IN HUMAN GENOME AND THE ROLE OF TRANSPOSON EVOLUTION IN THIS PROCESS	
<i>I.I. Titov, P.S. Vorozheykin</i>	139
INFLUENCE OF STARVATION ON THE LIFESPAN AND APOPTOSIS IN OVARIAN CELLS OF <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	
<i>M.V. Zhukova, E.V. Kiseleva</i>	148
POPULATION GENETICS OF THE COLORADO POTATO BEETLE: FROM GENOTYPE TO PHENOTYPE	
<i>M.B. Udalov, G.V. Benkovskaya</i>	156
CORRELATION ANALYSIS OF SOME AMARANTH SPECIES (<i>AMARANTHUS</i> L.)	
<i>A.I. Stasyuk, N.B. Zheleznova, A.V. Zheleznov</i>	173
VADIM B. ENKEN: TO 110th ANNIVERSARY OF THE BIRTH	
<i>N.P. Goncharov</i>	183
ON THE CENTENARY OF SERGEY SPIRIDONOVICH KHOKHLOV (29.09.1910–23.11.1974)	
<i>N.A. Shishkinskaya</i>	198

К НАШИМ ЧИТАТЕЛЯМ

Уважаемые коллеги!

В 2011 г. журнал «Информационный вестник ВОГиС» будет выходить с первого номера под новым названием «**Вавиловский журнал генетики и селекции**» (Vavilov Journal of Genetics and Breeding). Получено «Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ № ФС77-42741 от 25 ноября 2010 г.».

Перерегистрация журнала «Информационный вестник ВОГиС» связана со следующими обстоятельствами:

- уточнение тематик;
- изменение названия и территории распространения: с 2011 г. по контракту с МАИК-Springer статьи журнала будут переводиться на английский язык и журнал под названием «Russian Journal of Genetics: Applied Research» будет распространяться за рубежом;
- переименование учредителей и изменение юридического адреса учредителя.

Журнал включен в перечень изданий Сибирского отделения РАН.

В перечне ВАК журнал с новым названием будет перерегистрирован в 2011 г.

Повышение статуса журнала и, как мы надеемся, его рейтинга требует более продуманного подбора статей. Журнал будет продолжать публиковать работы по биологическим, сельскохозяйственным и медицинским наукам. Печатаются оригинальные экспериментальные, теоретические и обзорные работы по следующим научным направлениям: биологии; всем разделам генетики; молекулярной генетике; клеточной биологии, цитологии, гистологии; селекции и сельскохозяйственной биологии; ветеринарии; физиологии; медицинской генетике и биологии; математической биологии и биоинформатике; биохимии и физико-химической биологии; системной и эволюционной биологии; истории биологии. Публикуются статьи, материалы и документы по связанным и смежным с ними направлениям науки и образования; рецензии, письма редактору,

персоналии, хроника, а также материалы, касающиеся образовательных программ и методики преподавания генетики и селекции в высших учебных заведениях. При формировании англоязычных номеров особое внимание и предпочтение будут уделяться статьям прикладного характера в области селекции, медицинской генетики, биотехнологий, так как в названии переводного варианта есть дополнение «Российский генетический журнал: прикладные аспекты».

Правила оформления статей, их представление в редакцию журнала и научное рецензирование остаются прежними.

Журнал «Информационный вестник ВОГиС» основан в 1997 г. Это был тяжелый период для российской науки. Тем не менее 14 лет журнал рос и развивался и, как мы надеемся, приобрел свое «лицо» и занял достойное место в информационном пространстве научных журналов.

Среди особенностей и достоинств журнала отметим следующие. Во-первых, редакция журнала старается работать оперативно, с целью уменьшения сроков прохождения рукописей от момента получения до выхода в свет. Во-вторых, нам удается постоянно формировать тематические выпуски номеров. В этой огромной, сложной и специфической работе редакции журнала оказывают неоценимую помощь приглашенные редакторы, которым мы бесконечно признательны. Перечислим некоторые из тематических номеров «Информационного вестника ВОГиС» за последние 6 лет: 2005 г. – Математическая биология и биоинформатика (Памяти В.А. Ратнера) (Т. 9, № 2); К 40-летию Института генетики и цитологии НАН Беларуси (Т. 9, № 4); 2006 г. – Эволюционная и популяционная генетика человека (Т. 10, № 1); Микромир РНК (Т. 10, № 2); Медицинская генетика (Т. 10, № 3); 2007 г. – Проблемы генетики и селекции животных (пушных зверей). К 140-летию выхода в России труда Ч. Дарвина «Прирученные животные и возделанные растения» (Т. 11, № 1); Эволюци-

онная биология. К 90-летию со дня рождения Д.К. Беляева (Т. 11, № 2); 120 лет со дня рождения Н.И. Вавилова (Т. 11, № 3/4); 2009 г. – 200-летие рождения Ч. Дарвина и 150 лет его труда «Происхождение видов ...» (Т. 13, № 2), Центры генетических ресурсов лабораторных животных. Генетическая изменчивость и селекция в звероводстве (Т. 13, № 3); 2010 г. – Генетика и селекция животных (Т. 14, № 4), Кариофонды и дивергенция (Т. 14, № 1), Цитогенетика (Т. 14, № 4). В-третьих, в журнале были также опубликованы материалы научных конференций и симпозиумов: Труды 2-й международной конференции «Актуальные проблемы генетики и селекции растений», Омск, 2005 г. (2005, Т. 9, № 3); Труды симпозиума «Генетические коллекции и биоразнообразие возделываемых растений: получение, изучение, сохранение и хранение в вечной мерзлоте», Новосибирск, 2008 г.; Труды

конференции «Развитие эволюционных идей Д.К. Беляева» (2008, Т. 12, №1/2); Труды международной конференции «Биоинформатика регуляции и структуры генома», Новосибирск, 2008 г. (2009, Т. 13, № 1).

Этот стиль работы мы планируем сохранять и развивать и в дальнейшем в нашем журнале с новым названием «Вавиловский журнал генетики и селекции».

Уважаемые авторы, рецензенты и читатели журнала! Редколлегия благодарит вас за многолетнее сотрудничество и помощь в издании журнала. Мы ждем от вас новых, интересных, основанных на оригинальных исследованиях статей, имеющих существенное фундаментальное и прикладное значение.

Желаем всем вам удачи и надеемся на дальнейшее плодотворное сотрудничество.

В.К. Шумный

главный редактор академик РАН

И.К. Захаров

зам. главного редактора профессор

ЭВОЛЮЦИОННАЯ ЭКОЛОГИЯ ПЛОДОВИТОСТИ ЖИВОТНЫХ: 50 ЛЕТ ИЗУЧЕНИЯ РАЗМНОЖЕНИЯ КАК СВЯЗУЮЩЕГО ЗВЕНА ПОКОЛЕНИЙ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

В.И. Евсиков, М.А. Потапов

Учреждение Российской академии наук Институт систематики и экологии животных
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: ev@eco.nsc.ru

На основе собственных данных и данных литературы анализируется роль генетико-физиологических и экологических факторов в реализации репродуктивного потенциала млекопитающих. На примере многоплодных видов (норок и мышевидных грызунов) показано, что существенный вклад в стабилизацию фактической плодовитости на оптимальном для вида уровне вносит эмбриональная и ранняя постнатальная смертность потомков. Продемонстрирована определяющая роль иммуногенетических взаимоотношений организмов матери и зародышей в становлении жизненно важных свойств потомков. В исследованиях запахового выбора брачных партнеров самками грызунов установлено, что млекопитающие способны образовывать оптимальные структурно-функциональные группы родителей, обеспечивающие наиболее эффективное развитие потомков и тем самым наибольшую реализацию собственной «адаптивной ценности».

Ключевые слова: эволюционная экология, млекопитающие, плодовитость, эмбриональная смертность, гомеостаз, гетерозис, адаптации, половой отбор, иммуногенетические отношения мать–плод.

Предтечей эволюционной экологии является, несомненно, Ч. Дарвин, обосновавший в своем учении возможность эволюционных преобразований видов в результате естественного отбора, действующего в ходе конкуренции за ресурсы существования. В современном виде эволюционная экология сформировалась в 1930–1950-е гг. под влиянием идей исследователей, стоявших у истоков создания синтетической теории эволюции: Р. Фишера (Fisher, 1930), Дж. Хаксли (Huxley, 2010), Д. Лэка (Lack, 1954; Лэк, 1957) и др. Вклад в становление нового направления биологии внесли экспериментальные работы русского ученого Г.Ф. Гаузе (Gause, 1935). Наконец, первым, кто ввел термин «эволюционная экология» в российскую биологическую науку и сформулировал предмет, основные цели и проблемы данной дисциплины, стал С.А. Северцов (1936, 1951б). Суть основных положений эволюционной экологии заключается в признании того факта, что эволюционируют не особи, а их совокупности популяционно-видового уровня организации живой материи, при этом в не-

прерывном взаимодействии с биотическим и абиотическим окружением.

Минимальной единицей популяционно-видового уровня сообществ животных с половым размножением является семья, или «семейная триада». Благодаря эволюционно апробированному и экологически оправданному взаимодействию каждого из представителей семейной триады с другими осуществляется присущая всем живым системам «космическая» функция Жизни – размножение и преемственность поколений.

Результаты наших исследований, выполненных на нескольких видах млекопитающих, показали, что индивидуальная приспособленность особей и жизнеспособность популяций определяются комплексом генетико-физиологических и этологических механизмов, реализующихся в семейных триадах при взаимодействии брачных партнеров и родителей с их потомками. Семья представляет собой единую целостную систему, сплоченную множественными взаимосвязями, интегральные показатели жизнеспособности которой подпадают под действие естественного

отбора и служат потому основой эволюционных преобразований популяций и видов. Вектор фенотипических и генетических преобразований в смежных поколениях зависит от эффективности взаимодействий между членами семейной триады, а также с биотическим и абиотическим окружением. На уровне семьи осуществляется оптимизация жизненно важных показателей, от которых зависит существование популяций в динамичной среде.

Формирование представления о целостности семейной триады как элементарной единицы систем популяционного уровня («ячейки общества») в ходе изучения проблем репродукции животных прошло несколько этапов. Осознание важнейшей роли генетико-физиологических взаимоотношений (своеобразного «диалога») матери и потомков в становлении адаптивных свойств последних в дальнейшем привело к пониманию того, что эволюционная судьба представителей нового поколения во многом предопределена тем тайным «соглашением» между их будущими родителями, которое было достигнуто еще на этапе образования брачной пары. Значимость третьего члена семейной триады – отца – оказалась так же велика как при осуществлении брачного подбора, так и при его взаимоотношениях с потомками. Воистину семья триедина перед лицом эволюции.

А началось все на заре становления Сибирского отделения Академии наук СССР с изучения влияния генов окраски на плодовитость норок в лаборатории эволюционной генетики животных под руководством Д.К. Беляева и появления в 1961 г., 50 лет назад, первой публикации (Беляев, Евсиков, 1961). С тех пор генетико-физиологические исследования плодовитости млекопитающих успешно продолжались: сначала в ИЦиГ СО АН СССР (Беляев, Евсиков, 1962, 1967, 1968; Евсиков, 1966; Беляев и др., 1968, 1972; Евсиков и др., 1972, 1973), затем в ИМБГ в г. Киеве (Осетрова и др., 1976; Евсиков, Морозова, 1977, 1978; Колесников и др., 1977) и в Биологическом (ныне ИСиЭЖ) институте СО РАН (Евсиков, 1987; Евсиков и др., 1991, 1998, 2008; Назарова, Евсиков, 2000, 2004, 2007, 2008; Потапов, Евсиков, 2000; Evsikov *et al.*, 2000; Gerlinskaya, Evsikov, 2001 и др.).

Вскрытие коренных генетико-физиологических систем воспроизводительной функции

животных, анализ ее зависимости от внешних и внутривидовых факторов возможны лишь на широкой биологической основе. В целях дальнейшего развития представлений о становлении воспроизводительных способностей животных необходимо было привлечение данных и методов экологии, физиологии, эмбриологии, цитологии и других смежных наук о жизни.

Эволюция и плодовитость

Эволюция и преемственность жизни во времени на всех уровнях организации (от молекулярно-генетического до биосферного) обеспечиваются тремя ее основополагающими свойствами: способностью к редупликации («воспроизводству» начиная с молекул ДНК), дифференциации (появлению «изменчивости») и интеграции («эволюции» – возникновению более сложных живых систем из первоначально самостоятельных). Интеграция систем размножения на популяционно-видовом уровне возникла и эволюционировала вместе с возникновением полового размножения. Усложнение в процессе эволюции онтогенеза, обеспечивающего все более надежное сохранение и передачу потомкам генетической информации, и одновременная эволюция механизмов, гарантирующих поддержание гетерозиготности в смежных поколениях, привели к тому, что элементарной единицей размножения становится популяция. Развитие концепции о целостности вида (Северцов, 1951а; Завадский, 1967) вызвало представление о том, что естественный отбор действует не столько «... на пользу данного организма и только в силу этой пользы...» (Дарвин, 2001), сколько на пользу популяции как единого целого. Впрочем, еще Ч. Дарвин, говоря об эволюции жалящего аппарата пчел, указывал, что «... если, в итоге, способность жалить окажется полезной для социальной общины, она будет соответствовать всем требованиям естественного отбора, хотя бы и причиняла смерть отдельным членам этой общины» (Дарвин, 2001).

Плодовитость животных является эволюционно сложившимся признаком, в наиболее полной мере отражающим взаимоотношения животных с биотическими и абиотическими условиями внешней среды. Это весьма очевид-

ное положение вытекает из многих общебиологических соображений, приведших Ч. Дарвина к заключению, что главнейший результат борьбы за существование – не только и не столько сохранение жизни отдельно взятой особи, сколько ее успех в обеспечении себя потомством (Дарвин, 2001). Эта точка зрения Ч. Дарвина находит свое полное отражение в современном эволюционном учении, оценивающем адаптивную ценность особей по тому вкладу, который они вносят в генофонд следующего поколения. Плодовитость, являясь результатом реализации воспроизводительных способностей животных, обеспечивает преемственность поколений и сохранение генетической информации. Популяции животных способны сохранять оптимальный уровень плодовитости, и подобный гомеостаз базируется на тесном взаимодействии различных звеньев воспроизводительной функции. Плодовитость справедливо рассматривается как важнейшее звено динамики численности популяций, а ее изменчивость как адекватный ответ на влияние факторов внешней среды, способствующий сохранению вида во времени (Лэк, 1957).

Принцип гомеостаза

Признание принципа гомеостаза как основного принципа реализации жизненных явлений на всех уровнях биологической организации (Шилов, 1967; Шмальгаузен, 1968, 1969; Майр,

1968; Тимофеев-Ресовский и др., 1977; Мауг, 2001, 2004) заставляет с особой силой подчеркнуть роль стабилизирующего отбора в становлении жизненно важных свойств и признаков популяции. В полной мере значение стабилизирующего отбора проявляется и при формировании важнейшей функции животных – воспроизведения. При этом следует учитывать, что фактическая плодовитость животных, под которой понимается число выращенных до половозрелости потомков, зависит от целого ряда биологических параметров: числа овулирующих яйцеклеток, жизнеспособности эмбрионов и новорожденных, определяющей уровень эмбриональной и постнатальной смертности, генотипической конституции потомков и генетико-физиологических особенностей самих матерей. Тесное взаимодействие этих важнейших звеньев функции воспроизведения, в значительной мере осуществляемое по принципу обратной связи, и обеспечивает гомеостаз плодовитости на популяционном уровне. В этом смысле репродукция выступает в роли «связующего звена поколений» (рис. 1).

Понятие гомеостаза в приложении к плодовитости не следует, однако, понимать слишком буквально. Речь идет о том, что изменение плодовитости животных в обычных условиях осуществляется из поколения в поколение в определенных эволюционно оправданных пределах. При этом генетическая стабилизированность

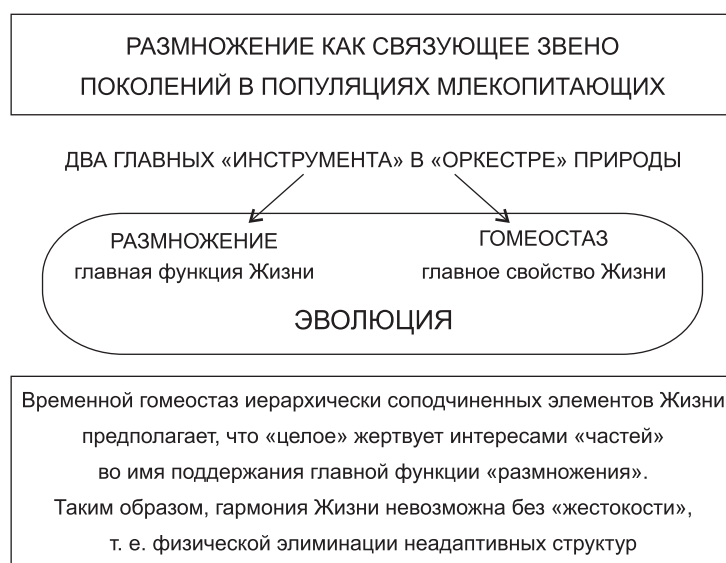


Рис. 1. Размножение как связующее звено поколений млекопитающих.

нормы реакции плодовитости, проявляющаяся в малой наследуемости плодовитости как таковой (Falconer, 1960; Плохинский, 1964), сочетается с генетико-физиологической пластичностью отдельных звеньев функции воспроизведения.

Эмбриональная и перинатальная смертность

Сохранение эволюционной и экологической пластичности популяции животных оплачивается ценой гибели определенной части составляющих ее особей. Системы размножения теснейшим образом связаны с системами обеспечения жизнеспособности потомства. Только интегральная оценка естественным отбором результатов взаимодействия этих систем вносит окончательные коррективы в формирование свойств и признаков, обеспечивающих сохранение вида во времени.

Несомненно, что у млекопитающих, обладающих наиболее совершенными механизмами сохранения жизни своего потомства, эмбриональная смертность в значительной мере носит адаптивный характер. Это следует, прежде всего, из самых общих популяционно-генетических соображений. В самом деле, генетический гомеостаз (Lerner, 1954) популяций млекопитающих так же, как и всех остальных размножающихся половым путем организмов, базируется на сложной гетерозиготной основе. Тем самым сохранение адаптивной гетерозиготности естественным отбором приводит к выщеплению и дальнейшей элиминации соответствующих гомозигот и неадаптивных гетерозигот. Таким образом, сохранение популяций млекопитающих в череде поколений должно оплачиваться гибелью части особей. С другой стороны, изменение уровня эмбриональной и ранней постнатальной смертности обеспечивает популяциям млекопитающих адаптацию к меняющимся условиям внешней среды (рис. 1).

Смертность особей следующего поколения на разных этапах онтогенеза представляет интерес и потому, что может служить хорошей моделью для изучения зависимости смертности животных от популяционной плотности, ибо, по словам Д. Лэка (1957), «пометы млекопитающих представляют собой популяцию в

миниатюре, и смертность в них также зависит от численности». Плодовитость и смертность являются ведущими факторами динамики численности. Поддержание плодовитости животных ниже их биологических возможностей не только объясняется давлением неблагоприятных экологических факторов, но и является адаптивным внутренне присущим популяциям животных свойством. Показано, в частности, что способность многих видов млекопитающих к саморегуляции своей численности, предотвращающей истощение пищевых ресурсов, реализуется через эмбриональную и раннюю постнатальную смертность (Christian, 1963; Wynne-Edwards, 1965). Необходимо отметить, что смертность потомков на той или иной стадии онтогенеза может выступать также в качестве механизма стабилизации оптимальной плодовитости животных. Выясняется, что потомки, развивающиеся в пометах средней – оптимальной – величины, находятся в более благоприятных условиях с самых ранних стадий эмбриогенеза, и среди них наблюдается меньшая смертность. Подобная роль эмбриональной и ранней постэмбриональной смертности в поддержании оптимальной плодовитости вырывается для многих видов животных (Лэк, 1957; Evsikov, Belyaev, 1972).

Иллюстрацией тому служит смертность потомков у самок норок (*Neovison vison*) и водяных полевок (*Arvicola amphibius*) разной плодовитости (рис. 2). Выяснилось, что смертность на эмбриональной и ранней постнатальной стадиях развития может стабилизировать плодовитость на оптимальных значениях, а потомки самок с оптимальной плодовитостью находятся в более благоприятных условиях уже с самых ранних стадий своего развития.

Особенности гетерозиса у млекопитающих

В приведенных выше примерах (рис. 2) обращает на себя внимание тот характерный факт, что существенное снижение смертности потомков при высокой плодовитости самок наблюдается в случае их гетерозиготности по некоторым генам окраски (Евсиков, 1987). Уже в ранних работах мы обнаружили, что гетерозис у гибридных матерей повышает жизнеспособность их потомства (Беляев, Евсиков, 1962),

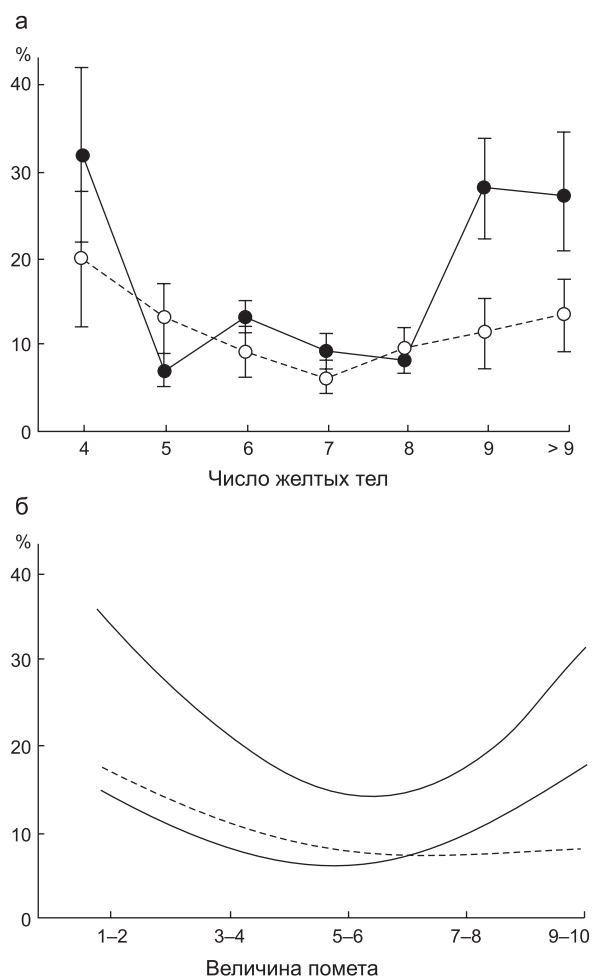


Рис. 2. Влияние плодовитости самок на доимплантационные потери у водяных полевок (а) и раннюю постнатальную смертность (приведены усредненные линии аппроксимации) у американских норок (б).

Сплошные линии – гомо-, прерывистые линии – гетерозиготные по генам окраски самки (по: Евсиков, 1987).

что было подтверждено не только на норках, но и на линейных мышах (Евсиков, 1975). В дальнейшем выяснилось, что именно для млекопитающих характерно проявление эффекта, аналогичного гетерозису («гибридной мощности» потомков), во втором поколении скрещивания (Кокенова, 2007; Потапов и др., 2011), что ярко отличает млекопитающих от других животных и растений, у которых эффекты, сходные по проявлению с «гибридной мощностью» (т. е. длительные модификации по признакам жизнеспособности), закрепить в следующих поколениях весьма проблематично. Так, при гибридизации двух инбредно разводимых линий степной пеструшки (*Lagurus lagurus*)

наблюдался эффект гетерозиса по плодовитости и массе тела. При этом эффекты, аналогичные гетерозису по массе тела, даже более отчетливо проявлялись у гибридов F_2 (рис. 3).

Мы полагаем, что это явление обусловлено тем, что «вклад» в потомков их родителей – гетерозисных гибридов F_1 увеличен за счет повышения молочности самок и заботы о потомстве обоих родителей (Кокенова, 2007; Потапов и др., 2011). Действительно, именно для большинства млекопитающих характерна длительно функционирующая связь представителей смежных поколений благодаря продолжительным периодам внутриутробного развития и лактации, когда становление жизнеспособности и адаптивных характеристик потомства полностью зависит от того, что «дает» ему мать, и от его способности поддерживать с ней физиологический «диалог» (Потапов и др., 2001). Таким образом, мы приходим к пониманию особой роли эффективности взаимодействия смежных поколений в рамках единой системы «мать–потомок».

Система «мать–потомок» у млекопитающих

В самом деле, обсуждение основ гомеостаза воспроизводительной функции млекопитающих невозможно вне рассмотрения проблемы взаимоотношений «мать–потомок». Любое несоответствие в генетически преддетерминированных взаимных реакциях эмбриона и матери может привести либо к гибели потомка, либо к развитию морфофизиологических аномалий. Следует учитывать также, что генетически predetermined отношения матери со своими потомками

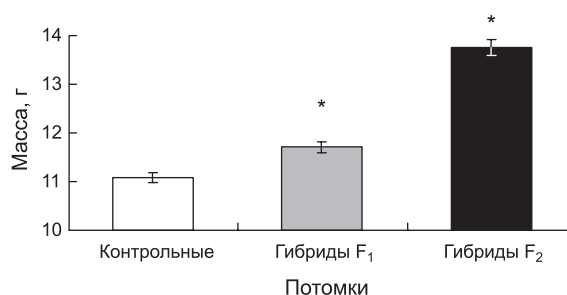


Рис. 3. Масса тела контрольных и гибридных потомков при отсадке от родителей (21-й день).

* Достоверные отличия от контроля и между гибридами F_1 и F_2 , $p < 0,001$.

у млекопитающих устанавливаются, очевидно, на самых ранних стадиях беременности, поскольку активация собственного генома эмбрионов начинается на стадии двух бластомеров (Корочкин, 1977), а возможно, даже на стадии оплодотворенной яйцеклетки (Solter *et al.*, 2002, 2004; Knowles *et al.*, 2003; de Vries *et al.*, 2004; Evsikov *et al.*, 2004, 2006; Mehlmann *et al.*, 2004; Peaston *et al.*, 2004).

Но чем же «физически» обеспечивается лучшее или худшее развитие потомков у млекопитающих? Мать и ее потомки в период беременности и вскармливания представляют единую функционирующую систему. На значительном интервале времени потомок полностью физиологически зависим от матери и реализовать свои генетически предопределенные потенции способен лишь во взаимодействии с ней. Нами получены данные о роли генетически контролируемых взаимоотношений (прежде всего, иммунологических) мать–потомок в становлении жизнеспособности и плодовитости особей следующего поколения. Выяснена роль антигенных различий мать–плод в определении жизнеспособности потомков и поддержании популяционного генетического гомеостаза. Получены данные по общебиологическим последствиям гибридизации и межлинейных и межпородных пересадок зародышей ранних стадий развития (Евсиков, Морозова, 1977, 1978; Евсиков, 1987; Евсиков и др., 1991, 1998; Gerlinskaya, Evsikov, 2001). В частности, показано, что эмбрионы развиваются лучше на фоне лучшего гормонального обеспечения в случае аллогенной беременности у самки (рис. 4).

После рождения детеныши не утрачивают связи с матерью на период молочного вскарм-

ливания. С помощью мышей двух генетически различных линий установлено, что у самок, родивших гибридных мышат, наблюдалось существенное улучшение питательных свойств молока (большее содержание белка и жира), что и определило более быстрый рост потомков (Евсиков и др., 1998; Potapov *et al.*, 1999b). Более того, у самок менялось поведение – возрастала материнская забота о потомстве.

Дестабилизирующий отбор

При разведении животных в контролируемых условиях человек сталкивается с рядом специфических проблем. Искусственный отбор, направленный на всемерное увеличение степени проявления интересующих человека признаков и свойств животных, как правило, противостоит отбору естественному, способствующему сохранению и усилению общей популяционной приспособленности. Тем самым искусственный отбор оказывает дезинтегрирующее влияние на генотип животных, ведет к «разбалансировке» интегрированной в результате долгой эволюции генотипической структуры популяции. Именно этим объясняется, очевидно, то обстоятельство, что «уклоненные формы и уродливости встречаются чаще в прирученном, чем в естественном состоянии» (Дарвин, 2001). Естественно, что искусственный отбор опирается не только на многочисленные мутации «мобилизационного» резерва популяционной изменчивости, но и на мутации с новым фенотипическим эффектом в реорганизационном генотипе, если такие мутации способствуют увеличению подхватываемой искусственным отбором наследственной изменчивости.

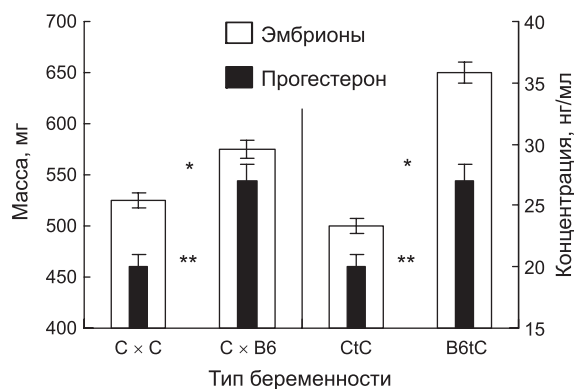


Рис. 4. Масса эмбрионов на 16-е сутки развития и концентрация прогестерона в плазме крови матерей на 4-е сутки после покрытия при разных типах сингенной и аллогенной беременности (по: Евсиков и др., 1998).

Обозначения: C × C – самка инбредной линии мышей BALB/c (C) покрыта самцом той же линии; C × B6 – самка C покрыта самцом C57BL/6 (B6); CtC – эмбрионы C пересажены в матку самки той же линии; B6tC – эмбрионы B6 пересажены в матку самки C. Достоверные отличия между сингенной и аллогенной беременностью: * по массе эмбрионов; ** по концентрации прогестерона.

Включение в сферу деятельности искусственного отбора все новых и новых мутаций, каждая из которых обладает множественным плейотропизмом, и создание на их основе таких комбинаций генов (генотипов), которые не встречаются в природных условиях, сопровождается перестройкой корреляционных систем «нормального» онтогенеза, изменением фенотипического проявления отдельных генов и их комплексов, сдвигом порога реактивности генетико-физиологических систем организма. Происходит «развал» всех регуляционных механизмов, обеспечивающих становление «дикого» фенотипа животных. Роль подобных явлений, по-видимому, особенно велика на первых этапах доместикации животных (Беляев, 1970).

Анализ генетико-селекционных последствий замены естественного отбора (одной из наиболее существенных форм которого является открытый И.И. Шмальгаузен (1968) стабилизирующий отбор) отбором искусственным привел Д.К. Беляева к выводу о существовании особой формы отбора, который он предложил назвать «дестабилизирующим отбором» (Belyaev, Khvastova, 1974; Беляев, 1978, 1983). Суть этой формы отбора сводится к тому, что селекция, приводящая к изменению нейроэндокринной системы организма, регулирующей в конечном итоге весь процесс его развития, сопровождается преобразованием характера коррелятивных взаимозависимостей коренных систем онтогенеза, изменением нормы реакции основных морфофизиологических процессов развивающегося организма, «развалом» нормального фенотипа. На примере серебристо-черных лисиц Д.К. Беляевым и Л.Н. Трут (Belyaev, 1979; Беляев, Трут, 1989; Трут, 1997, 2007) было показано, что такое дестабилизирующее действие на важнейшие функции животных, и в первую очередь на функцию воспроизведения, оказывает селекция по типу высшей нервной деятельности (селекция на «прирученность»). Дестабилизирующий отбор играет, по мнению Д.К. Беляева (1972), большую роль не только в доместикации, но и вообще в процессе эволюции.

Представления о дестабилизирующем отборе Д.К. Беляев развивает, опираясь прежде всего на те специфические доместикационные изменения, которые происходят в популяциях жи-

вотных при их селекции по типу поведения. Ни в коей мере не умаляя «дестабилизирующего» значения подобного отбора, «поставляющего» необходимую наследственную изменчивость для искусственного, а в некоторых случаях, очевидно, и для естественного отбора, следует отметить, что «пусковым механизмом» дестабилизации нормального фенотипа может быть, по-видимому, любое ослабление стабилизирующего отбора в отношении жизненно важных признаков. Сложная генетическая основа таких признаков, в реализации которых главнейшую роль играет гетерозиготность соответствующих наследственных систем, подразумевает сохранение из поколения в поколение жесткого отбора в отношении всех уклоняющихся от оптимума особей. Уменьшение давления стабилизирующего отбора ведет к реорганизации морфофизиологических корреляций, обеспечивающих сохранение оптимального проявления признаков в колеблющихся условиях среды, а также к сужению «нормы» реакции, падению общей гетерозиготности организма, являющейся одним из основных условий поддержания «генетического гомеостаза» (Lerner, 1954). Упрощение экологической ситуации в результате разведения животных в контролируемых человеком условиях в значительной мере снимает необходимость сохранения адаптивной к внешним условиям специализации многих признаков, обеспечивающих эволюционно выработавшуюся общую приспособленность. Все это приводит к тому, что в процессе одомашнивания наблюдается ряд характерных морфофизиологических изменений, как правило, не связанных с направлением искусственного отбора.

Эти изменения в своей основе базируются на: 1) упрощении поведенческих реакций; 2) снижении интенсивности метаболизма и 3) недоразвитии органов и тканей, потерявших свое значение (Шварц, 1972, 1977). Так, при разведении в искусственных условиях у степных пеструшек происходят закономерные изменения поведенческих и морфологических характеристик. В частности, снижается агрессивность самцов и растет уровень отцовской заботы о потомках; сокращаются длина слепой кишки, размер черепа и индекс длины лицевой его части, длина верхнего и нижнего зубных рядов, вес семенников и препуциальных желез

у самцов (Кокенова и др., 2005; Кокенова, 2007). Изменение условий существования (в данном случае – снятие действия природных, социальных и физических средовых факторов) приводит к направленному изменению морфометрических и поведенческих показателей степной пеструшки, отражающих, по всей видимости, особенности функционирования сопряженной с общей приспособленностью животных нейроэндокринной системы. Это говорит о том, что популяция в течение нескольких поколений разведения в неволе может выходить за пределы естественной адаптивной нормы реакции (Кокенова и др., 2005).

Отмеченные явления в популяциях домашних животных могут найти объяснение только с позиций дестабилизирующего отбора. Дестабилизация «нормального» онтогенеза наступает весьма быстро при селекции по типу поведения. Можно считать, что в принципе те же явления наступают и при любой форме искусственного отбора, нарушающей коадаптированную генетическую структуру популяций, только в этом случае дестабилизация окажется как бы более «растянутой» во времени. Новый, более глубокий смысл приобретает высказывание Ч. Дарвина о том, что «... человек, отбирая и накапливая какую-нибудь особенность строения, почти наверняка будет неумышленно изменять и другие части организма» (Дарвин, 2001).

Очевидно, в основе подобного «неумышленного изменения» лежит не только «сопряженная» (коррелятивная) зависимость различных признаков, но и «разбалансировка» генетической структуры популяций под действием дестабилизирующего отбора. Таким образом, работы по анализу генетико-физиологического становления воспроизводительных способностей животных, разводимых под контролем человека, показывают исключительную сложность и эволюционную стабилизированность данного процесса. Вместе с тем, полученные результаты позволяют приблизиться к пониманию конкретных путей и способов сохранения гомеостаза по репродуктивным качествам и в природных популяциях животных, а также наметить возможные пути его преодоления в интересах практической деятельности человека. Концепция дестабилизирующего отбора имеет большой научно-прикладной потенциал,

поскольку она указывает принципиальные пути и методы преобразования генетически стабилизированных признаков животных (в том числе и воспроизводительных способностей) при искусственном отборе.

Значение стресса в преобразовании популяций

В свое время академик Д.К. Беляев и его ученики подметили поразительную гомологию, возникающую при одомашнивании самых разных видов млекопитающих. Речь идет об одном из эффектов дестабилизирующего отбора, в частности, о появлении (в результате стрессовых воздействий и отбора по поведению) неокрашенных, белых участков на теле нарождающихся животных, т. е. – пегости (Трут, 1997). Кстати, еще библейский Иаков установил, что некоторые (довольно специфические) воздействия на животных в чувствительные периоды их жизни (случка) приводят к рождению «пестрого, и с крапинами, и с пятнами» молодняка. Поскольку именно пестрый скот был назначен Иакову в награду за службу, он, провоцируя появление «пятнистости» в потомстве и отделяя затем мутантов от стад своего тестя-работодателя, быстро сделался «весьма, весьма богатым» (Быт. 30: 31–43).

Итак, стресс может вызывать проявление белой пегости в потомстве. А у нас имеется возможность проверить это утверждение, причем не в эксперименте, а в природе. Дело в том, что в изучаемой нами на протяжении многих лет популяции водяных полевок всегда имеется определенная доля животных с белыми пятнами. С другой стороны, нами регулярно оценивался уровень стресса в этой популяции (по ряду сопряженных показателей). Действительно, предположение о том, что в годы, когда стресс велик, будет появляться на свет больше зверьков, отмеченных белыми пятнами, подтвердилось. Далее мы выяснили, что пятнистые особи более устойчивы к стрессу, и именно они в «напряженные» (стрессовые) годы размножаются успешнее (Потапов и др., 1998), в результате чего в такие периоды появляется больше пятнистых прибылых зверьков (их потомков). Тем самым получены подтверждения представлениям Д.К. Беляева (1983) о существенной

роли механизмов стресса в адаптивных и микроэволюционных преобразованиях популяций животных. Д.К. Беляев (Belyaev, 1983; Беляев, 1991) писал, что стресс вскрывает внутривидовую генетическую изменчивость, а селективная ценность животных разных генотипов в условиях нормы и стресса оказывается неодинаковой.

Половой отбор

Говоря о дифференциальном воспроизводстве (различном участии в размножении), нельзя упускать из виду, на чем оно, собственно, зиждется. Ч. Дарвин (2001), разрабатывая теорию естественного отбора, предостерегал от упрощенного понимания «борьбы за существование» и предлагал «успехом» в этой борьбе считать «обеспечение себя потомством». Развивая эти идеи дальше, он разработал концепцию полового отбора (Дарвин, 1953), выделив две его формы – внутривидовой (конкуренция между представителями одного пола) и межполовой («брачный выбор» среди конкурирующих претендентов противоположного пола). При этом первая форма полового отбора в основном присуща самцам, в то время как вторая (и более важная!) – самкам. И эта «ответственность» самок за выбор лучшего партнера понятна, если учесть высокую энергетическую стоимость их размножения. Скажем, энергозатраты кормящих самок многоплодных видов млекопитающих (рождающих одновременно несколько детенышей) возрастают почти в два раза.

Способность самки выбрать «перспективного» полового партнера, при взаимодействии с которым они приобретут некие эволюционные преимущества, была подвергнута экспериментальной проверке. Известно, что для большинства млекопитающих главным каналом общения является обонятельный. Запахи несут чрезвычайно много информации, которую способны воспринимать другие представители вида. Кстати, человек, возможно, в меньшей мере может различать индивидуальные запахи (Porter, 1999). Вспомним хотя бы историю состарившегося и ослепшего Исаака, намеревавшегося дать благословение своему любимому сыну Исаву. И ведь он, слепой, «опознал» Исава по специфическому запаху его одежды: «Вот, запах

от сына моего». Увы, в одежды Исава закутался младший сын Исаака, все тот же «испытатель природы» Иаков, получивший, в конце концов, не ему предназначавшееся благословение (Быт. 27: 1–38).

Впрочем, вернемся к вопросу о роли запахов в подборе брачных пар у животных и предъявим самкам грызунов для исследования подстилку из клеток разных самцов, сравним затем, каким из предложенных источников запаха они больше интересуются, дольше обнюхивают. Оценив степень ольфакторной привлекательности самцов, сопоставим ее с результатами последующего размножения пар. Выяснилось, что привлекательность самца для будущей матери в значительной мере предопределяет массу тела рожденных ею детенышей (рис. 5), да и растут потомки в подсосный период быстрее (Potapov *et al.*, 1999a).

В серии экспериментов на разных видах грызунов показаны положительные эффекты выбора самкой «оптимального» партнера на ее физиологическое состояние и плодовитость. При этом выявлены важнейшие факторы, лежащие в основе половых предпочтений: генетические различия потенциальных партнеров и ряд андрогенозависимых (морфологических и поведенческих) характеристик самцов (Evsikov *et al.*, 1995; Gerlinskaya *et al.*, 1995; Potapov *et al.*, 1995, 1999a, b; Потапов, Евсиков, 2000; Евсиков и др., 2001a, б, 2006; Потапов и др., 2010).

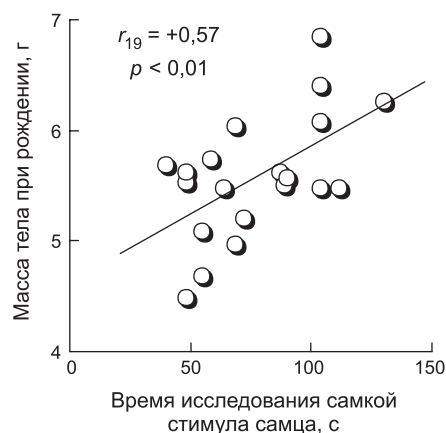


Рис. 5. Зависимость массы тела новорожденных водяных полевок от половой привлекательности их отцов.

Судьба «неблагополучных» семей

Утверждение об адаптивности эмбриональной смертности в деле регуляции плодовитости может быть проиллюстрировано результатами наших исследований «эволюционной судьбы» потомков «неблагоприятных» (с точки зрения обонятельных предпочтений) брачных пар. Если самкам, вопреки их предпочтениям, предоставить спариваться с «неудобными» самцами (а такие опыты проведены нами на нескольких видах – водяных полевках, мышах, джунгарских хомячках), то наблюдается снижение плодовитости самок (рождается меньшее число потомков). При этом из-за разницы в зависимости от пола эмбриональной смертности сокращается только число рожденных дочерей (рис. 6). Однако уменьшение размеров выводка оказывается благоприятным для развития в них самцов, т. е. сыновей. Ведь каждому из них благодаря этому достается больше материнской опеки и питания. В результате самцы вырастают в таких «неблагополучных» семьях более крупными и конкурентоспособными (Евсиков и др., 2001а). В то же время из-за численного преобладания самцов у самок следующего поколения возрастают возможности для выбора партнера. Таким образом, «дети» снова в выигрыше.

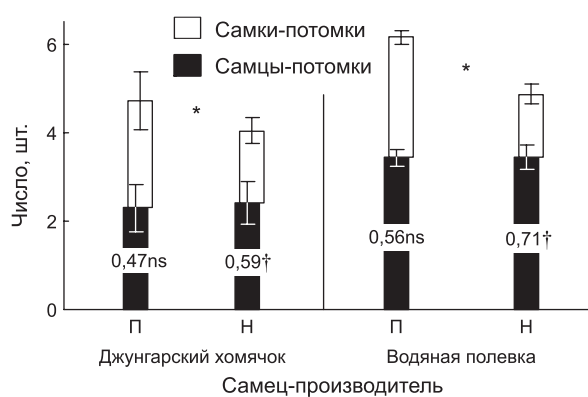


Рис. 6. Число самцов и самок при рождении и доля самцов (приведена на фоне столбцов) в потомстве предпочитаемых (П) и не предпочитаемых (Н) самками по запаховым стимулам самцов джунгарского хомячка и водяной полевки.

Обозначения: ns – нет достоверных отличий от равных долей полов; † – достоверные ($p < 0,05$) отличия от равных долей полов; * – достоверные отличия ($p < 0,05$) по общему числу родившихся детенышей и по числу родившихся самок.

Таким образом, размножающиеся самки млекопитающих адекватно реагируют на неблагоприятные условия. Действительно, в «норме» самки всегда имеют возможность выбора своей брачной «половинки». Ограниченный выбор партнера в природе может возникать либо в условиях низкой численности популяции, либо при большом напряжении внешнесредовых стрессоров, снижающих репродуктивные потенции большей части производителей. Эти предположения, вытекающие из наших экспериментов, доступны проверке на примере все той же природной популяции водяной полевки. Сопоставим многолетние сведения об уровне стресса с параметрами воспроизводства. Оказывается, что спад численности популяции происходит на фоне ухудшения внешнесредовых условий (засуха, кормовой дефицит) и повышения уровня стресса. Эти обстоятельства, в свою очередь, детерминируют высокий уровень эмбриональных потерь (невынашивания беременности), снижение плодовитости самок и сдвиг соотношения полов среди эмбрионов в сторону самцов (Evsikov *et al.*, 2000).

Заключение

Таким образом, можно считать, что смертность, особенно эмбриональная, у млекопитающих имеет большое биологическое значение. Несомненно значение эмбриональной смертности как одного из основных факторов регулирования численности популяций; имеются также веские основания считать, что эмбриональная смертность носит селективный характер и тем самым способствует сохранению интегрированного генофонда популяции в смежных поколениях. Пятьдесят лет изучения плодовитости животных привели нас к убеждению, что семейная триада – пара размножающихся особей и их потомство – является минимальной единицей популяционно-видового уровня организации, и именно эта репродуктивная группа, а не отдельный организм предстает перед естественным отбором. Полученные результаты приводят к выводу, что в системе «организм–репродуктивная группа–популяция–вид–факторы внешней среды» существуют эволюционно отлаженные каналы передачи, приема, хранения и обработки информации о

состоянии и доступности основных ресурсов жизнеобеспечения, а также физиологические системы их оптимального использования для сохранения адекватного условиям среды количества и качества потомков.

Дестабилизирующее действие отбора, которое наблюдали Д.К. Беляев и его ученики при доместикации ряда видов млекопитающих (Belyaev, 1979; Трут, 1997, 2007; Трапезов, 2007), может реализоваться в природе в процессе полового отбора. Ведь интегрирующие системы онтогенеза, на которые указал Д.К. Беляев, – поведение и гормональная система, обеспечивают, с одной стороны, адекватное реагирование животных на изменения внешнесредовых условий, а с другой – предопределяют характер и форму их брачных предпочтений (Evsikov *et al.*, 1995; Gerlinskaya *et al.*, 1995; Potapov *et al.*, 1995). Это позволяет полагать, что генетико-эволюционные перестройки популяций животных при половом отборе происходят с не меньшей эффективностью, чем при искусственном разведении (Потапов, Евсиков, 2009).

Сформировавшаяся в процессе полового отбора семья является элементарной популяционной и эволюционной единицей. На уровне семьи осуществляется оптимизация жизненно важных показателей, от которых зависит существование популяций в динамичной среде. Зародившаяся особь в течение продолжительного периода оказывается под влиянием матери, физиологические системы которой чутко реагируют на популяционное и биоценотическое окружение: доступность ресурсов и конкуренцию за них, особенности взаимодействия с половым партнером и т.д. В дальнейшем и новой особи предстоит последовательно интегрироваться в системы надорганизменного уровня в зависимости от условий, в которых в ходе онтогенеза она оказывается.

Благодарности

Мы благодарны своим учителям, всем коллегам и ученикам, принимавшим участие в исследованиях на разных этапах изучения великого таинства живой природы – репродукции животных, и в первую очередь Т.Д. Осетровой и О.Ф. Потаповой, нашим терпеливым и верным спутницам в жизни и в науке. В разные годы

работа была поддержана различными фондами, в частности в самое последнее время – РФФИ (грант № 09-04-01712) и программой Президиума РАН «Биологическое разнообразие» (проект 26.6).

Литература

- Беляев Д.К. Биологические аспекты доместикации животных // Генетика и селекция новых пород сельскохозяйственных животных: Матер. Всесоюз. совещ. 24–26 окт. 1968 г., Алма-Ата. Алма-Ата: Наука, 1970. С. 30–44.
- Беляев Д.К. Генетические аспекты доместикации животных // Проблемы доместикации животных и растений. М.: Наука, 1972. С. 39–45.
- Беляев Д.К. Факторы эволюции животных при доместикации // XIV Междунар. генет. конгр. (7–14 августа 1978 г., Москва): Тез. докл. пленарных заседаний. М., 1978. С. 8.
- Беляев Д.К. Дестабилизирующий отбор // Развитие эволюционной теории в СССР (1917–1970-е годы). Л.: Наука, Ленингр. отд-ние, 1983. С. 266–277.
- Беляев Д.К. Генетика, общество, личность // Проблемы генетики и теории эволюции: Сб. науч. тр. Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 1991. С. 43–51.
- Беляев Д.К., Евсиков В.И. Влияние мутаций окраски меха у норок на их воспроизводительную функцию и жизнеспособность // Межвуз. конф. по эксперим. генетике: Тез. докл. Ч. 1. Л., 1961. С. 18.
- Беляев Д.К., Евсиков В.И. О влиянии гетерозиготности материнского организма на жизнеспособность потомства // Докл. АН СССР. 1962. Т. 146. № 6. С. 1414–1417.
- Беляев Д.К., Евсиков В.И. Генетика плодовитости животных. Сообщение I. Влияние мутаций окраски меха на плодовитость норок (*Lutreola vison* Brisson) // Генетика. 1967. Т. 3. № 2. С. 21–33.
- Беляев Д.К., Евсиков В.И. Гетерозиготность и ее значение для развития гетерозиса у норок // Гетерозис в животноводстве. Л.: Колос, 1968. С. 70–80.
- Беляев Д.К., Евсиков В.И., Матыско Е.К. Генетика плодовитости животных. Сообщение III. Эффект моногибридного гетерозиса на плодовитость и жизнеспособность норок и перспективы его использования в селекции // Генетика. 1972. Т. 8. № 1. С. 62–70.
- Беляев Д.К., Евсиков В.И., Шумный В.К. Генетико-селекционные аспекты проблемы моногибридного гетерозиса // Генетика. 1968. Т. 4. № 12. С. 47–62.
- Беляев Д.К., Трут Л.Н. Конвергентный характер формообразования и концепция дестабилизирующего отбора // Вавиловское наследие в современной биологии. М.: Наука, 1989. С. 155–169.

- Дарвин Ч. Происхождение видов путем естественно-отбора, или Сохранение благоприятных рас в борьбе за жизнь. 2-е изд., доп. СПб: Наука, 2001 (1859). 568 с.
- Дарвин Ч. Происхождение человека и половой отбор // Собр. соч. В 9 томах. Т. 5. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1953 (1871). С. 120–656.
- Евсиков В.И. Генетика окраски и некоторых других признаков норки // Генетика. 1966. Т. 2. № 9. С. 74–91.
- Евсиков В.И. Генетические и фенотипические основы регулирования плодовитости млекопитающих: Дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск: ИЦиГ СО АН СССР, 1975. 309 с.
- Евсиков В.И. Генетико-эволюционные аспекты проблемы гомеостаза плодовитости млекопитающих (на примере норки) // Генетика. 1987. Т. 23. № 6. С. 988–1002.
- Евсиков В.И., Герлинская Л.А., Мошкин М.П. и др. Генетико-физиологические взаимоотношения мать–плод и их влияние на адаптивные признаки потомков // Онтогенез. 1998. Т. 29. № 6. С. 405–417.
- Евсиков В.И., Кокенова Г.Т., Задубровский П.А. и др. Моногамия как один из путей реализации адаптивного потенциала млекопитающих (на примере степной пеструшки, *Lagurus lagurus* Pallas) // Докл. АН. 2006. Т. 411. № 5. С. 708–710.
- Евсиков В.И., Морозова Л.М. Роль генетико-физиологических взаимоотношений мать–потомок в становлении жизнеспособности и плодовитости млекопитающих. Сообщение I. Эмбриональное развитие мышей при межлинейных пересадках бластоцист // Генетика. 1977. Т. 13. № 5. С. 826–839.
- Евсиков В.И., Морозова Л.М. Роль генетико-физиологических взаимоотношений мать–потомок в становлении жизнеспособности и плодовитости млекопитающих. Сообщение II. Вес зародышей мышей линий BALB, CBA и DBA, развивающихся из пересаженных бластоцист // Генетика. 1978. Т. 14. № 7. С. 1264–1271.
- Евсиков В.И., Мошкин М.П., Герлинская Л.А. и др. Концентрация прогестерона у мышей на ранних стадиях гомо- и гетерогенной беременности // Докл. АН СССР. 1991. Т. 319. С. 494–497.
- Евсиков В.И., Назарова Г.Г., Потапов М.А. Конгруэнции и видовые адаптации – основа биологической эволюции // Современные проблемы биологической эволюции: Тр. конф. к 100-летию Государственного Дарвиновского музея (17–20 сентября 2007 г., Москва). М.: Изд-во ГДМ, 2008. С. 352–377.
- Евсиков В.И., Осетрова Т.Д., Беляев Д.К. Генетика плодовитости животных. Сообщение IV. Эмбриональная смертность и ее влияние на плодовитость мышей линий BALB, C57Bl и их реципрокных гибридов // Генетика. 1972. Т. 8. № 2. С. 55–66.
- Евсиков В.И., Осетрова Т.Д., Кондрина Л.П., Беляев Д.К. Генетика плодовитости животных. Сообщение V. Вес мышей линий BALB, C57Bl и их реципрокных гибридов и его связь с плодовитостью // Генетика. 1973. Т. 9. № 8. С. 70–84.
- Евсиков В.И., Потапов М.А., Новиков Е.А., Потапова О.Ф. Видовые адаптации на примере взаимоотношений родители–потомки у млекопитающих // Эволюционная биология: Матер. конф. «Проблема вида и видообразование» (3–6 октября 2000 г., Томск) / Ред. В.Н. Стегний. Томск: ТГУ, 2001а. Т. 1. С. 264–278.
- Евсиков В.И., Потапов М.А., Потапова О.Ф. Эффекты отбора по запаховым предпочтениям в инбредной линии мышей // Докл. АН. 2001б. Т. 380. № 6. С. 844–846.
- Завадский К.М. Вид как форма существования жизни. Структура вида. Видообразование // Современные проблемы эволюционной теории. Л.: Наука, 1967. С. 145–295.
- Кокенова Г.Т. Влияние брачного подбора и длительного инбредного разведения на репродуктивные характеристики степной пеструшки (*Lagurus lagurus* (Pallas, 1773)): Дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск: ИСиЭЖ СО РАН, 2007. 121 с.
- Кокенова Г.Т., Потапова О.Ф., Потапов М.А., Евсиков В.И. Изменение этологических и морфометрических характеристик степной пеструшки (*Lagurus lagurus* Pall.) при инбредном разведении // Поведение и поведенческая экология млекопитающих: Матер. науч. конф. (4–8 октября 2005 г., Черноголовка). М.: Тов-во науч. изданий КМК, 2005. С. 251–253, 357–359.
- Колесников С.И., Морозова Л.М., Склянов Ю.И., Евсиков В.И. Морфология внезародышевых органов эмбрионов мышей при их развитии в аллогенных и сингенных матерях // Цитология и генетика. 1977. Т. 11. № 6. С. 513–518.
- Корочкин Л.И. Взаимодействие генов в развитии. М.: Наука, 1977. 280 с.
- Лэк Д. Численность животных и ее регуляция в природе. М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1957. 400 с.
- Майр Э. Зоологический вид и эволюция. М.: Мир, 1968. 592 с.
- Назарова Г.Г., Евсиков В.И. Влияние условий выкармливания на выживаемость потомков, их репродуктивные характеристики и соотношение полов у водяной полевки (*Arvicola terrestris*) // Зоол. журнал. 2000. Т. 79. № 3. С. 58–63.
- Назарова Г.Г., Евсиков В.И. Влияние метаболических ресурсов в период беременности у водяной полевки (*Arvicola terrestris* L.) на вторичное

- соотношение полов // Зоол. журнал. 2004. Т. 83. № 12. С. 1488–1494.
- Назарова Г.Г., Евсиков В.И. Наступление половозрелости у водяных полевок зависит от физического состояния матери во время беременности // Докл. АН. 2007. Т. 412. № 4. С. 568–570.
- Назарова Г.Г., Евсиков В.И. Влияние физического состояния матери в период беременности и лактации на постнатальный рост и репродуктивный успех потомков у водяной полевки (*Arvicola terrestris* L.) // Онтогенез. 2008. Т. 39. № 2. С. 125–133.
- Осетрова Т.Д., Кондрина Л.П., Евсиков В.И. Роль генетически контролируемых взаимоотношений мать–потомок в становлении воспроизводительной функции мышей // III Съезд генетиков и селекционеров Украины: Тез. докл. Ч. 2. Киев: Наук. думка, 1976. С. 180–181.
- Плохинский Н.А. Наследуемость. Новосибирск: Изд-во СО АН СССР, 1964. 196 с.
- Потапов М.А., Евсиков В.И. Генетико-физиологические взаимоотношения мать–плод и их влияние на адаптивные признаки потомков: Взгляд с третьей стороны // Современные концепции эволюционной генетики. Новосибирск: ИЦИГ СО РАН, 2000. С. 277–293.
- Потапов М.А., Евсиков В.И. Теория полового отбора Ч. Дарвина и перспективы ее развития в свете эволюционных идей Д.К. Беляева // Информ. вестник ВОГиС. 2009. Т. 13. № 2. С. 390–400.
- Потапов М.А., Евсиков В.И. Эволюционная экология плодовитости животных: факторы эпигамного полового отбора у грызунов // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2011. Т. 15. № 1. С. 22–34.
- Потапов М.А., Потапова О.Ф., Бахвалова В.Н., Евсиков В.И. Увеличение материнского вклада как один из механизмов гетерозиса у млекопитающих // XII Междунар. совещ. и V школа по эволюционной физиологии (19–25 ноября 2001 г., Санкт-Петербург): Тез. докл. СПб: ИЭФиБ РАН, 2001. С. 122.
- Потапов М.А., Потапова О.Ф., Задубровская И.В. и др. Половая привлекательность самцов и их агрессивность у грызунов с разными системами спаривания // Сиб. экол. журнал. 2010. № 5. С. 813–818.
- Потапов М.А., Рогов В.Г., Евсиков В.И. Влияние популяционного стресса на частоту встречаемости водяных полевок (*Arvicola terrestris* L.) с белыми отметинами // Докл. АН. 1998. Т. 358. № 5. С. 713–715.
- Северцов С.А. Морфологический прогресс и борьба за существование // Изв. АН СССР. 1936. Т. 5. С. 895–944.
- Северцов С.А. О конгруэнциях и понятии целостности вида // Проблемы экологии животных. Неопубл. работы. Т. 1. М.: Изд-во АН СССР, 1951а. С. 30–57.
- Северцов С.А. Проблемы эволюционной экологии и пути к их разрешению // Проблемы экологии животных. Неопубл. работы. Т. 1. М.: Изд-во АН СССР, 1951б. С. 11–29.
- Тимофеев-Ресовский Н.В., Воронцов Н.Н., Яблоков А.В. Краткий очерк теории эволюции. 2-е изд. М.: Наука, 1977. 297 с.
- Трапезов О.В. Об одомашнивании пушных зверей (к 140-летию выхода в России труда Ч. Дарвина: «Прирученные животные и возделанные растения») // Информ. вестник ВОГиС. 2007. Т. 11. № 1. С. 45–61.
- Трут Л.Н. Эволюционная концепция Д.К. Беляева – десять лет спустя // Генетика. 1997. Т. 33. № 8. С. 1060–1068.
- Трут Л.Н. Доместикация животных в историческом процессе и в эксперименте // Информ. вестник ВОГиС. 2007. Т. 11. № 2. С. 273–289.
- Шварц С.С. Доместикация и эволюция // Проблемы доместикации животных и растений. М.: Наука, 1972. С. 13–17.
- Шварц С.С. Эволюция биосферы и экологическое прогнозирование // 250 лет Академии наук СССР: Документы и матер. юбилейных торжеств. М.: Наука, 1977. С. 366–378.
- Шилов И.А. О механизмах популяционного гомеостаза у животных // Усп. соврем. биологии. 1967. Т. 64. Вып. 2(5). С. 333–351.
- Шмальгаузен И.И. Факторы эволюции (теория стабилизирующего отбора). 2-е изд. М.: Наука, 1968. 452 с.
- Шмальгаузен И.И. Проблемы дарвинизма. 2-е изд. Л.: Наука, 1969. 494 с.
- Belyaev D.K. Destabilizing selection as a factor in domestication // J. Hered. 1979. V. 70. P. 301–308.
- Belyaev D.K. Genetics, society and personality // Genetics: new frontiers. Proc. XV Intern. Congr. Genetics. New Delhi. Dec. 12–21, 1983. New Delhi: Oxford and IBN Publ. Co., 1983. P. 379–386.
- Belyaev D.K., Khvastova V.V. Domestication, Plant and Animal // Encyclopedia Britannica. 15th ed. V. 5. Chicago: Helen Hemingway Benton, 1974. P. 936–942.
- Christian J.J. Endocrine adaptive mechanisms and the physiological regulation of population growth // Physiol. Mammal. V. 1. N.Y.; L.: Acad. Press, 1963. P. 189–353.
- de Vries W.N., Evsikov A.V., Haac B.E. *et al.* Maternal β -catenin and E-cadherin in mouse development // Development. 2004. V. 131. P. 4435–4445.
- Evsikov A.V., de Vries W.N., Peaston A.E. *et al.* Systems biology of the 2-cell mouse embryo // Cytogenet. Genome Res. 2004. V. 105. P. 240–250.
- Evsikov A.V., Graber J.H., Brockman J.M. *et al.* Cracking

- the egg: molecular dynamics and evolutionary aspects of the transition from the fully grown oocyte to embryo // *Genes Dev.* 2006. V. 20. P. 2713–2727.
- Evsikov V.I., Belyaev D.K. The role of embryonic and early postnatal mortality in the control of the actual fertility in mammals // VII Intern. Congr. on Animal Reproduction and Artificial Insemination (München, 6–9 June, 1972): Congress Proceedings. München, 1972. V. 3. P. 595–598.
- Evsikov V.I., Nazarova G.G., Potapov M.A. Female odour choice, male social rank, and sex ratio in the water vole // *Advances in Biosciences*. V. 93: Chemical Signals in Vertebrates VII. Oxford: Pergamon, 1995. P. 303–307.
- Evsikov V.I., Nazarova G.G., Potapov M.A. *et al.* Ecological factors determine differential reproduction in mammals // *Biodiversity and Dynamics of Ecosystems in North Eurasia*. Novosibirsk: ICG, 2000. V. 1. P. 21–23.
- Falconer D.S. *Introduction to Quantitative Genetics*. L.: Oliver and Boyd, 1960. 365 p.
- Fisher R.A. *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford: Clarendon Press, 1930. 272 p.
- Gause G.F. Experimental demonstration of Volterra's periodic oscillations in the numbers of animals // *J. Exp. Biol.* 1935. V. 12. P. 44–48.
- Gerlinskaya L.A., Evsikov V.I. Genetic predetermined mother–fetus interrelations and their influence on adaptive features of offspring // *Reproduction*. 2001. V. 121. P. 409–417.
- Gerlinskaya L.A., Rogova O.A., Yakushko O.F., Evsikov V.I. Female olfactory choice and its influence on pregnancy in mice // *Advances Biosciences*. V. 93: Chemical Signals in Vertebrates VII. Oxford: Pergamon, 1995. P. 297–302.
- Huxley J.S. *Evolution: The modern synthesis*. Cambridge: The MIT Press, 2010 (1942). 784 p.
- Knowles B.B., Evsikov A.V., de Vries W.N. *et al.* Molecular control of the oocyte to embryo transition // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 2003. V. 358. P. 1381–1388.
- Lack D. *The Natural Regulation of Animal Numbers*. N.Y.: Oxford Univ. Press, 1954. 343 p.
- Lerner I.M. *Genetic Homeostasis*. N.Y.: John Wiley, 1954. 134 p.
- Mayr E. *What Evolution Is*. N.Y.: Basic Books, 2001. 192 p.
- Mayr E. *What Makes Biology Unique?* Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2004. 232 p.
- Mehlmann L.M., Saeki Y., Tanaka S. *et al.* The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes // *Science*. 2004. V. 306. P. 1947–1950.
- Peaston A.E., Evsikov A.V., Graber J.H. *et al.* Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos // *Dev. Cell*. 2004. V. 7. P. 597–606.
- Porter R.H. Olfaction and human kin recognition // *Genetica*. 1999. V. 104. № 3. P. 259–263.
- Potapov M.A., Nazarova G.G., Evsikov V.I. Attractiveness of male vole odor is positively correlated with pup viability // *Advances in Chemical Signals in Vertebrates*. N.Y.: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999a. P. 457–462.
- Potapov M.A., Potapova O.F., Evsikov V.I. Interstrain odor preferences and factors influencing growth rates of two strains of mice and their hybrids // *Advances in Chemical Signals in Vertebrates*. N.Y.: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999b. P. 399–406.
- Potapov M.A., Yakushko O.F., Belogurova M.N. Long-term effects of interstrain embryo transfer: Female olfactory preference in adult mice offspring // *Advances Biosciences*. V. 93: Chemical Signals in Vertebrates VII. Oxford: Pergamon, 1995. P. 313–316.
- Solter D., deVries W.N., Peaston A. *et al.* Fertilization and activation of the embryonic genome // *Mouse Development: Morphogenesis and Organogenesis* / Eds P. Tamm, J. Rossant. N.Y.: Academic Press, 2002. P. 5–19.
- Solter D., Hiiragi T., Evsikov A.V. *et al.* Epigenetic mechanisms in early mammalian development // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2004. V. 69. P. 11–17.
- Wynne-Edwards V.C. Self-regulating systems in populations of animals // *Science*. 1965. V. 147. № 3665. P. 1543–1548.

**EVOLUTIONARY ECOLOGY OF ANIMAL FERTILITY:
50-YEAR INVESTIGATION OF REPRODUCTION
AS A LINK BETWEEN GENERATIONS IN MAMMALS**

V.I. Evsikov, M.A. Potapov

Institute of Systematics and Ecology of Animals, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: ev@eco.nsc.ru

Summary

The role of genetic, physiological and ecological factors in the realization of the mammalian reproductive potential is considered on the base of data from original studies and the literature. The significance of embryonic and early postnatal mortality of progeny in the stabilization of actual fertility at the optimal level for a particular species is demonstrated by the example of minks and small rodents as multifetal species. It is shown that immunogenetic interactions between the maternal and fetal organisms play the decisive role in the development of vital traits in the progeny. It has been found that olfactory mating choice in mammals can form optimal combinations of parents predetermining the most effective development of progeny and thereby the maximal realization of the parental fitness. A family, as a triadic alliance, is formed via sexual selection and constitutes an elementary unit of population ecology and evolution. The family is the level of life organization at which vital population traits are optimized in the variable environment.

Key words: evolutionary ecology, mammals, fertility, embryonic mortality, homeostasis, heterosis, adaptations, sexual selection, immune-genetic mother–fetus interactions.

ЭВОЛЮЦИОННАЯ ЭКОЛОГИЯ ПЛОДОВИТОСТИ ЖИВОТНЫХ: ФАКТОРЫ ЭПИГАМНОГО ПОЛОВОГО ОТБОРА У ГРЫЗУНОВ

М.А. Потапов, В.И. Евсиков

Учреждение Российской академии наук Институт систематики и экологии животных
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: map@ngs.ru

Представлен обзор результатов экспериментального исследования основных факторов эпигамного полового отбора и его влияния на воспроизводительные показатели млекопитающих (на примере грызунов). Показана способность самок оптимизировать воспроизводство, осуществляя ольфакторный подбор партнера. В основе формирования брачных предпочтений самок лежит ограниченное число факторов эпигамного отбора и в первую очередь – генотипические отличия между партнерами, а также морфофизиологические и поведенческие характеристики самцов. Исследованные факторы брачного подбора незначительны для хода репродукции и повышают эффективность реализации воспроизводительного потенциала животных.

Ключевые слова: половой отбор, эпигамный отбор, сексуальная привлекательность, плодовитость, гетерозис, млекопитающие, грызуны.

Половое размножение и половой отбор

Половое размножение явилось в эволюции прогрессивным фактором, существенно повысившим ее темпы и эффективность. Оно способствует накоплению «скрытого резерва» мутационной изменчивости (Четвериков, 1983) и поддержанию высокого уровня наследственного разнообразия, предоставляющего материал для естественного отбора и определяющего в итоге устойчивость надорганизменных биосистем в изменчивой среде (Wynne-Edwards, 1965; Шиллов, 1967). Половое размножение, с одной стороны, «обособило» организм в континууме жизни, а с другой – привело к потере им значения самовоспроизводящейся единицы и увеличило функциональную взаимозависимость особей. Тем самым половое размножение положило начало эволюции как онтогенетического, так и популяционно-видового уровней организации живой материи (Северцов, 1951а, б; Камшилов, 1961; Завадский, 1967, 1968).

При половом размножении в результате взаимодействия особей разного пола возникает нечто эволюционно новое, одновременно генетически отличающееся от обоих родителей, но и несущее при этом их наследственные

затки в новом сочетании. Очевидно, что все члены этого процесса взаимозависимы. Минимальной единицей популяционно-видового уровня организации жизни животных с половым размножением становится, таким образом, семья, или «семейная триада» (Потапов, Евсиков, 2000; Евсиков и др., 2001б, 2008). Благодаря тесному взаимодействию членов семейной триады обеспечиваются как собственно воспроизведение, так и эволюционная связь (преемственность) поколений, поскольку приспособленность потомка естественным образом определяет адаптивную ценность каждого из его родителей.

Важно подчеркнуть, что предшествующий зарождению новой жизни подбор репродуктивной пары в природе осуществляется не случайным образом, поскольку в основе этого процесса лежат закономерности полового отбора, открытые Ч. Дарвином. Идеи полового отбора он последовательно развивает, начиная со своих «Очерков 1842 и 1844 гг.» (Darwin, 1909) и книги «Происхождение видов ...» (Darwin, 1859; Дарвин, 2001). В наиболее полной форме теория полового отбора изложена в книге «Происхождение человека и половой отбор» (Darwin, 1871; Дарвин, 1953).

Ч. Дарвин различал два «вида» полового отбора: 1) отбор, осуществляемый в ходе соперничества особей одного пола между собой по «закону битвы» и 2) отбор, производимый на основе «очарования», т. е. привлекательности потенциального брачного партнера для представителей противоположного пола. Принятую в настоящее время терминологию для этих видов полового отбора ввел Дж. Хаксли (Huxley, 1938a, b), предложивший различать в половом отборе его «интрасексуальную» (внутриполовую) и «эпигамную» (межполовую) составляющие. По сути же эти «виды» отбора – две стороны одной «медали». Сейчас мы понимаем, что определяемый этими сопряженными процессами дифференциальный доступ особей к размножению является одним из весьма эффективно действующих механизмов микроэволюционных преобразований популяций. Действие полового отбора ответственно за неслучайность формирования брачных пар и служит гарантией наиболее полного использования эволюционных выгод полового размножения и высокой эффективности действия разных форм отбора (Andersson, 1994). Тем самым половой отбор активно противодействует промискуитету (своего рода сексуальной «энтропии»), а соотношение интрасексуальной и эпигамной его составляющих определяет формирование видоспецифической системы брачных связей, упорядочивая взаимоотношения в семейной триаде.

В соответствии с идеями, высказанными Ч. Дарвином (1953), к настоящему времени сформировались представления о межполовых различиях в репродуктивных стратегиях животных (Huxley, 1938a, b; Давиташвили, 1961; Andersson, 1994): для самцов в большей мере характерен интрасексуальный отбор – конкуренция за доступ к самкам (их «репродуктивному ресурсу»), дифференцирующий особей по вкладу в следующее поколение, а для самок в связи с высокой энергозатратностью их репродукции более оправдан эпигамный отбор – выбор оптимального для последующего размножения полового партнера.

Действительно, считается, что у млекопитающих преобладает полигинная система спаривания (Kleiman, 1977; Clutton-Brock, 1989). Самцы преимущественно максимизируют свою дарвиновскую приспособленность (оцениваемую по

числу потомков, достигших половозрелости) и, соответственно, вклад в генофонд следующего поколения, покрывая возможно большее число самок. Самки же, обладая ограниченной возможностью регуляции своей приспособленности из-за гомеостазированности плодовитости (Евсиков, 1987), стремятся подобрать «наилучшего» партнера, союз с которым предопределяет лучшее развитие жизненно важных свойств будущего потомства, что также имеет решающее значение для сохранения элементов «адаптивной ценности» самок в последующих поколениях. Таким образом, роль самцов в микроэволюционных преобразованиях популяций чаще сводится к регулированию количественной составляющей своего репродуктивного выхода, а самок – качественной.

Необходимым условием осуществления эффективного эпигамного отбора является развитие у животных систем фенотипического распознавания ключевых характеристик потенциальных половых партнеров, небезразличных с позиций эффективности последующего размножения пары и качества потомства. Для млекопитающих важнейшей из этих систем является ольфакторная, поскольку химический канал коммуникации имеет у них огромное значение, о чем, в частности, свидетельствует наличие двух обонятельных систем: основной и дополнительной (вомероназальной), предназначенной, в первую очередь, для восприятия феромонов (Новиков, 1988). Но при этом надо иметь в виду, что на эффективность эпигамного отбора оказывает влияние целый ряд факторов, модифицирующих «запаховый образ» претендентов на участие в воспроизводстве. Так, показано значение в его формировании диеты питания (Brown, Schellinck, 1992), метаболитов симбионтной микрофлоры (Соколов, Ушакова, 1986; Brown, Schellinck, 1992, 1995), активации иммунной функции при паразитарных нагрузках (Moshkin *et al.*, 2002; Мошкин и др., 2003) и др. Для более полного представления о механизмах эпигамного отбора изучение роли этих «привходящих» факторов несомненно важно, однако здесь мы ограничимся рассмотрением лишь «базовых» характеристик, вовлеченных в брачный подбор, таких, как генотипические различия партнеров и также ряд морфологических и поведенческих показателей самцов, связанных преимущественно с их маскулинизованностью.

Генетические различия партнеров

У млекопитающих информация о генетической индивидуальности закодирована в определенных компонентах запаха (Duncan *et al.*, 1987; Beauchamp *et al.*, 1990; Schellinck *et al.*, 1993; Yamazaki *et al.*, 1999). Многочисленные опыты на инбредных мышах разных линий свидетельствуют о действии механизмов дисассортативного запахового подбора, в частности, в пользу половых партнеров, отличающихся по аллелям главного комплекса гистосовместимости, МНС (major histocompatibility complex), что обеспечивается участием тканевых антигенов в создании компонентов ольфакторного «имиджа» (Luszyk *et al.*, 1995; Yamazaki *et al.*, 1999). Следует отметить, что природой достигнута чрезвычайно высокая изменчивость по генам, входящим в МНС и другие системы, ответственные за иммунологические эффекты «гистосовместимости». Вклад в изменчивость вносят также кодоминантность родительских генов гистосовместимости (Снелл и др., 1979) и их рекомбинация в потомках, что создает возможность запахового кодирования индивидуальной неповторимости отдельных особей и генетического родства (Schellinck *et al.*, 1993; Brown, Eklund, 1994; Eggert *et al.*, 1995).

Способность к индивидуальному ольфакторному распознаванию, выказываемую как самками, так и самцами нескольких видов грызунов, проиллюстрируем следующим примером. Подавляющее большинство млекопитающих не поддерживают постоянных сексуальных связей. От самцов этого следовало ожидать, поскольку, как мы уже выяснили, им эволюционно выгодно иметь несколько половых партнерш. Однако в опытах на джунгарских хомячках (*Phodopus sungorus*) и аутбредных домовых мышах (*Mus musculus*) установлено, что нового, незнакомого прежде, партнера, в следующем репродуктивном цикле выбирают для себя не только самцы, но и самки. Тем самым они увеличивают генетическое разнообразие своего потомства и избегают потенциальных иммунологических проблем, связанных с повторным вступлением в связь с одним и тем же партнером (Потапов, Евсиков, 2000; Евсиков и др., 2001б). Очевидно, что в основе ольфакторного распознавания прежнего партнера лежит его индивидуальный

запах. В то же время у грызунов с устойчивыми половыми связями, таких, как степная пеструшка (*Lagurus lagurus*), узкочерепная полевка (*Microtus gregalis*) и хомячок Кэмпбелла (*Phodopus campbelli*), наблюдается прямо противоположная ольфакторная реакция: и самки, и самцы после окончания предыдущего репродуктивного цикла предпочитают запаховые стимулы прежнего партнера, сохраняя ему «верность» (Евсиков и др., 2006а; Potarov *et al.*, 2008; Задубровская и др., 2011). Таким образом, эпигамный отбор стабилизирует репродуктивные отношения полов и способствует поддержанию видоспецифической системы спаривания.

Дисассортативный выбор полового партнера, основанный на способности особи распознавать по запаху степень родства с ней потенциального партнера, обеспечивает избегание инбридинга, большее генетическое разнообразие потомства, его лучшие иммунологические качества и т. д. На примере лабораторной популяции водяной полевки (*Arvicola amphibius*) с известными родословными особей установлено, что в группу наиболее предпочитаемых рецептивными самками, которым в тестах предоставлялся выбор между запаховыми стимулами (подстилка) разных самцов, попадают те из них, кто не состоит с самками в родстве (Potarov, Evsikov, 1995; Потапов, 1996). Это подтверждает способность животных различать по запаху степень своего родства с донорами стимула, что обеспечивает им возможность следовать правилу дисассортативного подбора и, в частности, избежать близкородственного скрещивания. Благодаря такой тенденции выбора в популяции поддерживается генетическое разнообразие.

Однако выясняется, что репродуктивные стратегии на видовом уровне могут различаться. Недавно полученные данные не выявили действия «инцест-табу» у узкочерепной полевки. Более того, молодые половозрелые самцы узкочерепной полевки предпочитали запаховые стимулы эструсных самок-сисбсов (рис. 1). Мы объясняем это особенностями социальной организации данного колониального вида (Задубровская и др., 2011). Колония представляет собой сложную, «разросшуюся» семью, и численный рост ее обеспечивается территориальной задержкой здесь прибылых зверьков

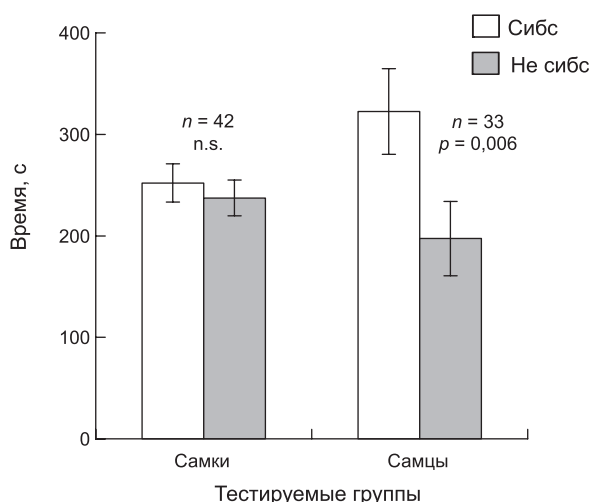


Рис. 1. Время исследования ($M \pm SEM$) половозрелыми самками и самцами узкочерепной полевки запаховых стимулов сибсов и неродственных особей противоположного пола. Приведено число тестов и достоверность отличий.

и их вступлением в размножение. Этому-то и способствует отсутствие запрета на близкородственные половые связи, что соответствует ранее высказанным утверждениям (Ченцова, 1969). Поддержание же генетической гетерогенности популяции обеспечивается, видимо, возможностью периодически спариваться за пределами занимаемой сложной семьей территории и неминуемо наступающим – по достижении критической плотности – распадом колонии и последующим расселением зверьков.

Скрещивания между аллогенными партнерами часто сопровождаются гетерозисом – «гибридной силой» и лучшим ростом потомков. Даже в случае отличий между партнерами лишь по одному локусу иногда наблюдается явление «моногобридного гетерозиса» (Беляев и др., 1968, 1972; Евсиков, 1987). Гетерозис у млекопитающих имеет свои особенности, связанные с тем, что достаточно продолжительное время (периоды беременности и лактации) развитие потомков находится в прямой «физической» зависимости от ресурсов, предоставляемых матерью (Евсиков, 1975; Потапов и др., 2001a; Кокенова, 2007).

Дисассортативный подбор брачной пары автоматически приводит к приобретению потомками генетических отличий от матери. В свою очередь, наличие таких отличий в диаде

мать–потомки гарантирует лучшее развитие последних, что показано как при гибридизации, так и при проведении межлинейных пересадок бластоцист у мышей (Евсиков и др., 1972, 1998, 2001b; Евсиков, 1975; Евсиков, Морозова, 1977, 1978; Потапов, Евсиков, 2000). В частности показано, что лучшее развитие и более высокая жизнеспособность зародышей при аллогенной беременности у мышей обеспечиваются их лучшим снабжением белковыми соединениями (Колесников и др., 1977) и повышенным уровнем прогестерона – главного «гормона беременности» (Евсиков и др., 1991, 1998; Gerlinskaya, Evsikov, 2001).

Организм матери распознает генотипические особенности зародыша на самых ранних стадиях беременности, поскольку активация собственного генома эмбрионов происходит уже на стадии оплодотворенной яйцеклетки (Evsikov *et al.*, 2004, 2006). Тем самым физиологические механизмы «благоприятствования» генетически отличающемуся потомству, действующие как внутриутробно, так и в последующий период молочного вскармливания, «запускаются» на самых ранних стадиях онтогенеза, а возможно, даже на стадии эпигамного отбора – при распознавании самкой генотипических признаков полового партнера (Потапов, Евсиков, 2000).

Значение лактационного периода в дальнейшем постнатальном становлении признаков гетерозиса у аллогенного потомства было проиллюстрировано в экспериментах с мышами различных инбредных линий (Евсиков, 1975). Так, показано, что самки мышей, покрытые самцами другой линии, больше времени проводят с детьми, у них лучше питательный состав молока (Евсиков и др., 1998; Potapov *et al.*, 1999b), выше его суточная отдача. Все это и обеспечивает гетерозис потомков по показателям жизнеспособности, в первую очередь по массе тела. Важно еще раз подчеркнуть, что лучший рост аллогенных потомков в подсосный период определяется в значительной мере ранним распознаванием матерью иммуногенетических отличий, а не только особенностями самих гибридных мышат (более интенсивной стимуляцией отдачи молока матерью и/или лучшим его усвоением). Этот факт подтвержден опытами по перекрестному вскармливанию. В частности, инбредные мышата, выкормленные

с рождения приемными матерями своей линии BALB/c (C), но выносившими перед этим гибридных мышат F₁ после скрещивания с самцами C57BL/6 (B6), росли ускоренным темпом, не уступая гибридам (рис. 2).

Важно отметить, кстати, особенность млекопитающих, вытекающую из продолжительной зависимости потомков от матери и заключающуюся в том, что гетерозиготные («гетерозисные») самки обладают лучшим родительским потенциалом, в результате чего наблюдаются эффекты увеличения жизнеспособности и физического состояния их потомков (Беляев, Евсиков, 1962; Евсиков, 1975, 1987). Этим обеспечивается «продление» в последующем поколении явления, сходного по проявлению с гетерозисом их матерей (Евсиков, Потапов, 2011).

В свое время в работах по межлинейным трансплантациям бластоцист в матку ложнобеременных самок был выявлен ряд эффектов на жизненно важные признаки аллогенного потомства. Помимо упомянутого выше ускорения роста (Евсиков и др., 1998), самцы B6, которые произошли из бластоцист, трансплантированных в свое время в матку суррогатных матерей линии C, по достижении ими половой зрелости демонстрировали низкий адренкортикальный ответ на социальный конфликт и чаще доминировали над контрольными самцами в ссаживаниях (Gerlinskaya *et al.*, 1993). Еще одно адаптивное преимущество такие самцы получили в эпигамном половом отборе: стандартно разводимые самки B6 предпочитали запах «трансплантированных» самцов B6 по сравнению с запахом контрольных самцов B6 (Potapov *et al.*, 1995).

Одним из возможных объяснений этого феномена может быть получение «трансплантированными» самцами от своей аллогенной суррогатной матери некой долго сохраняющейся «запаховой метки», которую впоследствии репродуктивные самки своей линии детектировали, опознавая ее как «чужую» и формируя свои сексуальные предпочтения на основе правила дисассортативного подбора. Реальными претендентами на носительство подобной метки являются материнские лимфоциты, перешедшие в организм потомка частично через плаценту и, в основном, – с молоком (Вербицкий, 1973; Говалло, 1987; Goldman *et al.*, 1994). Способность

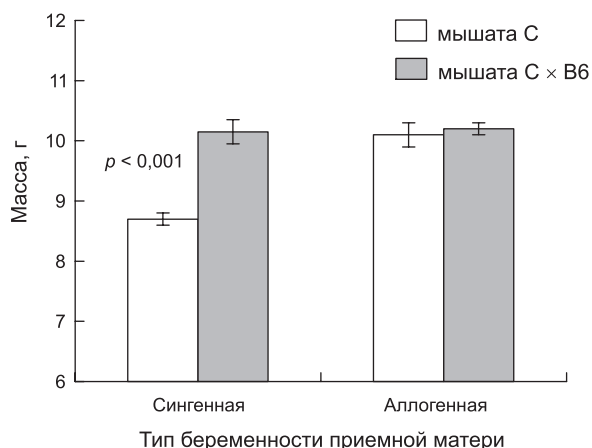


Рис. 2. Масса тела при отсадке ($M \pm SEM$) инбредных (C) и гибридных (C × B6) мышат, выкормленных самками линии C, прошедших через сингенную или аллогенную (после скрещивания с самцами B6) беременность. Приведена достоверность отличий от всех остальных групп (по: Potapov *et al.*, 1999b, с измен.).

материнских лимфоцитов переходить в организм потомка с молоком и неопределенно долго там существовать и даже пролиферировать в гомологичных органах получает все больше экспериментальных подтверждений (Hanson, 2000). Эти события приводят к «химизму» потомков (так называют существование в организме разных по происхождению популяций клеток) и являются причиной приобретения новорожденными толерантности к материнским антигенам. Этим, кстати, объясняется известный факт: матери, вскормившие детей естественным путем, являются для них лучшими донорами тканей и органов. Поскольку антигены чужеродных лимфоцитов принимают участие в формировании запаха особи (Yamazaki *et al.*, 1999), такие животные могут быть различимы соплеменниками, так как способности мышей улавливать тончайшие различия запахов, связанных с антигенной индивидуальностью, широко известны.

Для проверки предположения о том, что носителями «чужой» запаховой метки могут быть материнские клетки, существующие в организме потомка, были сформированы несколько групп самцов, получивших чужеродные лимфоциты в раннем онтогенезе в результате различных воздействий: I (трансплантация эмбрионов) – самцы B6 были пересажены на

стадии бластоцист в матку самок С, контрольные В6 были нормально рождены самками своей линии; II (перекрестное вскармливание) – самцы В6 были вскормлены со дня рождения приемными матерями С и наоборот, а контроль представлен самцами, вскормленными «приемными» матерями собственной линии; III (трансфузия клеток) – новорожденным самцам В6 и С была внутривенно введена суспензия селезенки взрослых особей реципрокной линии, контрольным – собственной; IV (запаивание) – самцам С трехкратно в течение первых двух недель лактации с помощью загнутой пастеровской пипетки спаивалась суспензия селезенки В6, контрольным – собственной линии. После достижения самцами 3-месячного возраста они были рассажены индивидуально. Затем запаховые стимулы (загрязненная подстилка) экспериментальных и контрольных самцов попарно предъявляли эструсным самкам генетически своей линии стандартного инбредного разведения в экспериментальной трехсекционной установке (центральный отсек – стартовый) в 10-минутных тестах с регистрацией времени нахождения самки в каждом из отсеков со стимулами самцов (Potapov *et al.*, 1995, 1999b).

Полученные результаты (табл. 1) свидетельствуют о том, что все способы переноса чужеродных лимфоцитов в организм потомков: как прямая трансфузия, так и введение через ротовую полость (искусственное запаивание и перенос с молоком матери) приводят к одному эффекту – взрослые животные повышают свою привлекательность в качестве потенциальных

половых партнеров. Это косвенно подтверждает способность чужеродных лимфоцитов (в том числе материнского происхождения) сохранять жизнедеятельность в организме потомка неопределенно долго (Hanson, 2000), демонстрируя при этом, кстати, некоторые проявления РТПХ (реакции трансплантата против хозяина), такие, как спленомегалия (Потапов, Евсиков, 2000; Евсиков и др., 2001б). Полученные в раннем онтогенезе чужеродные клетки влияют на формирование индивидуального запаха особи, различного при осуществлении ольфакторного брачного выбора.

Морфологические и этологические характеристики самцов

Ряд морфологических и поведенческих характеристик самцов, в том числе андрогенозависимых («вторичных половых признаков»), находят свое отражение в их «запаховом образе» и могут влиять на их привлекательность для самок в качестве половых партнеров. Так, на примере джунгарского хомячка (*Phodopus sungorus*) установлено, что привлекательность самцов определяется их массой тела: выявлена существенная зависимость между массой тела самцов и средним временем исследования рецептивными самками их запаховых стимулов (рис. 3). С другой стороны, масса тела самцов оказалась связана с их предшествующим репродуктивным успехом, который оценили по числу потомков, доживших в виварии до взрослого состояния после примерно равного для всех самцов числа

Таблица 1

Время исследования рецептивными самками мышей двух инбредных линий попарно предъявляемых запаховых стимулов от половозрелых самцов своей линии, получивших (эксперимент) и не получивших (контроль) чужеродные лимфоциты (от реципрокной линии) с помощью различных воздействий на ранних стадиях онтогенеза

Тип воздействия	Линия мышей	Время исследования запаха (M ± SEM), с		Число тестов	Достоверность различий
		Контроль	Эксперимент		
Трансплантация	C57BL/6	201,4 ± 7,6	249,4 ± 8,0	n = 26	p = 0,003
Перекрестное вскармливание	C57BL/6	210,8 ± 5,5	263,8 ± 6,7	n = 28	p = 0,00002
	BALB/c	191,4 ± 10,2	258,0 ± 10,6	n = 24	p = 0,0007
Трансфузия клеток	C57BL/6	208,0 ± 9,2	267,1 ± 9,9	n = 17	p = 0,003
	BALB/c	216,9 ± 10,0	256,4 ± 10,3	n = 19	p = 0,03
Запаивание	BALB/c	194,2 ± 6,2	242,5 ± 7,8	n = 26	p = 0,0004

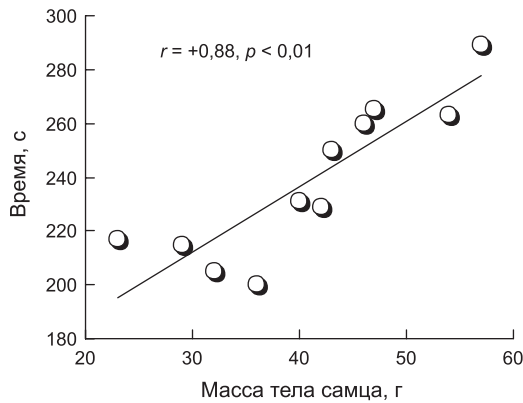


Рис. 3. Время исследования самками джунгарского хомячка запаховых стимулов самцов с разной массой тела.

сращиваний в пары с самкам за репродуктивный сезон ($R_S = +0,53$; $n = 14$; $p = 0,05$).

Конкурентоспособность самцов в природных популяциях, определяемая интрасексуальным отбором и в значительной мере опосредованная их маскулинизованностью, несомненно, вносит свой вклад в успешность их размножения. Этот вопрос более подробно рассмотрен нами ранее на данных, полученных по результатам многолетнего мониторинга природной популяции водяной полевки (Потапов, Евсиков, 2000; Евсиков и др., 2001а). Однако во многих случаях при половом отборе действует система «положительных обратных» связей, т. е. чем более «настойчив» самец—«победитель», тем в большей мере вероятно решение самки о вступлении в связь именно с ним (Потапов, Евсиков, 2000). На водяной полевке показано, что самки предпочитают высокоранговых самцов (Evsikov *et al.*, 1995). И во всяком случае часто в гетерогенных популяциях эффекты иммунологической несхожести на репродуктивные предпочтения животных, рассмотренные ранее, маскируются влиянием таких свойств партнеров, как социальный ранг и агрессивность самцов (Lenington *et al.*, 1992).

Можно полагать, что успех самцов в размножении обеспечивается не только и не столько их агрессивностью и, соответственно, «конкурентоспособностью», сколько предпочтением, которое им отдают особи противоположного пола. Часто высказываются утверждения о существовании положительной связи привлекательности самца с его агрессивностью, при-

чем имеется в виду линейная или по крайней мере монотонная зависимость (Lenington *et al.*, 1992; Gerlinskaya *et al.*, 1995). Более детальный анализ и подбор параметров аппроксимации, выполненный на нескольких видах грызунов с разными системами семейных отношений, приводят к выводу о том, что зависимость между данными параметрами имеет куполообразную форму с нахождением высшей точки привлекательности у разных видов в разных зонах шкалы агрессивности (рис. 4). Установлено, что наименее привлекательными для самок оказались как неагрессивные самцы, так и «чрезмерно» агрессивные (Потапов и др., 2001б, 2004, 2010; Евсиков и др., 2006б). При этом у полигинных видов (домовая мышь и водяная полевка) наиболее предпочитаемыми оказались значительно более агрессивные самцы, чем у видов с устойчивыми брачными связями (степной пеструшки и узкочерепной полевки) (Потапов и др., 2010; Задубровская и др., 2011). Это выглядит оправданным, так как для полигинных видов межсамцовая конкуренция имеет большее значение в интрасексуальном отборе, чем для моногамных. Эпигамный отбор, осуществляемый самками, оказывает стабилизирующее влияние на агрессивность самцов на видоспецифическом уровне. Важно подчеркнуть при этом, что репродуктивное взаимодействие самок с наиболее предпочитаемыми самцами во всех исследованных случаях было более успешным и благоприятно сказывалось на физическом состоянии самок, их плодовитости и адаптивных качествах потомков (Evsikov *et al.*, 1995; Евсиков и др., 2006а, б).

В ряде случаев для самок важны родительские качества будущего супруга. В нескольких смежных поколениях мышей линии С мы предоставляли самкам самостоятельно выбирать себе партнера, т. е. сращивали их в пару с теми самцами, запаховый стимул которых они предпочитали в тестах. К восьмому поколению в этой группе доля самцов, заботливых по отношению к детям, выросла в два раза. Оказалось, что в таком экспериментальном стоке вместе с ростом доли заботливых отцов выросла и выживаемость выводков (Евсиков и др., 2001в).

Предпочтения самок небезразличны для развития потомства. Чем более привлекателен

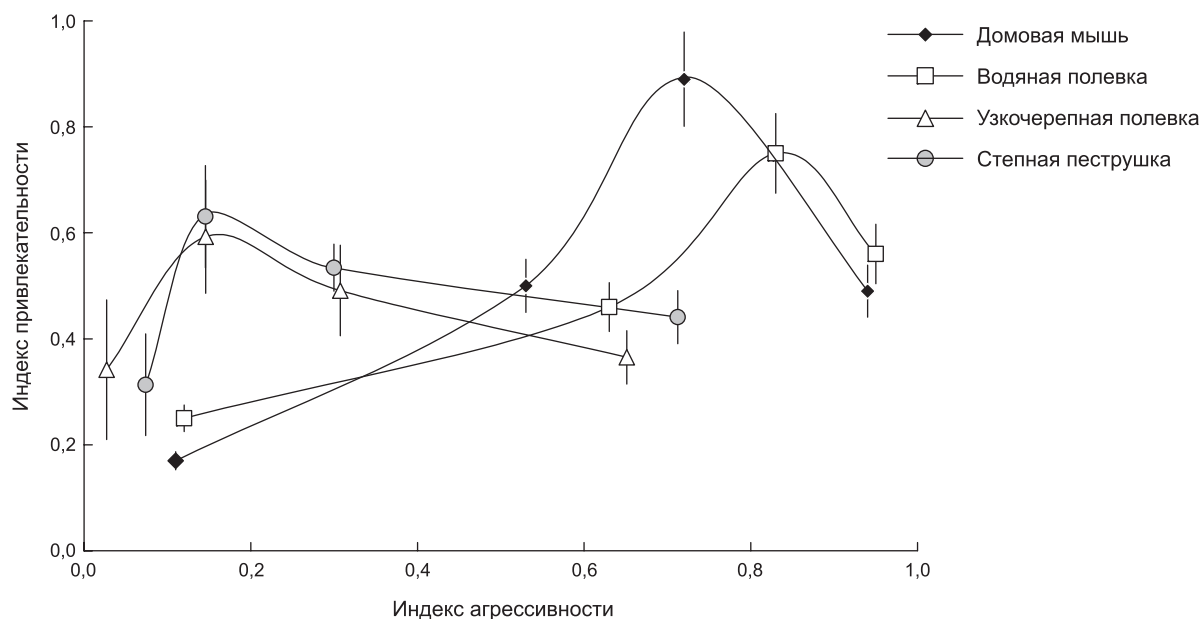


Рис. 4. Зависимость ольфакторной привлекательности самцов грызунов разных видов от их агрессивности.

самец, тем крупнее его потомки при рождении, тем более быстрыми темпами они растут в подсосный период (Potapov *et al.*, 1999a). Однако в некоторых случаях самка может быть покрыта и низкоранговым самцом, относящимся к категории непредпочитаемых. В экспериментах на водяных полевках и джунгарских хомячках показано, что в такой ситуации происходит снижение числа новорожденных, причем за счет женских особей. В результате наблюдается сдвиг соотношения полов в потомстве в сторону самцов (Evsikov *et al.*, 1995; Евсиков и др., 2001б, 2008; Евсиков, Потапов, 2011). Казалось бы, адаптивная ценность такой самки снижена. Но оказывается, что самка имеет и определенный эволюционный «выигрыш», поскольку в подобных неблагоприятных условиях ей удастся вырастить более крупных, чем в контроле, потомков-сыновей. В дальнейшем это дает таким самцам преимущества как в интрасексуальном, так и эпигамном половом отборе и компенсирует (правда, через поколение) потери их матери в плодовитости, а значит, и в дарвиновской приспособленности (Evsikov *et al.*, 1995; Потапов, Евсиков, 2000; Евсиков и др., 2008). Селективное преимущество самцов, рожденных в выводках с преобладанием братьев, показано и в опытах на мышках: во взрослом состоянии их предпочитают рецептивные самки (Потапов и др., 2002).

Заключение

Таким образом, выбор брачного партнера самками млекопитающих определяется рядом «базовых» факторов, которые можно сгруппировать следующим образом.

Первая группа факторов брачного подбора определяет индивидуальные предпочтения самок, связанные с распознаванием антигенных отличий потенциальных половых партнеров по их ольфакторным сигналам (Yamazaki *et al.*, 1999), что имеет важнейшее значение с точки зрения функционирования диады мать–потомки (Евсиков и др., 1998, 2001б; Potapov *et al.*, 1999b; Потапов, Евсиков, 2000). Эта система распознавания получила у млекопитающих чрезвычайное развитие и базируется на огромной антигенной изменчивости по ряду специальных локусов, включая главный комплекс гистосовместимости – МНС. Она обеспечивает распознавание по запаху степени родства (Brown, Eklund, 1994; Potapov, Evsikov, 1995) и узнавание отдельных особей, включая прежних половых партнеров (Евсиков и др., 2001в).

Вторую группу факторов эпигамного отбора объединяют характеристики, отражающие общую жизне- и конкурентоспособность самцов – потенциальных половых партнеров. К ним, в частности, можно отнести такие андроген-

нозависимые характеристики, как масса тела (Евсиков и др., 2001б), состояние репродуктивных органов, агрессивность (Потапов и др., 2004, 2010; Евсиков и др., 2006б) и связанную с ней способность к занятию высокого места в иерархии (Evsikov *et al.*, 1995), а также обычно отрицательно скоррелированные с ними уровень стрессированности (Потапов и др., 1986; Gerlinskaya *et al.*, 1993) и выраженность заботы о потомстве (Qvarnström, Forgren, 1998; Widemo, Sæther, 1999; Евсиков и др., 2001в). При этом ольфакторными маркерами этих характеристик (включая, кстати, и саму половую принадлежность) могут выступать некоторые стероидные гормоны и их производные (Карш и др., 1987; Новиков, 1988).

Таким образом, при удивительных способностях самок млекопитающих оптимизировать воспроизводство, осуществляя неслучайный ольфакторный подбор партнера, в самой основе формирования их брачных предпочтений лежит ограниченное число достаточно эффективно работающих факторов. Все исследованные здесь факторы эпигамного отбора небезразличны для хода репродукции и оптимизируют реализацию воспроизводительного потенциала млекопитающих.

В заключение важно указать на эволюционную роль эпигамного полового отбора. В стрессирующих условиях (при существенных отклонениях от «нормы» параметров среды) эпигамный отбор, ориентированный в первую очередь на интегрирующие системы онтогенеза (поведение и гормональную систему животных), может выполнять функцию дестабилизирующего (Беляев, 1983) и движущего отбора, провоцировать всплеск изменчивости и определять вектор адаптивных перестроек популяций. Эти вопросы рассмотрены нами ранее (Потапов, Евсиков, 2000, 2009; Евсиков, Потапов, 2011). В «нормальных» же условиях, как показано в настоящей работе, эпигамный отбор действует как стабилизирующий в отношении видоспецифической социальной организации популяции и жизненно важных характеристик животных, способствуя поддержанию популяционного гомеостаза.

Мы благодарны соавторам и соучастникам исследований, а особенно всем тем, кто вдохнов-

лял на научный поиск и помогал в выполнении этой работы на всех ее этапах. Исследования поддержаны РФФИ (грант № 09-04-01712) и программой Президиума РАН «Биологическое разнообразие» (грант № 26.6).

Литература

- Беляев Д.К. Дестабилизирующий отбор // Развитие эволюционной теории в СССР (1917–1970-е годы). Л.: Наука. Ленингр. отд-ние, 1983. С. 266–277.
- Беляев Д.К., Евсиков В.И. О влиянии гетерозиготности материнского организма на жизнеспособность потомства // Докл. АН СССР. 1962. Т. 146. № 6. С. 1414–1417.
- Беляев Д.К., Евсиков В.И., Матыско Е.К. Генетика плодовитости животных. Сообщение III. Эффект моногибридного гетерозиса на плодовитость и жизнеспособность норок и перспективы его использования в селекции // Генетика. 1972. Т. 8. № 1. С. 62–70.
- Беляев Д.К., Евсиков В.И., Шумный В.К. Генетико-селекционные аспекты проблемы моногибридного гетерозиса // Генетика. 1968. Т. 4. № 12. С. 47–62.
- Вербицкий М.Ш. Особенности иммунологической регуляции эмбриогенеза у млекопитающих и человека // Основы иммуноэмбриологии. М.: Медицина, 1973. С. 184–280.
- Говалло В.И. Иммунология репродукции. М.: Медицина, 1987. 304 с.
- Давиташвили Л.Ш. Теория полового отбора. М.: Изд-во АН СССР, 1961. 538 с.
- Дарвин Ч. Происхождение человека и половой отбор // Собр. соч.: В 9 томах. Т. 5. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1953. С. 120–656.
- Дарвин Ч. Происхождение видов путем естественного отбора, или Сохранение благоприятных рас в борьбе за жизнь. (Сер. Классики науки). 2-е изд., доп. СПб: Наука, 2001. 568 с.
- Евсиков В.И. Генетические и фенотипические основы регулирования плодовитости млекопитающих: Дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск: ИЦиГ СО АН СССР, 1975. 309 с.
- Евсиков В.И. Генетико-эволюционные аспекты проблемы гомеостаза плодовитости млекопитающих (на примере норок) // Генетика. 1987. Т. 23. № 6. С. 988–1002.
- Евсиков В.И., Герлинская Л.А., Мошкин М.П. и др. Генетико-физиологические основы популяционного гомеостаза (Глава 16) // Водяная полевка: Образ вида (сер. Виды фауны России и сопредельных стран) / Ред. П.А. Пантелеев. М.: Наука, 2001а. С. 386–411.
- Евсиков В.И., Герлинская Л.А., Мошкин М.П. и др.

- Генетико-физиологические взаимоотношения мать–плод и их влияние на адаптивные признаки потомков // Онтогенез. 1998. Т. 29. № 6. С. 405–417.
- Евсиков В.И., Кокенова Г.Т., Задубровский П.А. и др. Моногамия как один из путей реализации адаптивного потенциала млекопитающих (на примере степной пеструшки, *Lagurus lagurus* Pallas) // Докл. АН. 2006а. Т. 411. № 5. С. 708–710.
- Евсиков В.И., Морозова Л.М. Роль генетико-физиологических взаимоотношений мать–потомок в становлении жизнеспособности и плодовитости млекопитающих. Сообщение I. Эмбриональное развитие мышей при межлинейных пересадках бластоцист // Генетика. 1977. Т. 13. № 5. С. 826–839.
- Евсиков В.И., Морозова Л.М. Роль генетико-физиологических взаимоотношений мать–потомок в становлении жизнеспособности и плодовитости млекопитающих. Сообщение II. Вес зародышей мышей линий BALB, CBA и DBA, развивающихся из пересаженных бластоцист // Генетика. 1978. Т. 14. № 7. С. 1264–1271.
- Евсиков В.И., Мошкин М.П., Герлинская Л.А. и др. Концентрация прогестерона у мышей на ранних стадиях гомо- и гетерогенной беременности // Докл. АН СССР. 1991. Т. 319. С. 494–497.
- Евсиков В.И., Назарова Г.Г., Потапов М.А. Конгруэнции и видовые адаптации – основа биологической эволюции // Современные проблемы биологической эволюции: Тр. конф. к 100-летию Государственного Дарвиновского музея (17–20 сентября 2007 г., Москва). М.: Изд-во ГДМ, 2008. С. 352–377.
- Евсиков В.И., Осетрова Т.Д., Беляев Д.К. Генетика плодовитости животных. Сообщение IV. Эмбриональная смертность и ее влияние на плодовитость мышей линий BALB, C57B1 и их реципрокных гибридов // Генетика. 1972. Т. 8. № 2. С. 55–66.
- Евсиков В.И., Потапов М.А. Эволюционная экология плодовитости животных: 50 лет изучения размножения как связующего звена поколений млекопитающих // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2011. Т. 15. № 1. С. 7–21.
- Евсиков В.И., Потапов М.А., Назарова Г.Г., Потапова О.Ф. Стабилизирующая функция полового отбора в отношении агрессивности самцов у грызунов // Докл. АН. 2006б. Т. 411. № 6. С. 845–846.
- Евсиков В.И., Потапов М.А., Новиков Е.А., Потапова О.Ф. Видовые адаптации на примере взаимоотношений родители–потомки у млекопитающих // Эволюционная биология: Матер. конф. «Проблема вида и видообразование» (3–6 октября 2000 г., г. Томск). Томск: ТГУ, 2001б. Т. 1. С. 264–278.
- Евсиков В.И., Потапов М.А., Потапова О.Ф. Эффекты отбора по запаховым предпочтениям в инбредной линии мышей // Докл. АН. 2001в. Т. 380. № 6. С. 844–846.
- Завадский К.М. Вид как форма существования жизни. Структура вида. Видообразование // Современные проблемы эволюционной теории. Л.: Наука, 1967. С. 145–295.
- Завадский К.М. Вид и видообразование. Л.: Наука. Ленинград. отд-ние, 1968. 396 с.
- Задубровская И.В., Потапов М.А., Потапова О.Ф. и др. Особенности брачных предпочтений узкочерепной полевки (*Microtus gregalis*) // Териофауна России и сопредельных территорий. Междунар. совещ. (IX Съезд Териол. общ-ва при РАН). М.: Тов-во научных изданий КМК, 2011. С. 172.
- Камшилов М.М. Значение взаимных отношений между организмами в эволюции. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1961. 136 с.
- Карш Ф., Линкольн Д.У., Линкольн Дж.А. и др. Гормональная регуляция размножения у млекопитающих. М.: Мир, 1987. 305 с.
- Кокенова Г.Т. Влияние брачного подбора и длительного инбредного разведения на репродуктивные характеристики степной пеструшки (*Lagurus lagurus* (Pallas, 1773)): Дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск: ИСиЭЖ СО РАН, 2007. 121 с.
- Колесников С.И., Морозова Л.М., Склянов Ю.И., Евсиков В.И. Морфология внезародышевых органов эмбрионов мышей при их развитии в аллогенных и сингенных матерях // Цитология и генетика. 1977. Т. 11. № 6. С. 513–518.
- Мошкин М.П., Герлинская Л.А., Евсиков В.И. Иммуная система и реализация поведенческих стратегий размножения при паразитарных прессах // Журн. общ. биологии. 2003. Т. 64. № 1. С. 23–44.
- Новиков С.Н. Феромоны и размножение млекопитающих: Физиологические аспекты. Л.: Наука. Ленинград. отд-ние, 1988. 169 с.
- Потапов М.А. Роль социального поведения в приспособленности популяции водяной полевки (*Arvicola terrestris* L.): Дис... канд. биол. наук. Новосибирск: ИСиЭЖ СО РАН, 1996. 104 с.
- Потапов М.А., Евсиков В.И. Теория полового отбора Ч. Дарвина и перспективы ее развития в свете эволюционных идей Д.К. Беляева // Информ. вестник ВОГиС. 2009. Т. 13. № 2. С. 390–400.
- Потапов М.А., Евсиков В.И. Генетико-физиологические взаимоотношения мать–плод и их влияние на адаптивные признаки потомков: Взгляд с третьей стороны // Современные концепции эволюционной генетики. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2000. С. 277–293.
- Потапов М.А., Назарова Г.Г., Потапова О.Ф., Евсиков В.И. Ольфакторная привлекательность и

- репродуктивные характеристики снижены у высокоагрессивных самцов // Сиб. зоол. конф.: Тез. докл. всерос. конф., посв. 60-летию ИСиЭЖ СО РАН (Новосибирск, 15–22 сентября 2004 г.). Новосибирск: ООО «Талер-Пресс», 2004. С. 308–309.
- Потапов М.А., Потапова О.Ф., Бахвалова В.Н., Евсиков В.И. Увеличение материнского вклада как один из механизмов гетерозиса у млекопитающих // XII Междунар. совещ. и V школа по эволюционной физиологии (19–25 ноября 2001 г., Санкт-Петербург): Тез. докл. СПб: ИЭФИБ РАН, 2001а. С. 122.
- Потапов М.А., Потапова О.Ф., Евсиков В.И. Влияние агрессивности и потенциальных родительских качеств самцов мышей на брачные предпочтения самок // XII Междунар. совещ. и V школа по эволюционной физиологии (19–25 ноября 2001 г., Санкт-Петербург): Тез. докл. СПб: ИЭФИБ РАН, 2001б. С. 122–123.
- Потапов М.А., Потапова О.Ф., Задубровская И.В. и др. Половая привлекательность самцов и их агрессивность у грызунов с разными системами спаривания // Сиб. экол. журнал. 2010. № 5. С. 813–818.
- Потапов М.А., Потапова О.Ф., Рогов В.Г., Евсиков В.И. Компенсирует ли сдвиг вторичного соотношения полов влияние неблагоприятных условий? // Эндокринная регуляция физиологических функций в норме и патологии. Вторая науч. конф. с междунар. участием (15–17 октября 2002 г., Новосибирск): Тез. докл. Новосибирск: ИЦИГ СО РАН, 2002. С. 126.
- Потапов М.А., Фролова О.Ф., Мошкин М.П. Стресс и зоосоциальное поведение у разных видов грызунов // IV Съезд Всесоюз. териол. об-ва (Москва, 27–31 января 1986 г.). Тез. докл. М., 1986. Т. 2. С. 155–156.
- Северцов С.А. О конгруэнциях и понятии целостности вида // Проблемы экологии животных. Неопубликованные работы. Т. 1. М.: Изд-во АН СССР, 1951а. С. 30–57.
- Северцов С.А. Проблемы эволюционной экологии и пути к их разрешению // Проблемы экологии животных. Неопубликованные работы. Т. 1. М.: Изд-во АН СССР, 1951б. С. 11–29.
- Снелл Дж., Доссе Ж., Нэтенсон С. Совместимость тканей. М.: Мир, 1979. 501 с.
- Соколов В.Е., Ушакова Н.А. Микрофлора и химическая коммуникация животных: Некоторые экологические аспекты // Химическая коммуникация животных: Теория и практика. М.: Наука, 1986. С. 263–271.
- Ченцова Н.Ю. Об адаптивном значении инбридинга для мелких грызунов // Зоол. журнал. 1969. Т. XLVIII. Вып. 5. С. 734–745.
- Четвериков С.С. О некоторых моментах эволюционного процесса с точки зрения современной генетики // Проблемы общей биологии и генетики. Новосибирск: Наука, 1983. С. 170–226.
- Шилов И.А. О механизмах популяционного гомеостаза у животных // Усп. соврем. биологии. 1967. Т. 64. Вып. 2(5). С. 333–351.
- Andersson M. Sexual Selection. Princeton: Princeton Univ. Press, 1994. 336 p.
- Beauchamp G.K., Yamazaki K., Duncan H. *et al.* Genetic determination of individual mouse odor // Chemical Signals in Vertebrates V. Oxford: Oxford Univ. Press, 1990. P. 244–254.
- Brown J.L., Eklund A. Kin recognition and the major histocompatibility complex: An integrative review // Amer. Nat. 1994. V. 143. P. 435–461.
- Brown R.E., Schellinck H.M. Interaction among the MHC, diet and bacteria in the production of social odors // Chemical Signals in Vertebrates VI. N.Y.: Plenum Press, 1992. P. 175–181.
- Brown R.E., Schellinck H.M. Effects of selective depletion of gut bacteria on the odours of individuality in rats // Advances in the Biosciences. V. 93: Chemical Signals in Vertebrates VII. Oxford: Pergamon, 1995. P. 267–271.
- Clutton-Brock T.H. Mammalian mating systems // Proc. Roy. Soc. B: Biol. Sci. 1989. V. 236. № 1285. P. 339–372.
- Darwin C. On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. London: John Murray, 1859. 502 p.
- Darwin C. The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex. London: John Murray, 1871. V. 1/2.
- Darwin C. The Foundations of the Origin of Species. Two essays written in 1842 and 1844 / Ed. F. Darwin. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1909. 263 p.
- Duncan H.J., Beauchamp G.K., Yamazaki K. Relative contribution of different genetic regions to urinary odors distinguishing inbred strains of mice // Chem. Senses. 1987. V. 12. P. 653.
- Eggert F., Hotter C., Luszyk D., Ferstl R. MHC-associated urinary chemosignals in mice // Advances in the Biosciences. V. 93: Chemical Signals in Vertebrates VII. Oxford: Pergamon, 1995. P. 511–516.
- Evsikov A.V., de Vries W.N., Peaston A.E. *et al.* Systems biology of the 2-cell mouse embryo // Cytogenet. Genome Res. 2004. V. 105. P. 240–250.
- Evsikov A.V., Graber J.H., Brockman J.M. *et al.* Cracking the egg: molecular dynamics and evolutionary aspects of the transition from the fully grown oocyte to embryo // Genes Dev. 2006. V. 20. P. 2713–2727.
- Evsikov V.I., Nazarova G.G., Potapov M.A. Female odor choice, male social rank, and sex ratio in the water vole // Advances in the Biosciences: Chemical

- Signals in Vertebrates VII. V. 93. Oxford: Pergamon, 1995. P. 303–307.
- Gerlinskaya L.A., Evsikov V.I. Genetic predetermined mother–fetus interrelations and their influence on adaptive features of offspring // *Reproduction*. 2001. V. 121. P. 409–417.
- Gerlinskaya L.A., Potapov M.A., Evsikov V.I. Mother–fetus genetic interactions as a factor influencing behavior of offspring // XXIII Intern. Ethological Conf. (1–9 September 1993, Torremolinos, Spain): Abst. Cordoba: BAENA, 1993. P. 266.
- Gerlinskaya L.A., Rogova O.A., Yakushko O.F., Evsikov V.I. Female olfactory choice and its influence on pregnancy in mice // *Advances in the Biosciences: Chemical Signals in Vertebrates VII*. V. 93. Oxford: Pergamon, 1995. P. 297–302.
- Goldman A.S., Chheda S., Keeney S.E. *et al.* Immunologic protection of the premature newborn by human milk // *Semin. Perinatol.* 1994. V. 18. № 6. P. 495–501.
- Hanson L.A. The mother–offspring dyad and the immune system // *Acta Paediatr.* 2000. V. 89. № 3. P. 252–258.
- Huxley J.S. Darwin’s theory of sexual selection and the data subsumed by it, in the light of recent research // *Am. Nat.* 1938a. V. 72. P. 416–433.
- Huxley J.S. The present standing of the theory of sexual selection // *Evolution: Essays on Aspects of Evolutionary Biology* / Ed. G.R. de Beer. Oxford: Oxford Univ. Press, 1938b. P. 11–42.
- Kleiman D.G. Monogamy in mammals // *Quart. Rev. Biol.* 1977. V. 52. № 1. P. 39–69.
- Lenington S., Coopersmith C., Williams J. Genetic basis of mating preferences in wild house mice // *Amer. Zool.* 1992. V. 32. P. 40–47.
- Luszyk D., Wobst B., Eggert F. *et al.* MHC-molecules and urine odor formation // *Advances in the Biosciences*. V. 93: *Chemical Signals in Vertebrates VII*. Oxford: Pergamon, 1995. P. 523–528.
- Moshkin M.P., Gerlinskaya L.A., Morozova O.V. *et al.* Behaviour, chemosignals, and endocrine functions in male mice infected with tick-borne encephalitis virus // *Psychoneuroendocrinology*. 2002. V. 27. № 5. P. 603–608.
- Potapov M.A., Evsikov V.I. Kin recognition in water voles // *Advances in the Biosciences: Chemical Signals in Vertebrates VII*. Oxford: Pergamon, 1995. V. 93. P. 247–251.
- Potapov M.A., Nazarova G.G., Evsikov V.I. Attractiveness of male vole odor is positively correlated with pup viability // *Advances in Chemical Signals in Vertebrates*. N.Y.: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999a. P. 457–462.
- Potapov M.A., Potapova O.F., Evsikov V.I. Interstrain odor preferences and factors influencing growth rates of two strains of mice and their hybrids // *Advances in Chemical Signals in Vertebrates*. N.Y.: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999b. P. 399–406.
- Potapov M.A., Potapova O.F., Litvinov Yu.N., Evsikov V.I. The monogamy in the steppe lemming, *Lagurus lagurus* // ISBE Intern. Congr. on Behavioral Ecology (9–15 August 2008, Ithaca, Cornell University): Abst. Ithaca, 2008. P. 249.
- Potapov M.A., Yakushko O.F., Belogurova M.N. Long term effects of interstrain embryo transfer: female olfactory preference in adult mice offspring // *Advances in the Biosciences: Chemical Signals in Vertebrates VII*. Oxford: Pergamon, 1995. V. 93. P. 313–316.
- Qvarnström A., Forgren E. Should females prefer dominant males? // *Trends Ecol. and Evol.* 1998. V. 13. P. 498–501.
- Schellinck H.M., Monahan E., Brown R.E., Maxson S.C. A comparison of the contribution of the major histocompatibility complex (MHC) and Y chromosomes to the discriminability of individual odors of mice by Long-Evans rats // *Behav. Genet.* 1993. V. 23. № 3. P. 257–263.
- Widemo F., Sæther S.A. Beauty is in the eye of the beholder: causes and consequences of variation in mating preferences // *Trends Ecol. Evol.* 1999. V. 14. P. 26–31.
- Wynne-Edwards V.C. Self-regulating systems in populations of animals // *Science*. 1965. V. 147(3665). P. 1543–1548.
- Yamazaki K., Singer A., Curran M., Beauchamp G.K. Origin, functions, and chemistry of H-2 regulated odorants // *Advances in Chemical Signals in Vertebrates*. N.Y.: Kluwer Academic/Plenum Publ., 1999. P. 173–180.

EVOLUTIONARY ECOLOGY OF ANIMAL FERTILITY: FACTORS OF EPIGAMIC SEXUAL SELECTION IN RODENTS

M.A. Potapov, V.I. Evsikov

Institute of Systematics and Ecology of Animals, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: map@ngs.ru

Summary

The results of experimental investigation of major factors of epigamic sexual selection and their effects on reproductive parameters of rodents are reviewed. The ability of females to optimize reproduction via olfactory mating choice is shown. Female breeding preferences are based on a limited number of factors of epigamic selection, first of all, genotypic differences between partners and morphophysiological and behavioral characteristics of males. The studied factors of mate selection in mammals appear to be essential for reproduction and enhance the effectiveness of reproductive potential realization.

Key words: sexual selection, epigamic selection, sexual attractiveness, fertility, heterosis, mammals, rodents.

ИССЛЕДОВАНИЯ СИНХРОНИЗАЦИИ ПОЛОВОГО ЦИКЛА У САМОК СЕРОЙ КРЫСЫ (*RATTUS NORVEGICUS*) ПРИ СОВМЕСТНОМ СОДЕРЖАНИИ

Ю.Н. Иванов, Д.В. Клочков, М.А. Поздняков

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

Исследовалась возможность спонтанной синхронизации эстрального цикла у самок пасюка (*Rattus norvegicus*) при их содержании в условиях тесной близости (в одной клетке). По данным ежедневных наблюдений в течение периодов от 30 до 39 дней частота совпадения стадий овариального цикла у самок внутри пары учитывалась среди пар самок: 1) содержащихся вместе (опыт) и 2) содержащихся порознь (контроль). Различие частот оказалось несущественным. Синхронизация полового цикла при совместном содержании самок не наблюдается. Разбиение периода наблюдений на начальный и конечный этапы подтвердило отсутствие процесса синхронизации во времени. В силу возможности небиномиального распределения частоты события в совокупности опытов корректной является ее невзвешенная оценка. Сравнение взвешенных частот совпадения стадий полового цикла в парах самок в опыте и в контроле или на разных этапах периода наблюдений приводит к неадекватным заключениям относительно синхронизации полового цикла, поэтому следует пользоваться невзвешенными оценками частоты.

Ключевые слова: пасюк *Rattus norvegicus*, синхронизация эстрального цикла, совместное содержание самок, дисперсионный анализ, взвешенная и невзвешенная оценки частоты.

Введение

Существует представление, что у млекопитающих, имеющих в отличие от сезонного постоянное размножение, как, например, у человека, пасюка (*Rattus norvegicus*) и многих видов мышевидных грызунов, при обитании самок в условиях тесной близости друг с другом происходит синхронизация их овариального цикла (Schank, McClintock, 1992). Работ по этой проблеме не так уж много (обзор см. в статье Schank, 2001), и еще меньше их специально посвящено ее решению. Вместе с тем появились и сомнения в реальности этого явления и в адекватности методов, которыми оно устанавливается (Schank, 2001, 2004). Располагая обширными экспериментальными данными относительно протекания эстрального цикла у самок крыс линии Вистар и производной от нее линии ГК (генетические кататоники), мы решили исследовать вопрос на собственном материале. Данная работа посвящена проверке гипотезы о том, что

при совместном содержании самок крысы их эстральные циклы синхронизируются.

Эстральный цикл крысы (*R. norvegicus*) в норме длится 4–5 дней и разделяется на стадии: проэструс (П), эструс (Э), метаэструс (М) и диэструс (Д). Период цикла нередко удлиняется, чаще за счет переходной стадии диэструса, занимающей около 54 % времени цикла. Обнаружено сильное влияние на половой цикл суточного режима освещения самок (Klotchkov, Belayev, 1978; Клочков, 1988). Изменчивость длительности цикла в зависимости от внешних условий позволяет предполагать возможность синхронизации цикла у разных самок при одинаковых условиях. Синхронизация эстрального цикла означает тенденцию приведения его к одной и той же фазе у разных самок, так что доля самок, находящихся на одной и той же стадии цикла, должна возрастать во времени. Ожидается, что циклы, отстающие по фазе от некоего виртуального цикла, должны ускоряться, а циклы, опережающие его по фазе, –

замедляться, стремясь к совпадению друг с другом, или же происходит какой-либо один из этих процессов.

Значение нашего исследования состоит в том, что рассматриваемый вопрос синхронизации полового цикла недостаточно опирается на факты и нередко строится на домыслах. Еще до того, как феномен был изучен и подтвержден на опыте, появились теоретические соображения и модели, предполагающие его наличие, что является отступлением от научного метода. Поэтому выяснение существования процесса синхронизации является самой актуальной задачей. Работа имеет сильный методический уклон и можно надеяться, окажется полезной для многих экспериментаторов, применяющих статистические методы.

Материал и методика

Для проверки гипотезы о синхронизации эстрального цикла при совместном содержании самок крысы рассмотрим множество R_1 таких пар самок, в которых оба члена пары содержались вместе в одной клетке, и множество R_2 пар самок, в которых оба члена пары содержались раздельно (поодиночке или в группах из разных клеток). Поскольку исследуется синхронность, т. е. совпадение циклов во времени, комбинировать в пары можно только самок с совпадающими по датам сроками наблюдения. Эти сроки для различения обозначены римскими цифрами. Множества наблюдений в R_1 и R_2 обозначим соответственно через S_1 и S_2 и сравним последние по частоте совпадения стадий полового цикла внутри пары.

Умножая число пар в R_i ($i = 1; 2$) на соответствующее число дней наблюдения над ними, учтем общее число элементов (паро-дней) на каждом из множеств S_i , т. е. объем выборки n_i и число c_i совпадений стадии цикла внутри пар самок. Тогда частота совпадения стадий эстрального цикла внутри пар, или доля синхронных пар самок на множестве S_i , выразится как $p_i = \frac{c_i}{n_i}$, а частота несовпадения как $q_i = \frac{d_i}{n_i}$, где $d_i = n_i - c_i$ ($i = 1; 2$). Остается сравнить полученные частоты p_1 и p_2 , проверив нуль-гипотезу $H: p_1 = p_2$, например, посредством критерия гомогенности χ^2 для таблицы 2×2 :

$$\chi^2 = \frac{(|c_1 d_2 - c_2 d_1| - 0,5n)^2 \cdot n}{(c_1 + c_2) \cdot (d_1 + d_2) \cdot n_1 \cdot n_2}$$

при числе степеней свободы $df = 1$, где $n = n_1 + n_2$ (Бейли, 1964).

Если нуль-гипотеза будет отвергнута в пользу альтернативы $\bar{H}: p_1 \neq p_2$ и при этом окажется, что $p_1 > p_2$, то проверяемая гипотеза синхронизации эстрального цикла при совместном содержании самок крысы получит подтверждение. Однако, применяя при сравнении частот их взвешенные оценки, для окончательного выяснения ситуации мы сочли необходимым использование дисперсионного анализа. Согласно соображениям, представленным У. Энгельсом, если вследствие гетерогенности условий в отдельных опытах не предполагается биномиальное распределение частоты события в их совокупности, то некорректно оценивать частоту взвешенным способом, а следует находить ее как невзвешенную среднюю частот в отдельных опытах. Такая невзвешенная оценка частоты является несмещенной и более эффективной (Engels, 1979). Напомним читателю, что взвешенная оценка частоты события равна $p_w = \sum c / \sum n$, где c – число появлений события и n – число испытаний в отдельном опыте. Невзвешенная оценка частоты равна $p_u = \bar{p}$, т. е. средней арифметической ее значений $p = c/n$ в отдельных опытах.

Как метод описания экспериментального материала используем его табличное представление, которое содержит все данные для дисперсионного анализа и требует лишь некоторых пояснений. Такое описание дает табл. 1а, а также детализирующая ее табл. 1б, которая понадобится нам позднее.

Линии крыс Вистар и ГК различаются по частоте аномального поведения, называемого кататоническим замиранием, более характерным для линии ГК. Каких-либо различий по половому циклу между линиями не замечено. Наблюдения стадий полового цикла по влагилищным мазкам у всех самок в период исследования велись ежедневно в утренние часы и записывались символами П, Э, М или Д. Периоды и число дней исследования указаны в табл. 1а. Все самки, сочетаемые в пары совместного содержания, перед опытом содержались вместе по полмесяца, т. е. еще до исследования

Таблица 1а

Частота совпадения стадий эстрального цикла у самок внутри пары при совместном содержании самок, входящих в пару (опыт), и при содержании их отдельно друг от друга (контроль)

Вариант	№ п/п	Линия	№ клеток	Число		Время исследования	Число			Частота совпадений $p = \frac{c}{n}$
				♀♀	пар		дней	паро-дней, n	совпадений стадии в паре, c	
О.	1	В	1	5	10	I	35	350	117	0,3343
	2		2	5	10			350	128	0,3657
	3		3	5	10			350	106	0,3029
	4		4	7	21	IIIa	36	756	240	0,3175
	5		5	7	21			756	158	0,2090
	6		6	7	21			756	223	0,2950
	7	ГК	7	6	15	IIIб	39	585	124	0,2120
	8		8	7	21			819	190	0,2320
	9		9	7	21			819	175	0,2137
	10		10	5	10			390	138	0,3538
	11		11	5	10			390	104	0,2667
К.	1	В	1, 2	10	25	I	35	875	214	0,2446
	2		1, 3	10	25			875	207	0,2366
	3		2, 3	10	25			875	313	0,3577
	4		–	57	1596	II	30	47880	13340	0,2786
	5		4, 5	14	49	IIIa	36	1764	464	0,2630
	6		4, 6	14	49			1764	425	0,2409
	7		5, 6	14	49			1764	459	0,2602
	8	7, 8	13	42	IIIб			39	1638	410
	9	7, 9	13	42		1638	466		0,2845	
	10	7, 10	11	30		1170	261		0,2231	
	11	7, 11	11	30		1170	293		0,2504	
	12	8, 9	14	49		1911	470		0,2459	
	13	8, 10	12	35		1365	256		0,1875	
	14	8, 11	12	35		1365	415		0,3040	
	15	9, 10	12	35		1365	408		0,2989	
	16	9, 11	12	35		1365	403		0,2952	
	17	10, 11	10	25	975	259	0,2656			

Примечания. Варианты: О. – опыт, или совместное содержание самок; К. – контроль, или раздельное содержание самок. Линии: В – Вистар; ГК – генетические кататоники. Периоды исследования: I – 9.12.03 г. – 12.01.04 г.; II – 16.06 – 15.07.04 г.; IIIa – 6.12.04 г. – 10.01.05 г.; IIIб – 6.12.04 г. – 13.01.05 г.

прошли в соседстве друг с другом 3–4 эстральных цикла.

Расчеты объема выборок в опыте делаются следующим образом. Так, в клетке № 1 содержится группа из 5 самок, из которых можно образовать C_5^2 пар R_1 . За 35 дней наблюдения

над ними получаем 350 паро-дней, или наблюдений над парами. Таков объем выборки из множества S_1 , обеспечиваемый за счет крыс клетки № 1 (табл. 1а, строка О.1). И так далее. Общий объем выборки во множестве S_1 , т. е. в опыте, составляет $n_1 = 6321$.

Таблица 16

Частота совпадения стадий эстрального цикла у самок внутри пары:
 А) при совместном (О.) и раздельном (К.) их содержании;
 В) в разных линиях крыс (Вистар и ГК)
 и С) в разные этапы периода наблюдений (начальный – I и конечный – II)

Ва- риант А	Ли- ния В	№ клеток	Число		Период наблю- дения	Этап С	Число			Частота совпадений $p = \frac{c}{n}$
			♀♀	пар			дней	паро- дней, n	совпадений стадии цикла, c	
О.	В	1	5	10	I 35 дн.	I	17	170	67	0,3941
						II	18	180	50	0,2778
		2	5	10	II	I	17	170	43	0,2529
						II	18	180	85	0,4722
		3	5	10	II	I	17	170	52	0,3059
						II	18	180	54	0,3000
	ГК	4	7	21	IIIa 36 дн.	I	18	378	107	0,2831
						II	18	378	133	0,3519
		5	7	21	II	I	18	378	85	0,2249
						II	18	378	73	0,1931
		6	7	21	II	I	18	378	98	0,2593
			II	18		378	125	0,3307		
7	6	15	IIIb 39 дн.	I	19	285	54	0,1895		
				II	20	300	70	0,2333		
8	7	21		II	I	19	399	73	0,1830	
					II	20	420	117	0,2786	
9	7	21		II	I	19	399	92	0,2306	
			II		20	420	83	0,1976		
10	5	10	II	I	19	190	59	0,3105		
				II	20	200	79	0,3950		
11	5	10	II	I	19	190	64	0,3368		
				II	20	200	40	0,2000		
К.	В	1,2	10	25	I 35 дн.	I	17	425	103	0,2424
						II	18	450	111	0,2467
		1,3	10	25	II	I	17	425	116	0,2729
						II	18	450	91	0,2022
		2,3	10	25	II	I	17	425	129	0,3035
						II	18	450	184	0,4089
		–	57	1596	II 30 дн.	I	15	23940	6921	0,2891
						II	15	23940	6419	0,2681
	4,5	14	49	IIIa 36 дн.	I	18	882	222	0,2517	
					II	18	882	242	0,2744	
4,6	14	49	II		I	18	882	226	0,2562	
					II	18	882	199	0,2256	
5,6	14	49	II	I	18	882	197	0,2234		
				II	18	882	262	0,2971		

Окончание таблицы 16

Вариант А	Линия В	№ клеток	Число		Период наблюдения	Этап С	Число			Частота совпадений $p = \frac{c}{n}$
			♀♀	пар			дней	паро-дней, n	совпадений стадии цикла, c	
К.	ГК	7, 8	13	42	Шб 39 дн.	I	19	798	223	0,2794
						II	20	840	187	0,2226
		7, 9	13	42		I	19	798	218	0,2732
						II	20	840	248	0,2952
		7, 10	11	30		I	19	570	133	0,2333
						II	20	600	128	0,2133
		7, 11	11	30		I	19	570	168	0,2947
						II	20	600	125	0,2083
		8, 9	14	49		I	19	931	260	0,2793
						II	20	980	210	0,2143
		8, 10	12	35		I	19	665	153	0,2301
						II	20	700	103	0,1471
		8, 11	12	35		I	19	665	199	0,2992
						II	20	700	216	0,3086
		9, 10	12	35		I	19	665	195	0,2932
						II	20	700	213	0,3043
		9, 11	12	35		I	19	665	220	0,3308
						II	20	700	183	0,2614
10, 11	10	25	I	19	475	98	0,2063			
			II	20	500	161	0,3220			

Примечания. Обозначения см. в табл. 1а.

Расчеты объема выборок в контроле делаются несколько иначе. Пары R_2 образуются из самок, содержащихся порознь друг от друга, т. е. взятых из разных клеток. Так, в клетках 1 и 2 содержится по 5 самок. Каждая самка одной клетки может сочетаться с любой самкой из другой клетки, так что образуется 5×5 пар R_2 . Умножив это число на 35 дней наблюдения, получаем $25 \times 35 = 875$ паро-дней, т. е. объем выборки из множества S_2 , обеспечиваемый за счет крыс клеток 1 и 2 (табл. 1а, строка К.1). Другой пример. В клетках 7 и 8 содержится 6 и 7 самок соответственно. Они могут образовать $6 \times 7 = 42$ пары R_2 , а за 39 дней наблюдения дают вклад в выборку из S_2 , равный $42 \times 39 = 1638$ паро-дней (табл. 1а, строка К.8). И так далее. Кроме того, в контроль взяты 57 самок линии Вистар, содержащиеся в клетках поодиночке. Они исследовались в течение 30 дней и дали наибольший вклад в выборку из S_2 : $C_{57}^2 \times 30 = 47880$ паро-дней контроля (табл. 1а, строка К.4). Общий объем выборки во множестве S_2 , т. е. в контроле, составляет $n_2 = 69759$.

Суммарный объем выборки опыта и контроля равен $n = n_1 + n_2 = 76080$.

Объем выборки (число паро-дней) во всех случаях нетрудно найти непосредственно, но сочетать все необходимые пары самок, выписывая стадии эстрального цикла каждой самки, и подсчитывать долю синхронных (совпадающих по стадии полового цикла) пар самок за весь период исследования без помощи ЭВМ практически невозможно. Поэтому была составлена специальная программа, обеспечившая получение необходимых данных на компьютере.

Результаты и обсуждение

Дисперсионный анализ зависимости частоты совпадения стадий эстрального цикла в парах самок от способа их содержания приведен в табл. 2. Она подразделяется на вспомогательную (а) и итоговую (б) таблицы, где используются обозначения, принятые в руководствах по статистике (Бейли, 1964; Рокицкий, 1973). Из таблицы итогов (б) видно, что частота сов-

Таблица 2

Дисперсионный анализ зависимости частоты совпадения стадий эстрального цикла в парах самок от способа содержания самок

Вспомогательная таблица (а)

i	Способ содержания самок	Число выборок N_i	$\sum p_j = T_i$	$\sum p_j^2$	$\bar{p}_i = \frac{T_i}{N_i}$
1	Совместное (опыт)	11	3,1026	0,90949266	0,2820
2	Раздельное (контроль)	17	4,4870	1,2074126	0,2639
$k = 2$	Сумма	$N = 28$	$7,5896$ $G = \sum T_i$	$2,11690526$ $\sum \sum p_j^2$	$0,2711$ G/N

Итоговая таблица (б)

Вариация частоты совпадения	Сумма квадратов ss	Степени свободы df	Средний квадрат $p = \frac{ss}{df}$	Отношение дисперсий $F_{k-1; N-k}$
Между способами содержания $\sum \frac{T_i^2}{N_i} - \frac{G^2}{N}$	0,0021912	$\frac{1}{k-1}$	0,0021912	$F_{1; 26} = 0,991$
Остаточная $\sum \sum p_j^2 - \sum \frac{T_i^2}{N_i}$	0,0574988	$\frac{26}{N-k}$	0,0022115	—
Полная $\sum \sum p_j^2 - \sum \frac{G^2}{N}$	0,0596900	$\frac{27}{N-1}$	0,0022107	—

Примечание. Критические значения $F_{1; 26} = 4,23; 7,72$ и $13,7$ для уровней значимости $\alpha = 0,05; 0,01$ и $0,001$ соответственно. Поскольку $F_{1; 26} = 0,991$ меньше минимального из них, нуль-гипотеза равенства частот совпадения в опыте и контроле не отвергается.

падения стадий цикла у самок внутри пары не зависит от способа их содержания – вместе или порознь друг от друга.

Дисперсионный анализ сравнивает невзвешенные частоты \bar{p}_i ($i = 1, 2$) опыта и контроля и принимает гипотезу их равенства. Если же взять взвешенные частоты $\bar{p}_i = c_i/n_i$ ($p_1 = 1703/6321 = 0,2694$ и $p_2 = 19063/69759 = 0,2733$), то их сравнение можно провести непосредственно методом χ^2 или используя преобразование арксинуса. При этом гипотеза равенства частот опыта и контроля также не отвергается. Однако дисперсионный анализ является более корректным и имеет то преимущество, что может установить степень влияния разных факторов на исследуемую величину. Мы имели случай увидеть, что применение взвешенных частот может создать иллюзию синхронизации полового цикла. Так, в ходе статистической обработки нашего материала сначала была исследована линия Вистар, а потом линия ГК, причем обыч-

ными методами сравнения взвешенных частот (χ^2 и преобразование арксинуса) получены следующие результаты. Для линии Вистар $p_1 = 972/3318 = 0,2929$ и $p_2 = 15422/55797 = 0,2764$; нуль-гипотеза $H: p_1 \leq p_2$ отвергается в пользу альтернативы $\bar{H}: p_1 > p_2$ при уровне значимости $\alpha = 0,025$, и гипотеза синхронизации полового цикла при групповом содержании самок, казалось, получила подтверждение. Для линии ГК $p_1 = 731/3003 = 0,2434$ и $p_2 = 3641/13962 = 0,2608$; нуль-гипотеза $H: p_1 \geq p_2$ отвергается в пользу альтернативы $\bar{H}: p_1 < p_2$ при $\alpha = 0,025$, а это равносильно тому, что синхронизация циклов происходит, наоборот, при раздельном содержании самок (!). Эти курьезные противоречия возникли, несмотря на весьма большие объемы выборок из S_i (а, скорее, благодаря им), что особенно поучительно. Хотя объединение данных устраняет ошибки заключений, полученных для линий в отдельности, все же для большей уверенности в истинности заклю-

чения, полученного для совокупности линий, оказалась полезной независимая проверка результата 2-факторным дисперсионным анализом. Она позволила проверить влияние линии и отвергнуть его наличие.

Результаты 2-факторного дисперсионного анализа представлены в табл. 3. В качестве факторов, могущих влиять на частоту совпадения овариальных стадий у самок в парах, исследуются способ содержания самок (фактор А) и линия (фактор В). Из экономии приводится только таблица окончательных результатов, ибо читатель по данным табл. 1а имеет возможность сам провести анализ, руководствуясь пособием П.Ф. Рокицкого (1973). Результаты показывают, что ни указанные факторы, ни их взаимодействие не оказывают существенного влияния на частоту совпадения стадий.

Дезинформирующее влияние взвешенных оценок частоты можно пояснить более конкретно. Множества R_i ($i = 1; 2$) включают пары самок, как несинхронные, так и синхронные по половому циклу. Доля тех и других определяется случаем, ее отклонения зависят от объема выборки n из R_i и пропорциональны $1/\sqrt{n}$. Если в нашей выборке из R_i доля синхронных пар случайно оказалась завышенной, то в силу того, что такие пары самок на протяжении всего периода исследований будут неизменно показывать совпадения стадий полового цикла, частота совпадений p_i во всей выборке, объем которой измеряется пароднями, окажется завышенной, но это будет приписано не выборочной аномалии, а процессу синхронизации.

Это превышение получит тем большую статистическую значимость, чем больше будет период наблюдения или число пародней, т. е. объем выборки из S_i . При малой выборке из R_i увеличение выборки из S_i за счет длительности периода наблюдений не пойдет на пользу, ибо приведет к ложному выводу о синхронизации или десинхронизации, смотря по тому, будет ли выборочная аномалия в R_i состоять в случайном избытке или недостатке синхронных пар самок. Именно это мы могли наблюдать на ограниченных выборках из линий Вистар и ГК в отдельности, проверка чего приведена ниже, тогда как объединение выборок устранило случайные отклонения и привело к взаимному их погашению. Отсюда следует, что для правильного заключения о наличии процесса синхронизации 1) объем выборки пар самок R_i имеет едва ли не большее значение, чем длительность периода наблюдения, и 2) не следует пользоваться взвешенными оценками частоты, которые являются несостоятельными и смещенными и ведут к ложным выводам. Взвешенная оценка частоты искусственно завышает объем выборки, принимая его равным сумме весовых множителей, т. е. числу пародней, зависящему от длины периода наблюдений, а это ведет к заключению о существенности статистически несущественных различий, когда случайные различия преувеличиваются до уровня статистической значимости. Невзвешенная оценка наоборот свободна от этого недостатка, так как при ней объем выборки определяется числом групп и не зависит от числа дней наблюдения.

Таблица 3

Дисперсионный анализ зависимости частоты совпадения стадий эстрального цикла в парах самок от способа содержания самок (вместе или порознь, фактор А) и от линии крыс (Вистар или ГК, фактор В)

Источник вариации	<i>ss</i>	<i>df</i>	<i>ms</i>	Отношение дисперсий $F_{1; 24}$
Фактор А	0,002191	1	0,002191	1,03
Фактор В	0,004770	1	0,004770	2,25
Взаимодействие А и В	0,001907	1	0,001907	0,901
Остаточная	0,050822	24	0,002118	—
Полная	0,059690	27	0,002211	—

Примечания. Обозначения те же, что в табл. 2(б). Отношение дисперсий к остаточной во всех случаях меньше критического ($F_{1; 24} = 4,26; 7,82$ и $14,0$ для уровней значимости $\alpha = 0,05; 0,01$ и $0,001$ соответственно), т. е. факторы А, В и их взаимодействие не влияют на частоту совпадения эстральных стадий у самок внутри пары.

Однако мы дали всего лишь одно из возможных объяснений курьезного случая с линиями Вистар и ГК, ибо проверка показала, что в действительности могут иметь место и другие причины. Оказалось, что в линии Вистар, где была «синхронизация» в опыте, доля синхронных пар самок в начале периода наблюдений составила в R_1 $32/93 = 0,3441$, а в R_2 $820/1818 = 0,4510 > 0,3441$, хотя ожидалось неравенство противоположное. В линии ГК, где «синхронизация» была в контроле, доля синхронных пар самок в начале периода наблюдений составила в R_1 $19/77 = 0,2468$, а в R_2 $99/358 = 0,2765 > 0,2468$, что и ожидалось. Значит, судя по ситуации в линии Вистар, явление «синхронизации» может иметь и иные причины, чем первоначальное различие выборок из R_1 и R_2 по доле синхронных пар самок.

Другой способ проверить наличие синхронизации полового цикла состоит в наблюдении динамики этого процесса. Для этого каждый период наблюдения был разбит на два этапа: ранний – I и поздний – II. Данные по разбиению представлены в табл. 1б, из которой видно, что разбиение периодов сделано на равные этапы, а при нечетном числе дней в периоде начальный этап всюду сделан меньшим на один день. Затем эти этапы сравнивались по частоте совпадения эстральных стадий в парах самок. При наличии процесса синхронизации частота совпадений цикла в парах самок совместного содержания должна возрастать во времени, т. е. должна быть меньше на I этапе, чем на II.

Из данных табл. 1б нетрудно получить следующие частоты. При совместном содержании самок (О.) взвешенная частота совпадения стадий овариального цикла на I этапе была $p_{1,I} = 794/3107 = 0,2556$, на II этапе – $p_{1,II} = 909/3214 = 0,2828$. При раздельном содержании самок (К.) взвешенная частота совпадений на I этапе была $p_{2,I} = 9781/34663 = 0,2822$, на II этапе – $p_{2,II} = 9382/35096 = 0,2645$. В обоих случаях она существенно изменилась, так как гипотеза $H: p_I = p_{II}$ всюду отвергается, но в опыте (О.) – в пользу альтернативы $\bar{H}: p_I < p_{II}$ при уровне значимости $\alpha = 0,05$, а в контроле (К.) – в пользу альтернативы $\bar{H}: p_I > p_{II}$ при $\alpha < 0,001$. Истинность последней альтернативы является абсурдом, ибо означает, что раздельное содержание самок вызывает высокозначимую

десинхронизацию их полового цикла. Оба случая легко могут быть истолкованы пристрастно в пользу синхронизации, если произвольно предположить, что совместное содержание самок вызывает ее, а раздельное, наоборот, устраняет фактор синхронизации, что ведет к десинхронизации, как если бы существовала какая-то постоянная тенденция к ней.

Здесь нам представился ещё один случай продемонстрировать неадекватность взвешенных оценок частоты. Полученные выводы суть артефакты, вызванные преувеличением объема выборки при использовании взвешенной частоты. То, что, сравнивая взвешенные частоты, мы снова пришли к ложным выводам, выясняется при сравнении невзвешенных частот и при дисперсионном анализе факторов, влияющих на частоту совпадения стадий.

Из табл. 1б получаем, что при совместном содержании самок (О.) невзвешенная частота совпадения стадий овариального цикла в парах самок на I этапе была $p_{1,I} = 2,9706/11 = 0,2701$, на II этапе – $p_{1,II} = 3,2302/11 = 0,2937$. Значение критерия Стьюдента для различия частот равно $t_{20} = -0,714$. При раздельном содержании самок (К.) невзвешенная частота совпадений на I этапе была $p_{2,I} = 4,5587/17 = 0,2682$, на II этапе – $p_{2,II} = 4,4201/17 = 0,2600$. Значение критерия Стьюдента для различия частот равно $t_{32} = +0,485$. В обоих случаях гипотеза $H: p_I = p_{II}$ не отвергается. Синхронизация полового цикла при любом способе содержания самок не наблюдается.

Пусть факторы А, В и С суть соответственно способ содержания самок (совместное и раздельное), линия крыс (Вистар и ГК) и этап периода наблюдений (начальный и конечный). Дисперсионный анализ влияния на частоту совпадения стадий эстрального цикла в парах самок факторов А, В и С был проведен так, что исследовалось действие этих фактов, взятых попарно: А и В, А и С, В и С. Результаты этих трех 2-факторных анализов сведены в табл. 4, где как характеристики влияния каждого из факторов даны соответствующие значения критерия дисперсионного анализа $F_{1;52}$. Ввиду малых значений F -критерия действие любого из взятых факторов не обнаруживается.

Требования, предъявляемые к выборочной оценке любой случайной величины, суть со-

Таблица 4

Значения критерия дисперсионного анализа $F_{1; 52}$ как показатели влияния на частоту совпадения стадий эстрального цикла в парах самок: способа их содержания (совместное и раздельное, фактор А; линии (Вистар и ГК, фактор В) и этапа исследования (начальный и конечный, фактор С)

Влияние фактора	2-факторный анализ влияния		
	А и В	А и С	В и С
А	1,17	1,11	–
В	2,59	–	2,53
С	–	0,69	0,71

Примечание. Критические значения $F_{1; 52} = 4,03; 7,17$ и $12,2$ для уровней значимости $\alpha = 0,05; 0,01$ и $0,001$ соответственно. Ввиду того что все значения F -критерия меньше минимального из критических, ни одна из нуль-гипотез об отсутствии влияния факторов А, В и С на частоту совпадения стадий не отвергается.

стоятельность (сходимость к данной величине с ростом объема выборки), несмещенность (независимость математического ожидания оценки от объема выборки) и эффективность (минимальная из возможных дисперсия) (Смирнов и Дунин-Барковский, 1969). Согласно нашим соображениям и эмпирическим испытаниям, а также работе У. Энгельса (Engels, 1979), взвешенная оценка частоты в групповом опыте, подобном нашему, не отвечает ни одному из этих требований и является дезинформативной.

Заключение

Вопрос о синхронизации овариального цикла при групповом содержании самок крысы решается нами отрицательно. Это заключение можно считать справедливым и для других видов с постоянным размножением, по крайней мере пока и поскольку отсутствуют надежные фактические подтверждения. Во всяком случае, опыт показывает, что обмануться в наличии этой синхронизации очень легко. Необходимы

корректные статистические методы, а именно невзвешенные оценки частоты и дисперсионный анализ, в противном случае имеется риск ложного заключения. Само предположение о наличии синхронизации полового цикла у самок животных с постоянным размножением представляется нам безосновательным и произвольным, ибо никакого биологического смысла в нем не усматривается: конечные и движущие причины синхронизации являются воображаемыми и пока что не подтверждены никакими фактами. Очевидно, что представление о синхронизации цикла при совместном содержании самок легко могло возникнуть из несоответствия статистических методов.

Авторы благодарят В.Г. Колпакова, Н.Н. Барыкину и В.Н. Бабенко за помощь в оформлении данной работы и обсуждение результатов.

Литература

- Бейли Н. Статистические методы в биологии. М.: Мир, 1964. 271 с.
- Клочков Д.В. Эстральная цикличность и размножение крыс с разным уровнем фотореактивности // Журн. общ. биологии. 1988. Т. 49. № 1. С. 105–117.
- Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. Минск: Вышэйш. шк., 1973. 320 с.
- Смирнов Н.В., Дунин-Барковский И.В. Курс теории вероятностей и математической статистики. М.: Наука, 1969. С. 202–210.
- Engels W.R. The estimation of mutation rates when premeiotic events are involved // Environmental Mutagenesis. 1979. № 1. P. 37–43.
- Klotchkov D.V., Belayev D.K. Effect of continuous illumination of varying length on the reproductive rhythms in rats; after-effects // J. Interdiscipl. Cycle Res. 1978. V. 9. № 4. P. 293–301.
- Schank J.C., McClintock M.K. A coupled-oscillator model of ovarian-cycle synchrony among female rats // J. Theor. Biol. 1992. V. 157. № 3. P. 317–362.
- Schank J.C. Do Norway rats (*Rattus norvegicus*) synchronize their estrous cycles? // Physiol. Behav. 2001. № 72. P. 129–139.
- Schank J.C. Avoiding synchrony as a strategy of female mate choice // Nonlinear Dynamics Psychol. Life Sci. 2004. V. 8. № 2. P. 147–176.

ESTROUS CYCLE SYNCHRONIZATION IN RAT (*RATTUS NORVEGICUS*) FEMALES KEPT TOGETHER

Yu.N. Ivanov, D.V. Klotchkov, M.A. Pozdnyakov

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

Summary

The possibility of spontaneous synchronization of the estrous cycle was studied in *Rattus norvegicus* females kept in one cage. The frequency of coincidence of the estrous cycle stages inside a pair of females was estimated by daily observations for 30 to 39 days in a set of pairs consisting of females (1) kept together (experiment) and (2) kept separately (control). Analysis of variance shows that the regime of keeping of females constituting a pair does not affect the frequency of coincidence of the cycle stages in females inside a pair. Weighted estimates of frequency may lead to a false conclusion about the presence of synchronization. Division of the observation period into initial and final stages confirmed the absence of synchronization. We suggest that the same is true for other species with constant reproduction, at least as far as exact factual proofs thereof are not available. In any case, the experiment shows that it is very easy to come to erroneous conclusions concerning this synchronization on the base of biased weighted estimates of frequency. Reliable statistical methods and analysis of variance are essential to avoid this risk.

Key words: Norway rat *Rattus norvegicus*, synchronization of the estrous cycle, joint keeping of females, analysis of variance, weighted and unweighted estimates of frequency.

МОДЕЛЬ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ДЕТЕРМИНАЦИИ ЧИСЛА СОСКОВ У ДОМАШНИХ СВИНЕЙ

С.В. Никитин¹, С.П. Князев², В.И. Ермолаев¹

¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: nsv1956@mail.ru;

² Новосибирский государственный аграрный университет, кафедра разведения
и кормления животных, Новосибирск, Россия, e-mail: knyser@rambler.ru

В статье рассматривается гипотеза, основанная на положении о том, что число сосков у домашней свиньи является сложным признаком, состоящим из 10 субпризнаков, которыми являются отдельные пары сосков. Проверка гипотезы на 5 представительных (более 500 особей) выборках домашних свиней показала ее адекватность. Полученный результат позволяет рассматривать данную гипотезу как модель фенотипической детерминации числа сосков у домашних свиней.

Ключевые слова: домашние свиньи, число сосков, хозяйственно значимые признаки, селекция.

Введение

Число сосков у домашних свиней является признаком, имеющим определенное хозяйственное значение. Повсеместно принятая форма его регистрации имеет вид записи $n_L + n_R$, где n_L и n_R – число сосков с левой и правой стороны тела особи. Племенные, предназначенные для воспроизводства, свиньи и хряки должны иметь не менее 12 сосков (Инструкция ..., 1978).

Несмотря на то что к настоящему времени известно 27 QTL (локусов количественных признаков), которые могут участвовать в контроле числа сосков у домашней свиньи (Rothschild *et al.*, 2007), особенности формирования признака на уровне фенотипа изучены недостаточно. Зачатки молочных желез появляются у эмбриона свиньи в конце первой четверти беременности (на 28-й день) при его размере 1,5–2,0 см (Понд, Хаупт, 1983). То есть, фенотипически признак начинает проявляться довольно рано, когда эмбрионы находятся в матке свиньи, внутренняя среда которой приблизительно одинакова у всех материнских особей. Таким образом, можно предположить, что влияние окружающей среды на формирование признака отсутствует или незначительно. Соски у свиней расположены двумя параллельными рядами, проходящими

от грудной до паховой области. До 40 % особей могут иметь неполные (представленные только одним соском) пары, соответственно число сосков у них на левой и правой стороне тела различно, а общее количество нечетно (Понд, Хаупт, 1983). Интересно отметить, что увеличение среднего числа сосков в популяции может сопровождаться снижением среднего количества неполных пар (Князев и др., 2010, Князев, Никитин, 2011).

Число сосков у свиней является сложным признаком, состоящим из отдельных фенотипов (Яблоков, 1980) или субпризнаков (Мазер, Джинкс, 1985), которыми являются пары сосков. Вариация числа и расположения сосков несет в себе случайную компоненту: среди животных одного клона (идентичные генотипы) присутствуют особи с различным числом и расположением сосков (Archer *et al.*, 2003). В первой половине прошлого века было высказано предположение, что если за норму для домашних свиней принять 8 пар сосков, то пары № 2 и № 6 могут отсутствовать или в них может быть развит только один сосок, остальные же пары развиты всегда полностью (Волкопялов и др., 1934). Данное предположение явно устарело. Сейчас известно, что число пар сосков у свиней может варьировать от 4 (8 сосков) у дикого кабана

Sus scrofa (Данилкин, 2002) до 10 (20 сосков) у домашней свиньи *S. s. domesticus* (Понд, Хаупт, 1983). Следовательно, проявление признака может варьировать не в 2 парах, а в 6 (из 10) или, если за норму принять 8 пар, – в 4 парах сосков. Таким образом, признак содержит стабильную (4 пары сосков) и вариабельную (6 пар сосков) компоненты. Данное утверждение не только основано на литературных данных, но и подтверждается нашими собственными наблюдениями, сделанными не только на использованных в настоящей статье выборках. Известное нам минимальное число пар сосков равно 4, максимальное – 10 (9 полных, 1 неполная), максимальное число неполных пар – 6.

Число сосков является признаком, в котором присутствуют количественность и дискретность (число сосков), альтернативность (каждый отдельный сосок может присутствовать или отсутствовать), сегментация (разделение сосков на пары), билатеральность (число сосков на левой и правой стороне). Однако стандартное описание признака в зоотехническом учете содержит далеко не полную информацию о нем. Все, что касается топографии признака, – местоположения отдельных пар сосков – отсутствует.

В настоящем исследовании рассматривается только число сосков у особи. Это связано с тем, что именно этот суммарный показатель используют в селекции свиней и отбор по нему оказывается эффективным (Князев и др., 2010, Князев, Никитин, 2011).

Литературные данные и наши собственные наблюдения послужили основой для гипотезы, описывающей детерминацию числа сосков у домашних свиней на фенотипическом уровне. Гипотеза предполагает, что вариация числа сосков у домашних свиней является результатом случайной комбинации 3 фенотипов 6 пар сосков.

Гипотеза содержит три положения.

1. Стабильная компонента признака «число сосков» у домашних свиней представлена 4 полными парами (8 сосками), а вариабельная, соответственно, 6 парами сосков.

2. Для каждой из вариабельных пар сосков возможны 3 фенотипа: 0 – отсутствие 2 сосков (отсутствие пары), 1 – присутствие только 1 соска (неполная пара), 2 – присутствие 2 сосков (полная пара).

3. Проявление признака в каждой отдельной паре не зависит от его проявления в других парах, т. е. взаимодействия между парами сосков отсутствуют.

Цель настоящего исследования заключается в проверке этой гипотезы на 5 представительных выборках домашних свиней. Конкретная задача заключается в выяснении того, насколько могут быть близки ожидаемые согласно гипотезе распределения особей по классам признака к фактическим, без введения каких-либо дополнительных факторов и параметров. В случае получения результатов, позволяющих принять тестируемую гипотезу, ее можно рассматривать как модель фенотипической детерминации числа сосков у домашних свиней, т. е. как модель формирования сложного признака из отдельных субпризнаков на фенотипическом уровне.

Материал и методы

В исследовании использовали 5 выборок домашних свиней общей численностью 18160 особей (табл. 1). 2 из них представлены свиньями породы ландрас: это 10501 особь из стада Экспериментального хозяйства СО РАН и 989 особей из первого тома Государственной племенной книги свиней породы ландрас (Государственная..., 1971). Выборку свиней кемеровской породы представляют 2975 особей из племзавода «Юргинский» Кемеровской области. Две выборки представлены мини-свиньями Экспериментального хозяйства СО РАН. Первая выборка – 3181 особь из первоначального стада минисибсов. Эта группа мини-свиней прекратила существование в 1988 г. из-за массовой вспышки бруцеллеза на свиноферме Экспериментального хозяйства. Вторая выборка – 514 особей из созданного в 1992 г. кандидатом биологических наук И.Г. Гореловым нового стада мини-свиней. Основой для этого стада послужили гибриды, полученные скрещиванием в Экспериментальном хозяйстве СО РАН 4 лично отобранных и привезенных из Подмоскovie И.Г. Гореловым светлогорских мини-хряков с 13 свиноматками крупной белой породы из племзавода «Большевик» Новосибирской области (Князев, Никитин, 2006). В настоящее время потомками этих животных являются мини-свиньи Экспериментального хозяйства СО РАН,

Таблица 1

Распределение особей по числу сосков в выборках домашних свиной

Число сосков	Ландрас ЭХ	Ландрас ГПК	Кемеровская порода	Минисибс	Гибридные мини-свиньи
8	0	0	0	1	0
9	0	0	0	2	0
10	47	0	9	407	14
11	147	1	26	670	34
12	1454	119	394	1219	159
13	1792	74	560	487	123
14	4789	679	1774	328	163
15	1393	75	126	61	17
16	757	35	80	5	4
17	90	4	5	0	0
18	30	2	1	1	0
19	2	0	0	0	0
Всего	10501	989	2975	3181	514
$(\bar{X} \pm s_x)$	13,81 ± 0,012	13,85 ± 0,029	13,61 ± 0,017	11,96 ± 0,022	12,88 ± 0,051
$(\mu \pm s_\mu)$	5,95 ± 0,059	4,21 ± 0,182	4,61 ± 0,107	5,70 ± 0,106	5,29 ± 0,263

Обозначения: $(\bar{X} \pm s_x)$ – среднее значение признака и его ошибка, $(\mu \pm s_\mu)$ – среднее число фенотипов (классов признака) и его ошибка; ЭХ – Экспериментальное хозяйство СО РАН, ГПК – государственная племенная книга.

так же именуемые минисибсы (Тихонов, 2010). В дальнейшем во избежание путаницы первая выборка мини-свиной в тексте статьи именуется «минисибсы», вторая – «гибридные мини-свиньи». Выборки животных Экспериментального хозяйства (ландрасы и две группы мини-свиной) представлены новорожденными поросятами. В выборку животных из Государственной племенной книги входят прошедшие отбор племенные свиньи, поэтому в соответствии со стандартными требованиями среди них отсутствуют особи с числом сосков менее 12. В выборку кемеровской породы входят 1746 новорожденных поросят и 1229 племенных свиной, среди последних особи с числом сосков менее 12 также отсутствуют.

Статистическую обработку данных, построение ожидаемых по закону нормального распределения вариационных рядов и сравнение выборок проводили общепринятыми методами (Лакин, 1990). Разнообразие выборок по изучаемому признаку оценивали на основании среднего числа фенотипов (морф. классов признака) $\mu = (\sqrt{p_1} + \dots + \sqrt{p_m})^2$ со стандартной ошибкой $S_\mu = \sqrt{\frac{\mu(m - \mu)}{N}}$, где $p_1 \dots p_m$ – частоты фено-

типов, m – число фенотипов, N – объем выборки (Животовский, 1991). Достоверность различия средних значений признака, среднего числа фенотипов и отличие показателя r от единицы оценивали критерием Стьюдента (Лакин, 1990). При расчете критерия χ^2 классы признака с числом особей менее 5 объединялись. Адекватность гипотезы в целом оценивали суммарным критерием χ^2 по данным 5 выборок (Животовский, 1991).

В соответствии с гипотезой число сосков у особи описывает формула $NT = 8 + n_0 + n_1 + n_2$, где NT (number of teats) – число сосков, n_0 – число пар с фенотипом 0 (отсутствие пары), n_1 – число пар с фенотипом 1 (неполная пара), n_2 – число пар с фенотипом 2 (полная пара). NT – целые числа от 8 до 20, а n_0 , n_1 и n_2 – целые числа от 0 до 6. Таким образом, в 13 возможных классах признака может быть от 1 до 141 фенотипического сочетания (табл. 2). Гипотеза не содержит в явном виде неравных вероятностей рождения животных с четным и нечетным числом сосков: число фенотипических сочетаний, формирующих четное и нечетное число сосков у особи, соответственно равно 365 и

Таблица 2

Фенотипическая неоднородность классов признака «число сосков»

Класс признака	Группы фенотипических сочетаний, формирующих значение признака	Число фенотипических сочетаний
8	$1(8+6nt_0+0nt_1+0nt_2)$	1
9	$6(8+5nt_0+1nt_1+0nt_2)$	6
10	$6(8+4nt_0+0nt_1+1nt_2)+15(8+4nt_0+2nt_1+0nt_2)$	21
11	$30(8+3nt_0+1nt_1+1nt_2)+20(8+3nt_0+3nt_1+0nt_2)$	50
12	$15(8+2nt_0+0nt_1+2nt_2)+60(8+2nt_0+2nt_1+1nt_2)+15(8+2nt_0+4nt_1+0nt_2)$	90
13	$60(8+3nt_0+1nt_1+2nt_2)+60(8+2nt_0+3nt_1+1nt_2)+6(8+1nt_0+5nt_1+0nt_2)$	126
14	$20(8+3nt_0+0nt_1+3nt_2)+90(8+2nt_0+2nt_1+2nt_2)+30(8+1nt_0+4nt_1+1nt_2)+1(8+0nt_0+6nt_1+0nt_2)$	141
15	$60(8+2nt_0+1nt_1+3nt_2)+60(8+1nt_0+3nt_1+2nt_2)+6(8+0nt_0+5nt_1+1nt_2)$	126
16	$15(8+2nt_0+0nt_1+4nt_2)+60(8+1nt_0+2nt_1+3nt_2)+15(8+0nt_0+4nt_1+2nt_2)$	90
17	$30(8+1nt_0+1nt_1+4nt_2)+20(8+0nt_0+3nt_1+3nt_2)$	50
18	$6(8+1nt_0+0nt_1+5nt_2)+15(8+0nt_0+2nt_1+4nt_2)$	21
19	$6(8+0nt_0+1nt_1+5nt_2)$	6
20	$(8+0nt_0+0nt_1+6nt_2)$	1
Всего	28 групп фенотипических сочетаний	729 сочетаний

Обозначения: nt_0 – пары с фенотипом 0 (отсутствие сосков), nt_1 – пары с фенотипом 1 (неполная пара), nt_2 – пары с фенотипом 2 (полная пара).

364 (табл. 2). Однозначная связь между значением признака и конкретным фенотипическим сочетанием существует в минимальном (8 сосков) и максимальном (20 сосков) классах. 11 значениям признака соответствует множество фенотипических сочетаний. Следствием этого внутриклассового фенотипического полиморфизма является то, что при увеличении в популяции доли особей с числом сосков большим или меньшим 14 среднее число неполных пар снижается (табл. 2). Данное явление, собственно, и имело место при отборе, направленном на увеличение среднего числа сосков в популяции (Князев и др., 2010, Князев, Никитин, 2011).

Распределение частот фенотипов для отдельной пары сосков представляет сумму $a_i + b_i + c_i = 1$, где i – условный номер пары сосков, a_i – частота особей с отсутствием сосков i -той пары, b_i – частота особей с одним соском в i -й паре, c_i – частоты особей с двумя сосками в i -й паре. Признак «число сосков» формируют 10 пар сосков, которым были присвоены условные номера от 1 до 10. Номера с 1-го по 4-й присвоены парам, относящимся к стабильной компоненте признака, номера с 5-го по 10-й – парам, детерминирующим изменчивость

признака. Эти условные номера не связаны с расположением обозначаемых ими пар сосков, порядок их расположения может быть любым. Гипотеза предполагает случайную комбинацию фенотипов 6 переменных пар сосков, поэтому распределение популяционных частот фенотипических сочетаний рассчитывается как произведение сумм $a_i + b_i + c_i$ по формуле $(a_5 + b_5 + c_5)(a_6 + b_6 + c_6)(a_7 + b_7 + c_7) \times (a_8 + b_8 + c_8)(a_9 + b_9 + c_9)(a_{10} + b_{10} + c_{10}) = 1$, где $a_5 \dots a_{10}$ – частоты особей с отсутствием пары, обозначенной в индексе; $b_5 \dots b_{10}$ – частоты особей с неполной парой (один сосок), обозначенной в индексе; $c_5 \dots c_{10}$ – частоты особей с полной парой, обозначенной в индексе. После умножения сумм формула содержит 729 членов, которые соответствуют фенотипическим сочетаниям, формирующим у особи конкретное количественное значение признака – число сосков (табл. 2). Фенотипический полиморфизм внутри классов признака «число сосков», т. е. распределение по классам признака фенотипических сочетаний субпризнаков, описывает система уравнений, в которой $f_8 \dots f_{20}$ – популяционные частоты особей с числом сосков от 8 до 20.

$$\left\{ \begin{array}{l}
 f_8 = a_5 a_6 a_7 a_8 a_9 a_{10} \\
 f_9 = a_5 a_6 a_7 a_8 a_9 b_{10} + \dots + b_5 a_6 a_7 a_8 a_9 a_{10} \\
 f_{10} = (a_5 a_6 a_7 a_8 a_9 c_{10} + \dots + c_5 a_6 a_7 a_8 a_9 a_{10}) + (a_5 a_6 a_7 a_8 b_9 b_{10} + \dots + b_5 b_6 a_7 a_8 a_9 a_{10}) \\
 f_{11} = (a_5 a_6 a_7 a_8 b_9 c_{10} + \dots + c_5 b_6 a_7 a_8 a_9 a_{10}) + (a_5 a_6 a_7 b_8 b_9 b_{10} + \dots + b_5 b_6 b_7 a_8 a_9 a_{10}) \\
 f_{12} = (a_5 a_6 a_7 a_8 c_9 c_{10} + \dots + c_5 c_6 a_7 a_8 a_9 a_{10}) + (a_5 a_6 a_7 b_8 b_9 c_{10} + \dots + c_5 b_6 b_7 a_8 a_9 a_{10}) + \\
 + (a_5 a_6 b_7 b_8 b_9 b_{10} + \dots + b_5 b_6 b_7 b_8 a_9 a_{10}) \\
 f_{13} = (a_5 a_6 a_7 b_8 c_9 c_{10} + \dots + c_5 c_6 b_7 a_8 a_9 a_{10}) + (a_5 a_6 b_7 b_8 b_9 c_{10} + \dots + c_5 b_6 b_7 b_8 a_9 a_{10}) + \\
 + (a_5 b_6 b_7 b_8 b_9 b_{10} + \dots + b_5 b_6 b_7 b_8 b_9 a_{10}) \\
 f_{14} = (a_5 a_6 a_7 c_8 c_9 c_{10} + \dots + c_5 c_6 c_7 a_8 a_9 a_{10}) + (a_5 a_6 b_7 b_8 c_9 c_{10} + \dots + c_5 c_6 b_7 b_8 a_9 a_{10}) + \\
 + (a_5 b_6 b_7 b_8 b_9 c_{10} + \dots + c_5 b_6 b_7 b_8 b_9 a_{10}) + b_5 b_6 b_7 b_8 b_9 b_{10} \\
 f_{15} = (a_5 a_6 b_7 c_8 c_9 c_{10} + \dots + c_5 c_6 c_7 b_8 a_9 a_{10}) + (a_5 b_6 b_7 b_8 c_9 c_{10} + \dots + c_5 c_6 b_7 b_8 b_9 a_{10}) + \\
 + (b_5 b_6 b_7 b_8 b_9 c_{10} + \dots + c_5 b_6 b_7 b_8 b_9 b_{10}) \\
 f_{16} = (a_5 a_6 c_7 c_8 c_9 c_{10} + \dots + c_5 c_6 c_7 c_8 a_9 a_{10}) + (a_5 b_6 b_7 c_8 c_9 c_{10} + \dots + c_5 c_6 c_7 b_8 b_9 a_{10}) + \\
 + (b_5 b_6 b_7 b_8 c_9 c_{10} + \dots + c_5 c_6 b_7 b_8 b_9 b_{10}) \\
 f_{17} = (a_5 b_6 c_7 c_8 c_9 c_{10} + \dots + c_5 c_6 c_7 c_8 b_9 a_{10}) + (a_5 b_6 b_7 c_8 c_9 c_{10} + \dots + c_5 c_6 c_7 b_8 b_9 b_{10}) \\
 f_{18} = (a_5 c_6 c_7 c_8 c_9 c_{10} + \dots + c_5 c_6 c_7 c_8 c_9 c_{10}) + (b_5 b_6 c_7 c_8 c_9 c_{10} + \dots + c_5 c_6 c_7 c_8 b_9 a_{10}) \\
 f_{19} = b_5 c_6 c_7 c_8 c_9 c_{10} + \dots + c_5 c_6 c_7 c_8 c_9 b_{10} \\
 f_{20} = c_5 c_6 c_7 c_8 c_9 c_{10} \\
 f_8 + f_9 + f_{10} + f_{11} + f_{12} + f_{13} + f_{14} + f_{15} + f_{16} + f_{17} + f_{18} + f_{19} + f_{20} = 1
 \end{array} \right.$$

В более компактной форме эта система выглядит следующим образом:

$$\left\{ \begin{array}{l}
 f_8 = a_{j_1} a_{j_2} a_{j_3} a_{j_4} a_{j_5} a_{j_6} \\
 f_9 = \sum a_{j_1} a_{j_2} a_{j_3} a_{j_4} a_{j_5} b_{j_6} \\
 f_{10} = \sum a_{j_1} a_{j_2} a_{j_3} a_{j_4} a_{j_5} c_{j_6} + \sum a_{j_1} a_{j_2} a_{j_3} a_{j_4} b_{j_5} b_{j_6} \\
 f_{11} = \sum a_{j_1} a_{j_2} a_{j_3} a_{j_4} b_{j_5} c_{j_6} + \sum a_{j_1} a_{j_2} a_{j_3} a_{j_4} b_{j_5} b_{j_6} \\
 f_{12} = \sum a_{j_1} a_{j_2} a_{j_3} a_{j_4} c_{j_5} c_{j_6} + \sum a_{j_1} a_{j_2} a_{j_3} b_{j_4} b_{j_5} c_{j_6} + \sum a_{j_1} a_{j_2} b_{j_3} b_{j_4} b_{j_5} b_{j_6} \\
 f_{13} = \sum a_{j_1} a_{j_2} a_{j_3} b_{j_4} c_{j_5} c_{j_6} + \sum a_{j_1} a_{j_2} b_{j_3} b_{j_4} b_{j_5} c_{j_6} + \sum a_{j_1} b_{j_2} b_{j_3} b_{j_4} b_{j_5} b_{j_6} \\
 f_{14} = \sum a_{j_1} a_{j_2} a_{j_3} c_{j_4} c_{j_5} c_{j_6} + \sum a_{j_1} a_{j_2} b_{j_3} b_{j_4} c_{j_5} c_{j_6} + \sum a_{j_1} b_{j_2} b_{j_3} b_{j_4} b_{j_5} c_{j_6} + b_{j_1} b_{j_2} b_{j_3} b_{j_4} b_{j_5} b_{j_6} \\
 f_{15} = \sum a_{j_1} a_{j_2} b_{j_3} c_{j_4} c_{j_5} c_{j_6} + \sum a_{j_1} b_{j_2} b_{j_3} b_{j_4} c_{j_5} c_{j_6} + \sum b_{j_1} b_{j_2} b_{j_3} b_{j_4} b_{j_5} b_{j_6} \\
 f_{16} = \sum a_{j_1} a_{j_2} c_{j_3} c_{j_4} c_{j_5} c_{j_6} + \sum a_{j_1} b_{j_2} b_{j_3} c_{j_4} c_{j_5} c_{j_6} + \sum b_{j_1} b_{j_2} b_{j_3} b_{j_4} c_{j_5} c_{j_6} \\
 f_{17} = \sum a_{j_1} b_{j_2} c_{j_3} c_{j_4} c_{j_5} c_{j_6} + \sum b_{j_1} b_{j_2} b_{j_3} c_{j_4} c_{j_5} c_{j_6} \\
 f_{18} = \sum a_{j_1} c_{j_2} c_{j_3} c_{j_4} c_{j_5} c_{j_6} + \sum b_{j_1} b_{j_2} c_{j_3} c_{j_4} c_{j_5} c_{j_6} \\
 f_{19} = \sum b_{j_1} c_{j_2} c_{j_3} c_{j_4} c_{j_5} c_{j_6} \\
 f_{20} = c_{j_1} c_{j_2} c_{j_3} c_{j_4} c_{j_5} c_{j_6} \\
 \sum f_i = 1
 \end{array} \right.$$

при условии $\begin{cases} j_1 + j_2 + j_3 + j_4 + j_5 + j_6 = 45 \\ j_1 \neq j_2 \neq j_3 \neq j_4 \neq j_5 \neq j_6 \end{cases}$, где

j_1, j_2, j_3, j_4, j_5 и j_6 – целые числа, каждое из которых может принимать значения от 5 до 10; f_i – популяционные частоты особей с числом сосков от 8 до 20 ($f_8 \dots f_{20}$).

Система уравнений содержит 18 параметров (частот фенотипов переменных пар сосков), что для проверяемой гипотезы является ми-

нимумом. Выборочные значения параметров a_i , b_i и c_i определяли методом максимального правдоподобия. Для этого использовали полученную на основании принципов, изложенных в литературе (Гмурман, 1999; Ли, 1978), формулу $L = \sum n_i \ln f_i$, где n_i – фактическая численность особей в i -м классе признака, f_i – ожидаемая частота особей в i -м классе признака (Князев и др., 2003). Так как метод максимального правдоподобия способен обеспечить сходство

ожидаемого и фактического распределений, наилучшее только в рамках тестируемой гипотезы, ожидалось следующие возможные результаты его применения:

1. Полученные методом максимального правдоподобия ожидаемые распределения особей по классам признака не отличаются значимо от выборочных. Положения гипотезы верны, число параметров достаточно.

2. Частоты каких-либо параметров во всех выборках равны нулю. Гипотеза избыточна, число параметров следует сократить.

3. Достоверное сходство ожидаемых и фактических распределений в отдельных выборках отсутствует. Число параметров гипотезы недостаточно.

4. Достоверное сходство ожидаемых и фактических распределений отсутствует во всех выборках. Гипотеза неверна.

Сходство ожидаемых и фактических распределений оценивали показателем сходства $r = \sum_{i=1}^m \sqrt{p_i q_i}$, где r – показатель сходства, p_i и q_i – частоты морф (классов признака) в сравниваемых распределениях, m – число морф. Ошибка этого показателя

$$s_r = \sqrt{\frac{1}{4} \left[\frac{1 - q_0 - r^2}{2N_1} + \frac{1 - p_0 - r^2}{2N_2} \right]},$$

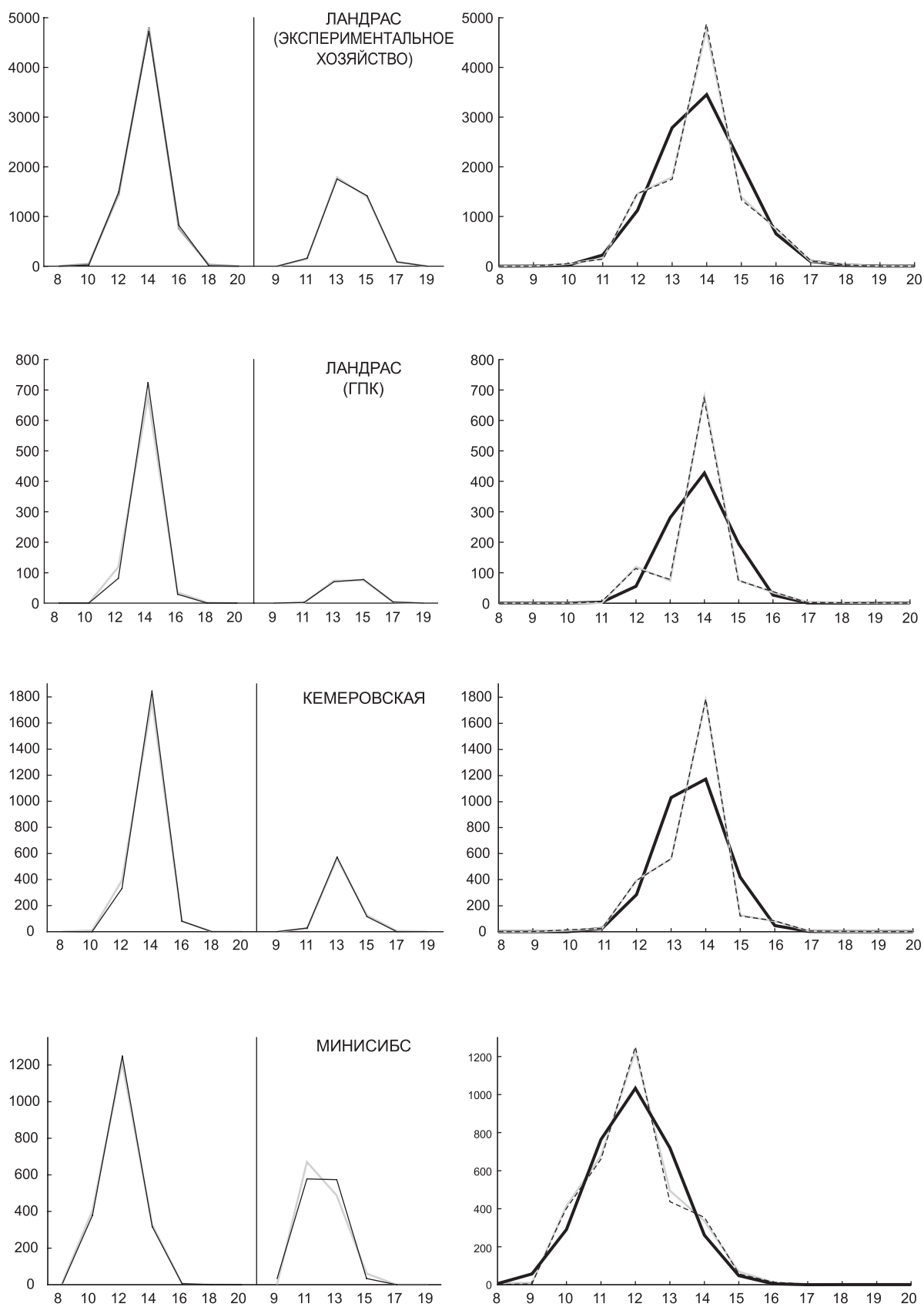
где p_0 – суммы частот морф первой группировки, не представленных во второй, q_0 – сумма частот морф второй группировки, не представленных в первой, N_1 и N_2 – объемы первой и второй группировок (Животовский, 1991). При $r = 1$ распределения идентичны, при $r = 0$ между распределениями нет ничего общего. Поэтому достоверность сходства ожидаемых и эмпирических распределений оценивали как значимость отличия показателя r от 1.

Результаты исследования

Прежде чем приступить к непосредственной проверке гипотезы, был проведен анализ особенностей выборок, предназначенных для этой цели. Интервал изменчивости числа сосков в массиве данных 5 выборок лежит от 8 до 19 сосков (табл. 1). Минимальное число сосков, соответствующее 4 полным парам, наблюдается в выборке минисибсов, максимальное, соответствующее 10 парам (9 полным и 1 неполной), –

в выборке ландрасов Экспериментального хозяйства СО РАН. Анализ выборок показал существенные различия между ними как по среднему значению признака, так и по среднему числу его фенотипов (классов с разным числом сосков у особи). Эти различия отчасти могут быть обусловлены особенностями выборочных распределений признака (табл. 1, рис. 1). В 3 выборках свиней продуктивных пород модальным является класс особей с числом сосков, равным 14. В выборке свиней минисибс модальный класс представляют особи с 12 сосками. В выборке гибридных мини-свиней наблюдаются два пика – на классах особей с 12 и 14 сосками (второй пик несколько выше, соответственно 159 и 163 особи). По среднему значению признака выборки могут быть ранжированы в порядке убывания следующим образом: ландрасы ГПК, ландрасы Экспериментального хозяйства, кемеровская порода, гибридные мини-свиньи, минисибсы. Все различия между выборками за единственным исключением (выборки свиней породы ландрас) статистически значимы ($p < 0,001$). Результаты сравнения выборок по среднему числу фенотипов интересны тем, что достоверные различия отсутствуют между ландрасами ГПК и кемеровской породой, а также между двумя выборками мини-свиней (табл. 3). В остальных случаях различия статистически значимы ($p < 0,05 - p < 0,001$).

Картина, наблюдаемая для выборок свиней породы ландрас, вполне закономерна. Обе выборки относятся к одной генеральной совокупности (порода ландрас), и поэтому отсутствие значимых различий средних значений признака естественно. Их различие по среднему числу фенотипов обусловлено тем, что ландрасы Экспериментального хозяйства СО РАН представлены новорожденными поросятами, а ландрасы, внесенные в Государственную племенную книгу, в соответствии со стандартом имеют число сосков не менее 12. То есть в первом случае это животные, не прошедшие искусственного отбора, а потому выборка содержит все возможные или большинство возможных для данной популяции фенотипов. Во втором случае часть фенотипов из выборки исключена. Выборка свиней кемеровской породы на 41,31 % состоит из племенных животных с числом сосков не менее 12. Очевидно, поэтому ее отличие по среднему



Начало рис. 1.

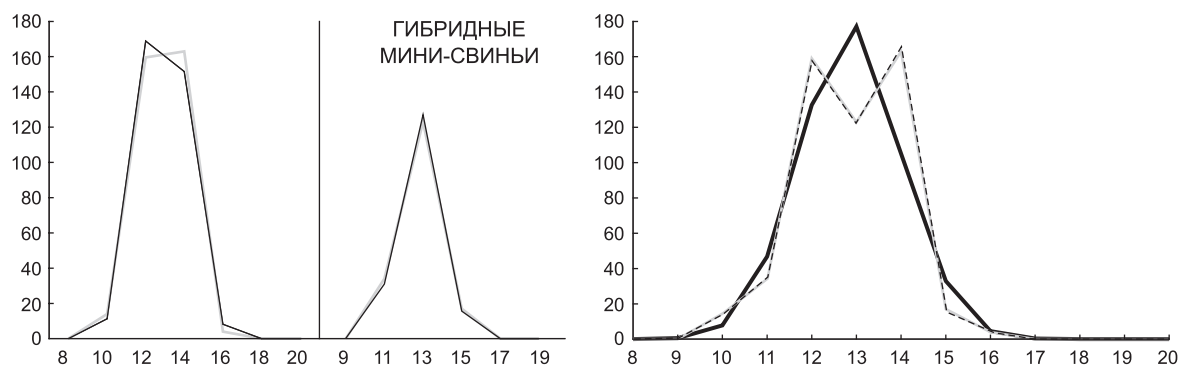


Рис. 1. Эмпирические и ожидаемые распределения особей по числу сосков в выборках домашних свиней.

На графиках левой стороны рисунка вариационный ряд разделен на две группы с четными и нечетными значениями признака; на графиках правой стороны вариационный ряд представлен без разделения на четные и нечетные группы значений.

Обозначения: серая линия – эмпирическое распределение особей; черная жирная линия – распределение, ожидаемое по закону нормального распределения; черная тонкая линия – распределения, ожидаемые по закону нормального распределения для рядов с четными и нечетными значениями признака; черная пунктирная линия – распределение, ожидаемое согласно модели. Ось x – класс признака по числу сосков; ось y – число особей в классе.

Таблица 3

Оценка сходства ожидаемых распределений с фактическими в выборках домашних свиней

Выборка	Нормальное распределение		Чередование значений двух нормальных распределений		Фенотипическая детерминация признака	
	$r \pm s_r$	t_{1-r}	$r \pm s_r$	t_{1-r}	$r \pm s_r$	t_{1-r}
Ландрас ЭХ	$0,9837 \pm 0,00088$	18,52***	$0,9994 \pm 0,00017$	3,54***	$0,9999 \pm 0,00007$	1,43 ^{нд}
Ландрас ГПК	$0,9308 \pm 0,00581$	11,91***	$0,9977 \pm 0,00107$	2,15*	$0,9998 \pm 0,00031$	0,65 ^{нд}
Кемеровская порода	$0,9600 \pm 0,00257$	15,56***	$0,9979 \pm 0,00059$	3,56***	$0,9999 \pm 0,00012$	0,83 ^{нд}
Минисибс	$0,9936 \pm 0,00100$	6,40***	$0,9982 \pm 0,00053$	3,40***	$0,9994 \pm 0,00003$	1,94 ^{нд}
Гибридные мини-свиньи	$0,9852 \pm 0,00378$	3,92**	$0,9994 \pm 0,00076$	0,79 ^{нд}	$1,0000 \pm 0,00000$	–

Обозначения: *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; ^{нд} – различие недостоверно; r – показатель сходства; s_r – ошибка показателя сходства; t_{1-r} – критерий Стьюдента для отличия показателя сходства от единицы.

числу фенотипов от выборки ландрасов ГПК незначимо, и она, подобно последней, достоверно отличается от выборок, представленных новорожденными поросятами. Отсутствие различий по среднему числу фенотипов между выборками мини-свиней может быть обусловлено двумя причинами: во-первых, отсутствием отбора по числу сосков, во-вторых, тем, что светлогорские мини-свиньи являются потомками скрещивания минисибсов с геттингенскими мини-свиньями (Тихонов, 2010).

Так как число сосков у домашних свиней является количественным дискретным признаком,

была проверена гипотеза о соответствии выборочных распределений закону нормального распределения признака. Проверка показала, что в целом данная гипотеза статистически значимо отвергается ($\sum \chi^2 = 2950,72$, $\sum d.f. = 31$, $p < 0,001$). Совпадений ожидаемых и эмпирических распределений в выборках не наблюдается (рис., табл. 2). Отклонения от нормальности, обусловленные выбраковкой животных с числом сосков меньше 12, в данном случае, очевидно, не имеют существенного значения. Распределение признака не нормально в выборке новорожденных ландрасов Экспериментального хозяйства,

где этот отбор еще не проводился, и в двух выборках мини-свиней, у которых отбор по числу сосков не проводился и среди племенных животных. Причина наблюдаемой в выборках ненормальности распределений заключается в самом признаке, для которого характерна неравная вероятность четных и нечетных значений (Понд, Хаупт, 1983). В исследуемых выборках доля особей с нечетными значениями признака составляет: 15,57 % у ландрасов ГПК, 24,10 % у кемеровских свиней, 32,61 % у ландрасов Экспериментального хозяйства, 33,85 % у гибридных мини-свиней и 38,35 % у минисибсов. Очевидно, что наложение неравной вероятности четных и нечетных значений признака на ряды выборочных распределений и приводит к их ненормальности, а также обуславливает «бимодальность» распределения в выборке гибридных мини-свиней. В связи с этим было предположено, что особенности выборочных распределений вызваны чередованием величин, относящихся к двум нормальным распределениям, одно из которых представлено четными, а второе нечетными значениями признака. Проверка показала, что хотя совпадение ожидаемых и эмпирических распределений существенно улучшилось (рис., табл. 2), в целом данная гипотеза также отвергается ($\sum\chi^2 = 460,36$, $\sum d.f. = 31$, $p < 0,001$).

После проведения всех необходимых предварительных статистических сравнений и проверки гипотез о нормальности распределения признака – числа сосков переходим непосредственно к цели настоящего исследования. Эта цель заключается в проверке гипотезы о том, что число сосков у домашней свиньи может быть результатом случайного сочетания трех фенотипов 6 субпризнаков (пар сосков). Аппроксимация параметров гипотезы показала, что полученные методом максимального правдоподобия ожидаемые выборочные распределения особей по классам признака не отличаются статистически значимо от наблюдаемых фактически (табл. 3) и визуально практически полностью с ними совпадают (рис.). В целом по распределениям 5 выборок данная гипотеза не отвергается ($\sum\chi^2 = 24,72$, $\sum d.f. = 31$), т. е. может быть принята в качестве модели фенотипической детерминации числа сосков у домашних свиней. Исключение из репродуктивного ядра

особей с числом сосков менее 12, несомненно, вносит искажения как в выборочные, так и в ожидаемые распределения. Однако ими можно пренебречь, так как частота рождения таких особей у свиней продуктивных пород крайне мала. Доля новорожденных с числом сосков менее 12 составляет 1,85 % у ландрасов Экспериментального хозяйства и 2,00 % у свиней кемеровской породы.

Принципиальное значение, очевидно, имеет использование параметров, избыточных для совокупности, из которой взята выборка. При использовании всех 18 параметров метод максимального правдоподобия показывает в выборке ландрасов ГПК возможность полиморфизма 5-й условной пары (табл. 4). Преимущество этого варианта над вариантом, в котором 5-я пара всегда полная (15 параметров), весьма незначительно: $L_{18} = -1093,40$ и $L_{15} = -1093,52$. Однако его оказалось достаточно, чтобы максимально правдоподобным оказался вариант, допускающий у ландрасов возможность рождения особей всего с 4 парами сосков, что для этой породы абсолютно нереально. В выборке свиней кемеровской породы метод максимального правдоподобия показал возможность полиморфизма 10-й условной пары сосков (табл. 4). Однако за все время существования юргинской популяции (более 60 лет) животных с числом сосков более 18 зафиксировано не было. Правдоподобие полного варианта гипотезы в данном случае также лишь незначительно превосходит правдоподобие варианта с отсутствием 10-й пары, соответственно, $L_{18} = -3619,35$ и $L_{15} = -3619,48$. Аналогичная картина наблюдается у минисибсов: $L_{18} = -5306,22$ и $L_{15} = -5306,94$, в выборке которых особи с 10 парами отсутствуют. Однако в последнем случае нельзя исключить, что полный вариант гипотезы дал корректный результат. Минисибсы были выведены на основе скрещивания ландрасов с вьетнамской масковой породой (Тихонов, 2010). В процессе совершенствования они неоднократно скрещивались с ландрас-кабаньими гибридами и собственно ландрасами, поэтому вероятность полиморфизма 10-й пары сосков хотя и мала, но все же существует. В двух других случаях вероятности полиморфизмов, показанных методом максимального правдоподобия (в 5-й паре у ландрасов и в 10-й паре у кемеровских сви-

Таблица 4

Полученные методом максимального правдоподобия
параметры гипотезы фенотипической детерминации числа сосков у домашних свиней

Частота	Ландрас ЭХ	Ландрас ГПК	Кемеровская порода	Минисибс	Гибридные мини-свиньи
a_5	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000
b_5	0,000	0,019 (0,000)	0,000	0,002	0,000
c_5	1,000	0,981 (1,000)	1,000	0,996	1,000
a_6	0,038	0,000	0,036	0,206	0,087
b_6	0,064	0,019 (0,037)	0,010	0,288	0,153
c_6	0,898	0,981 (0,63)	0,54	0,06	0,60
a_7	0,79	0,39	0,24	0,44 (0,50)	0,45
b_7	0,63	0,48 (0,50)	0,01	0,59	0,23
c_7	0,58	0,13 (0,11)	0,75	0,97 (0,91)	0,32
a_8	0,11	0,12	0,78 (0,64)	0,72 (0,65)	0,02
b_8	0,05	0,75	0,00	0,3 (0,112)	0,73
c_8	0,084	0,013	0,022 (0,036)	0,015 (0,023)	0,025
a_9	0,923	0,956	0,948 (0,939)	0,972 (0,946)	1,000
b_9	0,056	0,024	0,051	0,16 (0,032)	0,000
c_9	0,021	0,020	0,001 (0,010)	0,012 (0,022)	0,000
a_{10}	0,923	0,977	0,978 (1,000)	0,973 (1,000)	1,000
b_{10}	0,056	0,000	0,000	0,015 (0,000)	0,000
c_{10}	0,021	0,023	0,22 (0,000)	0,012 (0,000)	0,000

Обозначения: $a_5...a_{10}$ – частоты особей с отсутствием пары, обозначенной в индексе; $b_5...b_{10}$ – частоты особей с неполной парой, обозначенной в индексе; $c_5...c_{10}$ – частоты особей с полной парой, обозначенной в индексе. В скобках приведены значения параметров для ограниченных вариантов гипотезы.

ней), можно считать равными нулю. Очевидно, при анализе выборок правдоподобие варианта гипотезы с 18 параметрами следует сравнивать с правдоподобием вариантов, учитывающих минимальное и максимальное число полных пар в породах и популяциях, из которых взяты исследуемые выборки. В тех случаях, когда нет достоверного преимущества полного варианта гипотезы, следует выбирать вариант, по числу параметров соответствующий совокупности, из которой происходит выборка.

Обсуждение результатов

Исследование подтвердило гипотезу о том, что число сосков у домашних свиней может быть результатом случайной комбинации трех фенотипов шести субпризнаков (пар сосков). Гипотеза достаточно точно описывает распределение особей по данному признаку в породах

и популяциях, а обнаруженное ранее (Князев и др., 2010, Князев, Никитин, 2011) снижение среднего числа неполных пар, которое происходит при отборе, направленном на увеличение числа сосков, является одним из ее следствий. Гипотеза показывает, что для описания разнообразия домашних свиней по числу сосков может быть достаточно 6 полиморфных генов. Кроме того, в соответствии с гипотезой для числа сосков характерна фенотипическая (и, соответственно, связанная с ней генотипическая) неоднородность классов, которая может оказаться причиной низких коэффициентов наследуемости признака (Понд, Хаупт, 1983).

В дальнейшем гипотеза может быть использована в качестве модели формирования значений признака (числа сосков у домашних свиней) на фенотипическом уровне. В нее могут вноситься дополнения, учитывающие билатеральность признака, взаимодействия между

субпризнаками, влияние на признак внешних факторов и генетический контроль признака. В последнем случае становится возможным прогнозирование среднего числа сосков у потомков скрещиваний родителей с разным числом сосков, а также распределения этих потомков по классам признака.

Работа частично финансово поддержана программами Президиума РАН «Происхождение и эволюция биосферы», «Биоразнообразие и динамика генофондов».

Литература

- Волкопялов Б.П., Лус Я.Я., Шульженко И.Ф. Порода, генетика и селекция свиней. М.; Л.: Гос. изд-во с.-х. и колхозной лит-ры, 1934. 268 с.
- Государственная племенная книга свиней породы ландрас. Т. I. М.: Колос, 1971. 440 с.
- Гмурман В.Е. Теория вероятностей и математическая статистика. М.: Высш. шк., 1999. 480 с.
- Данилкин А.А. Свиньи (Suidae). Сер. «Млекопитающие России и сопредельных регионов». М.: Геос, 2002. 309 с.
- Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 272 с.
- Инструкция по бонитировке свиней. Главное управление животноводства (с Государственной инспекцией по племенному делу). М.: Колос, 1978. 16 с.
- Князев С.П., Дубровская Р.М., Фадеева Н.С. и др. Генетическая структура популяций лошадей рысистых пород по аллелям D-системы групп крови // С.-х. биология. 2003. № 4. С. 31–34.
- Князев С.П., Никитин С.В. Пренатальная приспособленность свиней и гетерозиготность по генам систем групп крови D, E, F, G // С.-х. биология. 2006. № 2. С. 95–102.
- Князев С.П., Никитин С.В. Стандартизирующий отбор и его последствия для генетической структуры популяции // Генетика. 2011. Т. 47. № 1. С. 103–114.
- Князев С.П., Никитин С.В., Швებель Т.И. Число и расположение сосков у свиней как показатель стабильности развития популяции // С.-х. биология. 2010. № 2. С. 25–28.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Наука, 1990. 352 с.
- Ли Ч. Введение в популяционную генетику. М.: Мир, 1978. 555 с. (Li Ch. First course in Population Genetics. The Boxwood Press. Pacific Grove, California. 1976).
- Мазер К., Джинкс Дж. Биометрическая генетика. М.: Мир, 1985. 464 с. (Mather K., Jinks J.L. Biometrical genetics. The study of continuous variation)
- Понд У.Дж., Хаупт К.А. Биология свиньи. М.: Колос, 1983. 336 с.
- Тихонов В.Н. Лабораторные мини-свиньи. Генетика и медико-биологическое использование. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2010. 304 с.
- Яблоков А.В. Фенетика. М.: Наука, 1980. 136 с.
- Archer G., Dinlot S., Friend T.H. *et al.* Hierarchical phenotypic and epigenetic variation in cloned swine // Biol. of Reprod. 2003. V. 69. P. 430–436.
- Rothschild M.F., Hu J.-L., Jiang Z. Advances in QTL mapping in pigs // Intern. J. Biol. Sci. 2007. V. 3. № 3. P. 192–197.

MODEL OF PHENOTYPIC DETERMINATION OF THE NUMBER OF NIPPLES IN DOMESTIC PIGS

S.V. Nikitin¹, S.P. Knyazev², V.I. Ermolaev¹

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: nsv1956@mail.ru;

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

Summary

The article discusses the hypothesis based on the statement that the number of nipples in the domestic pig is a complex trait consisting of 10 subtraits, each of which is a separate pair of nipples. Test of the hypothesis in five representative (above 500 individuals) samples of domestic pigs confirmed it. This result allows the hypothesis to be considered a model of phenotypic determination of the number of nipples in domestic pigs.

Key words: domestic pig, number of nipples, economically important trait, breeding.

НЕОБЫЧНАЯ ДЕВИАЦИЯ РЕПРОДУКЦИИ В ДИНАСТИИ РОМАНОВЫХ: ПОВТОРНЫЕ РОЖДЕНИЯ ДЕВОЧЕК И ПРЯМОЕ ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПА ОТЦА

М.Д. Голубовский

Отдел молекулярной и клеточной биологии, Университет Калифорнии, Беркли, США,
e-mail: mdgolub@gmail.com

Приведено описание неизвестной ранее необычной девиации репродукции в многодетных семьях в царской династии Романовых. В ряду поколений этой династии наблюдалось повторное рождение 3–5 девочек подряд, обычно после рождения первой из них, независимо от того, какие по счету были роды. Этот признак назван «F-тетрада». В семьях с числом детей пять и более наблюдались распределения по полу в порядке рождения: FFFFF, FFFFFM, MFFFF, MFFFFMMM, MMFFFFMMF, MMFFFFMM. Склонность к повторному рождению девочек зависела от прямого влияния генотипа отца. Эта черта передавалась как по мужской, так и по женской линиям. Предполагаемый генетический фактор(ы) F-тетрады обладает доминантным действием с неполными проявлением и выражением. В рамках физиологической генетики аномалию можно определить таким образом: первое рождение девочки в браках, в которых отец несет фактор F-тетрады, повышает вероятность рождения девочек в серии последующих 3–4 родов. У матерей возникает определенная «репродуктивная память», которая меняет обычный профиль воспроизведения. Обсуждены возможные механизмы, способные привести к такой девиации.

Ключевые слова: генетика, репродукция, соотношение полов, отцовский эффект.

Анализ влияния отцовских генов на процессы оплодотворения и раннего эмбриогенеза – весьма актуальная проблема репродуктивной генетики. Здесь сделаны важные открытия и новые наблюдения на трех взаимосвязанных уровнях: цитогенетическом и молекулярном, эпигенетике оплодотворения и ранних стадий развития эмбриона, а также на стыке генетики и демографии. К оригинальным результатам первых двух уровней в данном контексте следует прежде всего отнести: доказательство преимущественно диспермного возникновения триплоидии (наиболее частой геномной аномалии); установление андрогенной природы полных (2n) и частичных (3n) пузырных заносов; открытие передачи через спермии и отцовского наследования centrosомы – самовоспроизводящейся органеллы, которая «оркеструет» первые деления дробления; обнаружение андрогенного химеризма (полного

и тканеспецифичного) в связи с аномалиями воспроизведения и онтогенеза; представление о постзиготной диплоидизации андрогенных триплоидов как источнике образования необычных вариантов химер, пузырных заносов и близнецов; особый характер архитектуры хромосом в сперматогенезе и особый характер репрограммирования мужского генома при оплодотворении (Пузырев, Степанов, 1997; Sutovsky, Shatten, 2000; Golubovsky, 2003; Zalensky, Zalenskaya, 2004; Malan *et al.*, 2006; Tesarik, 2005; Yanagimachi, 2005; Bestor, Burc'his, 2006; Баранов, Кузнецова, 2007; Robinson *et al.*, 2007; Carrell, 2008; Machin, 2009; Epigenetic Human Reproduction, 2011). Эти открытия и новации о специфике роли мужского генома в репродукции имеют прямое или косвенное отношение к истолкованию возникновения и наследования врожденных аномалий размножения (Crow, 2003).

Важные наблюдения о роли отцовских генов в процессе воспроизведения сделаны на стыке собственно генетики и демографии. Результаты шведско-английского длительного демографического анализа выявили, что воздействие внешних факторов (курение и голодание) в ранние критические периоды онтогенеза отцов имеет трансгенерационный эффект на здоровье и продолжительность жизни сыновей последующего поколения. Авторы связывают этот феномен с эпигенетической наследственностью (Pembrey *et al.*, 2006).

В рамках настоящего сообщения важны выводы систематических наблюдений о влиянии пола первого ребенка на исход следующих беременностей. Результаты 16-летнего анализа в популяции Дании показали, что в случаях, когда первородящие матери вынашивали мальчиков, у них достоверно увеличивались осложнения при последующих беременностях (привычное невынашивание, выкидыши). Среди матерей, которые при первой беременности вынашивали девочек, 76 % родили повторно без осложнений. Тогда как у матерей, которые впервые вынашивали мальчиков, успешные вторые роды наблюдались лишь в 56 % случаев, повышалось и число повторных осложнений. Предполагается, что носительство мужского плода инициирует у матерей иммунологическую реакцию против HY-мужских антигенов, активированных на фето-плацентарном уровне (Christiansen *et al.*, 2004). Этот конфликт ведет к отторжению и гибели плода при последующих беременностях. Обнаруженный феномен по своей семантике напоминает хорошо известную ситуацию резус-конфликта у Rh- матерей.

В генеалогии ряда шотландских родов были обнаружены семьи, в которых на протяжении двух веков проявлялось прямое отцовское влияние на близнецовость. Впервые проведено подробное генетико-демографическое описание данных семей (St Clair, Golubovsky, 2002). Цитогенетическая основа этой девиации связывается с действием на уровне гамет мужских генов, которые повышают вероятность диспермии или преждевременного деления мужских пронукулеусов (гетерохрония) с последующим двойным оплодотворением. Было постулировано, что подобные семьи могут служить естественной

селективной системой для обнаружения случаев полуидентичных близнецов, а также частоты естественного химеризма (Голубовский, Голубовская, 1984; Golubovsky, 2002, 2006). В 2007 г. предсказанные полуидентичные близнецы-химеры, имеющие один материнский и смесь отцовских наборов, были найдены и молекулярно идентифицированы (Souter *et al.*, 2007). Что касается частоты спонтанного химеризма на уровне целого организма или на тканевом уровне, то она остается неизвестной и может достигать в норме нескольких процентов (Boklage, 2006).

Приведенные выше факты показывают важность целенаправленных генетико-демографических наблюдений и семейного анализа особенностей репродукции. Особенно интересны описания репродуктивного профиля многодетных семей. Подробные сведения такого рода имеются в генеалогических записях правящих династий и семьях известных деятелей истории и культуры. Так, стерильность 3 из 6 вступивших в брак детей в многодетной семье Чарльза Дарвина позволила предположить в потомстве его близкородственного брака выщепление мутации мейоза, вызывающей нарушения гаметогенеза у обоих полов (Golubovsky, 2008).

В данной работе приводится первое описание неизвестной ранее необычной девиации репродукции в многодетных семьях династии Романовых. В ряду поколений этой династии наблюдалось последовательное рождение 3–5 девочек подряд обычно после рождения первой из них. Предрасположенность к повторному рождению девочек зависела от прямого влияния генотипа отца. Эта черта передавалась как по мужской, так и по женской линиям. Предполагаемый генетический фактор(ы) обладает доминантным действием с неполным проявлением и выражением. В рамках физиологической генетики ситуацию можно сформулировать в таком общем виде: первое рождение девочки в браках, где отец несет определенную доминантную мутацию, повышает вероятность рождения девочек в серии последующих 3–4 родов. У матерей возникает определенная «репродуктивная» память, которая меняет обычный профиль воспроизведения.

Материал и метод

Основные генеалогические и демографические данные о семейном статусе числа детей, порядке их рождения, продолжительности жизни в династии Романовых, а также в генеалогиях других династий взяты из специального сайта, посвященного разным сторонам всемирной истории, включая генеалогию и биографии, www.hrono.ru, а также сведений интернет-энциклопедии Wikipedia. В некоторых случаях привлекались другие источники. Например, полные данные о порядке рождения и полу всех родившихся детей в семье Николая I даны в книге А. Труайя (2007), а сведения о происхождении Марты Скавронской (первой императрицы Екатерины I) обсуждены в книге историка С.Ю. Дудакова (2011).

Родословные и их описание

Исходные посылки

В норме ожидаемая вероятность рождения мальчика или девочки составляет 0,5. В многодетных семьях ожидаемая вероятность рождения подряд 3, 4, 5, 6 детей одного пола составляет соответственно 1/8, 1/16, 1/32 и 1/64. Как отдельные единичные события случаи последовательного рождения 3–4 детей одного пола в многодетных семьях вполне ожидаемы и встречаются. Рассмотрим для примера последовательности рождения по полу в многодетных семьях ряда известных в истории лиц, обозначая символами F и M женский (female) и мужской (male) пол.

1. Король Великобритании Георг III (1738–1820) правил с 1760 г. 60 лет. Он был женат на Шарлотте Мекленбург-Стрелицкой и оказался самым многодетным британским королем во всей истории. В его браке за период в 21 год, с 1762 по 1783 г., родилось 15 детей: 9 сыновей и 6 дочерей в последовательности: MMMFMFFMMMFFMMF. Соотношение полов и их чередование здесь соответствуют ожидаемым, хотя серия рождений трех сыновей подряд MMM встретилась дважды (вероятность 1/8).

2. Внучка Георга III королева Великобритании Виктория (1819–1901) была на троне 64 года начиная с 1837 г. («викторианский период»). В

браке Виктории с принцем Альбертом Саксен-Кобургским за 17-летний период (1840–1857) родилось 9 детей. Распределение по полу было типично случайным: FMFMFFMMF.

3. У Льва Толстого в браке с Софьей Берс в период 25 лет (1853–1888) родилось 13 детей: MFMMFMFMMMFM. Здесь также типично случайное распределение рождений по полу с однократной последовательностью MMM (вероятность 1/8).

Эти три многодетные семьи могут служить своеобразным контролем к анализируемой репродуктивной девиации, наследуемой в династии Романовых. Девиация проявилась уже у царя Алексея Михайловича (1629–1676) и прослеживается в ряду поколений в других семьях династии по линии: Петр I – его правнук Павел I – два его сына Николай I и Михаил и, возможно, Николай II. Генеалогические данные с указанием последовательности рождений по полу приведены на рис. 1–3. Для всех этих многодетных семей характерна указанная особенность воспроизведения: серия последовательных рождений 4–5 девочек, обычно после рождения первой из них.

Царь Алексей Михайлович (1629–1676) из своей 47-летней жизни правил 31 год. Он был отцом 16 детей от двух браков. Трое его сыновей впоследствии стали царями. В первом браке с Марией Милославской родилось 13 детей за период 20 лет с 1649 по 1669 гг.: 5 сыновей и 8 дочерей (при последних тяжелых родах царица умерла от родовой горячки). Последовательность рождений детей по полу оказалась необычной: MFFMFFFFMFMMF – четыре подряд рождения дочерей (роды 5–8-е **FFFF**, выделены жирным шрифтом). Эту девиацию можно было бы считать редким случайным событием. Но оказалось, что она наследуется в ряду поколений. Обозначим последовательность рождений как минимум четырех девочек подряд как **FFFF**, или «F-тетрада».

Репродуктивная F-тетрада проявилась у двух сыновей (впоследствии царей) Алексея Михайловича – Ивана (Иван V) и Петра (Петр I), родившихся от разных жен. Иван был 12-м по счету ребенком Марии Милославской. Он прожил всего 30 лет, будучи провозглашен в 1682 г. (вместе с Петром) царем. С 1684 г. Иван был женат на Прасковье Салтыковой. От этого

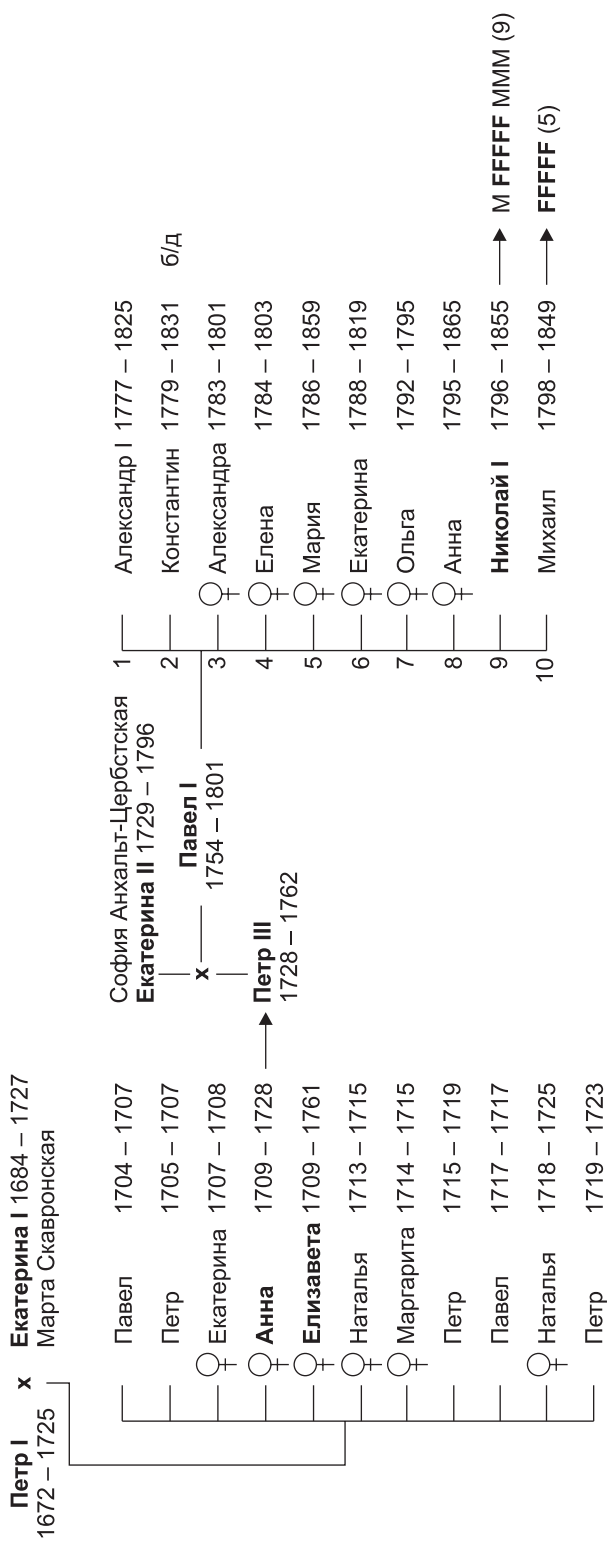


Рис. 1. Фрагменты родословной Петра I и его правнука Павла I, показывающие проявление признака «повторное рождение девочек», или «F-тетрада».

Пол ребенка: F – женский, M – мужской. Порядок символов соответствует порядку рождения детей. Жирным шрифтом обозначены две дочери Петра I и два сына императора Павла I; б/д – бездетность.

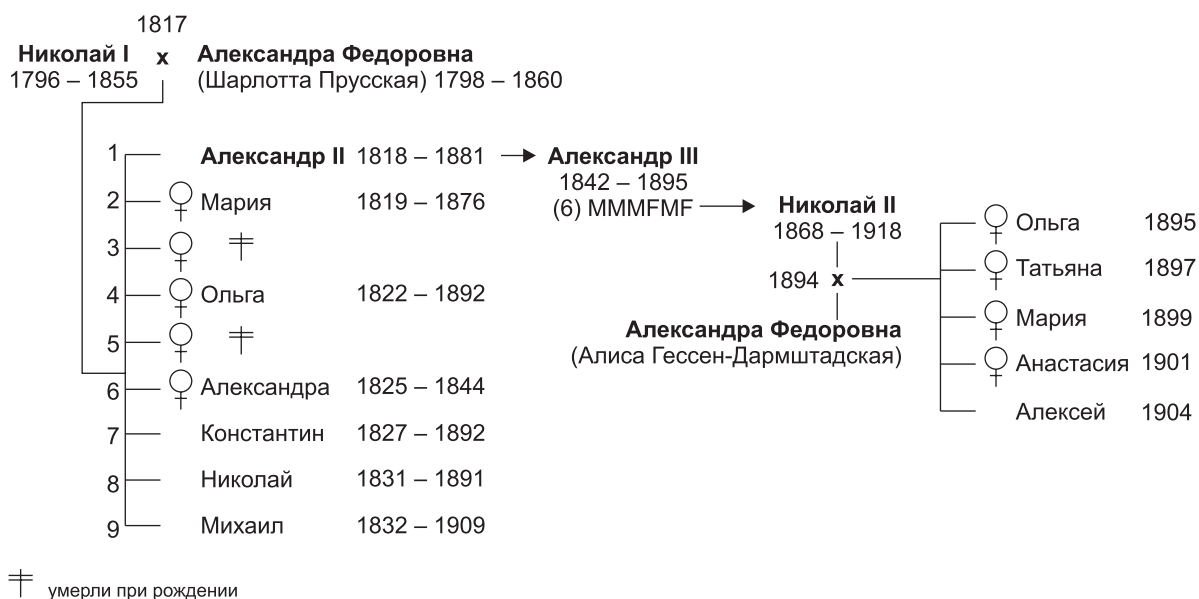


Рис. 2. Фрагменты родословной Николая I и его правнука Николая II, показывающие повторное рождение девочек.

Обозначения такие же, как на рис. 1.

брака за 10 лет родилось пять детей – все дочери, FFFFF. Наследование Иваном отцовской аномалии очевидно.

На рис. 1 и 2 приведены родословные Петра I, его правнука Павла I, его сына Николая I и его правнука Николая II. F-тетрада отчетливо проявилась у Петра I. Он родился во втором браке царя Алексея с Натальей Нарышкиной. На рис. 1 показано проявление признака F-тетрады в многодетном союзе (а затем браке) Петра I с Мартой Скавронской. В 1703 г. Петр I встретил 19-летнюю Марту, захваченную русскими войсками как военную добычу при взятии шведской крепости Мариенбург (ныне г. Алуксне в Латвии). Марта происходила из прибалтийских крестьян, была служанкой у одного пастора, а затем попала в наложницы к А. Меншикову. Петр забрал Марту от Меншикова и сделал ее своей фавориткой. В 1704 г. она родила ему первенца, названного Петром, а в следующем году Павла (вскоре оба умерли). До законного брака с Петром I Марта Скавронская родила еще двух дочерей. После того как в неудачном прусском походе 1811 г. Марта, бывшая в обозе Петра I, самоотверженно помогла спасти его от неминуемого турецкого плена, Петр I, возвратившись в Петербург, в 1712 г. отпраздновал свадьбу с Мартой и она

стала именоваться императрицей Екатериной I. В этом брачном союзе за 15-летний период, с 1704 по 1719 гг., родилось 11 детей (8 из них умерли в возрасте до 7 лет). Последовательность рождений по полу такова: MMFFFFMMFM. Пять подряд рождений девочек указывают на наследование Петром I признака F-тетрады от своего отца Алексея Михайловича.

Дочь Петра и Екатерины Анна Петровна стала герцогиней Гольштейн-Готторпской. Она умерла в возрасте 20 лет, но успела родить сына, который в 1761 г. был провозглашен (по настоянию захватившей трон Елизаветы Петровны) императором Петром III. В жены ему была выбрана Софья Анхальт-Цербстская, ставшая (после свержения и убийства Петра III) императрицей Екатериной II. В их браке родился единственный законный сын Павел I (1754–1801). Он был женат на Софье Луизе Вюртембургской, получившей после принятия православия имя Мария Федоровна (1759–1828). В этом многодетном браке за 21 год родилось 10 детей. Последовательность рождений по полу: MFFFFFFMM. Шесть последовательных рождений дочерей указывают на признак F-тетрады. Очевидна передача в ряду поколений гипотетического фактора не только по мужской, но и по женской линии: Петр I – дочь Анна – ее сын Петр III – Павел I.

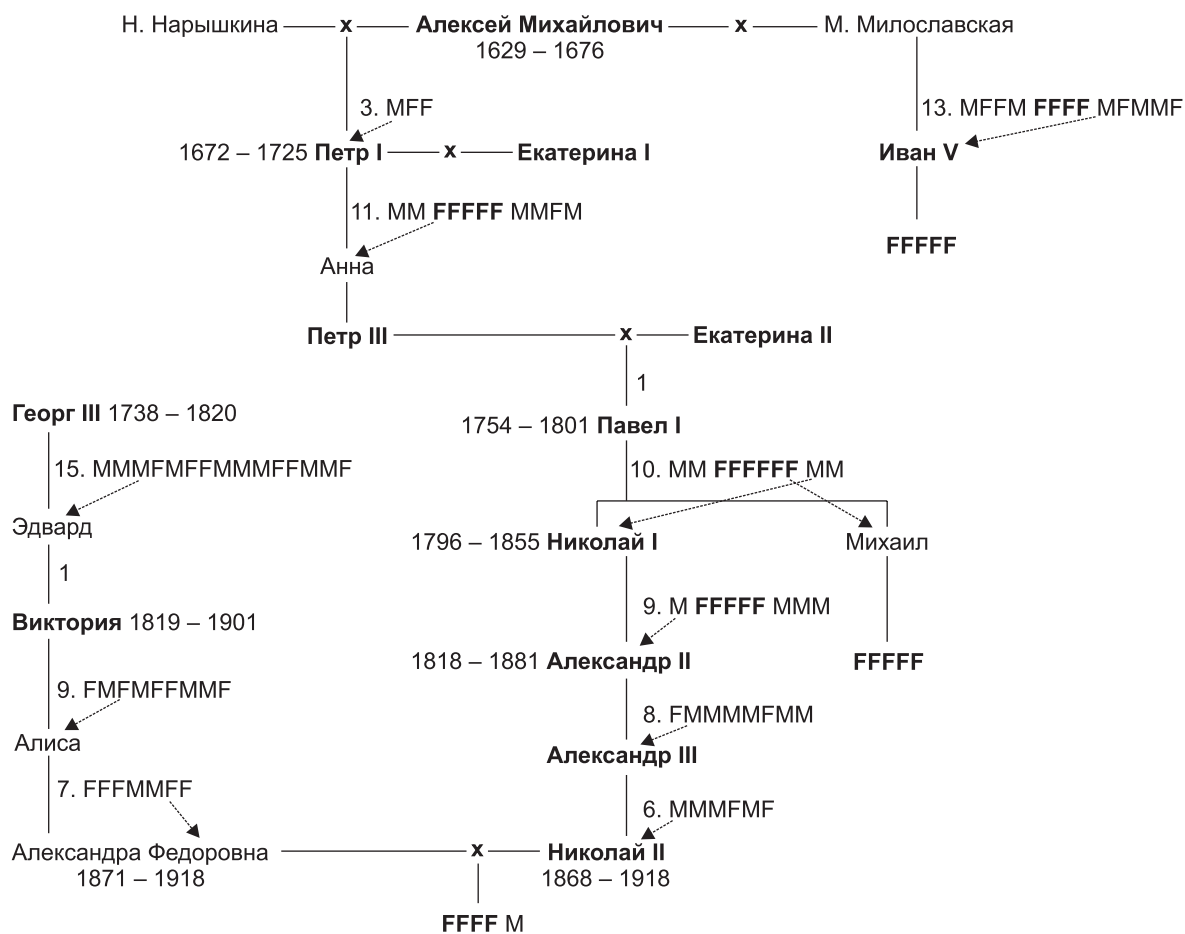


Рис. 3. Фрагменты родословной многодетных семей в английской династии («контроль») и в династии Романовых, где на протяжении 9 поколений передавался и проявлялся признак «F-тетрада».

Обозначения такие же, как на рис. 1. Прерывистые стрелки указывают, каким по счету ребенок был данный пробанд.

Среди четырех сыновей Павла I родившийся девятым по счету Николай (Николай I) и его младший брат Михаил также обладали генотипом, который приводил к репродуктивной F-тетраде. У Николая I в браке с Александрой Федоровной (принцесса Шарлотта Прусская) родилось 9 детей, из них 5 девочек подряд: **MFFFFFMMM**. F-тетрада очевидна (рис. 2). Первый сын Павла I, ставший императором Александром I, в браке с Елизаветой Алексеевной (Луиза Мария Августа Баденская) имел только двух дочерей. Обе они умерли во младенчестве и их происхождение по отцу считается сомнительным. У Михаила, последнего сына Павла, все 5 детей были девочки. Второй сын Павла I Константин не имел детей в законном браке. Таким образом, доминантный фактор, вызывающий девиацию «F-тетрада», передался и отчетливо проявлялся, по крайней мере, у 2 из 4 сыновей императора Павла I.

Далее в династии Романовых репродуктивная F-тетрада наблюдается лишь у последнего императора Николая II. В его семье родилось 5 детей с последовательностью по полу **FFFFM** – 4 подряд дочери, а затем сын Алексей. Если Николаю II гипотетический фактор, вызывающий склонность к F-тетраде, передался по мужской линии от Александра II, а затем через Александра III, то приходится полагать, что у обоих этих императоров гипотетический фактор F-тетрады по какой-то причине не проявился (феномен неполной пенетрантности и экспрессивности). Хотя в семье Александра III распределение по полу среди его 6 детей было **MMMMFMM** – вполне обычное, одна из его сестер, Мария Александровна (1853–1920), ставшая герцогиней Великобритании, родила 5 детей с последовательностью по полу: **MFFFF**, что указывает на возможное носительство и проявление F-тетрады.

Обсуждение

На рис. 3 суммированы данные о характере передачи в 9 поколениях династии Романовых признака F-тетрады – повторного рождения девочек в серии 3–5 родов, обычно после рождения первой из них. В левой части рис. 3 показан фрагмент родословного древа английской королевской династии, которая оказалась связанной с династией Романовых. Фрагмент содержит сведения о порядке рождения детей по полу в двух самых многодетных семьях английской династии – у короля Георга III и его внучки королевы Виктории. Этот фрагмент родословной может служить своеобразным контролем для вариантов ожидаемого в норме распределения по полу в многодетных семьях. Последовательность рождения по полу среди 15 детей Георга III была MMMFMFFMMFFMMF, а у Виктории FMFMFFMMF. В обоих случаях нет и намека на F-тетрадную аномалию.

В то же время фрагмент древа Романовых, приведенный на рис. 3, демонстрирует проявление F-тетрады у двоих сыновей царя Алексея Михайловича Романова от его двух разных браков: у Ивана V и Петра I. Сходным образом двое детей Павла I, Николай I и великий князь Михаил, проявили эту репродуктивную девиацию. Отсюда следует: 1) наследование фактора(ов) F-тетрады происходит по доминантному типу и 2) есть прямой отцовский эффект влияния генотипа отца на аномальный характер воспроизведения у матерей их детей – признак F-тетрады.

Царь Алексей Михайлович, несомненно, был носителем фактора F-тетрады. Возможно, он достался ему от отца-основателя всей династии Михаила Федоровича Романова (1596–1645). В браке с Евдокией Спешневой у него за 12 лет (с 1627 г. по 1639 г.) родилось 10 детей в последовательности FFMFFMFFFM. Преобладание девочек и их трехкратное повторное рождение могут указывать на действие наследуемого в этой династии фактора F-тетрады.

Возникают два естественных вопроса: передается ли F-фактор по женской линии (чтобы исключить зависимость от Y-хромосомы) и вызывает ли данный фактор, переданный дочерям, появление у них F-тетрадной аномалии. Павлу I фактор F-тетрады передался через дочь

Петра I Анну. Значит, данный фактор передается по женской линии. Для определенного ответа на второй вопрос имеющихся данных недостаточно. Из 6 дочерей Павла I ни у одной из них число детей в браке не превышало 4. Михаил Павлович, младший сын Павла I, оказался отцом 5 дочерей и явно был носителем F-фактора. Но, к сожалению, две его дочери умерли во младенчестве, а две другие – в возрасте 20 лет. Оставшаяся дочь княгиня Екатерина Михайловна оставила потомство в нормальной по полу последовательности MFMFМ. Дочь Николая I Мария в первом браке за период 12 лет, с 1840 по 1852 гг., родила 7 детей, но также в нормальной по полу последовательности – FFMFMMM.

Истолкование механизма прямого отцовского влияния ведет к предположению о некоей «репродуктивной памяти» – специфическом влиянии определенной по полу беременности на ход и результаты последующих. В самом общем виде можно думать о двух типах влияния: а) неспецифические влияния, связанные с длительным отклонением нормальной активности гормональных или иммунологических факторов у женщины после первой беременности. Например, первая беременность в относительно молодом возрасте 18–22 лет приводит к многолетнему уменьшению секреции гормона пролактина в течение последующих 12–13 лет и протектирует против рака груди (Musey *et al.*, 1987); б) специфические, зависящие от генотипа отца, иммунологические изменения по типу ситуации с Rh-фактором.

Следует предположить, что в случае первой беременности при вынашивании женского плода Xp^*/Xm (где Xp^* – отцовская X-хромосома) репродуктивная система матери сенсibiliзирует таким образом, что либо негативно селекционируются Y-содержащие спермии, либо негативная селекция мужских спермиев происходит на ранних этапах эмбриогенеза. Наконец, возможны ситуации типа гибридного дисгенеза у дрозофилы, когда в определенных скрещиваниях у гибридов возникают и продолжают в ряду поколений генетико-физиологические аномалии в генеративной системе и воспроизведении.

На возможность семейных отклонений в соотношении полов указывает анализ бесprecedентных по демографической полноте сведений, которые охватывают все население

Дании в рамках проводимой там начиная с 1968 г. Гражданской системы регистрации. На основе данных о более чем 700 тыс. семейных пар была изучена зависимость между числом детей в семьях, соотношением полов и последовательностью рождений по полу (Biggar *et al.*, 1999). Оказалось, что первичное соотношение по полу SR (Sex Ratio), оцениваемое как соотношение числа рождений мальчиков к числу рождений девочек в процентах, уменьшается по мере роста числа детей в семьях, особенно если перед рождением каждого следующего ребенка в семье уже были девочки. Так, если для всей популяции Дании соотношение по полу при рождении (SR) равно 51,2 %, или 103 мальчика на 100 девочек, то в семьях из 4 девочек FFFF при рождении пятого ребенка соотношение становится уже 91 мальчик : 100 девочек. Отсюда следует, что в ряде семей есть наследственное предрасположение к рождению девочек, которое выявляется при таком детальном демографическом анализе.

На существование подобных аномалий в разных популяциях указывает и текст Библии, где, как известно, приводятся генеалогические и демографические данные. Слежение за генеалогиями было основано на вековых традициях, ибо в патриархальных обществах соотношение по полу оказывалось важным при наследовании земельного надела и имущества. Именно эта традиция дала возможность ветхозаветным патриархам предвидеть сцепленное с полом наследование гемофилии и впервые сформулировать своего рода медико-генетическую консультацию, описанную в Талмуде: если при ритуальном обряде обрезания два мальчика подряд погибают при кровотечении, то все остальные мальчики у этой женщины, а также мальчики ее родной сестры (но не брата!) освобождаются от данной процедуры. Это правило по существу провидение сцепленного с полом наследования. Кроме того, в тексте Библии удалось найти описание прямого отцовского влияния на близнецовость в сочетании субфертильности с нарушением фертильности (Golubovsky, 1985). Это сочетание лишь недавно получило генетико-демографическое подтверждение и цитогенетическое истолкование (StClair, Golubovsky, 2002).

В Библии удалось найти указание и на проанализированную в данной работе девиацию

репродукции – семьи с повторными рождением девочек. «И пришли дочери Салпаада, сына Хеферова, сына Галаадова, сына Махирова, сына Манассиина из поколения Манассии, сына Иосифова, и вот имена дочерей его: Махла, Ноа, Хагла, Милка и Фирца; и предстали перед Моисеем и пред Улеазара священника и перед всем обществом, у входа в скинии собрания и сказали: отец наш умер в пустыне, и сыновей у него не было. За что исчезать имени отца нашего из племени его, потому что нет у него сына? Дай нам удел среди братьев отца нашего» (Числа, 27 : 1). Пять подряд дочерей и ни одного сына – это как раз ситуация рождения пяти подряд девочек у Ивана V и князя Михаила Павловича, последнего сына Павла I.

Загадочным и трудным для истолкования действия фактора F-тетрады является факт о том, что аномалия возникает обычно после первого рождения девочки независимо от того, какими по счету это были роды, т. е. появление F-тетрады происходит в семьях с порядками рождений по полу FFFF (первые роды), MFFFF (вторые роды) или MMFFFF (третьи роды). Каждый раз первое рождение девочки вызывает рождение девочек в последующих 3–5 родах (и лишь в одном случае, у Алексея Михайловича, эта девиация проявилась не сразу). Эта парадоксальность ведет к необходимости предполагать некое «запечатление» или «репродуктивную память». Отчасти данная ситуация последствия напоминает установленное датскими генетиками влияние пола первого ребенка на частоту привычного невынашивания в следующих родах (Christiansen *et al.*, 2004).

В этой связи важно интересное генетико-демографическое наблюдение, которое сделал открыватель вируса гепатита В Нобелевский лауреат Блумберг (Blumberg, 2006). ДНК-содержащий вирус гепатита В, подобно вирусу СПИД, встраивается в геном человека, передается плоду через кровь матери и плаценту. Вирус в латентной форме существует в человеческих популяциях с частотой от нескольких до 20 %. Оказалось, что в потомстве носителей латентной формы вируса В, содержащих в крови антитела к поверхностному антигену вируса, мальчики рождаются в 2–3 раза чаще, нежели девочки. Этот удивительный факт непрямого действия вирусного носительства на соотноше-

ние полов расширяет возможности истолкования действия и фактора F-тетрады.

В аспекте обнаруженной девиации, а также все возрастающего числа сведений об эпигенетическом наследовании возникает одно общегенетическое соображение. Вполне возможно, что феномен, обозначаемый термином «телегония», который считается генетиками предрассудком, имеет под собой определенное генетическое основание. Под расплывчатым термином «телегония» в общем виде можно понимать разнообразные влияния генотипа отца первого или «n-потомка» на фенотип, или структурно-динамические вариации генотипа следующего (n + 1) потомка в результате специфических взаимодействий мать–плод в тканях репродуктивной системы женского организма. Эмпирическими указаниями на такого рода возможности могут служить ситуация «резус-конфликта», обнаруженный феномен тканевого послеродового микрохимеризма – передачи через кровотоки плаценты клеток плода, среди которых могут быть как клетки другого пола, так и стволовые клетки. Сложившаяся веками практика собаководов исключать из чистопородного разведения самку при ее неконтролируемом скрещивании может получить генетическое истолкование, как это было с библейскими рекомендациями в случае гемофилии.

Благодарности

Автор благодарен историку С.Ю. Дудакову за ценные советы и консультации.

Литература

- Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития человека. Спб: Н-Л., 2007.
- Голубовский М.Д., Голубовская И.Н. Возможные цитогенетические механизмы прямого отцовского влияния на близнецовость у человека и их последствия // Генетика. 1984. Т. 20. С. 1043–1050.
- Дудаков С.Ю. Петр Шафиров и другие. Иерусалим; Москва, 2011.
- Пузырев В.П., Степанов В.А. Патологическая анатомия генома человека. Новосибирск: Наука, 1997.
- Труайя А. Николай I. М.: Эксмо, 2007.
- Bestor T.H., Bourc'his D. Genetics and epigenetics of hydatidiform moles // Nature Genet. 2006. V. 38.

№ 3. P. 374–376.

- Biggar R.J., Wohlfahrt J., Westergaard T., Melbye M. Sex ratios, family size and birth order // Am. J. Epidemiol. 1999. V. 150. № 9. P. 957–962.
- Blumberg B.S. The curiosities of hepatitis B virus. Prevention, sex ratio and demography // Proc. Am. Thora. Soc. 2006. V. 3. P. 14–20.
- Boklage C.E. Embryogenesis of chimeras, twins and anterior midline asymmetries // Hum. Reprod. 2006. V. 21. P. 579–591.
- Carrell D. Contribution of spermatozoa to embryogenesis: assays to evaluate their genetic and epigenetic fitness // Reprod. Biomed. Online. 2008. V. 16. № 4. P. 474–484.
- Christiansen O.B., Pedersen B., Nielsen H.S., Nybo-Andersen A.-M. Impact of sex of first child on the prognosis in secondary recurrent miscarriage // Human Reprod. 2004. V. 19. № 12. P. 2946–2951.
- Crow J.F. There's something curious about paternal-age effect // Science. 2003. V. 30. № 5633. P. 606–607.
- Epigenetics and Human Reproduction / Eds S. Rousseaux, Khochbin. Springer Verlag, 2011.
- Golubovsky M.D. Genetics and Terah-Abraham pedigree in genesis // Koroth. 1986. V. 3. P. 374–382.
- Golubovsky M.D. Paternal familial twinning: hypothesis and genetical/medical implications // Twin Res. 2002. V. 5. P. 75–86.
- Golubovsky M.D. Postzygotic diploidization of triploids as a source of unusual cases of mosaicism, chimerism and twinning // Hum. Reprod. 2003. V. 18. № 2. P. 236–242.
- Golubovsky M. Mosaic/chimeras and twinning in the current reproductive genetic perspective // Hum. Reprod. 2006. V. 21. P. 2458–2460.
- Golubovsky M. Unexplained infertility in Charles Darwin family: genetic aspect // Hum. Reprod. 2008. V. 23. № 5. P. 1237–1238.
- Machin G. Non-identical monozygotic intermediate twins types, zygotic testing and the non random nature of monozygotic twins // Am. J. Med. Genet. 2009. V. 151(C2). P. 110–127.
- Malan V., Vekemans M., Turleau C. Chimera and other fertilization errors // Clin. Genet. 2006. V. 70. P. 363–373.
- Musey V.C., Collins D.C., Musey P.I. *et al.* Long-term effect of a first pregnancy on the secretion of prolactin // New Engl. J. Med. 1987. V. 316. P. 229–234.
- Pembrey M.E., Byrge L.O., Kaati G. *et al.* Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans // Eur. J. Hum. Genet. 2006. V. 14. № 2. P. 159–166.
- Robinson W., Lauzon J.L., Innes A.M. *et al.* Origin and outcome of pregnancies effected by androgenic/biparental chimerism // Hum. Reprod. 2007. V. 22. P. 1114–1122.
- Souter V.L., Parisi M.A., Nyholt D.R. *et al.* A case of

- true hermaphroditism reveals an unusual mechanism of twinning // *Hum. Genet.* 2007. V. 121. P. 179–185.
- StClair J.B., Golubovsky M.D. Paternally derived twinning: A two century examination of one Scottish name // *Twin Res.* 2002. V. 5. P. 294–307.
- Sutovsky P., Schatten G. Paternal contribution to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion // *Int. Rev. Cytol.* 2000. V. 195. P. 1–65.
- Tesarik J. Paternal effects on cell division in human preimplantation embryo // *Reprod. Biomed. Online.* 2005. V. 10. № 3. P. 337–375.
- Yanagimachi R. Male gamete contribution to the embryo // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005. V. 1061. P. 203–207.
- Zalensky A.O., Zalenskayay I.A. Non-random positioning of chromosomes in the human sperm nuclei // *Chrom. Res.* 2004. V. 12. P. 163–173.

AN UNUSUAL REPRODUCTIVE ODDITY IN THE ROMANOV DYNASTY: THE CONSECUTIVE BIRTH OF GIRLS AND THE DIRECT PATERNAL EFFECT

M.D. Golubovsky

Department of Cell and Molecular Biology, University of California, Berkeley,
California 94720, USA, e-mail: mdgolub@gmail.com

Summary

I describe previously unnoticed reproductive oddity in the large families of the Romanov dynasty of Russian Tsars. Consecutive four to five births of girls were observed in a series of generations, usually after the first girl was born. This oddity is called «Female tetrad» or F-tetrad. F-tetrad occurred in large families regardless of the preceding sex order. Thus, the following distributions of sex and birth order were observed: **FFFFF**, **FFFFM**, **MFFFF**, **MFFFFFFMMM**, **MMFFFFFFMMF**, and **MMFFFFFFMM** (13 children in the family of Tsar Alexei Mikhailovich). A predisposition to the repeated births of girls was transmitted both paternally and maternally. The conjectured F-tetrad factor(s) had a dominant effect and an incomplete penetrance and expressivity. In terms of physiological genetics this anomaly can be described in the following manner: the first birth of a girl in marriages where the father carried the F-tetrad factor significantly increased the probability of consecutive three to four births of girls. After giving birth to the first girl the mother acquires some kind of «reproductive memory», which changes the family's normal sex ratio in the next three to five births. Possible genetic causes capable of inducing such F-tetrad oddity are discussed.

Key words: genetics, reproduction, sex ratio, paternal effect.

АПОЗИГОТИЧЕСКИЙ СПОСОБ РЕПРОДУКЦИИ СЕМЯН В СИСТЕМЕ РОДА *BETA* (CHENOPODIACEAE) И ГОМОЛОГИЧЕСКИЕ РЯДЫ Н.И. ВАВИЛОВА

С.И. Малецкий, Е.И. Малецкая, С.С. Юданова

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

Рассмотрена гомология способов репродукции семян у видов рода *Beta* (сем. Chenopodiaceae). Показано, что апозиготический способ семенной репродукции присущ как диким видам рода *Beta*, так и культурному виду *Beta vulgaris* L. С одной стороны, гомология способов репродукции семян в роде *Beta* находится в гармоническом соответствии с законом гомологической наследственной изменчивости Н.И. Вавилова, с другой стороны, гомологию способов репродукции семян в роде *Beta* вряд ли можно объяснить параллельным мутагенезом генов, контролирующих признак «репродукция семян». Следовательно, агамоспермная репродукция семян у сахарной свеклы имеет эпигенетическую природу. Закону гомологической наследственной изменчивости Н.И. Вавилова соответствует и фрактальный способ описания морфогенеза цветочных структур (гомологический компонент закона Н.И. Вавилова), так как морфогенез у растений четко описывается на основе представлений, развиваемых фрактальной геометрией.

Ключевые слова: автосегрегация генов, агамоспермия, апозиготия, апомиксис, гомологическая изменчивость, итерации, миксоплоидия, одно- и многосемяпочковость цветков, партеногенез, репродуктивные признаки растений, фрактальная геометрия, эпигенез, эпигены.

Введение

Н.И. Вавилов определил селекцию как *эволюцию, направляемую волей человека*, введя, таким образом, селекцию в круг ноосферных дисциплин. «Без сочетания эволюционного и генетического подходов Вавилов не мыслил себе успешное изучение сортов растений и пород животных. По этому пути он пошел одним из первых генетиков мира. ... Все его крупные теоретические построения – закон гомологических рядов, учение о центрах происхождения культурных растений, учение об исходном потенциале селекции, теория иммунитета – были построены на основе синтеза теории эволюции и генетики» (Мирзоян, 2006. С. 217).

Одним из важнейших теоретических обобщений Н.И. Вавилова стал закон о гомологической (параллельной) наследственной изменчивости, который гласит: «Виды и роды, генетически близкие, характеризуются сходными рядами наследственной изменчивости

с такой правильностью, что, зная ряд форм в пределах одного вида, можно предвидеть нахождение параллельных форм у других видов и родов. Чем ближе генетически расположены в общей системе роды и линнеоны, тем полнее сходство в рядах их изменчивости» (Вавилов, 1967. С. 35).

Открытие Н.И. Вавиловым закона о параллельной изменчивости не было спонтанным событием, так как о параллельной изменчивости писали многие выдающиеся биологи еще в XIX в. – Ж. Сент-Илер, Ч. Дарвин и др. А.А. Любищев отмечал по этому поводу: «Н.И. Вавилову принадлежит бесспорная заслуга, что он не просто извлек из забвения старое положение Дарвина, но сделал крупный шаг вперед по пути познания одной из глубоких закономерностей, лежащих в основе формообразования организмов. ... В этом же направлении двигалась мысль нашего выдающегося ученого Л.С. Берга (1922), палеонтолога Д.Н. Соболева (1924) и гистолога А.А. Завар-

зина (1923). ... Общим выводом их было то, что морфологические закономерности, существование которых вынужден был допускать Дарвин, играют в эволюции органического мира несравненно большую роль, чем это принимает ортодоксальный дарвинизм» (Любищев, 1982. С. 249, 250). Жестко подчеркивал закономерности морфогенетических процессов в эволюции палеонтолог Д.Н. Соболев: «В основе биогенеза лежит не случай, но закон. Законности, которые характеризуют ход биогенеза, не могут быть объяснены простым накоплением или подбором неупорядоченных и лишенных какой-либо тенденции случайно полезных для вида уклонений (мутаций). Их нельзя объяснить отбором, производимым исключительно лишь борьбой за существование и ведущим к чисто пассивному приспособлению к условиям существования. Процессы морфогенеза упорядочены, строго закономерны и притом тенденциозны» (Соболев, 1924. С. 176).

Таким образом, так же, как и сам Н.И. Вавилов, многие современные ему биологи подчеркивали значимость законов морфогенеза и морфогенетической изменчивости для понимания тенденций и закономерностей эволюции. Эти утверждения русских биологов не соответствуют базовой концепции Ч. Дарвина и его многочисленных последователей как в XIX, так и XX вв. о том, что эволюция организмов покоится исключительно на неопределенной (хаотической) изменчивости (мутациях) и естественном отборе. Положения теории Дарвина о движущих силах эволюции сохранились неизменными и поныне, и потому фундаментальное теоретическое обобщение Н.И. Вавилова для современной эволюционной биологии оказалось фактически «инородным телом».

Между тем в момент своего появления открытие Вавилова вызвало энтузиазм у биологов, ибо по своему значению оно могло быть сравнимо лишь с открытием Д.И. Менделеевым Периодической системы химических элементов. В дальнейшем энтузиазм в отношении закона Н.И. Вавилова в научном сообществе ослаб и было констатировано: «Это направление в науке сейчас, можно сказать, еле теплится (даже в мировой литературе)» (Любищев, 1982. С. 250). «И позже, когда имя Вавилова было возвращено в список классиков, а его работа

многократно переиздана, положение мало изменилось: большинство наших палеонтологов и эволюционистов не знает, что с этими рядами делать» (Чайковский, 1994. С. 20). Объяснение этому пароксизму – «взрывному» энтузиазму и сменившему его скептицизму в отношении закона гомологической изменчивости Н.И. Вавилова – дал А.А. Любищев в цитированной выше статье. Он отметил, что открытие Вавилова не имеет никаких разумных оснований в рамках дарвиновской парадигмы эволюции: «Закон гомологических рядов является только началом выяснения номологического компонента эволюции» ... «для сколько-нибудь полного понимания требует весьма радикального пересмотра наших общебиологических воззрений» (Любищев, 1982. С. 251, 252).

Хотя с момента опубликования работы Ч. Дарвина «Происхождение видов ...» прошло уже полтора столетия, но его взгляды на природу изменчивости ныне упорно воспроизводятся в рамках синтетической теории эволюции (СТЭ). Согласно СТЭ, биологическая изменчивость определяется в основном двумя, хотя и разными по сути, но при всем том случайными факторами – *хаотическими мутациями* и *естественным отбором*. Оба дарвиновских фактора изменчивости не совместимы с явлениями параллельной изменчивости в биологическом мире, которые четко и ясно обосновал Н.И. Вавилов на обширнейшем материале. «Примеры параллелизмов обнаруживаются в признаках, истолковать приспособительное значение которых с позиции естественного отбора (дарвинизма) крайне трудно. С данными трудностями не справились и сторонники СТЭ, отводившие параллелизму в изменчивости, как правило, роль второстепенных факторов. ... Они изменчивость ..., связанную с изменениями среды либо с самопроизвольными мутациями, четко увязывают с действием естественного отбора, игнорируя при этом в своей интерпретации многочисленные факты параллельной изменчивости» (Богатых, 2006. С. 251, 252). Наличие в живом веществе некой «внутренней силы», законов, определяющих изменчивость и движущих эволюцией, в корне противоречит взглядам сторонников СТЭ (Штеренберг, 2009).

СТЭ – это не только самое значительное теоретическое обобщение в биологии XX в., но ее

идеи положены в основу построения различных схем селекционного улучшения растений, так как СТЭ по сути признается теоретическим фундаментом для селекции. В настоящей статье будут рассматриваться различия в понимании проблем репродуктивной биологии видов рода *Beta* в рамках вавиловского понимания наследственной изменчивости и понимание этого же феномена в рамках менделевской генетики и СТЭ.

Менделизм и селекция. Основными методами, успешно используемыми на протяжении многих столетий в селекции растений, являются гибридизация (внутри- или межвидовая) и искусственный отбор. Креативный вклад менделизма (генетики) в теорию наследственности состоял в разработке методов гибридологического анализа, учитывающего сегрегацию маркерных признаков на основе правил наследования, открытых Г. Менделем в середине XIX в. В начале XX в. правила наследования Г. Менделя были переоткрыты, и новое направление биологии (менделизм) получило необычайно мощную поддержку и развитие. *Менделевский подход к наследованию рассматривает организм (растение) как статичную структуру, составленную из мозаики признаков (фенов), контролируемых множеством генов (наследственных факторов).* Менделевская парадигма наследования устанавливает, по сути, линейную зависимость между генами и признаками. Это нашло, в частности, отражение в исторической череде уточняющих концепций о взаимоотношениях «ген–признак»: «один ген–один признак», «один ген–один фермент», «один ген–один полипептид», «один ген–одна нуклеотидная последовательность» и т. п. Линейные представления о соотношении функции генов и контролируемых ими признаков позволили осуществить локализацию генов в хромосомах (хромосомная теория наследственности) и рассматривать вопрос о числе генов в геномах растений, которые должны быть либо равны числу идентифицируемых признаков, либо меньше, если два или большее их число контролируют один и тот же признак.

В свете сложной природы наследственности у высших растений соотношение «ген–признак», скорее всего, не должно описываться только линейными отношениями. Известно, что разнообразие признаков растений, с которыми приходится сталкиваться в селекционно-гене-

тических исследованиях, весьма велико (если не сказать неисчерпаемо). Их условно делят на «дискретные» (прерывные) и «континуальные» (непрерывные). Дискретные признаки, в свою очередь, распадаются на *альтернативные* и *счетные* (Малецкий и др., 2004). Вклад менделизма в теорию селекции состоял в том, что в ряде случаев удается оценить вклад отдельных генов или их ансамблей в наследование некоторого числа признаков. Действительно, если это альтернативный признак, контролируемый одним или небольшим числом генов, то в эксперименте можно наблюдать четкое соответствие между поведением наследственных детерминантов (генов) и признаков. Этот раздел в теории наследственности можно было бы обозначить как *феноменальная генетика* (феномен – явление, постигаемое чувствами – зрением, слухом и пр.), т. е. наследование признака, наблюдаемое и регистрируемое в гибридологических экспериментах.

Другую группу признаков составляют *континуальные* признаки, к числу которых относят все или почти все линейные, поверхностные или объемные (весовые) признаки растений или отдельных их частей, получаемые путем измерений, а также разнообразные морфофизиологические признаки растений, формирующиеся в онтогенезе. Селекцию преимущественно интересуют именно континуальные признаки, для которых установить соответствие селекционируемого признака с активностью отдельного гена или определенного числа генов трудно или даже невозможно. В рамках менделевской парадигмы постулируется, что континуальные признаки контролируются большим числом генов, и потому их сегрегация в ряду поколений репродукции гибридов носит сложный (полифакториальный) характер и описывается уже не в частотах гено- и фенотипов, как при сегрегации альтернативных признаков, а на языке математической статистики. Этот раздел теории наследственности можно назвать умопостигаемой, ноуменальной генетикой, которая не может опираться только на линейные зависимости между активностью генов и признаками. Рассматривая теоретическую селекцию с методологической точки зрения, отметим, что лишь отчасти она опирается на четкие представления о наследовании тех или иных признаков, и по-

тому ее, с одной стороны, характеризуют как науку (опора на феноменологию наследственности), а с другой стороны, рассматривают как искусство: опора на ноуменальные представления, где значительную роль играет интуиция селекционера. В совокупности селекционные процедуры по изменению свойств растений, выполняемые для достижения необходимых результатов, имеют всегда четко ограниченные пределы.

Репродуктивные признаки растений. Среди признаков и свойств растений отдельную группу составляют репродуктивные признаки, определяющие видовой статус растений, многие из них положены в основу растительной систематики. Впервые классификацию растительных форм выполнил шведский натуралист К. Линней в первой половине XVIII в., взяв за основу признаки цветков. «Наиболее известная система классификации, составленная Линнеем, называлась “Система пола”. Растительный мир был разделен на 24 класса. Первые 10 классов основывались на количестве тычинок, остальные – на различных характерных особенностях тычиночного комплекса, а также на связи их с плодолистиками. ... Опубликование “Системы пола” имело шумный успех, объяснявшийся тем, что это была первая система, которая позволяла практически узнавать многие растения и каталогизировать их» (Жуковский, 1982. С. 373).

Репродуктивная биология – базовый раздел биологии растений, на который опирается и современная теория селекции. Комплекс репродуктивных свойств любого вида определяет потенциал семенной продуктивности этого вида, а способ возникновения семян целиком и полностью определяет схему ведения материала в селекционном процессе. Репродуктивные признаки растений по своей природе не могут быть линейными, так как их экспрессия являет собой итог реализации множества частных программ развития, и так же, как и любым другим признакам, им присуща изменчивость. Многие части репродуктивной системы зрелого растения можно отнести к счетным признакам (например, число цветков, плодов или семян на растении и др.), изменчивость которых описывается биномиальным правилом А. Кетле (Филипченко, 1926; Малецкий, 2000).

Выделим особый тип внутривидовой изменчивости: внутривидовая изменчивость растений по способу репродукции семян (зиготическая или апозиготическая)¹. Зиготическая репродукция семян реализуется в результате самооплодотворения или перекрестного оплодотворения. Апозиготическая репродукция предполагает партеногенетическое развитие семян либо из клеток зародышевого мешка (гаметофитная агамоспермия), либо из соматических клеток семязачек (спорофитная агамоспермия – нуцеллярная или интегументальная эмбриония). Растение одного вида, как правило, использует один или другой способ семенной репродукции, или одновременно оба способа (Asker, Jerling, 1992; Richards, 1997; Малецкий, 2000, 2010).

Сценарные картины формирования признака «семенная продуктивность» определяются тем, что любому способу репродукции семян предшествуют процессы дифференцировки клеток, дающие начало морфогенетическому процессу развития и созревания цветочных структур. В цветках формируются зрелые мега- и микроспоры и происходят такие события, как: перенос пыльцы внутри цветка или на другие цветки, рост пыльцевых трубок в тканях столбика пестика, процессы двойного оплодотворения или партеногенеза, эмбриогенез семян и прочие процессы, обеспечивающие получение семян. Сценарный ход цито- и морфофизиологических процессов при зиготическом и апозиготическом способах репродукции семян в основном одинаков и лишь на заключительных этапах развития цветковых структур происходит переключение с одного сценария на другой. Говоря другими словами, происходит *переключение с одной программы на другую (точка бифуркации в развитии), которую осуществляют эпигены, или так называемые гены-переключатели («switch genes»)*, *меняющие тем самым эпигенотип клеток и самого растения.*

¹ Термины «апомиксис», «агамоспермия» и «апозиготия» – синонимичны и обозначают получение семян без пыльцевого (отцовского) генома. В тексте эти термины используются в зависимости от контекста: *апомиксис* (введен в научную лексику в 1906 г.) указывает на отсутствие смешения двух зародышевых плазм; *агамоспермия* (введен в научную лексику в 1923 г.) указывает на образование семян без оплодотворения; *апозиготия* (введен в научную лексику в 1967 г.) указывает на то, что новое семя развилось не из зиготической клетки зародышевого мешка.

Два способа репродукции семян у сахарной свеклы. Рассмотрим представления о репродуктивной системе *Beta vulgaris* L. в историко-эволюционном контексте. Общеизвестно, что растения *Beta vulgaris* L. формируют на цветоносах огромное число обоеполых цветков, и им присущ исключительно зиготический способ семенной репродукции: доминирует перекрестное оплодотворение с переносом ветром пыльцы от цветков одного растения на цветки другого (ветроопыляемое растение), а самооплодотворение предотвращается системой генов самонесовместимости (Харечко-Савицкая, 1940; Owen, 1942; Зайковская, 1968). На основе этих представлений строятся все схемы селекционного улучшения сахарной свеклы. Изложенные представления о репродукции семян настолько очевидны, что не вызывают никаких вопросов у специалистов, работающих с сахарной свеклой.

Между тем растениям *Beta vulgaris* L. одновременно с зиготическим присущ и апозиготический способ репродукции семян. Впервые об этом сообщил сотрудник Н.И. Вавилова Н.В. Фаворский (1928), описав образование нуцеллярных зародышей в цветочных семяпочках свеклы. Это сообщение долгое время оставалось в литературе единственным и неподтвержденным, и лишь спустя довольно долгое время появились публикации, подтверждающие наблюдения Н.В. Фаворского (Зайковская и др., 1978; Богомолов и др., 1994; Малецкая, 1994; Ярмолюк и др., 1994; Малецкий, 1995; Сеилова, 1996; Szkutnik *et al.*, 2001). Все публикации по апозиготическому способу репродукции семян у свеклы в 1970–1990 гг. выполнялись исключительно советскими биологами, в этих публикациях проводилась мысль о том, что «апомиксис у сахарной свеклы выражен слабо и носит случайный характер» (Богомолов, 2010. С. 505). Авторы большинства публикаций описывают исключительно спорофитный тип агамоспермии у свеклы и рассматривают его в качестве примера, когда семена являются генетическими клонами материнского растения. Если при спорофитной агамоспермии получают семена-клоны, то этот тип репродукции семян имеет громадное значение для селекции, открывая прямую возможность закрепления эффекта гетерозиса у простых гибридов в ряду

смежных поколений репродукции (Богомолов и др., 1994; Сеилова, 1996; Богомолов, 2010). Представление об агамоспермии (апомиксисе) как о семенном клонировании распространено не только в публикациях по сахарной свекле, но и в публикациях по апомиксису у других видов растений (Петров, 1957; 1988; Koltunow, Grossniklaus, 2003).

Нами показано, что наряду со спорофитной агамоспермией у сахарной свеклы реализуется и гаметофитная агамоспермия (партеногенетическое развитие семян из клеток зародышевого мешка) (Малецкий, Малецкая, 1996; Малецкий, 1997, 2000, 2010; Малецкий и др., 2001). В этом случае семена возникают непосредственно из клеток зародышевого мешка (яйцеклеток), которые являются продуктами мейоза, и в апозиготических потомствах наблюдается сегрегация по любым маркерным признакам – гаметная автосегрегация (Малецкий, Малецкая, 1996; Левитес и др., 1998; Малецкий, 2000; Малецкий и др., 2001; Юданова, Малецкий, 2010; Szkutnik, 2010). Партеногенетический эмбриогенез (развитие зародыша из клеток зародышевого мешка или клеток нуцеллуса) происходит без участия пыльцевого генома, и он ничем не отличается от аналогичного процесса при развитии семени из зиготической клетки. Подобная репродукция семян не имеет ничего общего с «семенным клонированием» (спорофитная агамоспермия), описанным выше, так как, с генетической точки зрения, семена, получаемые при гаметофитной агамоспермии, неотличимы от семян, получаемых посредством самооплодотворения. Был сделан вывод, что гаметофитная агамоспермия у сахарной свеклы – это один из механизмов *инбридинга*, приводящий к гомозиготизации генома (42,8 % генов за одно поколение репродукции) (Малецкий, 1997, 2000). Таким образом, на примере свеклы показано, что гаметофитная агамоспермия (получение семян в беспыльцевом режиме) по сути аналогична самооплодотворению, а сегрегация по маркерным локусам в агамоспермных потомствах была обозначена нами термином «автосегрегация» (Малецкий, 1997, 2000). В совокупности эти наблюдения позволили сформулировать представление о гаметном типе автосегрегации по любым маркерным признакам у сахарной свеклы (Малецкий, Малецкая, 1996; Левитес и др.,

1998; Малецкий, 2000; Малецкий и др., 2001; Юданова, Малецкий, 2010; Szkutnik, 2010).

Агамоспермная репродукция семян у диплоидных растений свеклы базируется на миксоплоидности (смесь клеток различного уровня плоидности) соматических клеток растений. Популяции клеток археспория у растений свеклы, по-видимому, также миксоплоидны, а потому семенные потомства при агамоспермии представлены как дигаплоидными, так и гаплоидными семенами (Юданова, 2004, 2010; Малецкая, Малецкий, 2006; Малецкая и др., 2009). Уровень семенной продуктивности отдельных растений при агамоспермном способе репродукции ничем не отличается от такового при гамоспермном способе семенной репродукции (Цильке и др., 2010; Юданова и др., 2011).

Параллелизм в изменчивости систем репродукции у видов рода *Beta*

Агамоспермия в роде *Beta*. Н.И. Вавилов полагал, что генетически близкие виды и роды характеризуются сходными (параллельными) рядами наследственной изменчивости, и это правило обладает предсказательной (номогенетической) силой, позволяя выявлять у новых систематических групп (видов, родов, семейств) неизвестные, но предсказуемые фенотипы, ранее обнаруженные у их родственников. Для демонстрации своего закона Н.И. Вавилов описал ряды параллельной изменчивости у различных видов злаков семейства Poaceae, исследуя у них такие морфологические признаки, как остиность и опушенность колосьев, их окраску, а также окраску кожуры семян и пр. Он пишет: «... состав признаков, различающий формы ржи, когда он был вскрыт полностью, оказался до деталей напоминающим расы и разновидности пшеницы» (Вавилов, 1967. С. 18, 19).

Очевидно, что закон гомологической изменчивости Н.И. Вавилова должен иметь универсальное значение и распространяться не только на морфологические признаки растений, но также и на репродуктивные. Возможность обнаружения агамоспермного способа репродукции семян у культурных образцов *Beta vulgaris* L. однозначно вытекает из представлений о параллельной изменчивости, так как некоторые дикие виды рода *Beta* секции *Corollinae* репро-

дуцируют семена исключительно агамоспермным (апозиготическим) способом. К их числу относятся *B. corolliflora* ($2n = 18$), *B. trygina* ($2n = 54$), *B. intermedia* ($2n = 36$), *B. lomatogona* ($2n = 36$) (Barocka, 1966).

Обнаружение у диких видов агамоспермного способа репродукции семян стимулировало исследования по переносу этого признака от диких видов рода *Beta* (*B. trygina*, *B. lomatogona*) в культурную свеклу путем скрещивания ее с дикими видами (Cleij, Bock, 1968; Jassem, 1969, 1976; Jassem B., Jassem M., 1969; Арапова, 1984; Жексембиев, 2010). Это направление экспериментальных исследований полностью соответствует менделевской парадигме наследственности: если искомый признак (мутация) нельзя обнаружить у культурного растения, но этот признак есть у дикого сородича, то через гибридизацию и последующую трансгрессию желаемый признак (мутацию) можно передать от дикаря к культурному виду. Как показала полувекковая практика, перенос репродуктивных признаков (в частности, признака агамоспермии) от диких сородичей к культурным видам, как правило, оказывался неудачным. С теоретической точки зрения цель подобных экспериментов оказывается неясной, так как непонятно, что же, собственно, надо передавать (какую мутацию или какую-то часть генома), а кроме того, при отдаленной гибридизации геномы скрещиваемых видов инконгруэнтны (Карпеченко, 1935), что делает такие гибриды «неинтересными» для практической селекции. Неудача при переносе признака «агамоспермия» встречается не только у отдаленных скрещиваний в роде *Beta*, но и скрещиваний у других родов и семейств растений, где производились подобные отдаленные скрещивания по переносу признака «агамоспермия» (Петров, 1988; Жексембиев, 2010). Между тем поиск признака «агамоспермия» у культурной свеклы оказался успешным в силу гомологической (параллельной) природы изменчивости в пределах рода *Beta*.

Одноростковость посевных единиц свеклы.

Гомология признаков апозиготического способа репродукции семян в роде *Beta* – не единственный пример успешного применения в селекции сахарной свеклы закона гомологических рядов в наследственной изменчивости Н.И. Ва-

вилова. Более ранним примером стало обнаружение у культурной свеклы растений с одиночными цветками на цветоносах, которые вначале были обнаружены у некоторых диких видов рода *Beta*. Речь идет о попытках поиска в популяциях *Beta vulgaris* L. растений с одиночными цветками на цветоносах. Этот признак в популяциях культурной (многоростковой) свеклы не встречался, и работы в этом направлении оказались unsuccessful (Роик, 2010). Начало планомерных работ по этой тематике в Советском Союзе было осуществлено в 1934 г. в ходе выполнения приказа по Наркомату пищевой промышленности СССР, который был подготовлен по инициативе президента ВАСХНИЛ Н.И. Вавилова и подписан сталинским наркомом А.И. Микояном (Личное сообщение М.Г. Бордонос в 1988 г.). Согласно приказу, сотрудникам подведомственных учреждений вменялось: осуществить на свекловичных плантациях поиск растений с одиночными цветками на цветоносах. К этому времени уже было известно, что растения с одиночными цветками на цветоносах (раздельноцветковые или РЦ растения) встречаются только среди дикорастущих видов рода *Beta* (*B. pattelaris*, *B. procumbens*, *B. webbiana*, *B. lomatogona*) (Роик, 2010). Сорто-популяции сахарной свеклы, возделываемые в то время в производстве, были представлены исключительно растениями со сросшимися цветками (срастание 3–5 цветков в одно соцветие-клубочек). Выращивание в производстве многоростковых сортов свеклы было чрезвычайно трудоемким делом, так как связано с необходимостью удаления вручную лишних проростков в посевах. В 1934 г. сотрудниками ВНИС (Всесоюзный НИИ сахарной свеклы) «... было организовано массовое обследование семенных плантаций с целью выявления растений с одиночно сидящими цветками на цветоносах. Всего были просмотрены растения на площади 1023 га. В результате этого обследования было найдено 109 растений, у которых доля одиночных плодов на растениях варьировала от 10 до 90 %» (Роик, 2010. С. 251).

На базе найденных в 1934 г. РЦ растений были выполнены генетические исследования и показано, что РЦ признак – рецессивный и наследуется по моногибридной схеме (Бордонос,

1938) (рис. 1). Выделенные в ходе массового обследования РЦ растения, а также РЦ растения, обнаруженные позже в других селекционных материалах, послужили в дальнейшем основой для создания односторонних сортов и гибридов свеклы как в Советском Союзе, так и в других свеклосеющих странах (Роик, 2010). Таким образом, на основе закона о параллельных рядах изменчивости успешно осуществлен поиск среди многоростковых форм *Beta vulgaris* L. растений РЦ фенотипа, тогда как перенос этого признака от диких видов в культурную свеклу до сих пор не дал практических результатов. «... эффективность использования диких видов рода *Beta* в гибридизации с культурной сахарной свеклой для передачи ей признака раздельноплодности оказалась очень низкой» (Роик, 2010. С. 256).

Исследования украинских биологов-селекционеров 1930–1950 гг. привели к созданию первых односторонних сортов и гибридов свеклы в СССР, что позволило осуществить технологическую революцию в свекловодстве, сократив затраты ручного труда при выращивании свеклы примерно в 40–50 раз. В начале 1960-х гг. биологи-селекционеры были удостоены Ленинской премии. В настоящее время все посевные площади во всех свеклосеющих странах заняты исключительно односторонними сортами и гибридами свеклы.

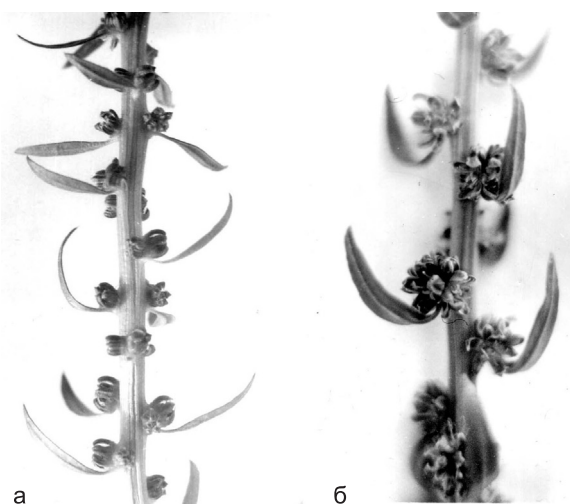


Рис. 1. Цветонос с одиночно сидящими цветками в пазухе листьев (раздельноцветковый фенотип, РЦ) – а; цветонос с цветками, собранными в клубочки-соцветия (сростноцветковый фенотип, СЦ) – б.

Эпигенез морфологических признаков и фракталы

Фрактальная геометрия и эпигенез. Эпигенез – это возникновение новых структур в процессе роста и развития растения начиная с первого деления зиготической (или апозиготической) клетки и заканчивая образованием нового поколения спор и гамет. Процесс эпигенеза есть не что иное, как реализация во времени наследственной информации клеток, и этот процесс не может быть линейным, описываемым языком евклидовой геометрии. Описанию морфоэпигенеза более соответствует лексика фрактальной геометрии: *фракталом называют структуру, состоящую из частей, которые в каком-то смысле подобны целому*.

Если менделизм представляет *организм в виде структуры со статичной мозаикой признаков*, определяемых комбинаторикой генов их детерминирующих, то эпигенетика представляет *развивающийся организм в виде предфрактала (динамического фрактала)*, важнейшее свойство которого – внутреннее самоподобие («как внизу, так и наверху»). «Для морфологического описания и получения количественных характеристик биологических систем различных уровней организации, от молекул до экосистем, все шире применяется язык фрактальной геометрии, дающей возможность корректного и сжатого описания структур и процессов, не доступного для традиционно используемого в биологии языка евклидовой геометрии» (Исаева, 2009. С. 200).

Наследственность в ходе роста и развития растений реализуется через системы морфогенетических и морфофизиологических реакций и процессов, а «процессы морфоэпигенеза упорядочены, строго закономерны и притом тенденциозны» (Соболев, 1924. С. 176). Как известно, общепринятой теории морфоэпигенеза растений в целом или его частей не существует. Справедливо утверждение, что «геном и морфоэпигенез – сущности совершенно разного порядка. ... морфоэпигенез – это разворачивающийся в пространстве–времени континуальный ... процесс. Даже если принять, что каждый шаг морфоэпигенеза связан с активацией или репрессией определенных генов ..., то пространственно временное расписание активации/репрессии генов

должно определяться не ими самими, а ... вне (эпи)генетическими факторами, прямо или косвенно связанными с морфоэпигенезом» (Белоусов, 2009. С. 30).

Фрактальная динамика развития растения – это изменение морфогенетических структур в ряду последовательных (итерационных) клеточных делений, в ходе которых отдельные структуры (предфракталы) обретают свое конечное структурное состояние. Фрактальное представление морфоэпигенеза предполагает синтез двух процессуальных состояний – *динамичности* и *статистичности*, что соответствует нелинейности процессов роста и развития растений и достижению ими некоторых конечных состояний, определяемых как неслучайными, так и случайными факторами. Формирование фрактальных структур в ходе морфоэпигенеза основано на принципе обратной связи, когда конец одной итерации служит началом второй, конец второй итерации – началом третьей и т. д. Пример подобной итерационности дает непрерывность клеточных делений. Итерационность наглядно можно проиллюстрировать на примере формирования геометрического фрактала «снежинка Коха»² (рис. 2). Рост отдельных частей растений

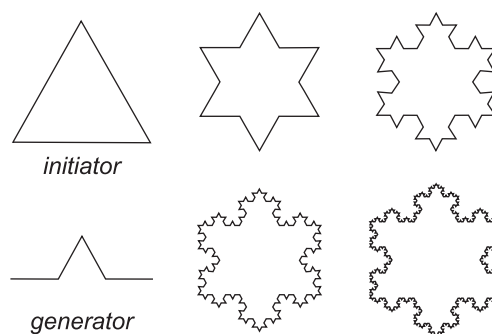


Рис. 2. Пример получения геометрически сложного объекта по правилам замены частей у простого начального объекта.

Initiator (затравка – равносторонний треугольник) – начальный объект, стороны которого заменяются на *generator* (производитель). После однократной итерации получаем 6-угольную звезду, после второй – 18-угольную и т. д. С каждой новой итерацией (поколением) сложность фигуры возрастает и после бесконечного числа итераций получается фрактал, называемый «снежинка Коха» (Мандельброт, 2002).

² Копии кривой Коха, построенные на сторонах правильного треугольника, образуют замкнутую кривую, называемую *снежинкой Коха* (кривая Коха – фрактальная кривая, описанная в 1904 г. шведским математиком Хельге фон Кохом).

как фрактальных структур создает так называемую *итерационную изменчивость* по морфологическим признакам растений. Фрактальность (самоподобие) можно наблюдать у самых разных морфологических структур растений: листьев, корней, побегов, эмбрионов, плодов, семян.

С математической точки зрения, «многообразие фракталов, отраженное через принцип самоподобия, описывается довольно простой формулой множества Мандельброта (ММ). ММ – фрактал, в котором закодировано почти все, если не все многообразие природы» (Богатых, 2006. С. 246). В математике ММ – это фрактал, определенный как множество точек c на комплексной плоскости, для которых задана итеративная последовательность операций

$$z_{n+1} = z_n^2 + c,$$

которая раскрывается для каждой точки c на комплексной плоскости следующим образом:

$$\begin{aligned} Z_0 &= 0 \\ Z_1 &= Z_0^2 + c \\ &= x + iy \\ Z_2 &= Z_1^2 + c \\ &= (x + iy)^2 + x + iy \\ &= x^2 + 2ixy - y^2 + x + iy \\ &= x^2 - y^2 + x + (2xy + y)i \text{ и т. д.} \end{aligned}$$

Точке c на комплексной плоскости можно придавать множество значений, что позволяет получать соответствующее множество различных фрактальных изображений. Если взять ту же итерационную формулу и повторить процесс вычислений, но начальным значением Z на плоскости брать не точку $(0, 0)$, а любые другие числовые значения, то им будут соответствовать новые множества, обозначаемые как множества Жюлиа (Мандельброт, 2002). Указанные обстоятельства позволяют утверждать, что ММ способно кодировать любые формы многообразия в природе (Богатых, 2006).

Фрактальность репродуктивных признаков при гамо- и агамоспермии, как нам представляется, начинается на уровне генома в момент, когда происходит переключение с одной программы развития на другую программу, которую осуществляют гены-переключатели («switch genes»), меняющие эпигенотип клетки. Эмбриогенетические процессы у растений начинаются делением одной клетки (зиготической или апо-зиготической), а потому смена способа семенной репродукции берет свое начало с изменения ее

эпигенотипа. Если клетка зародышевого мешка делится до слияния с мужской гаметой (до оплодотворения), то развивается апозиготический эмбрион, если после оплодотворения – зиготический эмбрион. Условием для апозиготической репродукции семян является отсутствие в воздухе пыльцевых зерен (беспыльцевой способ семенной репродукции) (Малецкая, Малецкий, 1996, 2006; Малецкий и др., 2001; Цильке и др., 2010; Юданова и др., 2011).

Не рассматривая всех причин, определяющих морфогенез, выделим роль полярностей в этом процессе. Частота и направление клеточных делений в ходе эмбриогенеза определяются полярностями, присущими как клеточным элементам молекулярного и надмолекулярного уровней, так и вновь возникающим эмбриологическим структурам (Малецкая, 1984, 1988, 2010). К числу внешних поляризационных факторов растительных клеток и тканей относят гравитацию и свет, а к числу внутренних – различные внутриклеточные и межклеточные полярные градиенты – минеральные ионы, органические молекулы, гормоны и пр. Примером полярности уже на уровне целого растения служит апикальное доминирование на уровне как эмбрионов, так и морфологических структур – побегов, листьев. Все разноуровневые элементы растения формируют в совокупности его морфогенетическое поле, задающее вектор роста на протяжении всего срока развития растения. Процесс построения фрактальных структур при морфогенезе растений порождает *итеративную изменчивость, определяемую числом итерационных событий при формировании отдельных тканей или частей растения.*

Фрактальность (геометрический закон) формирования отдельных морфологических структур хорошо вписывается в представление Н.И. Вавилова о гомологической изменчивости растений, так как формирование сходных признаков у родственных видов в пределах рода или семейства должно описываться одним и тем же фракталом («законом») (Богатых, 2006). Фрактальное представление морфогенеза можно рассматривать в качестве одного из нумеральных фрагментов современной теории селекции и иллюстрации теоретической и практической значимости открытия Н.И. Вавилова

роли параллельной изменчивости в эволюции и селекции растений.

Фрактальная структура репродуктивных признаков сахарной свеклы. Морфогенез цветочных и эмбриологических структур в рамках евклидовой геометрии можно представить как линейный рост числа клеток в ходе развития растений и отдельных морфоструктур цветков, т. е. в конечном счете он позволяет изобразить прямой путь от начальной клетки (зиготы) до нового поколения гамет (зародышевый путь клеток). В рамках традиционных эмбриологических исследований подчеркивается, что в цветках свеклы в завязи формируется всегда одна семязпочка с одним зародышевым мешком, и это умозаключение как будто бы подтверждается четкими демонстрационными эмбриологическими препаратами (Харченко-Савицкая, 1940; Табенцкий, 1968).

Представление о фрактальном строении цветочных и эмбриоструктур не предусматривает такой линейной однозначности, а представляется как непрерывное ветвление (почкование) морфологических структур цветка, что указывает на нелинейность (многовариантность) реализации зародышевого пути клеток растений от первой клетки, дающей начало эмбриону, до нового поколения гаметических клеток.

Становление цветковых фракталов во времени соответствует хрестоматийному описанию процессов морфогенеза цветков и соцветий

свеклы. В ходе морфогенеза формируются такие селекционно значимые признаки, как отдельно- и сроссноцветковость (РЦ–СЦ признак, рис. 1), трех- и многолопастное строение рыльца пестика (рис. 3) и одно- и многосемяпочковость (ОСП–МСП признак, рис. 4) (Малецкая, 1984, 1988, 2010).

Закладке нескольких семязпочек в завязи цветка сопутствует формирование на растениях цветков с многолопастными рыльцами пестиков (рис. 3, б). Если в норме у цветка 3 лопасти пестика (рис. 3, а), то у многосемяпочкового цветка число лопастей варьирует от 5–6 до 10–12 лопастей (рис. 3, б). Это, в свою очередь, предопределяет формирование плодов с 1, 2, 3 и 4 семенами в отдельном плоде (рис. 5). Множественность (ветвление) семязпочек в отдельном цветке (рис. 3 и 4) позволяет предполагать и различные пути семяобразования – может реализовываться как зиготический, так и апозиготический способы репродукции семян. Дополнительно к многосемяпочковости цветков у сахарной свеклы встречается и полиэмбриония, когда в одной семязпочке развиваются два зародыша (рис. 6) – ветвление инициальных клеток зародышей.

У растений РЦ фенотипа из меристематического бугорка побега закладывается отдельный цветок с цветоложем на отдельной цветоножке. У СЦ растений первый цветок в соцветии также закладывается из меристематического бугорка,

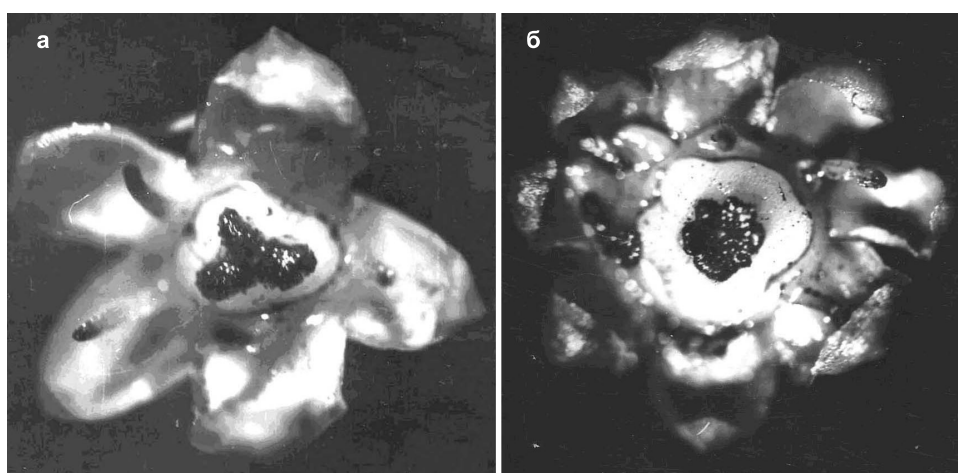


Рис. 3. Цветки свеклы с 3 и 6 лопастями рыльца.

а – обычный цветок с 3 лопастями рыльца пестика, с 5 пыльниками и чашелистиками (с одной семязпочкой в завязи); б – цветок с несколькими семязпочками в завязи с 6-лопастным рыльцем пестика и 8 пыльниками и чашелистиками.

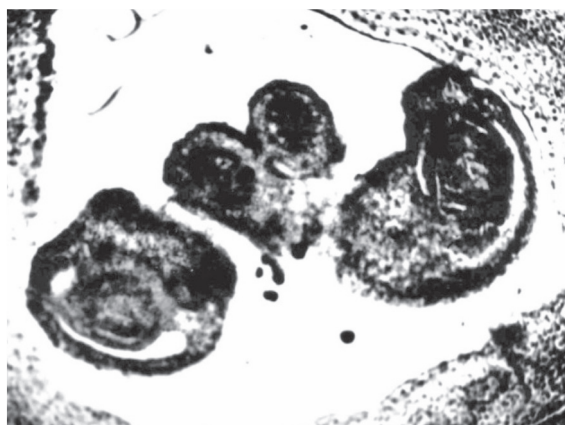


Рис. 4. Нераскрытый цветок с 4 семяпочками в завязи.

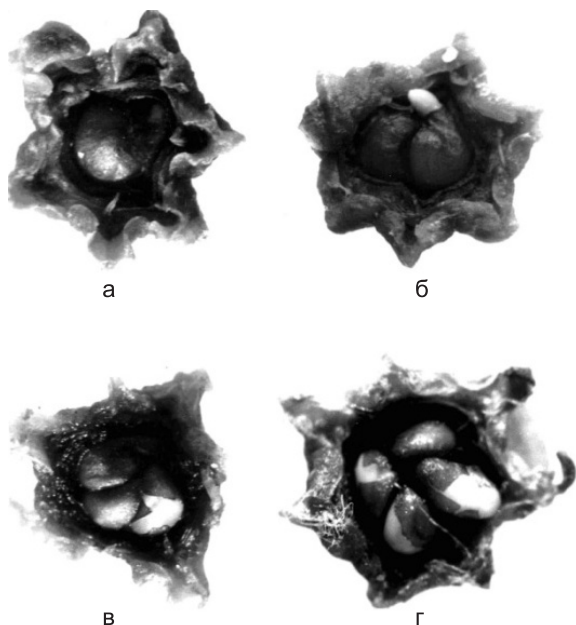


Рис. 5. В одном плоде сформированы: одно (а), два (б), три (в), четыре (г) семени.

а последующие цветки в соцветии-клубочке закладываются из ткани первого цветоложа (Харечко-Савицкая, 1940; Табенцкий, 1968). Если цветок – это видоизмененный побег, то можно отметить, что если внутри цветков наблюдается изотомический (дихотомический) тип ветвления, то внешним тканям цветка (цветоложу) и цветоносным побегам присущ анизотомический (моноподиальный) тип ветвления, т. е. в процессах эмбрио- и морфогенеза (цветков и соцветий) реализуются различные типы ветвления (Малецкая, 1984, 1988, 2010),

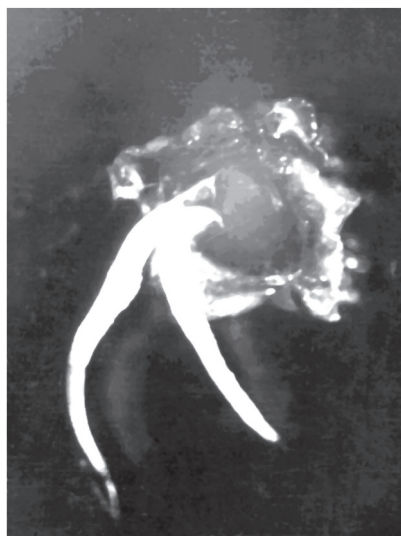


Рис. 6. Один плод с одной семяпочкой и двумя проростками.

определяющие «рисунки» конечных фракталов (цветков и соцветий), а также архитектуру растения в целом (рис. 1, 3–6).

Сахарная свекла с несколькими семяпочками и генетически различными мегаспорами в каждой семяпочке, а также со склонностью генеративных клеток зародышевых мешков к партеногенезу (гаметофитная агамоспермия) представляет собой на сегодня уникальный растительный объект с гаметным типом сегрегации по маркерным признакам на уровне целых растений. Показано, что в апозиготических потомствах свеклы наблюдается автосегрегация по любым маркерным локусам, числовые значения которых радикально отличаются от менделевских пропорций (Малецкий, Малецкая, 1996; Малецкий, 1997, 2000; Левитес и др., 1998; Юданова, Малецкий, 2010).

Настоящая работа выполнялась при поддержке Интеграционного гранта СО РАН № 99 и гранта РФФИ 10-04-00697.

Литература

- Арапова Т.С. О возможности апомиксиса у сахарной свеклы путем заимствования его элементов у диких видов // Генетика сахарной свеклы. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1984. С. 171–177.
- Белоусов Л.В. Морфогенез, морфомеханика и геном // Информ. вестник ВОГиС. 2009. Т. 13. № 1. С. 29–35.

- Богатых Б.А. Фрактальные структуры живого и эволюционный процесс // Журн. общ. биологии. 2006. Т. 67. № 4. С. 243–255.
- Богомоллов М.А. Индуцированный апомиксис и использование его в селекции сахарной свеклы *Beta vulgaris* L. // Энциклопедия рода *Beta*. Биология, генетика и селекция свеклы. Новосибирск: Изд-во «Сова», 2010. С. 504–513.
- Богомоллов М.А., Жужжалова Т.П., Корниенко А.В. Использование индуцированного апомиксиса в создании новых форм сахарной свеклы // Апомиксис у растений: состояние проблемы и перспективы исследований: Тр. Междунар. симп. Саратов, 1994. С. 22–23.
- Бордонос М.Г. Характер расщепления и некоторые особенности свекловичных высадков с одноцветковыми семенами // Селекция и семеноводство. 1938. № 6. С. 24–27.
- Вавилов Н.И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. Линнеевский вид как система Л.: Наука. Ленингр. отд-ние, 1967. 92 с.
- Жексембиев Р.К. Виды рода *Beta* – дикорастущие доноры апомиксиса // Матер. Междунар. науч. конф. «Актуальные проблемы ботанического ресурсоиспользования». Алматы, 2010. С. 295–297.
- Жуковский П.М. Ботаника. М.: Колос, 1982. 624 с.
- Зайковская Н.Э. Биология цветения, цитология и эмбриология сахарной свеклы // Биология и селекция сахарной свеклы. М.: Колос, 1968. С. 137–207.
- Зайковская Н.Э., Ярмолюк Г.И., Болелова З.А. Особенности апомиксиса у анеуплоидных форм сахарной свеклы // Докл. ВАСХНИЛ. 1978. № 9. С. 11–13.
- Карпеченко Г.Д. Теория отдаленной гибридизации // Теоретические основы селекции растений. М.; Л.: Сельхозгиз, 1935. Т. 1. С. 293–354.
- Левитес Е.В., Шкутник Т., Овечкина О.Н., Малецкий С.И. Псевдосегрегация в агамоспермных потомствах пыльцестерильных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Докл. АН. 1998. Т. 362. № 3. С. 430–432.
- Любищев А.А. Проблемы формы, систематики и эволюции организмов. М.: Наука, 1982. 280 с.
- Малецкая Е.И. Наследование признаков многосемянности и многозародышевости у сахарной свеклы // Генетика сахарной свеклы. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1984. С. 79–93.
- Малецкая Е.И. Анатомия и морфология цветков, плодов и соплодий свеклы // Одноростковость свеклы (эмбриология, генетика, селекция). Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1988. С. 12–33.
- Малецкая Е.И. Апомиксис у сахарной свеклы // Апомиксис у растений: состояние проблемы и перспективы исследований: Тр. Междунар. симп. Саратов, 1994. С. 106–108.
- Малецкая Е.И. Многосемяпочковость цветков и многоростковость посевных единиц у сахарной свеклы // Энциклопедия рода *Beta*. Биология, генетика и селекция свеклы. Новосибирск: Изд-во «Сова», 2010. С. 290–301.
- Малецкая Е.И., Малецкий С.И. Апозиготический способ репродукции и гаплоидия у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Фактори экспериментальної еволюції організмів: Зб. наук. прац. Т. 3. Киев: Логос, 2006. С. 274–280.
- Малецкая Е.И., Юданова С.С., Малецкий С.И. Гаплоидия в апозиготических семенных потомствах сахарной свеклы *Beta vulgaris* L. // Докл. АН. 2009. Т. 426. С. 710–713.
- Малецкий С.И. Влияние экологических условий на выявление потенциальной способности растений к неполному способу формирования семян (на примере сахарной свеклы *B. vulgaris*) // Введение в популяционную биологию и генетику растений. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 1995. С. 67–71.
- Малецкий С.И. Сцепленное и несцепленное наследование в партеногенетических потомствах растений // Генетика. 1997. Т. 33. № 10. С. 1333–1340.
- Малецкий С.И. Биология размножения сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Малецкий С.И. Биномиальные распределения в генетических исследованиях на растениях. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2000. С. 75–96.
- Малецкий С.И. Семенное размножение сахарной свеклы // Энциклопедия рода *Beta*. Биология, генетика и селекция свеклы. Новосибирск: Изд-во «Сова», 2010. С. 52–62.
- Малецкий С.И., Левитес Е.В., Батуринов С.О., Юданова С.С. Репродуктивная биология покрытосеменных растений. Генетический словарь. Новосибирск: Ин-т цитологии и генетики СО РАН, 2004. 160 с.
- Малецкий С.И., Малецкая Е.И. Самофертильность и агамоспермия у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. 1996. Т. 32. № 12. С. 1643–1650.
- Малецкий С.И., Шкутник Т., Прусинская Е., Червчак У. Экспрессия аллелей локуса *Mdh1* в апозиготических потомствах сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. 2001. Т. 37. № 3. С. 344–349.
- Мандельброт Б. Фрактальная геометрия природы. М.: Ин-т комп. исследований, 2002. 656 с.
- Мирзоян Э.Н. Н.И. Вавилов и теоретическая биология // Этюды по истории теоретической биологии. М.: Наука, 2006. С. 207–222.
- Петров Д.Ф. Значение апомиксиса для закрепления гетерозиса // Докл. АН СССР. 1957. Т. 112. С. 954–957.
- Петров Д.Ф. Апомиксис в природе и опыте. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1988. 214 с.

- Роик Н.В. Создание однострочковых сортов и гибридов сахарной свеклы в Советском Союзе // Энциклопедия рода *Beta*. Биология, генетика и селекция свеклы. Новосибирск: Изд-во «Сова», 2010. С. 248–264.
- Соболев Д.Н. Начала исторической биогенетики. Симферополь: Гос. изд-во Украины, 1924. 204 с.
- Сеилова Л.Б. Апомиксис у сахарной свеклы и его использование в практической селекции: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Алматы, 1996. 44 с.
- Табенцкий А.А. Анатомо-биологический очерк сахарной свеклы // Физиология сельскохозяйственных растений. М.: Изд-во МГУ, 1968. Т. VII. С. 28–72.
- Фаворский Н.В. Материалы по биологии и эмбриологии сахарной свеклы // Докл. ВАСХНИЛ. 1928. № 3. С. 3–11.
- Филипченко Ю.А. Индивидуальная изменчивость. Вариационный ряд и кривая // Изменчивость и методы ее изучения. Основы биологической вариационной статистики. Л., 1926. С. 5–32.
- Харечко-Савицкая Е.И. Цитология и эмбриология сахарной свеклы // Свекловодство. Т. 1. Киев: Госсельхозиздат, 1940. С. 453–550.
- Цильке Р.А., Позняк С.И., Малецкая Е.И. и др. Завязываемость плодов у гибридов сахарной свеклы при апозиготической репродукции в контрастных условиях выращивания // Вестник НГАУ. 2010. Т. 5. № 3. С. 19–25.
- Чайковский Ю.В. Преобразование разнообразия. Эволюционная теория Сергея Мейена // Химия и жизнь. 1994. № 1. С. 20–24.
- Штеренберг М.И. Биоэволюция. М.: Волшебный фонарь, 2009. 410 с.
- Юданова С.С. Миксоплоидия клеточных популяций сахарной свеклы и ее связь с репродуктивными признаками: Дис. ... канд. биол. наук. СПб: Всерос. НИИ растениеводства, 2004. 126 с.
- Юданова С.С. Миксоплоидия клеточных популяций у сахарной свеклы // Энциклопедия рода *Beta*. Биология, генетика и селекция свеклы. Новосибирск: Изд-во «Сова», 2010. С. 63–86.
- Юданова С.С., Малецкий С.И. Миксоплоидия клеточных популяций и автосегрегация по локусу *Mm* в потомствах сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) при апозиготии // Биология развития: морфогенез репродуктивных структур и роль соматических, стволовых клеток в онтогенезе и эволюции: Матер. междунар. конф., посвященной 50-летию юбилею Лаб. эмбриологии и репродуктивной биологии БИН РАН. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2010. С. 141–142.
- Юданова С.С., Малецкий С.И., Позняк С.И., Малецкая Е.И. Изменчивость завязываемости плодов при апозиготическом способе репродукции у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. 2011. Т. 47 (В печати).
- Ярмолук Г.И., Белгородская С.П., Балков И.Я. Апомиксис у сахарной свеклы // Апомиксис у растений: состояние проблемы и перспективы исследований: Тр. междунар. симп. Саратов, 1994. С. 166–168.
- Asker S., Jerling L. Apomixis in Plants. CRC Press, Boca Raton, 1992. 298 p.
- Barocka K.H. Die section corollinae der gattung *Beta* (Tournef) L. // Z. Pflanzenzücht. 1966. Bd. 56. № 4. S. 379–388.
- Cleij G., Bock T.S.M. Crosses between *Beta intermedia* Bunge and *Beta vulgaris* L. // Euphytica. 1968. V. 17. P. 11–20.
- Jassem B. Embriology and genetics of apomixes in the section Corollinae of the genus *Beta* // Acta Biol. Cracovensia. Ser. Botanica. 1976. V. 19. P. 151–172.
- Jassem B. Apomiksja u tetraploidalnych mieszancow między wielonasiennym burakiem cukrowym i *Beta lomatogona* F. et M. // Hodowla Roslin. Aklimatyzacja i Nasienictwo. 1969. T. 13. Z. 3. S. 245–255.
- Jassem B., Jassem M. The embriology of sterile F_1 hybrids between the sugarbeet and *Beta webbiana* Moq. // Acta Agrobotanica. 1969. V. XXII. Z. 1. S. 5–12.
- Koltunow A.M., Grossniklaus U. Apomixis: a developmental perspective // Annu. Rev. Plant Biol. 2003. V. 54. P. 547–574.
- Owen F.V. Inheritance of cross- and self-sterility and self-fertility in *Beta vulgaris* L. // J. Agric. Res. 1942. V. 64. P. 679–698.
- Richards A.J. Chapter 10. Agamospermy // Plant breeding system. London: Allen and Unwin, 1997. P. 396–450.
- Szkutnik T. Apomixis in the sugar beet reproduction system // Acta Biol. Cracoviensia. Ser. Botanica. 2010. V. 52. № 1. P. 87–96.
- Szkutnik T., Prusinska E., Czerwczak U. Uzyskanie agamospermicznych potomstw u męskosterylnych roślin buraka cukrowego (*Beta vulgaris* L.) // Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin. 2001. V. 217. P. 249–261.

**APOZYGOUS SEED PRODUCTION IN THE SYSTEM
OF THE GENUS *BETA* (CHENOPODIACEAE)
AND VAVILOV'S HOMOLOGY SERIES**

S.I. Maletsky, E.I. Maletskaya, S.S. Yudanova

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

Summary

The homology of seed reproduction modes in species of the genus *Beta* (Chenopodiaceae) is considered. It is demonstrated that apozygous reproduction is typical in wild *Beta* species and in the cultivated species *B. vulgaris* L. On the one hand, the homology of seed reproduction modes in *Beta* is in agreement with Vavilov's law of homologous hereditary variability; on the other hand, this homology can hardly be explained by a parallel mutation process in genes governing traits associated with seed reproduction. Hence, the agamospermy in sugar beet is of epigenetic nature. The fractal way of description of the flower structure morphogenesis is also in agreement with the nomological component of the said law, because plant morphogenesis can be adequately described in terms of fractal geometry.

Key words: gene autosegregation, agamospermy, apozygoty, apomixis, homologous variability, iterations, mixoploidy, uni- and multiovulation of flowers, parthenogenesis, reproductive traits in plants, fractal geometry, epigenesis, epigenes.

СУЩЕСТВУЕТ ЛИ ГАМЕТОФИТНЫЙ АПОМИКСИС У ДИПЛОИДНЫХ ЦВЕТКОВЫХ РАСТЕНИЙ?

В.А. Соколов^{1,2}, П.А. Панихин¹, Т.К. Тараканова¹

¹ Учреждение Российской академии наук Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: sokolov@mcb.nsc.ru;

² Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

В статье изложен анализ имеющихся в литературе результатов по обнаружению бесполосеменного (апомиктического) размножения у диплоидных цветковых растений. Под этим термином принято понимать клоновое размножение растений через семенную фазу. В этом случае зародыш формируется из диплоидной материнской клетки без участия генетического материала отца и является абсолютной генетической копией матери. Еще в 1940-е годы Г. Стеббинс (Stebbins, Babcock, 1939), а затем и другие исследователи (Powers, 1945) обратили внимание на тесную связь апомиктического размножения и полиплоидии. До настоящего момента нет какого-либо принятого объяснения этого феномена, но вместе с тем не обнаружено ни одного приемлемого доказательства существования бесполосеменных диплоидов. Был проработан большой массив сообщений по данной теме, и в результате был сделан вывод о том, что статьи об обнаружении диплоидных апомиктов не имеют однозначных доказательств по причине недостаточного методического обеспечения экспериментов или связаны с неверной трактовкой термина *диплоид*.

Ключевые слова: апомиксис, зародышевые мешки, диплоиды, полиплоиды, анеуплоиды, полигаплоиды.

Введение

Прежде всего, стоит пояснить, что подразумевается под терминами *диплоид* и *полиплоид*. Под диплоидами имеются в виду формы или клетки, обладающие полным набором гомологичных пар хромосом. Э.А. Страсбургер, предложивший этот термин, полагал, что зигота получает по гаплоидному набору гомологов от обоих родителей. Поскольку у апомиктов потомки наследуют геномы только от матери, мы оставили лишь первую часть его классического определения. Полиплоидами называем клетки или организмы, число хромосом которых более чем диплоидное ($> 2n = 2x$). При этом, если геном содержит количество хромосом кратное гаплоидному, то полиплоид – сбалансированный. Если нет, то такие формы считаем гетероплоидами или анеуплоидами.

Первым на тесную корреляцию апомиксиса и полиплоидии обратил внимание Л. Стеббинс (Stebbins, Babcock, 1939). Позднее эта проблема

была рассмотрена весьма подробно в работе Пауэрса (Powers, 1945). К настоящему моменту связь апомиксиса и полиплоидии у растений достаточно хорошо обоснована экспериментально (Nogler, 1984; Carman, 1997; Savidan, 2000; Sokolov, Khatypova, 2000). Тем не менее периодически появляются сенсационные сообщения об обнаружении диплоидных растений, размножающихся бесполосеменным путем. В прошлом заблуждения такого рода, иногда очень длительные, были связаны с тем, что способ репродукции определяли по фенотипическим признакам потомков. Этот метод не позволял однозначно отличать апомиктических потомков от полученных в результате самоопыления или гибридизации с сибями, что служило источником ошибок и посылкой к неверной интерпретации получаемых результатов (Holm, Ghatnekar, 1996; Holm *et al.*, 1997). Публикации о наблюдении апомиктического способа репродукции у диплоидных растений можно разделить на две группы. Первая и наиболее

обширная связана либо с изучением $2n = 2x$ цитотипов агамных комплексов, либо с экспериментальными попытками передачи апомиктического способа размножения от полиплоидов диплоидным формам. Агамными комплексами называют естественные популяции какого-

либо вида растений, состоящие из индивидов, несущих кариотипы различной пloidности, от $2n = 2x$ до $2n = 16x$.

Диплоидные компоненты агамных комплексов размножаются сексуально, а полиплоиды, как правило, являются апомиктами (рис. 1).

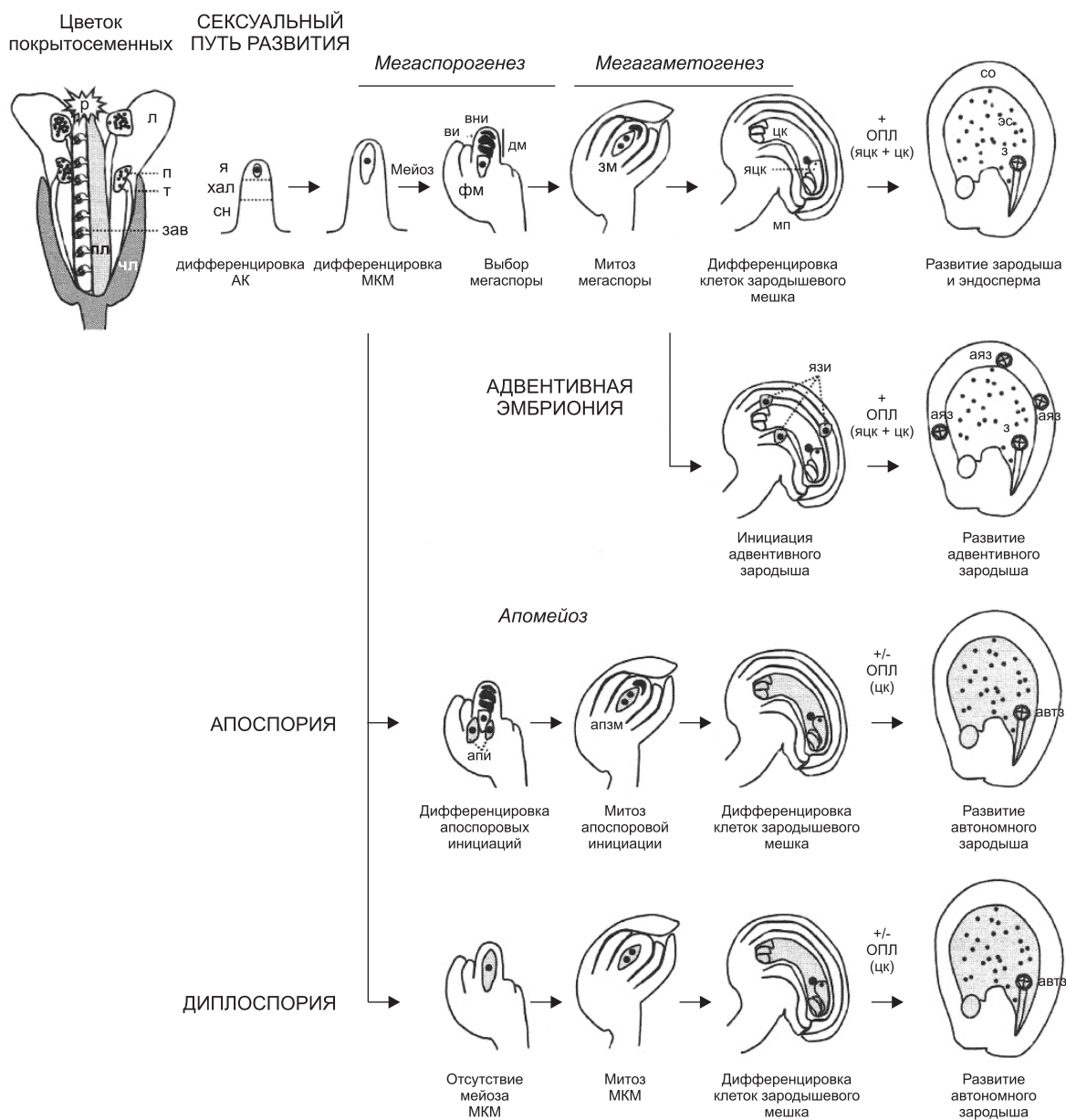


Рис. 1. Стадии развития семяпочки и семени у сексуальных и апомиктических покрытосемянных.

Сокращения (см. рисунок): *р* – рыльце; *пл* – плодolistик; *л* – лепесток; *п* – пыльник; *т* – тычинка; *зав* – завязь; *чл* – чашелистик; *я* – ядро; *хал* – халаза; *сн* – семяножка; *АК* – археспориальная клетка; *МКМ* – материнская клетка мегаспоры; *ви* – внешний интегумент; *вни* – внутренний интегумент; *дм* – дегенерирующие мегаспоры; *фм* – функционирующая мегаспора; *зэм* – зародышевый мешок; *яцк* – яйцеклетка; *цк* – центральная клетка; *мп* – микропиле; *ОПЛ* – оплодотворение; *со* – семенная оболочка; *эс* – эндосперм; *з* – зародыш; *язи* – ядра зародышевых инициалей; *аяз* – адвентивные ядерные зародыши; *апи* – апоспоровая инициаль; *апзм* – апоспоровый зародышевый мешок; *автз* – автономный зародыш. Апомиктические структуры на схеме семяпочка/семя затушеваны в серый цвет (Tucker, Koltunov, 2009).

Внутри интерплоидных популяций существует постоянный поток генов между растениями разных цитотипов (Harlan *et al.*, 1964; Asker, Jerling, 1992). Диплоиды в таких сообществах, кроме полового воспроизведения, могут формироваться как дигаплоиды в результате партеногенетического развития редуцированных яйцеклеток тетраплоидов (Harlan *et al.*, 1964; Asker, Jerling, 1992). В связи с этим обстоятельством теоретически среди диплоидных форм агамного комплекса вполне могут обнаруживаться растения, несущие все локусы, контролирующие элементы апомиксиса и экспрессирующие его. Диплоидные апомикты такого типа наиболее вероятны среди видов с автономным развитием эндосперма, поскольку у них отсутствует препятствие, связанное с дисбалансом родительских геномов в развитии этого органа (Sokolov, 2006). У псевдогамных апомиктов для успешного развития функционального эндосперма требуются либо изменения в проявлении эффекта импринтинга, либо модификации развития зародышевого мешка и оплодотворения. Одним из таких типов бесполосеменных растений являются апоспорические формы с развитием четырехъядерного зародышевого мешка Ranunculum-типа. У них центральная клетка формируется на основе единственного полярного ядра, несущего соматический набор хромосом ($2n$). При ее оплодотворении спермий приносит гаплоидное ядро, поэтому соотношение геномов родителей в первичной клетке эндосперма будет $2F : 1M$, как и при половом размножении. И, наконец, третий вариант ухода от эффекта импринтинга из-за нарушения баланса геномов – это оплодотворение центральной клетки двумя гаплоидными спермиями или одним нередуцированным диплоидным. Первый из этих вариантов наблюдается у лютика (*Ranunculus*), а второй – у бочеры (*Boechea*) (Naumova *et al.*, 2001). Вместе с тем у бочеры, видимо, возможен и вариант оплодотворения, наблюдаемый у лютика (Taskin *et al.*, 2009a, b). Эта группа растений крайне полиморфна. Разные виды и линии демонстрируют различия по элементам апомиксиса, что, возможно, и приводит к противоречию результатов (Naumova *et al.*, 2001; Kantama, 2005; Taskin *et al.*, 2009a, b). Так, Д. Карман обнаружил у почти облигатного полигаплоида *Boechea microphylla* ($2n = 2x = 14$) формирование как апоспорических, так и ди-

поспорических зародышевых мешков (Личное сообщение Д. Кармана, рис. 2). При этом диплоспория может быть как *Antennaria*- так и *Taraxacum*-типов.

Следует подчеркнуть, что изучение бесполосеменного размножения у *Boechea* только началось, и пока нет достаточного пула экспериментальных результатов, чтобы сделать определенные выводы. Все выкладки, приведенные нами в пользу возможного обнаружения диплоидных апомиктов в природе или их экспериментального получения, не учитывают еще одного не столь давно обнаруженного феномена. При переходе из диплоидного состояния в полиплоидное и обратно экспрессия некоторых генов существенно меняется. Поэтому предсказать со всей определенностью пенетрантность и экспрессивность развития такого сложного признака, как апомиксис, при изменении плоидности не представляется возможным (Adams, Wendel, 2005; Comai, 2005; Rodrigues, Koltunow, 2005; Chen, Ni, 2006). Отсюда можно заключить, что дигаплоидизация полиплоидных апомиктных растений путем партеногенетического развития редуцированных яйцеклеток может быть сопряжена с эпигенетическим изменением экспрессии признака бесполосеменного размножения у получаемых форм.

Вторая группа публикаций связана с обнаружением диплоидных апомиктов у экспериментальных и культурных растений (Зайковская и др., 1978; Сеилова и др., 1984, 1989, 1994; Малецкий, Малецкая, 1996; Богомолов, 2007; Elkonin *et al.*, 2007; Kantama *et al.*, 2007). При этом культурные бесполосеменные растения были выявлены среди обычных сексуально размножающихся сортов, которые длительное время селектировали и изучали как половые (Rao, Narayana, 1968; Rao, Murty, 1972; Зайковская и др., 1978; Сеилова и др., 1984; Малецкий, Малецкая, 1996; Малецкий и др., 1998; Богомолов, 2007). Более того, некоторые исследователи на основе таких апомиктов создали гетерозисные гибриды (Богомолов, 2007).

Создание диплоидных апомиктов является принципиальным моментом для освоения на практике технологий бесполосеменной селекции, которая, по сложившимся представлениям, должна радикально изменить создание сортов и сельскохозяйственное производство (Jefferson,

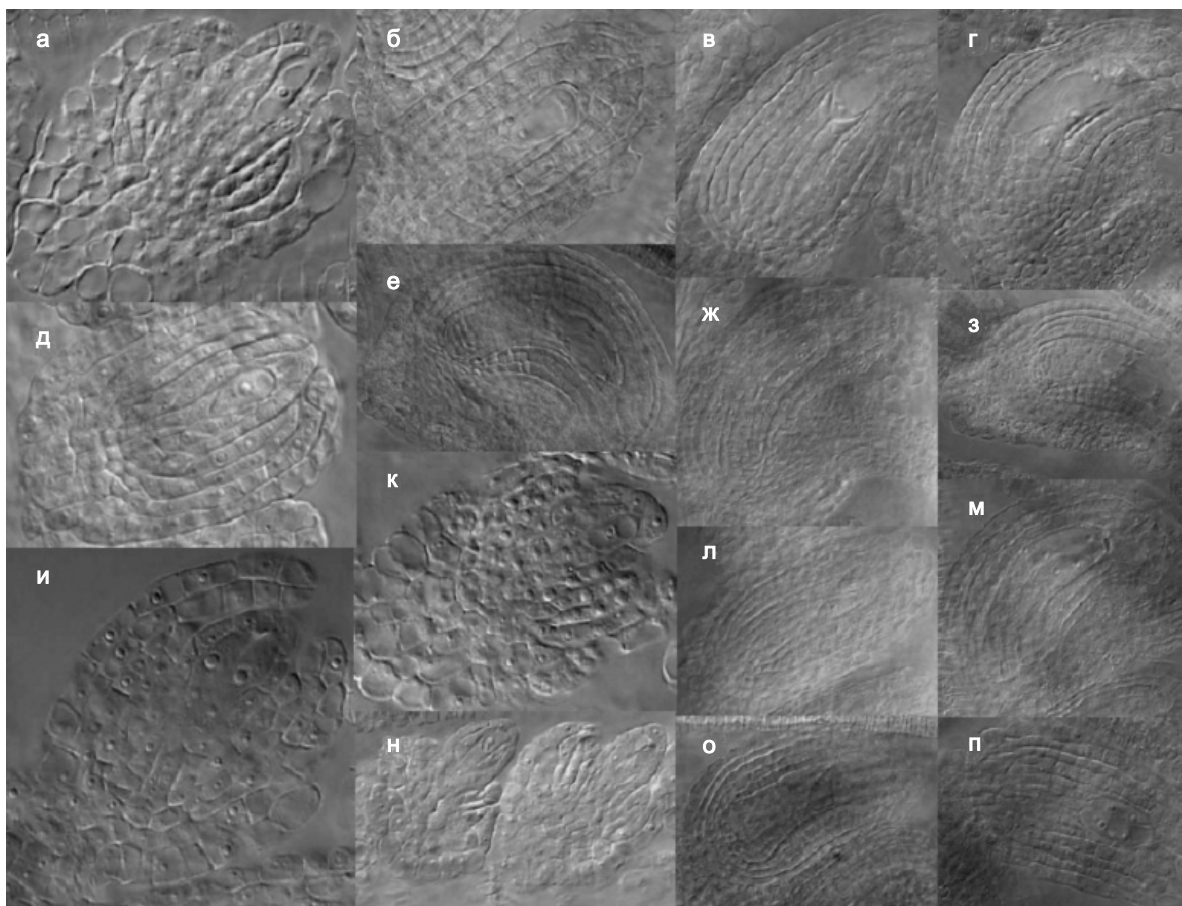


Рис. 2. Половые, диплоспорические и аспоспорические зародышевые мешки у *Boechea microphylla*.

а, к – ранняя дегенерация МКМ и замещение ее аспоспорической или возможно диплоспорическое развитие; б, г, е, з, л, м, о, п – первичные и вторичные аспоспорические зародышевые мешки; д – Тагахасум-тип диплоспории; и – множественные аспоспорические инициалии (АИ), замещающие МКМ; н – половая МКМ слева и АИ и аспоспорические мешки, замещающие половую МКМ. Фото представлены Дж. Карманом.

1994; Hanna, 1995; Kindiger, Sokolov, 1997; Savidan, 2000). Это связано с тем, что апомиктическая репродукция позволяет сохранять комплексы сложных признаков (например, гетерозис) без расщепления теоретически бесконечно долго, что резко сокращает потерю ресурсов при получении гибридных семян (Kindiger, Sokolov, 1997). Поэтому получение самоконирующихся культурных растений рассматривается в современной прикладной биологии как скатерть самобранка (или Святой Грааль).

В данном обзоре предпринята попытка проанализировать опубликованные по диплоидным апомиктам результаты и, насколько возможно, подвести черту под многолетними дискуссиями по этой проблеме.

Лапчатка (*Potentilla argentea*)

Первое упоминание об обнаружении диплоидных апомиктов в природных популяциях связано с изучением агамных комплексов лапчатки (*Potentilla argentea*) и принадлежит шведскому классику генетики А. Мюнтцингу (Muntzing, 1928, 1931). Более 60 лет из-за несовершенства экспериментальных методов этот ошибочный результат не был опровергнут, несмотря на обширные исследования многих авторов (Muntzing, 1933, 1940; Popoff, 1935; Shimotomai, 1935; Gentcheff, 1938; Gentcheff, Gustafson, 1940; Muntzing A., Muntzing G., 1941, 1943, 1945; Hakansson, 1946; Asker, 1966, 1970a, b, 1971, 1978–1980). При этом Аскер подчеркивал,

что апомиктические диплоиды лапчатки встречаются только как составная часть агамных комплексов. Более того, им была предложена схема циклической динамики цитотипов в природных популяциях этих растений (Asker, Jerling, 1992). Однако широкое использование биохимических и молекулярных методов в конце 20 в. позволило со всей определенностью установить, что диплоиды в агамных комплексах размножаются сексуально. Наиболее активный исследователь природных популяций *Potentilla* С. Аскер через два десятка лет работы усомнился в существовании диплоидных апомиктов (Asker, 1990; Asker, Jerling, 1992). Далее были получены экспериментальные доказательства отсутствия бесполосемянных растений среди диплоидов агамных комплексов *P. argentea* (Holm, 1995; Holm, Ghatnekar, 1996; Holm *et al.*, 1997). Используя RAPD маркеры, Холм показал, что в 19 природных популяциях диплоиды лапчатки размножаются самоопылением с присутствием небольшого числа гибридов от перекрестного опыления. Клоновых форм среди потомства у диплоидов, т. е. апомиктов, он не обнаружил (Holm, 1995). Далее при контролируемом опылении и анализе получаемых гибридов с использованием изозимных маркеров, а также проточной цитофотометрии было показано, что все они имеют половое происхождение (Holm, Ghatnekar, 1996; Holm *et al.*, 1997). Этими работами было окончательно установлено отсутствие бесполосемянного размножения у диплоидных лапчаток.

Злаки (*Poaceae*)

Роды *Paspalum*, *Brachiaria*, *Panicum* принадлежат трибе Paniceae подсемейства Panicoideae, имеющим очень высокий уровень морфологического и таксономического разнообразия. Растения этих родов существуют в форме агамных комплексов и имеют много общего в репродуктивной стратегии (Stebbins, 1950). Все они являются важнейшими пастбищными растениями и требуют селекционного улучшения, чему препятствует апомиксис. Обычно в природных агамных популяциях Paniceae диплоиды крайне редки – около 2 %. Они в большей массе стерильны и не способны конкурировать с полиплоидами. Харлан и де Вет

(Harlan *et al.*, 1964) не нашли апоспорических диплоидов у *Bothriochloa – Dichanthium*, а Савидан – у *Panicum maximum* (Savidan, Pernes, 1982). Среди трав к настоящему моменту выявлены виды, которые экспрессируют отдельные элементы апомиксиса на диплоидном уровне. Так, например, апоспорические зародышевые мешки и партеногенетические зародыши на ранних стадиях развития обнаружены у диплоидной *Brahiaria decumbens*. Но семян, развившихся из этих зародышевых мешков, не зарегистрировано, так как у них не формируется эндосперм, и партеногенетические зародыши гибнут на стадии глобулы (Naumova *et al.*, 1999). У некоторых диплоидных видов *Paspalum* (*P. equitans*, *P. cromoiorrhizon*, *P. intermedium*, *P. quadrifarium*, *P. haumanii*, *P. rufum*, *P. notatum*) наряду с обычными половыми спорадически обнаруживаются апоспорические зародышевые мешки. Но экспериментальных доказательств бесполосемянного размножения этих видов пока не имеется (Quarin, 1986; Quarin, Norrmann, 1987; Norrmann *et al.*, 1989; Quarin *et al.*, 2001). Рассмотрим далее работы по выявлению элементов апомиктического размножения у диплоидных злаков как наиболее изученной в этом направлении группе.

Гречка (*Paspalum rufum*)

Наиболее обширные исследования по выявлению диплоидных апомиктов были проведены на различных видах гречки – *Paspalum* (Quarin, 1986; Quarin, Norrmann, 1987; Norrmann *et al.*, 1989; Quarin *et al.*, 2001). Обычно виды этого рода (их более 400, и это одна из главных пастбищных культур, занимающая миллионы га в Аргентине и Бразилии) организованы в агамные комплексы. Числа хромосом у индивидов, входящих в них, колеблются от $2n = 2x$ до $2n = 16x$. Диплоидные формы, как правило, – самонесовместимые растения, а полиплоиды являются апоспорическими, самоопыляемыми, псевдогамными апомиктами с весьма переменными по структуре зародышевыми мешками. Центральная клетка обычно содержит два полярных ядра. При этом зародышевый мешок может быть трехъядерным, и тогда у него отсутствуют как синергиды, так и антиподы. Возможен и пятиядерный вариант, когда

имеется яйцеклетка, две синергиды и двухъядерная центральная клетка (рис. 3). Впрочем, возможны и другие варианты.

Возможно, что неопределенность в формировании компонентов зародышевого мешка есть способ преодоления импринтинга у *Paspalum*, что приводит к формированию функциональных зерновок при самоопылении редуцированной пылью. Наиболее детально изучавшаяся диплоидная форма *P. rufum* имеет $2n = 2x = 20$ и размножается сексуально, при этом высокостерильна. В то же время тетраплоиды этого вида ($2n = 4x = 40$) являются самоопыляемыми псевдогамными апомиктами. Фенотипически эти цитотипы очень близки и при гибридизации дают незначительное количество гибридных семян, что, по всей видимости, объясняется эффектом импринтинга (Nortmann *et al.*, 1994). Цитозембриологические исследования показали, что некоторые диплоидные перекрестники гречки из агамных комплексов, в том числе и *P. rufum*, спорадически формируют апоспорические зародышевые мешки (Quarin, 1986; Quarin, Nortmann, 1987; Nortmann *et al.*, 1989). Отсюда можно предполагать, что на диплоидном уровне существует некоторый генетический потенциал к апоспорическому размножению. Поскольку апомиксис тесно связан с полиплоидией, выявление экспрессии бесполого размножения у диплоидов могло бы изменить существующие представления о его генетическом контроле, равно как и о стабильности агамных комплексов как эволюционно сложившейся адаптивной системе.

В генетических исследованиях по доказательству возможной апомиктической репродукции диплоидов был использован обнаруженный в природе $2n = 2x$ цитотип *P. rufum* – Q3754 (Siena *et al.*, 2008). Эмбриологические исследования этой линии показали, что от 8,8 до 26,8 % ее семян имеют одновременно как сексуальные, так и апоспорические зародышевые мешки, а остальные – только половые (Nortmann *et al.*, 1989). Апомиксис и сексуальное размножение не исключают друг друга, и часто одно и то же растение и даже семяпочка могут нести зародышевые мешки обоих типов (Harlan *et al.*, 1964). Апомикты, дающие хотя бы часть потомства половым путем, называются факультативными. Потомство

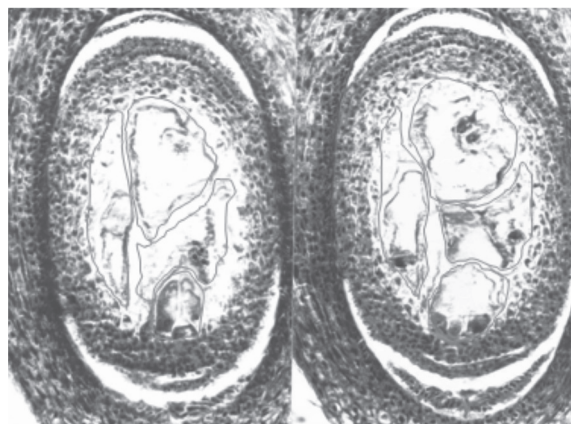


Рис. 3. Апомиктический тетраплоид *Paspalum notatum*.

Два последовательных среза материнской завязи, демонстрирующих четыре апоспорических зародышевых мешка (фото предоставлено С. Quarin).

таких растений может быть представлено 4 вариантами: 1) сегрегационные V^{II} гибриды – при половом формировании яйцеклетки и ее оплодотворении ($n + n$); 2) собственно апомикты – при апомейотическом формировании яйцеклетки и ее партеногенетическом развитии ($2n + 0$); 3) потомки с увеличенной относительно материнского организма плоидностью, когда нередуцированная яйцеклетка оплодотворяется и дает потомство – V^{III} ($2n + n$); 4) полигаплоиды, когда редуцированная яйцеклетка развивается партеногенетически ($n + 0$) (Nogler, 1984; Savidan, 2000). При этом в случае завязывания V^{II} и V^{III} гибридов от самоопыления их иногда называют S^{II} и S^{III} соответственно. Анализ потомства – это лучший и абсолютно точный способ оценки уровня агамоспермии у факультативных апомиктов, так как закладка апоспорического зародышевого мешка, наблюдаемая цитозембриологически, не гарантирует формирования бесполого потомства. У апоспорических апомиктов всегда закладываются сексуальные зародышевые мешки и в развитии осуществляется много фенокритических событий, поэтому любой из зародышей может погибнуть на каком-либо этапе развития семени (Marshall, Brown, 1974). Для дифференциации полового потомства от апомиктического можно использовать различные методы с тестированием признаков по ДНК (Kantama *et al.*, 2007)

или достаточно быстрое и массовое сравнение путем количественной цитофотометрии ДНК в ядрах (Matzk *et al.*, 2000). Этот метод позволяет оценить содержание ДНК в зародыше и эндосперме единичной зерновки. Гречка является удобным объектом для изучения методом проточной цитофотометрии, поскольку апомиксис у нее псевдогамный и получаемое при этом соотношение геномов между зародышем и эндоспермом при апоспории будет 2/5, а у половых – 2/3, что безошибочно тестируется.

Способ репродукции у линии Q3754 был перепроверен цитозембриологически на стадии выброса пыльников. С этой целью были проанализированы 48 семязпочек для обнаружения зародышевых мешков, соответствующих разным способам размножения: 1) Polygonum-типа, т. е. сформированных только редуцированными мегаспорами; 2) как редуцированных, так и апоспорических; 3) только апоспорических. Наблюдения показали, что абсолютное большинство исследованных семязпочек – 42 (87,5 %) – содержали по единственному зародышевому мешку. Они имели характерный для Polygonum-типа набор структурных элементов – яйцеклетку, две синергиды у микропиллярного отдела, большую вакуолированную центральную клетку с двумя полярными ядрами и группу антипод в халазальной части. Другие 6 семязпочек (12,5 %) имели по одному мейотическому зародышевому мешку и одному апоспорическому. При этом апоспорический был меньше и имел 4–5 клеток. Одна из них – яйцеклетка, одна или две – синергиды и большая клетка с двумя полярными ядрами. Все апоспорические зародышевые мешки не имели антипод. Эти результаты говорят о наличии у изученной диплоидной линии Q3754 весьма незначительного потенциала к апомиксическому размножению. На основании полученных данных было решено проанализировать потомство этой линии при гибридизации с разными отцовскими формами с целью определения уровня возможной апоспории у потомков изучили три популяции.

Первая из них – семья Н1 (44 растения) была получена опылением Q3754 пыльцой естественного диплоида Q3861 этого же вида. Следующая семья – S1 (95 растений) была получена путем стимулирования самоопыления у Q3754. С этой целью пыльцу *Paspalum urvillei* наносили на

пыльца *P. rufum*, при этом гибридизация отсутствовала, но разрушалась система самонесовместимости, что позволяло собственной пыльце прорасти и оплодотворять яйцеклетки (Quarin, Norrmann, 1987; Burton, Hanna, 1992; Quarin, Caronio, 1995). И, наконец, третья семья – М1 (20 растений) была получена опылением Q3754 пыльцой тетраплоида Q3785 этого же вида.

Анализ популяции Н1 показал, что все ее растения являются продуктами только половой репродукции и у них всегда присутствует хотя бы один маркер от пыльцевого родителя. Более того, не было выявлено ни одного V^{III} гибрида, так как все растения были сегрегантами по материнским маркерам вследствие прохождения мейоза при макроспорогенезе. Этот результат совершенно однозначно можно интерпретировать как отсутствие функциональных апоспорических зародышевых мешков у диплоида Q3754, и все полученное потомство является результатом полового размножения.

Анализ семьи S1 показал, что 5 из 95 растений имеют такой же тип гетерозиготности по 14 маркерам, как и материнское растение. Siena с соавт. (2008) полагают, что случайное восстановление гетерозиготной конституции в результате полового размножения маловероятно, поэтому следует считать их продуктом бесполого размножения. Таким образом, основной способ размножения у линии Q3754 сексуальный, и ожидаемая частота апоспории – 7,3 %. Здесь два момента осложняют однозначность интерпретации, и они связаны с методами проведения эксперимента. Прежде всего, при некоторой селективности прорастания пыльцы восстановление гетерозиготности по 14 маркерам у 5 растений из 95 вполне допустимо. Во-вторых, такие маркеры могли быть привнесены пыльцой *P. urvillei*, использовавшейся для преодоления барьера самонесовместимости.

В потомстве Н1 и S1 были только диплоидные растения, в то время как при опылении Q3754 пыльцой тетраплоидного цитотипа этого же вида, Q3785 (вариант М1), получали диплоидные (15 растений – 75 %), триплоидные (4 растения – 20 %) и тетраплоидные формы (1 растение – 5 %). Диплоиды, по всей видимости, являются продуктом самоопыления. Триплоиды являются продуктом опыления

редуцированной яйцеклетки диплоидной пыльцой Q3785 или нередуцированной яйцеклетки собственной гаплоидной пыльцой Q3754. Тетраплоид, возможно, есть результат оплодотворения нередуцированной яйцеклетки пыльцой тетраплоидной отцовской формы. Таким образом, в этом опыте апомиктические растения не обнаружены, поскольку все они являются результатом гибридизации. Кроме анализа развивающихся зерновок, было проведено цитофотометрическое изучение 40 семян, полученных при опылении Q3754 пыльцой Q3785. Большая часть из них – 29 семян (72,5 %) давали два пика, соответствующие диплоидному зародышу и триплоидному эндосперму, т. е. они развились половым путем от самоопыления. 9 семян были V^{III} гибридами с триплоидными зародышами и пентаплоидными эндоспермами. И оставшиеся 2 растения были тетраплоидными V^{III} гибридами от опыления нередуцированных яйцеклеток пыльцой тетраплоида. Заметим, в этом эксперименте также не выявлено ни одного действительно апомиктического потомка среди изученных растений.

Если проанализировать все изученные растения суммарно, приняв 5 растений из популяции S1 за апомикты, мы должны сказать, что уровень апоспории у Q3754 равен 2,5 % (5 растений из общего числа 199). Однако при этом не ясно, почему при опылении собственной пыльцой на фоне чужеродной 5 растений авторы отнесли к апомиктам и не обнаружили ни одного V^{III} гибрида, в то время как 104 потомка от опыления чужеродной диплоидной и тетраплоидной пыльцой не дали ни одного бесполосеменного растения, но выявили гибриды с возросшей ploидностью общей численностью 16, т. е. 8 %?

К настоящему моменту становится совершенно очевидным, что без генетического тестирования потомства, на основании только эмбриологических результатов, невозможно дать определенный ответ о типе размножения. Так, у диплоида *P. malacophyllum* гистохимические исследования показали наличие потенциала к апомиктическому развитию, но бесполосеменных потомков не было обнаружено (Hojsgaard *et al.*, 2008).

Подводя итог анализу работы на гречке, необходимо подчеркнуть неубедительность доказательства апомиктического размножения

диплоида *P. rufum*. Но если даже принять точку зрения Siena с соавт., то уровень апоспорических потомков в 2,5 % едва ли говорит о бесполосеменном размножении этой линии, скорее это факультативно-половой тип.

Отметим еще два момента, связанных с исследованиями этой группы авторов. Прежде всего, ими показано, что перевод полового диплоида *P. notatum* на тетраплоидный уровень с помощью колхицина давал апоспорические растения (Quarin, 1992; Quarin *et al.*, 1998). Тем самым они подтвердили ранее высказанную идею Ноглера (Nogler, 1984) об отсутствии экспрессии признака апомиксиса у диплоидов. Кроме того, они продемонстрировали, что апоспория у *Paspalum simplex* контролируется единственным доминантным локусом (Pupilli *et al.*, 2001, 2004), и позднее он был выявлен также у *P. malacophyllum* и *P. notatum* (Pupilli *et al.*, 2004). Доказательство апоспоричности изучаемой линии было бы много строже, если бы авторы показали присутствие у нее соответствующих маркеров. Отсюда было бы ясно, что наличие бесполосеменного локуса и экспрессия этого признака – неравнозначные явления. Более того, к настоящему времени известны ампликоны, специфичные для апомиктов *Paspalum*, и они также могут быть использованы для тестирования бесполосеменного размножения у диплоидов (Martinez *et al.*, 2003; Polegri *et al.*, 2010).

Близко к этим работам примыкает исследование американских авторов, в котором была предпринята попытка получить бесполосеменные диплоиды у *P. notatum* в чисто селекционных целях (Burton, Hanna, 1992; Burton, 1999). Однако несмотря на большие объемы проработанного материала, апомиктические диплоиды не были выявлены.

Ветвянка (*Brachiaria decumbens*)

Другим хозяйственно важным растением, имеющим более 70 видов и широко распространенным в дикой природе в форме агамных комплексов и потенциально способным к апомиксису на диплоидном уровне, является ветвянка – *Brachiaria decumbens*. У нее существует очень своеобразный механизм обхода проблемы соотношения родительских геномов в эндосперме. Этот вид является псевдогамным апомиктом

Panicum-типа, и его зародышевые мешки состоят из четырех клеток: двух синергид, одной яйцеклетки и одной центральной клетки, каждая из которых несет по нередуцированному материнскому геному. Поэтому при образовании первичной клетки эндосперма к двойному набору хромосом последней добавляется гаплоидный набор спермия и, таким образом, соотношение будет $2F : 1M$, как при половом размножении. Именно такой набор родительских геномов требуется для его нормального развития и функционирования. В связи с этим у диплоидов *Brachiaria* эффект импринтинга не может быть препятствием в реализации апомиктического типа развития. Ветвянка является очень важной кормовой культурой. Только в Центральной Бразилии она занимает 30 млн га, что стимулирует исследования, связанные с ее селекцией. Цитоэмбриологические изучения растений ветвянки из природных агамных комплексов, проведенные в Голландии, позволили обнаружить у диплоидов (авторы используют и второй термин – дигаплоиды) уровень апоспории по числу заложенных зародышевых мешков от 7 до 15 %, а у тетраплоидов – от 80 до 95 % (Naumova *et al.*, 1999). Но при этом апомиктически развившихся потомков у диплоидов не наблюдалось, так как эндоспермы не формировались и зародыши гибли на ранних этапах онтогенеза (Naumova *et al.*, 1999). Следует упомянуть, что ранее проведенные на этом же материале исследования также не обнаружили диплоидных апомиктов и способности дигаплоидов давать семена (Valle, Savidan, 1989; Valle *et al.*, 1989; Valle, Glienke, 1991). Это послужило основанием считать диплоиды облигатными половыми растениями (Valle, Glienke, 1991). В цитируемой работе подчеркивается, что, возможно, следует считать диплоидные формы факультативно-сексуальными (Naumova *et al.*, 1999). Тем не менее окончательный ответ на возникшее противоречие можно получить только после генетического анализа потомства диплоидов. Для нас важен вывод авторов рассмотренных работ об отсутствии у диплоидов апомиктического способа репродукции.

Кейптаунская трава (*Tribolium*)

Эндемичный для Южной Африки род *Tribolium*, входящий в трибу Dantonieae, подразде-

ляется на три секции: собственно *Tribolium*, *Acutiflorae* и *Uniolae*. Первая секция состоит из 5 видов, и у одного среди них (*Tribolium hispidum*) имеется тетраплоидный цитотип. Кроме того, все представители этой секции, кроме *Tribolium ciliare*, имеют *B*-хромосомы. Две другие секции состоят в основном из тетраплоидных видов с небольшим числом гексаплоидных цитотипов. Некоторые из них имеют от 1 до 4 *B*-хромосом. У одного из диплоидных видов (*Tribolium echinatum*) цитоэмбриологически показано формирование нередуцированного зародышевого мешка до состояния 4 ядер (Visser, Spies, 1994). Эта работа вызывает много вопросов. Прежде всего, основываясь только на эмбриологических данных, утверждать обнаружение диплоидных апомиктов, по нашему мнению, – излишне смелый вывод. Ранее мы рассмотрели работы на гречке и ветвянке, где выявленная цитоэмбриологически потенция к апоспории не реализуется. Тем более что все без исключения изученные растения имели сексуальные зародышевые мешки и лишь некоторые как дополнение – апоспорические. К сожалению, авторы не провели количественной оценки по соотношению завязей с чисто половыми зародышевыми мешками и совмещенных с апоспорическими. Никаких генетических доказательств бесполосеменного размножения у диплоидов *Tribolium* после этой публикации авторы не сообщили, несмотря на весьма продолжительное время. Совершенно очевидно, что цитоэмбриологические наблюдения на ранних стадиях развития семязпочки не могут быть однозначно увязаны с получаемым в итоге потомством. При этом утверждения о формировании апоспорического зародышевого мешка основываются только на том, что веретено деления у предполагаемой инициальной клетки располагается параллельно таковому у делящихся клеток нуцеллуса. Следующее возражение, которое можно привести в качестве недостаточной доказательности апоспории в данном исследовании, связано с его кариотипом. Авторы указывают, что у *Tribolium* имеются три *B*-хромосомы. Вполне допустимо, что если это действительно *B*-хромосомы, то они могут давать нарушения развития семязпочки и экспрессии генов, контролирующих формирование в нем единственной МКМ.

Кроме того, поскольку диплоидные формы являются частью агамных комплексов, то они вполне могут экспрессировать отдельные компоненты элементов бесполосеменного размножения, как это было показано на других злаковых травах.

Белоус торчащий (*Nardus stricta*)

Белоус торчащий – *Nardus stricta*, в монографии Аскера и Джерлинга этот вид упоминается как апомиктически размножающийся диплоид (Asker, Jerling, 1992). По всей видимости, это ошибка, связанная с обнаружением автором оригинального исследования цитотипа с $2n = 26$ (Rychlewski, 1967). Исходя из того, что 26 делится лишь на 2, эта форма была отнесена к диплоидам. На самом деле в природных популяциях этого вида имеется широкая вариабельность по числу хромосом – от $2n = 4x = 22$ до $2n = 4x = 28$. Некоторые расы с Ньюфаундленда имеют $2n = 4x = 30$. Ранее Авдулов показал, что базовое число хромосом этого вида тетраплоидное и кратно 7: $2n = 4x = 28$. Обнаруживаемые цитотипы с иным количеством хромосом – это его вариации, существующие благодаря бесполосеменному размножению и отсутствию мейоза (Авдулов, 1931). Их происхождение связывают преимущественно с корневищным способом размножения этих растений в природе (Chadwick, 1960), хотя они могут давать жизнеспособные семена. Поэтому наблюдаемые отклонения в числе хромосом никак не сказываются на жизнеспособности и адаптивности этого апомиктического полиплоидного вида. В цитируемой Аскером и Джерлингом работе (Asker, Jerling, 1992) изложены лишь результаты кариологического анализа разных экотипов белоуса, а способы их размножения не рассматриваются (Rychlewski, 1967). Поэтому апомиктический способ репродукции у *N. stricta* не имеет исключения из правила, предложенного Ноглером (Nogler, 1984).

Зубровка (*Hieriechloe*) Poaceae

По зубровке существует единственная работа, в которой изложены результаты сравнительного цитоэмбриологического исследования двух ее видов (*Hieriechloe australis* и *Hieriechloe*

odorata) разного эколого-географического происхождения (Weimark, 1967).

Базовое число хромосом у видов этого злака $x = 7$, и у изученных форм оно колебалось от $2n = 2x = 14$ до $2n = 8x = 56$. Диплоидные растения были собраны в Германии и Финляндии. Авторы не сообщают, были ли они компонентами агамных комплексов. Все результаты ограничены эмбриологическими наблюдениями и иллюстрации выполнены рисунками. К сожалению, приводимые статистические данные не дают представления об уровне апоспории у диплоидов. Сообщается только, что основная масса зародышевых мешков имеет мейотическое происхождение, при этом они множественные (от 1 до 4 на семяпочку) и иногда сопровождаются апоспорическими инициалиями. Генетического анализа потомков предполагаемых диплоидных апомиктов в рассматриваемой работе не представлено. По этим причинам считать данную публикацию доказывающей существование апоспории у диплоидных рас зубровки, по нашему мнению, нельзя. Даже принимая точку зрения автора о существовании апоспорических инициалий, «иногда сопровождающих сексуальные зародышевые мешки» и развитие из них бесполосеменного потомства, можно говорить только о факультативно половом размножении, но не бесполосеменном.

Гамаграсс (*Tripsacum*) Poaceae

Весьма показательный эксперимент, демонстрирующий однозначную связь полиплоидии и апомиксиса, выполнен Шерманом с коллегами (Sherman *et al.*, 1991). Они опыляли диплоидную половую форму гамаграсса ($2n = 2x = 36$) пылью триплоидного апомиктического вида ($2n = 3x = 54$) и получали гибриды с набором хромосом от 36 до 50, т. е. имеющие трисомию по отдельным хромосомам. Анализ типа зародышевых мешков позволил установить, что растения с числом хромосом 45 и выше (т. е. $2n = 36 + 9$ и более) закладывают от 75 до 100 % диплоспорических зародышевых мешков. В то время как у диплоидов их наблюдается от 0 до 25 %. Результаты этого эксперимента соответствуют наблюдаемым на гречке и ветвянке, у которых диплоидные компоненты агамных ком-

плексов проявляли закладку апоспорических зародышевых мешков в аналогичном проценте случаев (Quarin, 1986; Quarin, Caronio, 1995; Naumova *et al.*, 1999). Кроме того, результаты данного исследования хорошо согласуются с нашими данными по хромосомному контролю апомиксиса у гибридов кукурузы с гамаграссом. Минимальное число хромосом дикого родителя, необходимых для поддержания апомиктического размножения гибридов, в наших опытах равнялось 9 (Sokolov, Khaturova, 2000). И именно такое число добавочных хромосом у диплоида приводит к резкому возрастанию количества закладываемых диплоспорических зародышевых мешков (Sherman *et al.*, 1991). Несмотря на то что данная работа выполнена на цитозембриологическом уровне, в ней показана четкая корреляция между количеством дополнительных хромосом и долей диплоспорических зародышевых мешков у потомков.

Рассматривая результаты данного исследования в сравнении с данными других авторов (Blakey *et al.*, 2003), можно однозначно утверждать строгую связь диплоспории и полиплоидии у гамаграсса. Несмотря на то что диплоидные формы трипсакума входят в агамные комплексы, апомиктов среди них не обнаружено (Bradley *et al.*, 2007).

Голубое просо (*Panicum antidotale*)

Сообщение о возможном апомиктическом способе репродукции у диплоидного проса (*Pennisetum ramosum*) прозвучало в диссертации Нарайана, но эта работа нами не изучена в силу ее недоступности (Narayan, 1951). Еще ранее тенденция к апоспории у голубого проса (*Panicum antidotale*) была обнаружена Бартоном (Burton, 1942). Позднее этот вид был исследован им цитозембриологически с целью обнаружения бесполосеменных зародышевых мешков (Kumari, 1960). Он изучил около 500 цветков и обнаружил, что только два содержали множественные зародышевые мешки. Однако лишь у одного из них наряду с мешком Polygonum-типа были обнаружены инициалии, которые можно было считать апоспорическими зачатками. При этом надо отметить, что, работая с этим видом, Браун и Эмери, просмотрев 28 завязей, апоспории не обнаружили (Brown, Emery, 1958).

Вряд ли можно считать частоту 0,2 % апоспорических зародышевых мешков доказательством апомиксиса у диплоидного голубого проса, притом что следующее поколение генетически не изучено.

Ястребинка (*Hieracium*) Asteraceae

Род *Hieracium* – весьма полиморфный и имеет множество видов, организованных в агамные комплексы, включающие растения с геномами от $2n = 3x$ до $2n = 8x$, и все они апомиктичны. Диплоидные формы среди них, как правило, отсутствуют, но у некоторых полиплоидных видов показано партеногенетическое развитие редуцированных яйцеклеток (Skalinska, 1971). Возможно, такой дигаплоид был выявлен Бикнеллом среди 5000 проростков, полученных из семян размножавшегося в теплице триплоидного *Hieracium auranticum* (Bicknell, 1997). Он предположил, что эта форма является диплоидным апомиктом. По габитусу это растение (A2) было много меньше и слабее других сибов. Как показал цитогенетический анализ, у него было диплоидное число хромосом $2n = 2x = 18$. Автор предполагает, что это растение могло иметь половое происхождение или быть партеногенетическим дигаплоидом. У него было намного меньше цветков в соцветии в сравнении с триплоидами и наблюдалась очень низкая завязываемость семян – 9 % (у триплоида 57 %).

Далее для получения экспериментального материала растение A2 размножали микроклонованием через культуру тканей. Клоны выращивали в теплице и стимулировали к цветению изменением продолжительности светового режима. Формирование множественных апоспорических зародышевых мешков у растения A2 было показано на эмбриологических препаратах семян. В большинстве из них наблюдали от одной до двух вакуолированных апоспорических инициалей, дифференцирующихся из клеток нуцеллуса. Обычно они располагались либо рядом с редуцированной материнской клеткой зародышевого мешка, либо с самим мешком. Развитие нередуцированного зародышевого мешка было очень быстрым, и в большинстве случаев все мейотические продукты деления дегенерировали до первого митотического деления гаплоидной клетки. Развитие эмбриона в

апоспорическом зародышевом мешке началось сразу же по окончании мегаспорогенеза. В некоторых семяпочках наблюдали зародыши на стадии глобулы, т. е. еще до раскрытия цветка и формирования пестика. Многие семяпочки содержали по несколько нередуцированных зародышей. Низкую семенную продуктивность у A2 R. Vicknell объясняет конкуренцией множественных зародышей за пластические вещества, что приводит к их элиминации.

Микроспорогенез у A2 также сильно нарушен, и они дают мало функциональной пыльцы. Это объясняется очень слабым развитием спорогенной ткани, в результате чего формируется малое число тетрад, что в итоге ведет к формированию небольшого количества мелких пыльцевых зерен. Попытки получить потомство опылением такой пыльцой диплоидных половых растений не увенчались успехом. Обычно у полиплоидных апоспорических форм ястребинки наблюдается одновременное формирование сексуальных и апоспорических зародышевых мешков (Skalinska, 1971, 1973, 1976). Это способствует как увеличению, так и снижению плоидности растений, входящих в агамные комплексы благодаря V^{II} и V^{III} гибридам. Некоторые семяпочки у растений A2 содержат только по одному зародышевому мешку, и исходя из их структуры и полярности они, видимо, несут редуцированные гаметы, т. е. являются половыми.

Работа Бикнелла вызывает много вопросов, начиная со способа получения материала для исследования. Нам представляется не совсем корректным изучение генетически контролируемого признака на материале, у которого могли произойти соматональные мутации при размножении через культуру тканей. Кроме того, поскольку Бикнелл, наблюдал не только апоспорические зародышевые мешки, но и чисто сексуальные, то для оценки апомиктического потенциала диплоидов было бы желательно знать их соотношение. Как мы уже неоднократно отмечали выше, если уровень апоспории не более нескольких процентов, то называть такое размножение бесполовым не корректно. Закрепиться в природе таким растениям: с частотой возникновения 0,02 %, стерильной пыльцой и завязываемостью семян на порядок более низкой в сравнении с триплоидным

апомиктом даже в условиях искусственного выращивания практически нереально. По всей видимости, по сумме названных причин такие бесполовые растения не обнаруживаются в естественных популяциях.

У нас нет принципиальных возражений против возможных диплоидных апомиктов среди растений с автономным развитием перманентного эндосперма, как у ястребинки, поскольку у них формируется под контролем только материнского генома, и постзиготические препятствия, связанные с дисбалансом родительских геномов, у них отсутствуют (Sokolov, 2006). Однако экспериментальные результаты Бикнелла недостаточны, для того чтобы быть убедительными.

Древесные

Рябина (*Sorbus eximia*) Rosaceae

Первой работой на древесных, цитируемой в связи с апомиксисом на диплоидном уровне, является статья Янкуна и Кованда (Jankun, Kovanda, 1988). Она выполнена на рябине, *Sorbus eximia* (межвидовой гибрид *Sorbus aria* × *Sorbus torminalis*). Этот гибрид произрастает в Богемии и имеет два цитотипа: диплоид $2n = 2x = 34$ и тетраплоид $2n = 4x = 68$. У тетраплоида апоспорические и сексуальные зародышевые мешки формируются приблизительно в равных количествах, а у диплоида основная масса их – половые (117 из 121 изученных), тогда как оставшиеся четыре апоспорические. Все иллюстрации выполнены от руки, и генетического анализа потомства не проводилось. Простой подсчет говорит о том, что у диплоидов только 3,3 % потенциальных потомков могут иметь апомиктическое происхождение. Опять, как мы уже неоднократно отмечали ранее, такое размножение следует считать факультативно половым.

Кипарис

(*Cupressus duprieziana*) Cupressaceae

Очень долгое время надежных сообщений о существовании апомиктических форм среди голосеменных растений не существовало (Asker, Jerling, 1992). Открытие совершенно уникального мужского апомиксиса было сделано Пичо с коллегами (Pichot *et al.*, 1998, 2001, 2008;

Fady *et al.*, 2000). Они работали с реликтовым кипарисом *Cupressus duprieziana*, популяция которого в Алжирской Сахаре насчитывает всего 231 дерево, занимающие ареал 12 тыс. га. Полученные результаты являются великолепной иллюстрацией того, как в природе могут возникать и закрепляться уникальные варианты отклонений от полового размножения. Все началось с того, что при искусственной гибридизации *C. duprieziana* у потомков не выявлялись материнские варианты изозимов. Изучение содержания ДНК в клетках гибридных зародышей показало, что они диплоидны. Обычно клетки эндосперма у голосеменных гаплоидны, но у *C. duprieziana* так же, как и у близкого ему *Cupressus sempervirens*, имели варьирующую ploидность от 1С до 6С и более. Для выяснения происхождения диплоидности зародышей провели измерение ДНК в пыльцевых зернах обоих видов. Оказалось, что пыльца *C. duprieziana* диплоидна, в то время как у *C. sempervirens* она гаплоидна. Отсюда стало понятным, почему потомки *C. duprieziana* выявляют только отцовские варианты изозимов при наличии диплоидного генома. Авторы сделали вывод, что в данном случае имеет место уникальное явление «мужского апомиксиса». Более поздние исследования с использованием RAPD маркеров подтвердили эти результаты Pichot с соавт. (2008). Далее они получили уникальные гаплоидные растения, опыляя *C. duprieziana* пыльцой *C. sempervirens* (Pichot *et al.*, 2001), подтвердив тем самым отсутствие функциональных яйцеклеток у материнского растения. Генетический анализ получаемого потомства также говорит об андрогенном – бесполом типе размножения *C. duprieziana*. Таким образом, этот пример показывает, что продуцируемый зародыш не связан генетически с другими компонентами семени. Авторы сделали вывод, что апомиксис наряду с другими факторами является препятствием инбредному вырождению и дает селективные преимущества этому виду, сохраняя уникальную комбинацию отцовских генов (Pichot *et al.*, 2001). Заканчивая эту часть, касающуюся специфического типа андрогенного апомиксиса у кипариса, подчеркнем, что мы включили его как пример диплоидного апомиксиса у **голосеменного** растения. Для них характерны развитие **гаплоидного** эндосперма

без оплодотворения и, как следствие, отсутствие импринтинга – основного препятствия для развития жизнеспособных семян у потенциальных апомиктов.

Бочера (*Boechea*) Brassicaceae

Самыми примечательными событиями начала 21 в. в изучении апомиксиса были подтверждение и углубление современными методами результатов Бёчера по диплоидным апомиктам (Naumova *et al.*, 2001; Koch *et al.*, 2003; Schranz *et al.*, 2005, 2006; Kantama *et al.*, 2007), полученных в 1951 г. на *Arabis holboellii* (Bocher, 1951). Позднее род *Arabis* был подразделен на два, и новый получил название в честь первооткрывателя бесполосеменного размножения у видов этого таксона *Boechea*.

Основная масса растений этого рода обитает на территории Северной Америки, они наиболее подробно изучены ботанически (Windham, Al-Shehbaz, 2006, 2007a, b). Этот род состоит из более чем 70 видов, размножающихся половым путем, и 38 гибридных видов (в основном триплоидов), размножающихся апомиктически (Kantama *et al.*, 2007; Kiefer, 2008; Voigt, 2009).

Анализ результатов, касающихся бесполосеменного размножения у *Boechea*, оказался наиболее трудоемким и сложным, так как гибридизация сыграла значительную роль в его эволюции (Dobeš *et al.*, 2004a, b; Kantama *et al.*, 2007), и обычно такие события сопровождаются значительными геномными перестройками и изменениями в экспрессии генов (Shaked *et al.*, 2001; Hegarty, Hiscock, 2005). Наблюдаемые в настоящее время ploидность и репродуктивное поведение у *Boechea* являются результатом биогеографической истории этого рода, включающей генетическую изоляцию, дивергенцию, адаптацию и реколонизацию Северной Америки после отступления ледника. Периодическое возникновение полиплоидии и апомиктического размножения (Sharbel, Mitchell-Olds, 2001) привело к формированию множества бесполосеменных форм, различающихся по эволюционному возрасту. По мере возникновения апомиктические линии развивались независимо. В итоге они накопили различные геномные изменения, отличающие их друг от друга (инделы, дубликации и делеции),

некоторые из которых существенно влияют на конъюгацию хромосом и протекание мейоза у межвидовых гибридов. В результате событий в эволюционной истории рода *Boecheira* у половых диплоидов и некоторых апомиктов числа хромосом совпадают – $2n = 2x = 14$ (Kantama, 2005; Kiefer, 2008; Voigt, 2009; Carman, личное сообщение). Вместе с тем обнаружены виды *Boecheira*, имеющие $2n = 2x = 15$. При этом некоторые исследователи считали, что такие анеуплоиды несут В-хромосому (Sharbel *et al.*, 2004; Sharbel *et al.*, 2005; Voigt, 2009), и относили их к апомиктичным диплоидам. Однако к настоящему моменту экспериментально показано, что дополнительные хромосомы в метафазе мейоза образуют гетероморфные триваленты и несут ДНК *Boecheira stricta* (Kiefer, 2008), поэтому их следует считать настоящими трисомиками, а следовательно, полиплоидами.

Исследование апомиксиса у бочера насчитывает около 10 лет, т. е. число работ пока невелико и поддается сравнительному анализу. Мы решили рассмотреть их здесь на основе хронологического подхода.

Первая работа на диплоидных апомиктах бочера была выполнена в рамках международного проекта, и в ней показаны псевдогамное и автономное развитие эндосперма, а также происхождение потомства от нередуцированных женских и мужских гамет (Naumova *et al.*, 2001). Авторы наблюдали формирование материнских клеток мегаспор, а далее развитие зародышевого мешка шло либо половым путем, либо бесполосеменным. При бесполосеменном варианте размножения мегаспора делится один раз, производя диплоспорическую диадру, представляющую собой две мегаспороподобные клетки. Клетка, лежащая ближе к микропиле, дегенерирует, тогда как халазальная увеличивается в размерах, вакуолизируется, делится митотически три раза и формирует зародышевый мешок, морфологически не отличимый от полового (апомиксис Тагахасум-типа). Частота апомиктических зародышевых мешков у диплоидов колеблется от 45 до 89 %.

Преимущественный способ формирования эндосперма у апомиктов бочеры – псевдогамия, хотя встречается и автономное развитие, судя по результатам проточной цитофотометрии (Naumova *et al.*, 2001). С небольшой частотой

у них встречаются оплодотворение нередуцированной яйцеклетки и образование V^{III} гибридов. На основе количественных данных по ДНК в ядрах авторы предположили, что у диплоидного апомикта центральная клетка оплодотворяется нередуцированной пылью. Позднее этот результат был подтвержден только для триплоидов (Voigt *et al.*, 2007; Taskin *et al.*, 2009a). В свою очередь, у диплоидных апомиктов бочеры эндосперм формируется на основе слияния центральной клетки и двух редуцированных спермиев (Voigt *et al.*, 2007; Taskin *et al.*, 2009a). Для разрешения противоречий в цитированных исследованиях были необходимы дополнительные эксперименты. Позднее они были проведены в диссертационной работе Фойгт (Voigt, 2009). Она показала, что у апомиктов с геномом $2n = 14$ формируется как гаплоидная, так и диплоидная пыльца так же, как и у триплоидов (рис. 4).

Вскоре молекулярно-цитогенетические эксперименты голландских и немецких ученых в корне изменили представления о плоидном состоянии геномов «диплоидных апомиктов». Сравнительные цитогенетические исследования половых и апомиктических форм ($2n = 14$) нескольких видов бочера из разных географических популяций показали, что бесполосеменные растения имеют совершенно иную структуру хромосом, нежели сексуальные диплоиды. В реальности они представляют собой гибриды между видами *B. stricta* и *B. holboellii*, у которых произошла реконструкция хромосом, сопровождавшаяся сокращением их числа (гаплоидизация) и превратившая их в дигаплоиды (Kantama, 2005) (табл. 1).

Эти исследования вскрыли характерную особенность для всех без исключения бесполосеменных диплоидных форм бочера: они несли одну хромосому с высоким содержанием гетерохроматина. Кроме того, некоторые апомиктичные линии имели дополнительную 15-ю хромосому, самую мелкую в наборе, также с высоким содержанием гетерохроматина. У линий из Гренландии хромосому с высоким содержанием гетерохроматина обозначали *Het'*. Аналогичную хромосому у линий из Скалистых гор обозначали *Het*, а дополнительную 15-ю – *Del* (Kantama, 2005) (табл. 2).

Примечательно, что прицентромерный гетерохроматин абберантных хромосом *Het* и *Del* у

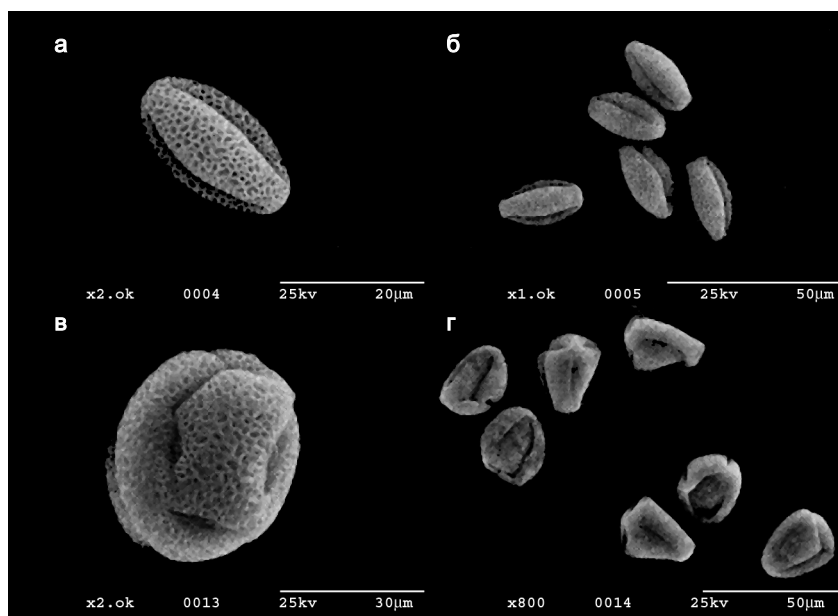


Рис. 4. Микрофотография пыльцы *Boecheera*, выполненная на сканирующем электронном микроскопе.

а, б – пыльца полового диплоида. Гаплоидные пыльцевые зерна мелкие (ширина 13–16 μm) эллипсоидной формы с симметричными бороздками. в, г – пыльца апомиктического триплоида. Триплоидные пыльцевые зерна значительно крупнее (ширина 22–30 μm) и имеют сферическую форму с асимметричными бороздками (Windham, Al-Shehbaz, 2006).

Таблица 1

Краткий обзор основных цитогенетических
и таксономических особенностей апомиктов *Boecheera*

Линии	Таксономическая принадлежность	Число хромосом вида (GISH окрашивание)		Цитоплазма по хлоропластной ДНК	Происхождение внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS)
		<i>holboellii</i>	<i>stricta</i>		
BH208	<i>holboellii</i>	14	0	<i>holboellii</i>	<i>holboellii</i>
BS2	<i>stricta</i>	0	14	<i>stricta</i>	<i>stricta</i>
ES6	<i>stricta</i>	0	14	<i>stricta</i>	<i>stricta</i>
ES9	× <i>divaricarpa</i>	7	7	<i>holboellii</i>	<i>stricta</i> ¹
BH1	<i>holboellii</i>	11	4	<i>holboellii</i>	<i>holboellii</i>
BH74	<i>holboellii</i>	4	11	<i>holboellii</i>	<i>holboellii</i>
BH115	<i>holboellii</i>	5	10	<i>holboellii</i>	<i>holboellii</i>
BH224	<i>holboellii</i>	11	4	<i>holboellii</i>	<i>holboellii</i>
BDi175	× <i>divaricarpa</i>	9	6	<i>stricta</i>	<i>stricta</i>
GRL2	<i>holboellii</i>	9	5	<i>holboellii</i>	<i>holboellii</i>

¹ Обе NOR хромосомы пришли от *Boecheera stricta*. По: Kantama, 2005.

всех без исключения линий состоит из повторов, пришедших от *B. stricta*. На основе полученных результатов Кантама обосновал схему происхождения полигаплоидов с 14 и 15 хромосомными геномами от триплоидного гибрида, у которого диплоидизация сопровождалась потерей значи-

тельной части генома и реконструкцией оставшихся хромосом (Kantama, 2005).

Подводя итог анализу рассмотренных исследований, мы можем заключить: 1) апомикты *Boecheera* – аллогамноиды с различными комбинациями хромосом *B. holboellii* и *B. stricta*,

Таблица 2

Краткий обзор соотношения количества видоспецифичных хромосом по распределению сигналов *Boecheera holboellii* (красный сигнал) и *Boecheera stricta* (зеленый сигнал). *Het*, *Het'* и *Del* – добавочные aberrантные хромосомы *Boecheera stricta* всегда показывают зеленый гибридационный сигнал

Линии	Число хромосом	Структура хромосом в геномах			
		<i>Boecheera stricta</i>	<i>Boecheera holboellii</i>	Аберрантные хромосомы	Примечание
Sexuals					
BH208	14		14		
BS2	14	14			
ES6	14	14			
<i>B. × divaricarpa</i> apomicts					
BDi175	15	6	9	<i>Het + Del</i>	
ES9	14	7	7	<i>Het'</i>	
<i>B. holboellii</i> apomicts					
GRL2	14	5	9	<i>Het'</i>	
BH1	15	4	11	<i>Het + Del</i>	Слабое присутствие ДНК от <i>stricta</i> по всему геному
BH74	15	11	4	<i>Het + Del</i>	
BH115	15	10	5	<i>Het + Del</i>	Слабое присутствие ДНК от <i>stricta</i> по всему геному
BH224	15	4	11	<i>Het + Del</i>	

По: Kantama, 2005.

являющиеся результатом межвидовой гибридизации, сопровождающейся комплексной реорганизацией хромосом; 2) все апомикты *Boecheera* имеют гетерохроматиновый комплемент *Het + Del* или *Het'* – эти aberrантные хромосомы несут перичентромерные повторы от *B. stricta*; 3) поскольку все апомикты имеют хромосомы с высоким содержанием гетерохроматина, то возможно, что он играет какую-то роль в становлении этого способа репродукции (Kantama, 2005; Kiefer, 2008).

Таким образом, диплоидность апомиктов бочера является чисто внешней. Цитогенетический анализ однозначно показал, что их геномы состоят из компонентов хромосом родительских видов, участвовавших в межвидовой гибридизации, и они должны быть отнесены к полигаплоидам. При этом они несут наборы не просто хромосом, суммарно равные диплоидному набору ($2n = 2x = 14$), а в значительной степени реконструированных хромосом. По всей видимости, количество ДНК на геном (2С)

у апомиктичных дигаплоидов больше, чем у диплоидных родительских линий за счет дубликаций, что подтверждается характером экспрессии генов в зародышевых мешках (Sharbel *et al.*, 2009, 2010). Последние результаты четко демонстрируют, что полигаплоиды бочера ($2n = 14$) отличаются от диплоидов не только по структуре хромосом, но и функционально на уровне профилей экспрессии генов – они ведут себя не как половые диплоиды, а как бесполо-семенные триплоиды. Это связано с тем, что гены, вовлеченные в экспрессию апомиксиса в зародышевых мешках, представлены у них многими копиями. Шарбелю с коллегами (Sharbel *et al.*, 2010) удалось продемонстрировать усиление экспрессии некоторых аллелей, сопровождающейся гетерохронией. По всей видимости, этот феномен опосредован дубликациями и последствиями давней гибридизации комплекса апомиктов *B. holboellii*. Использование метода супер-SAGE позволило идентифицировать в зародышевых мешках у половых и бесполо-

менных растений 4000 различно экспрессирующихся мРНК. Их попарное сравнение у двух сексуальных (*B. stricta* и *B. holboellii*, $2n = 2x = 14$) и двух апомиктов (*B. divaricarpa*, $2n = 14$) позволяет идентифицировать аллельные варианты в одинаковых локусах. У апомиктов усиленно экспрессирующиеся аллели согласованно имели более чем три родственных варианта РНК, т. е. выявляли транскрипцию с дублированных локусов. Таким образом, морфологические преобразования хромосом, выявленные в работе Кантама, функционально обнаруживают себя как дублированные, по крайней мере по локусам, вовлеченным в экспрессию апомиксиса (Sharbel *et al.*, 2010).

Кроме того, созревание пыльцы у полигаплоидов бочера протекает так же, как и у триплоидов, от которых они произошли. При этом формируются как гаплоидные, так и диплоидные пыльцевые зерна, что является одной из возможностей избежать эффекта импринтинга (Voigt, 2009).

Изложенные результаты исследований «диплоидных» апомиктов бочера однозначно говорят о том, что правильнее такие растения называть **полигаплоидами**. К диплоидам их нельзя отнести, так как нет парности хромосом и функционально по многим параметрам они ведут себя как полиплоиды.

Апомиктические диплоиды культурных растений

Основная масса публикаций, сообщающих о диплоидных апомиктах среди культурных растений, выполнена в странах ближнего зарубежья и России. Одни исследования говорят о выявлении бесполосеменных форм среди сортов, ранее селектировавшихся как половые (Зайковская и др., 1978; Малецкий и др., 1991; Сеилова, 1996; Elkonin *et al.*, 2007), другие – о его индуцировании различными физическими факторами (Сеилова и др., 1984; Богомолов, 2007). И абсолютно большее их число связано с бесполосеменной сахарной свеклой *Beta vulgaris*. Провести анализ этих исследований, который был проделан по работам на злаках и *Boechea*, не представляется возможным, так как ни одна из работ не имеет доказательной базы декларируемого авторами бесполосеменного размножения и часто изложе-

ны в форме, не позволяющей оценить реальность экспериментальных результатов. Так, один из исследователей по своим материалам защитил докторскую диссертацию, и вся библиография, оговоренная правилами ВАК, состоит из 8 публикаций на 15 страницах журнала «Сахарная свекла» (Богомолов, 2007)! Другая группа авторов также достаточно активна (Малецкий, Малецкая, 1996; Малецкий и др., 1997, 1998). Однако эмбриологических доказательств у них вообще нет, а генетические не выдерживают критики. К слову сказать, некая легкость присутствует у этих авторов и в цитировании. Так, в одной из работ дана ссылка на публикацию Фаворского в Докладах ВАСХНИЛ за 1928 г. Здесь уточним, что Совнарком издал постановление об организации академии с таким названием 25 июня 1929 г. Возможно, что Фаворский опубликовал свою работу, не дожидаясь этого решения и организации журнала в 1936 г.? Еще несколько исследователей сообщали об обнаружении апомиктических форм диплоидной сахарной свеклы из бывших союзных республик (Зайковская и др., 1978; Сеилова и др., 1994; Сеилова, 1996). Мы не хотим анализировать причины получения этих результатов, поскольку для этого необходимо провести проверку с использованием экспериментального материала, на котором работы были выполнены. Думаем, полезнее отослать заинтересованных читателей к обзору самого опытного и признанного в мире специалиста по апомиктическим формам и эволюции рода *Beta* Барбары Яссем (Jassem, 1990). Она сообщила, что среди диплоидных культурных форм свеклы апомиктов нет, а все попытки передать этот способ размножения от диких полиплоидных сородичей пока безуспешны. С ее мнением согласуются результаты поиска бесполосеменной сахарной свеклы, выполненные на большом материале Кнаппом (Knapp, 1975).

Что касается обнаружения апомиктов у диплоидов сорго, то здесь ситуация близка к изложенной по сахарной свекле (Rao, Nagayana, 1968; Rao, Murty, 1972; Elkonin *et al.*, 2007). Мы решили не анализировать эти результаты в нашем сообщении, поскольку ранее они многократно проверялись и обсуждались в независимых экспериментах и неизменно делались выводы об отсутствии бесполосеменных диплоидов сорго (Marshall, Downes, 1977; Ravi,

1993). Упомянем лишь недавнюю работу Кармана с коллегами по обнаружению регулярной закладки апоспорических инициалий у некоторых видов диплоидного сорго (Carman *et al.*, 2011). Однако у всех этих форм не наблюдается развития бесполосеменных зародышевых мешков и апомиктического способа репродукции. Эти наблюдения еще раз говорят об ограниченности цитоэмбриологического метода в деле выявления способа размножения растений.

Благодарности

Авторы благодарят Камило Кварина и Джона Кармана за многочисленные обсуждения материалов статьи и любезно представленные фотоматериалы. Кроме того, мы благодарны к.б.н. Г. Герашенкову за вездливую критику, которая заставила нас дополнительно проштудировать две диссертации и около 30 работ, чтобы основательнее подтвердить свою позицию об отсутствии диплоидных апомиктов у цветковых растений.

Работа выполнена при поддержке интеграционного проекта СО РАН № 53.

Список сокращений

- RAPD – random amplified polymorphic DNA
 GISH – genomic *in situ* hybridization
 cpDNA – chloroplast DNA
 ITS – internal transcribed spacer
 NOR – nucleolar organiser region
 F – female
 M – male
 МКМ – материнская клетка мегаспоры

Литература

- Авдулов Н.П. Кариосистематическое исследование семейства злаков // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. Л.: ВИР, 1931. 428 с.
- Богомолов М.А. Научное обоснование и приемы создания исходного материала для гетерозисной селекции сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.): Дис. ... д-ра с.-х. наук. Рамонь: Всерос. науч.-исслед. ин-т селекции и семеноводства овощных культур, 2007. 314 с.
- Зайковская Н.Э., Перетятко В.Г., Ширяева Э.И., Ярмолюк Г.И. Апомиксис у мужскостерильной сахарной свеклы // Докл. ВАСХНИЛ. 1978. № 3. С. 11–13.
- Малецкий С.И., Вепрев С.Г., Шавруков Ю.Н. Генетический контроль размножения сахарной свеклы. Новосибирск: Наука, 1991. 168 с.
- Малецкий С.И., Малецкая Е.И. Самофертильность и агамоспермия у сахарной свеклы // Генетика. 1996. Т. 32. № 12. С. 1643–1650.
- Малецкий С.И., Левитес Е.В., Малецкая Е.И., Овечкина О.Н. Автосегрегация и сцепленное наследование в агамоспермных потомствах сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. 1998. Т. 34. № 4. С. 520–527.
- Малецкий С.И., Левитес Е.В., Малецкая Е.И., Шаворская О.А. Автосегрегация в партеногенетических потомствах сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Докл. АН. 1997. Т. 354. № 5. С. 705–706.
- Сеилова Л.Б. Апомиксис у сахарной свеклы и его использование в практической селекции: Дис. ... д-ра биол. наук. Алматы: Ин-т ботаники, 1996. 210 с.
- Сеилова Л.Б., Абдурахманов А.А., Камалетдинова Ф.И. Апомиксис у инбредных линий видов рода *Beta* (Chenopodiaceae) // Ботан. журнал. 1989. Т. 74. № 5. С. 700–702.
- Сеилова Л.Б., Абдурахманов А.А., Хайленко Н.А. Эмбриология индуцированного апомиксиса у сахарной свеклы // Цитология и генетика. 1984. Т. 18. № 2. С. 90–92.
- Сеилова Л.Б., Коновалов А.А., Балков И.Я. Пути формирования апомиктического потомства у сахарной свеклы с факультативным апомиксисом // Цитология и генетика. 1994. Т. 28. № 4. С. 44–47.
- Adams K.L., Wendel J.F. Polyploidy and genome evolution in plants // Curr. Opin. Plant Biol. 2005. V. 8. № 2. P. 135–141.
- Asker S.E. The occurrence of aberrants in some apomictic *Potentilla argentea*-biotypes // Hereditas. 1966. V. 56. № 1. P. 54–70.
- Asker S.E. Apomixis and sexuality in the *Potentilla argentea* complex I. Crosses with other species // Hereditas. 1970a. V. 66. № 1. P. 127–143.
- Asker S.E. Apomixis and sexuality in the *Potentilla argentea* complex II. Crosses within the complex // Hereditas. 1970b. V. 66. № 2. P. 189–204.
- Asker S.E. Apomixis and sexuality in the *Potentilla argentea* complex III. Euploid and aneuploid derivatives (including trisomics) of some apomictic biotypes // Hereditas. 1971. V. 67. № 1. P. 111–142.
- Asker S.E. Pseudogamy, hybridization and evolution in *Potentilla* // Hereditas. 1978. V. 87. № 2. P. 179–183.
- Asker S.E. Progress in apomixis research // Hereditas. 1979. V. 91. № 2. P. 231–240.
- Asker S.E. Gametophytic apomixis: elements and

- genetic regulation // *Hereditas*. 1980. V. 93. № 2. P. 277–293.
- Asker S.E. Biochemical studies of variation in *Potentilla argentea* // *Apomixis Newslett.* 1990. V. 2. P. 55.
- Asker S.E., Jerling L. *Apomixis in Plants*. L.; B. R.: CRC Press, 1992. 298 p.
- Bicknell R.A. Isolation of a diploid, apomictic plant of *Hieracium aurantiacum* // *Sex. Plant Reprod.* 1997. V. 10. № 3. P. 168–172.
- Blakey C.A., Goldman S.L., Dewald C.L. *et al.* Isolation of stage- and ploidy-specific floral RNA in *Tripsacum dactyloides* for cDNA library construction – a pilot study for large-scale isolation // *Maize Gen. Coop. Newslett.* 2003. V. 77. P. 56–57.
- Bradley J.E., Carman J.C., Jamison M.S., Naumova T.N. Heterochronic features of the female germline among several sexual diploid *Tripsacum* L. (Andropogoneae, Poaceae) // *Sex Plant Reprod.* 2007. V. 20. № 1. P. 9–17.
- Brown W.V., Emery W.H.P. Apomixis in Gramineae: Panicoideae // *Amer. J. Bot.* 1958. V. 45. № 4. P. 253–263.
- Bocher T.W. Cytological and embryological studies in the amphi-apomictic *Arabis holboellii* complex // *Kong. Danske Vidensk. Selsk. Biol. Skr.* 1951. V. 6. № 7. P. 1–59.
- Burton G.W. A cytological study of some species in the Tribe Paniceae // *Am. J. Bot.* 1942. V. 29. № 5. P. 355–361.
- Burton G.W., Hanna W.W. Using apomictic tetraploids to make a self-incompatible diploid *Pensacola bahiagrass* clone set seed // *J. Heredity*. 1992. V. 83. № 4. P. 305–306.
- Burton G.W. Effort to create apomictic diploid of *Paspalum notatum* var. *parodi* // *Apomixis Newslett.* 1999. V. 11. P. 35.
- Carman J.G. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispority, tetraspority, and polyembryony // *Biol. J. Linn. Soc.* 1997. V. 61. № 1. P. 51–94.
- Carman J.G., Jamison M., Elliott E. *et al.* Apospority appears to accelerate onset of meiosis and sexual embryo sac formation in sorghum ovules // *BMC Plant Biol.* 2011. V. 11. P. 9–21.
- Chadwick M.J. Biological flora of the British Isles: *Nardus stricta* L. // *J. Ecol.* 1960. V. 48. P. 225–267.
- Chen Z.J., Ni Z. Mechanism of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids // *BioEssays*. 2006. V. 28. № 3. P. 240–252.
- Comai L. The advantages and disadvantages of being polyploid // *Nat. Rev. Genetics*. 2005. V. 6. № 11. P. 836–846.
- Dobeš C., Mitchell-Olds T., Koch M.A. Extensive chloroplast haplotype variation indicates Pleistocene hybridization and radiation of North American *Arabis drummondii*, *A. × divaricarpa*, and *A. holboellii* (Brassicaceae) // *Mol. Ecol.* 2004a. V. 13. P. 349–370.
- Dobeš C., Mitchell-Olds T., Koch M.A. Intraspecific diversification in North American *Boechea stricta* (= *Arabis drummondii*), *Boechea × divaricarpa*, and *Boechea holboellii* (Brassicaceae) inferred from nuclear and chloroplast molecular markers – an integrative approach // *Amer. J. Bot.* 2004b. V. 91. P. 2087–2101.
- Elkonin L.A., Belyaeva E.V., Tsvetova M.I. Efficient selection for apomixis in Sorghum lines with nuclear and cytoplasmic male sterility // 3th Intern. Apomixis Conf. Wernigerode, Germany, 27 June – 1 July 2007. Wernigerode: The Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. 2007. P. 112.
- Fady B., Pichot C., Hochu I. Lack of mother tree alleles in zymograms of *Cupressus dupreziana* A. Camus embryos // *Ann. For. Sci.* 2000. V. 57. № 1. P. 17–22.
- Gentcheff G. Über die pseudogame Fortpflanzung bei *Potentilla* // *Genetica*. 1938. V. 20. P. 398–408.
- Gentcheff G., Gustafsson A. Parthenogenesis and pseudogamy in *Potentilla* // *Bot. Not.* 1940. for 1940. P. 109–132.
- Hakansson A. Untersuchungen über die Embryologie einiger *Potentilla* Formen // *Lunds Univ. Årsskr. N.F. Adv. 2.* 1946. V. 42. № 5. P. 70.
- Hanna W.W. Use of apomixis in cultivar development // *Adv. Agron.* 1995. V. 54. P. 333–350.
- Harlan J.R., Brooks M.H., Borgaonkar D.S., de Wet J.M.J. Nature and inheritance of apomixis in *Bothriochloa* and *Dichanthium* // *Bot. Gas.* 1964. V. 125. P. 41–46.
- Hegarty M.J., Hiscock S.J. Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies // *New Phytol.* 2005. V. 165. P. 411–423.
- Hojsgaard D., Schegg E., Valls J.F.M. *et al.* Sexuality, apomixis, ploidy levels, and genomic relationships among four *Paspalum* species of the subgenus *Anachyris* (Poaceae) // *Flora*. 2008. V. 203. № 7. P. 535–547.
- Holm S. Unexpectedly high levels of genetic variation in *Potentilla argentea* L. (s. l.) in Southern Sweden // *Hereditas*. 1995. V. 123. № 2. P. 127–139.
- Holm S., Ghatnekar L. Sexuality and no apomixis found in crossing experiments with diploid *Potentilla argentea* // *Hereditas*. 1996. V. 125. № 1. P. 77–82.
- Holm S., Ghatnekar L., Bengtsson B.O. Selfing and outcrossing but no apomixis in two natural populations of diploid *Potentilla argentea* // *J. Evol. Biol.* 1997. V. 10. № 3. P. 343–352.
- Jankun A., Kovanda M. Apomixis at the diploid level in *Sorbus eximia* (Embryological studies in *Sorbus* 3) // *Preslia*. 1988. V. 60. P. 193–213.

- Jassem B. Apomixis in the genus *Beta* // Apomixis Newslett. 1990. V. 2. № 19. P. 7–23.
- Jefferson R.A. Apomixis: a social revolution for agriculture? // Biotechnol. Dev. Monit. 1994. V. 19. P. 14–16.
- Kantama L. Chromosome studies and genetic analysis of natural and synthetic apomictic model species: Ph. D. thesis. Wageningen: Wageningen University, 2005. 120 p.
- Kantama L., Sharbel T.F., Schranz M.E. *et al.* Diploid apomicts of the *Boechera holboellii* complex display large-scale chromosome substitutions and aberrant chromosomes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. № 35. P. 14026–14031.
- Kiefer C. Evolution and Phylogeography of the North American genus *Boechera* (Brassicaceae) and the Evolution of Apomixis: Ph. D. thesis. Heidelberg: Heidelberg University, 2008. 122 p.
- Kindiger B., Sokolov V.A. Progress in development of apomictic maize // Trends Agron. 1997. V. 1. P. 76–94.
- Knapp E. Apomixis bei der Zuckerrübe? // Z. Pflanzenzüchtg. 1975. B. 75. № 1. S. 1–9.
- Koch M., Al-Shehbaz I.A., Mummenhoff K. Molecular systematics, evolution, and population biology in the mustard family (Brassicaceae) // Ann. Mo. Bot. Gard. 2003. V. 90. P. 151–171.
- Kumari S.K. Cytogenetic investigations in Paniceae: Occurrence of apospory in a diploid species of *Panicum* – *P. antidotale* Retz // Curr. Sci. 1960. V. 29. P. 191.
- Marshall D.R., Brown A.H.D. Estimation of the level of apomixis in plant populations // Heredity. 1974. V. 32. P. 321–333.
- Marshall D.R., Downes R.W. A test for obligate apomixis in grain sorghum R473 // Euphytica. 1977. V. 26. P. 661–664.
- Martinez E.J., Hopp H.E., Stein Ju. *et al.* Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers // Mol. Breed. 2003. V. 12. P. 319–327.
- Matzk F., Meister A., Schubert I. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots // Plant J. 2000. V. 21. № 1. P. 97–108.
- Muntzing A. Pseudogamie in der Gattung *Potentilla* // Hereditas. 1928. V. 11. № 2/3. P. 267–283.
- Muntzing A. Note on the cytology of some apomictic *Potentilla*-species // Hereditas. 1931. V. 15. № 2. P. 166–178.
- Muntzing A. Apomictic and sexual seed formation in *Poa* // Hereditas. 1933. V. 17. № 2. P. 131–154.
- Muntzing A. Further studies on apomixis and sexuality in *Poa* // Hereditas. 1940. V. 26. № 2. P. 115–190.
- Muntzing A., Muntzing G. Some new results concerning apomixis, sexuality and polymorphism in *Potentilla* // Bot. Not. 1941. V. 94. P. 237–278.
- Muntzing A., Muntzing G. Spontaneous changes in chromosome number in apomictic *Potentilla collina* // Hereditas. 1943. V. 29. P. 451–460.
- Muntzing A., Muntzing G. The mode of reproduction of hybrids between sexual and apomictic *Potentilla argentea* // Bot. Not. 1945. V. 98. P. 49–71.
- Narayan K.N. Cytogenetic studies of apomixis in *Penisetum*: Ph. D. thesis California: University of California, 1951.
- Naumova T.N., Hayward M.D., Wagenvoort M. Apomixis and sexuality in diploid and tetraploid accessions of *Brachiaria decumbens* // Sex. Plant Reprod. 1999. V. 12. № 1. P. 43–52.
- Naumova T.N., Van der Laak J., Osadchij J. *et al.* Reproductive development in apomictic populations of *Arabis holboellii* (Brassicaceae) // Sex. Plant Reprod. 2001. V. 14. № 4. P. 195–200.
- Nogler G.A. Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus* // Bot. Helv. 1984. V. 94. № 2. P. 411–422.
- Norrmann G.A., Quarin C.L., Burson B.L. Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species // J. Hered. 1989. V. 80. № 1. P. 24–28.
- Norrmann G.A., Bovo O.A., Quarin C.L. Post-zygotic seed abortion in sexual diploid × apomictic tetraploid intraspecific *Paspalum* crosses // Austral. J. Bot. 1994. V. 42. № 4. P. 449–456.
- Pichot C., Borrut A., El Maâtaoui M. Unexpected DNA content in the endosperm of *Cupressus dupreziana* A. Camus seeds and its implications in the reproductive process // Sex. Plant. Reprod. 1998. V. 11. № 3. P. 148–152.
- Pichot C., El Maâtaoui M., Raddi S., Raddi P. Surrogate mother for endangered *Cupressus* // Nature. 2001. V. 412. № 6842. P. 39.
- Pichot C., Liens B., Nava J.L.R. *et al.* Cypress surrogate mother produces haploid progeny from alien pollen // Genetics. 2008. V. 178. № 1. P. 379–383.
- Polegri L., Calderini O., Arcioni S., Pupilli F. Specific expression of apomixis-linked alleles revealed by comparative transcriptomic analysis of sexual and apomictic *Paspalum simplex* Morong flowers // J. Exp. Bot. 2010. V. 61. № 6. P. 1869–1883.
- Popoff A. Über die Fortpflanzungsverhältnisse der Gattung *Potentilla* // Planta. 1935. V. 24. P. 510–522.
- Powers L. Fertilization without reduction in *Guayule* (*Parthenium argentatum* Gray.) and a hypothesis as to the evolution of apomixis and polyploidy // Genetics. 1945. V. 30. № 4. P. 323–346.
- Pupilli F., Labombarda P., Caceres M.E. *et al.* The chromosome segment related to apomixis in *Paspalum simplex* is homoeologous to the telomeric region of

- the long arm of rice chromosome 12 // *Mol. Breed.* 2001. V. 8. № 1. P. 53–61.
- Pupilli F., Martinez E.J., Busti A. *et al.* Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. // *Mol. Genet. Genom.* 2004. V. 270. № 6. P. 539–548.
- Quarin C.L. Seasonal changes in the incidence of apomixis of diploid, triploid, and tetraploid plants of *Paspalum cromyorrhizon* // *Euphytica.* 1986. V. 35. P. 515–522.
- Quarin C.L. The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses // *Apomixis Newslett.* 1992. V. 5. P. 8–15.
- Quarin C.L., Caponio I. Cytogenetics and reproduction of *Paspalum dasypleurum* and its hybrids with *P. urvillei* and *P. dilatatum* ssp. *Flavescens* // *Int. J. Plant Sci.* 1995. V. 156. № 2. P. 232–235.
- Quarin C.L., Espinoza F., Martínez E.J. *et al.* A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum* // *Sex. Plant Reprod.* 2001. V. 13. № 5. P. 243–249.
- Quarin C.L., Norrmann G.A. Cytology and reproductive behavior of *Paspalum equitans*, *P. ionanthum*, and their hybrids with diploid and tetraploid cytotypes of *P. cromyorrhizon* // *Bot. Gaz.* 1987. V. 148. № 3. P. 386–391.
- Quarin C.L., Norrmann G.A., Espinoza F. Evidence for autopolyploidy in apomictic *Paspalum rufum* // *Hereditas.* 1998. V. 129. № 2. P. 119–124.
- Rao N.G.P., Narayana L.L. Apomixis in grain sorghum // *Ind. J. Genet. Plant Breed.* 1968. V. 28. P. 121–127.
- Rao N.G.P., Murty U.R. Further studies on obligate apomixis in grain sorghum // *Indian J. Genet. Plant Breed.* 1972. V. 32. P. 379–383.
- Ravi S.B. Apomixis in sorghum line R473 – Truth or myth? A critical analysis of published work // *Current Sci.* 1993. V. 64. № 5. P. 306–315.
- Rodrigues J.C.M., Koltunow A.M.G. Epigenetic aspects of sexual and asexual seed development // *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 2005. V. 47. № 1. P. 37–49.
- Rychlewski J. Karyological studies on *Nardus stricta* L. // *Acta. Biol. Cracov. ser. Bot.* 1967. V. 10. P. 55–72.
- Savidan Y., Pernes J. Diploid-tetraploid-dihaploid cycles and the evolution of *Panicum maximum* Jacq // *Evolution.* 1982. V. 36. P. 596–600.
- Savidan Y. Apomixis: Genetics and breeding // *Plant Breed. Rev.* 2000. V. 18. P. 13–86.
- Schranz M.E., Dobe C., Koch M.A., Mitchell-Olds T. Sexual reproduction, hybridization, apomixis, and polyploidization in the genus *Boechea* (Brassicaceae) // *Am. J. Bot.* 2005. V. 92. P. 1797–1810.
- Schranz M.E., Lysak M.A., Mitchell-Olds T. The ABC's of comparative genomics in the Brassicaceae: building blocks of crucifer genomes // *Trends Plant Sci.* 2006. V. 11. P. 535–542.
- Shaked H., Kashkush K., Ozkan H. *et al.* Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat // *Plant Cell.* 2001. V. 13. P. 1749–1759.
- Sharbel T.F., Mitchell-Olds T. Recurrent polyploid origins and chloroplast phylogeography in the *Arabidopsis holboellii* complex (Brassicaceae) // *Heredity.* 2001. V. 87. P. 59–68.
- Sharbel T.F., Mitchell-Olds T., Dobes C. *et al.* Biogeographic distribution of polyploidy and B chromosomes in the apomictic *Boechea holboellii* complex // *Cytogenet. Genome Res.* 2005. V. 109. P. 283–292.
- Sharbel T.F., Voigt M.-L., Corral J.M. *et al.* Molecular signatures of apomictic and sexual ovules in the *Boechea holboellii* complex // *Plant J.* 2009. V. 58. № 5. P. 870–882.
- Sharbel T.F., Voigt M.-L., Corral J.M. *et al.* Apomictic and sexual ovules of *Boechea* display heterochronic global gene expression patterns // *Plant Cell.* 2010. V. 22. № 3. P. 655–671.
- Sharbel T.F., Voigt M.-L., Mitchell-Olds T. *et al.* Is the aneuploid chromosome in an apomict *Boechea holboellii* a genuine B chromosome? // *Cytogenet. Genome Res.* 2004. V. 106. P. 173–183.
- Sherman R.A., Voigt P.W., Burson B.L., Dewald C.L. Apomixis in diploid × triploid *Tripsacum dactyloides* hybrids // *Genome.* 1991. V. 34. P. 528–532.
- Shimotomai N. Zur kenntnis der pseudogamie bei *Potentilla* // *Proc. Imp. Acad. Japan.* 1935. V. 11. P. 338–339.
- Siena L.A., Ortiz J.P.A., Startor M.E. *et al.* Genetic and embryological evidences of apomixis at the diploid level in *Paspalum rufum* support recurrent autopolyploidization in the species // *Sex. Plant Reprod.* 2008. V. 21. № 3. P. 205–215.
- Skalinska M. Experimental and embryological studies in *Hieracium aurantiacum* L. // *Acta. Biol. Cracov. ser. Bot.* 1971. V. 14. P. 139–155.
- Skalinska M. Further studies in facultative apomixis of *Hieracium aurantiacum* L. // *Acta. Biol. Cracov. ser. Bot.* 1973. V. 16. P. 121–137.
- Skalinska M. Cytological diversity in the progeny of octoploid facultative apomicts of *Hieracium aurantiacum* // *Acta. Biol. Cracov. ser. Bot.* 1976. V. 19. P. 39–46.
- Sokolov V.A. Imprinting in Plants // *Rus. J. Gen.* 2006. V. 42. № 9. P. 1043–1052.
- Sokolov V.A., Khatypova I.V. The development of apomictic maize: update, problems and perspective // *Genetika (Yugoslavia).* 2000. V. 32. № 3. P. 331–353.
- Stebbins G.L., Babcock E.B. The effect of polyploidy

- and apomixis on the evolution of species in Crepis // J. Hered. 1939. V. 30. № 12. P. 519–530.
- Stebbins G.L. Variation and Evolution in Plants. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1950. 643 p.
- Taskin K.M., Turgut K., Scott R. Apomeiotic pollen mother cell development in the apomictic *Boechera* species // Biol. Plantarum. 2009a. V. 53. № 3. P. 468–474.
- Taskin K.M., Turgut K., Scott R.J. Somatic embryogenesis in apomict *Boechera holboellii* // Acta Biol. Hungar. 2009b. V. 60. № 3. P. 301–307.
- Tucker M.R., Koltunow A.M.G. Sexual and asexual (apomictic) seed development in flowering plants: molecular, morphological and evolutionary relationships // Funct. Plant Biol. 2009. V. 36. P. 490–504.
- Valle C.B., Glienke C. New sexual accessions in *Brachiaria* // Apomixis Newslett. 1991. V. 3. P. 11–13.
- Valle C.B., Savidan Y.H. Embryological analysis in *Brachiaria decumbens* Stapf // Apomixis News. 1989. V. 1. P. 29–31.
- Valle C.B., Savidan Y.H., Jank L. Apomixis and sexuality in *Brachiaria decumbens* Stapf // Proc. XVI Intern. Grasslands Congr. France, 1989. France: Inst. Nat. de la Recherche Agronom., 1989. P. 407–408.
- Visser N.C., Spies J.J. Cytogenetic studies in the genus *Tribolium* (Poaceae: Danthonieae). II. A report on embryo sac development, with special reference to the occurrence of apomixis in diploid specimens // S. Afr. J. Bot. 1994. V. 60. № 1. P. 22–26.
- Voigt M.-L. From a Phenotype to Transcriptomics Apomixis Initiation in the genus *Boechera*: Ph. D. thesis. Gatersleben: IPK Gatersleben, 2009. 150 p.
- Voigt M.-L., Melzer M., Rutten T. *et al.* Gametogenesis in the apomictic *Boechera holboellii* complex: the male perspective // Apomixis: Evolution, Mechanisms and Perspectives / Ed. E. Hörandl, U. Grossniclaus, P. van Dijk, T.F. Sharbel. Ruggell: Gantner-Verlag, 2007. P. 235–258.
- Weidmark G. Apomixis and sexuality in *Hierochloa australis* and in Swedish *H. odorata* on different polyploidy levels // Bot. Notiser. 1967. V. 120. P. 209–235.
- Windham M.D., Al-Shehbaz I.A. New and Noteworthy species of *Boechera* (Brassicaceae) I: sexual diploids // Harvard Papers Bot. 2006. V. 11. P. 61–68.
- Windham M.D., Al-Shehbaz I.A. New and noteworthy species of *Boechera* (Brassicaceae) II: apomictic hybrids // Harvard Papers Bot. 2007a. V. 11. P. 257–274.
- Windham M.D., Al-Shehbaz I.A. New and noteworthy species of *Boechera* (Brassicaceae) III: additional diploids and apomictic hybrids // Harvard Papers Bot. 2007b. V. 12. P. 251–274.

IS GAMETOPHYTIC APOMIXIS PRESENT IN DIPLOID FLOWERING PLANTS?

V.A. Sokolov^{1,2}, P.A. Panikhin¹, T.K. Tarakanova¹

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: sokolov@mcb.nsc.ru;

² Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

Summary

The paper reviews publications on detection of apomixis in diploid flowering plants. By this term we mean plant cloning through the seed. In this case, the embryo forms from a diploid maternal cell without the contribution of parental genes. It is a perfect genetic replica of the mother. As long ago as 1930s, Stebbins (Stebbins, Babcock, 1939) and later other researchers (Powers, 1945) noted a tight connection between apomictic reproduction and polyploidy. Until now, there is no accepted explanation for this phenomenon; on the other hand, no acceptable evidence for existence of apomictic diploids has been found. The goal of this work was to analyze the available publications on diploid apomictic plants. A large volume of papers on this problem was analyzed, and the results are concisely presented here. It is concluded that the reported cases of discovery of diploid apomicts either lack unambiguous evidence because of improper experimental methods or are related to a wrong interpretation of the term diploid.

Key words: apomixis, embryo sacs, diploids, polyploids, aneuploids, polyhaploids.

РЕДЕРИВАЦИЯ КАК СПОСОБ ОЧИСТКИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Е.Ю. Брусенцев¹, В.А. Напримеров^{1,3}, С.Я. Амстиславский^{1,2}

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

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

³ Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

В настоящее время стандарты биологических исследований постоянно повышаются. Кроме того, неуклонно возрастает число трансгенных и нокаутных линий мышей. В связи с этим все большее значение уделяется животным SPF-статуса (specified pathogens free). Работа на таких животных позволяет получать более точные результаты, без погрешности на инфекционное заболевание. Редеривация позволяет очистить колонии лабораторных животных и перевести их в SPF-статус. В обзоре сделано краткое описание и проведен сравнительный анализ основных способов редеривации с точки зрения эффективности, трудоемкости и других характеристик. Более подробно описан способ редеривации путем трансплантации эмбрионов как наиболее оптимальный на сегодняшний день.

Ключевые слова: лабораторные животные, редеривация, репродуктивные технологии.

Введение

Редеривация – от англ. rederivation – возврат к истокам, началу. В современной биотехнологии данный термин обозначает процесс очищения, избавления животных от различных патогенов. Редеривация может осуществляться различными способами: как простыми, с использованием кросс-фостеринга, так и более сложными, путем извлечения у зараженных доноров эмбрионов на разных стадиях преимплантационного развития, их отмывания в стерильных средах и последующей трансплантации. Важнейшая роль редеривации состоит в том, чтобы получить здоровое потомство от потенциально зараженного каким-либо патогеном донора. В последние годы редеривации придают все большее значение (Janus *et al.*, 2009; Okoli *et al.*, 2009; Pluck, Klasen, 2009; Yeom *et al.*, 2009; Lee, Kent Lloyd, 2010). Это обусловлено тем, что лабораторные животные, которые живут в условиях обычного (конвенционального) вивария, являются носителями большого числа различных инфекций (Zenner, Regnault, 2000). Однако по мере повышения стандартов в биологических исследованиях и ужесточения требований

биоэтики к экспериментальным работам все большее значение уделяется животным SPF-статуса (specified pathogens free); работа на таких животных позволяет получать более точные результаты, без погрешности на инфекционное заболевание (Shek, 2008). Другим важным фактором является появление большого числа трансгенных и нокаутных линий мышей (Abbott, 2004), которых необходимо предохранять и избавлять от различных патогенов (Mayer *et al.*, 2007). Согласно оценкам западных экспертов, одним из 10 наиболее значимых достижений науки в первом десятилетии XXI в. является расширение «биологических полномочий» бактерий и вирусов, сосуществующих вместе с многоклеточными хозяевами. Это не только не отрицает необходимости очистки конвенциональных животных, а, напротив, повышает требования к их SPF-статусу как необходимому условию изучения механизмов взаимодействия геномов хозяина и сопутствующей микрофлоры при формировании фенотипических свойств макроорганизма.

В вивариях России по-прежнему велика проблема заражения лабораторных животных всевозможными инфекциями, в том числе

вирусом экстремелии (мышинная оспа) (Абдрашитова, Конопленко, 2005). Он не несет вреда для человека, но представляет большую угрозу для животных, так как заразен, неизлечим и приводит к летальному исходу (Chapman *et al.*, 2010; Erez *et al.*, 2009; Moulton *et al.*, 2010). Во многих зарубежных центрах также имеет место заражение колоний лабораторных животных различными вирусными и бактериальными инфекциями и имеется потребность их очистки (Zenner, Regnault, 2000; Yamamoto *et al.*, 2001; Perdue *et al.*, 2007; Fray *et al.*, 2008). Правильно подобранный способ редеривации позволяет очистить колонии лабораторных животных и перевести их в SPF-статус.

Целью данного обзора являются анализ основных способов редеривации, активно применяющихся в мире, и выявление плюсов и минусов тех или иных методик (в частности, сравнительная оценка современных способов редеривации с точки зрения эффективности, экономичности, трудоемкости и других характеристик).

Краткое описание различных способов редеривации

Существует множество способов редеривации, как давно разработанных и используемых по сей день, так и предложенных относительно недавно, но уже получивших всеобщее признание.

Наиболее простым и известным способом является кросс-фостеринг. Он заключается в том, что новорожденное потомство переносят для дальнейшего выращивания другой самке в течение суток после рождения. Кросс-фостеринг давно применяют для исследования развития в онтогенезе физиологических и поведенческих характеристик у разных видов млекопитающих (Dennenberg *et al.*, 1969; Rosenberg *et al.*, 1970; Амстиславский и др., 1998–2000; Amstislavsky *et al.*, 2001; Kendrick *et al.*, 2001). Однако при посадке потомства от потенциально инфицированных доноров приемным матерям, которые не являются носителями определенного патогена, этот метод позволяет произвести очистку колоний лабораторных животных и рассматривается как один из способов редеривации (Bergin *et al.*, 2005; Glage *et al.*, 2007; Artwohl *et al.*, 2008; Okoli *et al.*, 2009; Yeom *et al.*, 2009). Этот способ иногда

применяют с дополнительной обработкой подсаживаемых потомков слабым раствором йода перед посадкой их на вскармливание приемным матерям (Watson *et al.*, 2005).

Процедура длительного воздействия антибиотиками на потомков в ходе раннего постнатального онтогенеза также может считаться разновидностью редеривации. Определенную дозу антибиотика добавляют в ежедневный рацион мышат. Процедура довольно длительная, так как животное необходимо содержать на этой диете как минимум 7–8 недель. Метод помогает не при всех инфекциях, а лишь при некоторых, не имеющих резистентности к антибиотикам (Goelz *et al.*, 1996; Bergin *et al.*, 2005; Kostomitsopoulos *et al.*, 2007).

Способ редеривации посредством хирургического извлечения практически сформированных потомков из матки потенциально инфицированных беременных самок непосредственно перед родами и последующей их посадки на вскармливание приемным матерям SPF-статуса применяют в некоторых крупнейших центрах генетических ресурсов мышей, таких, как «Джексоновская лаборатория» (США) (<http://www.jax.org/>). В России этот метод редеривации предлагает питомник «Пушино», который является одним из сертифицированных центров по разведению мышей и крыс SPF-статуса (<http://www.spf-animals.ru/>). Суть этого способа заключается в том, что на 18–19-й день беременности извлекают плоды (практически полностью сформированных мышат) из рогов матки потенциально инфицированных самок путем кесарева сечения, помещают преждевременно рожденных животных в инкубатор, предварительно обработав их дезинфицирующим раствором, где они доращиваются при 37 °С и увлажняемом воздухе. После 1–2 дней, проведенных в инкубаторе, мышат подсаживают здоровой суррогатной матери для дальнейшего доращивания и вскармливания (Marcotte *et al.*, 1996; Masy *et al.*, 2000; Glage *et al.*, 2007).

Начиная с 1970-х гг. экстракорпоральное оплодотворение применяется в медицинской практике (программа ЭКО), в частности, в целях преодоления бесплодия (Edwards, Steptoe, 1978; Papanikolaou *et al.*, 2008; Sills, Palermo, 2010). Метод редеривации, в основе которого лежит техника экстракорпорального оплодотворения

и культивирования образовавшегося зародыша до двухклеточной стадии с последующей подсадкой полученных *in vitro* эмбрионов суррогатной матери, является весьма надежным, хотя и достаточно трудоемким методом избавления от большинства патогенов (Suzuki *et al.*, 1996).

Между тем, по мнению большинства исследователей, наиболее оптимальным способом редеривации является трансплантация эмбрионов на ранних стадиях развития (двух клеток, морулы, бластоцисты) от зараженного донора чистому реципиенту (Carthew *et al.*, 1983; Homberger, 1997; Morrell, 1999; Van Keuren, Saunders, 2004; Ike *et al.*, 2007; Besselsen *et al.*, 2008; Fray *et al.*, 2008; Janus *et al.*, 2009).

Редеривация колоний лабораторных животных путем трансплантации эмбрионов

Трансплантация эмбрионов – это процесс, в результате которого эмбрионов вымывают из репродуктивных путей животных-доноров, находящихся на ранних стадиях беременности, а затем пересаживают в яйцеводы или матку других самок (реципиентов эмбрионов), эстральный цикл которых, как правило, синхронизирован с донорами.

Впервые успешная трансплантация эмбрионов была осуществлена на кроликах (Heар, 1891) с исследовательскими целями, но прошло более 40 лет, прежде чем эта методика была применена к другим лабораторным животным, а именно – крысам (Nicholas, 1933) и мышам (Fekete, Little, 1942). Примерно в то же самое время метод трансплантации эмбрионов уже начали применять в сельском хозяйстве. Были осуществлены первые успешные трансплантации эмбрионов на овцах (Warwick, Berry, 1949), козах (Warwick *et al.*, 1934; Warwick, Berry, 1949), крупном рогатом скоте (Umbaugh, 1951) и лошадях (Oguri, Tsutsumi, 1974).

В настоящее время этот подход широко применяют как с исследовательскими, так и практическими целями, в частности, в сельском хозяйстве и медицине (Амстиславский и др., 1991), а также для сохранения видов и пород животных (Amstislavsky *et al.*, 2004, 2006). В последнем случае приходится иногда прибегать к межвидовой трансплантации (Амстиславский, 2006).

Начиная с 1980-х гг. в качестве метода редеривации широко используется перенос эмбрионов от доноров, несущих патогены, к «чистым» реципиентам SPF-статуса (Carthew *et al.*, 1983; Homberger, 1997; Morrell, 1999; Van Keuren, Saunders, 2004; Ike *et al.*, 2007; Besselsen *et al.*, 2008; Fray *et al.*, 2008; Janus *et al.*, 2009). Данный метод является многоэтапным, состоящим из нескольких основных стадий, т. е. длительным и трудоемким, требующим четкой работы группы квалифицированных сотрудников. Несмотря на длительность проведения и относительно высокие материальные затраты, редеривация путем трансплантации эмбрионов является оптимальным способом очистки животных от подавляющего большинства патогенов (Carthew *et al.*, 1983; Homberger, 1997; Morrell, 1999; Van Keuren, Saunders, 2004; Ike *et al.*, 2007; Fray *et al.*, 2008).

Для получения эмбрионов у мышей, как правило, вызывают суперовуляцию, вводя самкам-донорам гонадотропные препараты в определенных дозах по стандартной схеме (Hogan *et al.*, 1986). Эмбрионы вымывают либо на стадии морулы-бластоцисты и после соответствующих процедур очистки вводят в матку «чистого» реципиента (Carthew *et al.*, 1983; Suzuki *et al.*, 1996; Okamoto, Matsumoto, 1999; Peters *et al.*, 2006), либо на более ранней двухклеточной стадии и вводят в воронку яйцевода реципиента (Mahabir *et al.*, 2007; Besselsen *et al.*, 2008; Janus *et al.*, 2009; Pluck, Klasen, 2009).

Очистка извлеченных эмбрионов непосредственно перед их трансплантацией осуществляется путем отмывания их в стерильной питательной среде. Эту процедуру обычно осуществляют путем переноса зародышей по одному из капли в каплю, добываясь при каждом переносе разбавления 1 : 100 (Mahabir *et al.*, 2007). При работе с эмбрионами сельскохозяйственных животных существует достаточно жестко регламентированный протокол, при котором отмывание осуществляют последовательно через 10 капель, причем дополнительным фильтром очистки является проведение этих эмбрионов через раствор трипсина в течение 1,5 мин (Stringfellow, 1998). При работе с лабораторными грызунами нет столь жесткого регламента (Mahabir *et al.*, 2008), однако считается, что правильное выполнение отмывания и проводка через 10 капель

достаточны для избавления от подавляющего большинства патогенов (Peters *et al.*, 2006). Но следует учитывать, что эта процедура не позволяет избавиться от наиболее мелких вирусов мышей, например, mouse minute virus (MMV) (Mahabir *et al.*, 2007).

Использование по возможности более ранних стадий развития эмбрионов для проведения процедур редеривации считается предпочтительным по двум причинам. Во-первых, ранние эмбрионы меньше времени находились внутри инфицированного донора по сравнению с более поздними и, соответственно, меньше подвергались риску проникновения патогена внутрь зародыша. Во-вторых, структура прозрачной оболочки, являющейся барьером, предохраняющим эмбрион от внешних воздействий, меняется по мере его развития (Van Soom, 2010). Именно на ранних стадиях развития зародыша она максимально плотная и практически непроницаема для подавляющего большинства вирусов (Mertens, 2006).

Прозрачная оболочка как барьер, защищающий от патогенов

Основной оболочкой, присущей эмбрионам всех видов млекопитающих на протяжении всего их преимплантационного развития (или, по крайней мере, части этого периода), является *zona pellucida* (zp), известная в русскоязычной литературе как прозрачная оболочка (Амстиславский и др., 1991; Rankin *et al.*, 2000; Denker, 2000; Menkhorst, Selwood, 2008). Прозрачная оболочка большинства исследованных видов млекопитающих эластична (Schwartz *et al.*, 1996) и обладает пористой структурой (Dudkiewicz, Williams, 1977), хотя характер пористости и структура прозрачной оболочки меняются в зависимости от стадии развития зародыша, вида животных и существенным образом зависят от того, получен ли зародыш *in vivo* или *in vitro* (Van Soom *et al.*, 2010). Прозрачная оболочка ооцита играет важнейшую роль в процессе оплодотворения, затем на протяжении всего преимплантационного развития эта структура является тем образующим элементом, который удерживает эмбрион в заданном объеме, выполняя также роль естественного барьера по отношению к окружающей среде (Denker, 2000; Bedford, 2004; Van Soom *et al.*, 2010).

У мышей прозрачная оболочка состоит из трех хорошо охарактеризованных гликопротеинов: ZP1, ZP2, ZP3 (Wassarman, 1998; Rankin *et al.*, 2000). Исследования эмбрионов мышей нокаутных линий выявили роль каждого из этих гликопротеинов на протяжении развития зародыша. В частности, эти исследования указывают на важнейшую роль гликопротеина ZP3 в процессе оплодотворения (Liu *et al.*, 1996; Rankin *et al.*, 2000). Толщина прозрачной оболочки зависит от вида млекопитающих и варьирует от 6 до 16 микрон (Bedford, 2004).

Таким образом, прозрачная оболочка является естественной преградой для попадания различных патогенов, в том числе вирусов, внутрь эмбриона (Gwatkin, 1967; Peters *et al.*, 2006; Van Soom *et al.*, 2010). В то же время именно на прозрачной оболочке могут адсорбироваться некоторые вирусы, от которых следует избавиться в ходе процедур редеривации (Van Soom *et al.*, 2009). Важной с точки зрения редеривации характеристикой прозрачной оболочки является ее относительная устойчивость к действию протеолитических ферментов, таких, как трипсин, хемотрипсин или проназа (Bedford, 2004). Именно на этом свойстве прозрачной оболочки основано применение трипсина в некоторых вариантах отмывки зародышей (Stringfellow, 1998; Angelo, 2009). Но время экспозиции должно быть коротким (1–1,5 мин) (Stringfellow, 1998). Этого времени контакта с трипсином достаточно, чтобы разрушить прилипшие к оболочке вирусы, но не достаточно для того, чтобы разрушить саму оболочку (Van Soom *et al.*, 2010). При воздействии трипсином характеристики прозрачной оболочки изменяются, что, однако, не влияет в большинстве случаев на дальнейшее развитие подвергнутых такому воздействию зародышей (Van Soom *et al.*, 2010).

В ходе движения по яйцеводам и нахождения в матке *zona pellucida* у большинства исследованных видов животных существенно изменяется по своей структуре и составу, а у некоторых видов млекопитающих дополнительно к прозрачной оболочке (или замещая ее) появляются так называемые «третичные» оболочки (Betteridge, 1989; Denker, 2000; Menkhorst, Selwood, 2008). Наличие третичных оболочек и динамика их развития хорошо изучены у эмбрионов кролика и лошади (Böving, 1957; Betteridge, 1989; Denker, 2000).

Дэнкер в своем обзоре (Denker, 2000) приводит указания на то, что множество других видов млекопитающих, такие, как кошки, бабуины, морские коты и ряд других, имеют дополнительные, помимо *zona pellucida*, оболочки, хотя до настоящего времени изученными в этом отношении видами являются лишь лошадь и кролик. Как правило, наличие дополнительных оболочек усложняет проведение биотехнологических процедур. Хорошей иллюстрацией данного положения является то, что замена *zona pellucida* на так называемую «капсулу» в ходе преимплантационного развития лошади существенно усложняет замораживание эмбрионов этого вида млекопитающих (Allen, 2005). Хотя до настоящего времени редеривация видов млекопитающих, у которых имеются дополнительные помимо *zona pellucida* оболочки, не проводилась, можно предположить, что редеривация этих видов будет технически более сложной по сравнению с теми видами млекопитающих, у которых третичных оболочек не образуется.

В настоящее время оболочкам в ходе преимплантационного развития зародыша уделяют самое пристальное внимание (Denker, 2000; Menkhorst, Selwood, 2008; Van Soom *et al.*, 2010). С учетом важности оболочек, прежде всего основной оболочки эмбриона – *zona pellucida*, производят одну из достаточно легко выполнимых манипуляций – отбраковку зародышей, у которых имеются существенные нарушения оболочки (разрывы, трещины или полное ее отсутствие). Для того чтобы увидеть эти нарушения, рекомендовано в процессе процедур редеривации рассмотреть зародыши при 50-кратном (или большем) увеличении и выбрать для дальнейшей работы лишь те из них, у которых отсутствуют нарушения прозрачной оболочки (Van Soom *et al.*, 2010).

Примеры использования трансплантации эмбрионов для очистки колоний мышей и крыс от различных патогенов

Трансплантацию эмбрионов эффективно используют для очистки колоний лабораторных животных от различного рода патогенов, в частности от вирусных инфекций, избавиться от которых другими способами особенно тяжело.

Аденовирусы мышей являются достаточно просто устроенными ДНК-содержащими вирусами, которые вызывают у животного воспаление верхних дыхательных путей, а также пневмонию (Van Keuren, Saunders, 2004). Редеривация путем трансплантации эмбрионов колоний лабораторных животных, зараженных мышинным аденовирусом типа 1 и 2 (mouse adenovirus type 1 (FL) + type 2 (R87)) (сокращенно их обозначают обычно как MAD 1+2), позволяет избавиться от этого вида вирусной инфекции (Morrell, 1999; Van Keuren, Saunders, 2004; Fray *et al.*, 2008).

Ротавирусы являются наиболее частыми возбудителями гастроэнтеритов у молодых мышей. Типичным представителем данного семейства является вирус эпизоотической диареи мышат (mouse rotavirus) (EDIM). Вирион (зрелая вирусная частица) содержит двуцепочечную РНК и внутренние белки. Способ инфицирования фекально-оральный. Вирус размножается в клетках эпителия ворсинок тонкого кишечника. В результате воспалительных процессов в слизистой оболочке кишечника усиливается перистальтика, что и вызывает диарею. Редеривация при помощи трансплантации эмбрионов привела к очистке колонии мышей от этого патогена (Van Keuren, Saunders, 2004).

Вирус гепатита мыши (mouse hepatitis virus) (MHV) относится к группе коронавирусов (Coronaviridae). Этот вирус содержит одноцепочечную РНК, вызывает поражение печени. Известен целый ряд примеров успешной очистки колоний мышей от вируса гепатита мыши путем редеривации посредством трансплантации эмбрионов (Homburger, 1996, 1997; Morrell, 1999; Van Keuren, Saunders, 2004; Fray *et al.*, 2008).

Представителями рода парвовирусов (*Parvovirus*) являются: парвовирус 1 (rat parvovirus) (PRV), вирус Килхема (Kilham rat virus) (KRV) и мелкий вирус мышей (mouse minute virus) (MMV, MVM). Трансплантация эмбрионов очищает животных и от этих патогенов (Van Keuren, Saunders, 2004; Besselsen *et al.*, 2008; Janus *et al.*, 2009).

Вирус энцефаломиелита мышей (вирус Тейлера) (Theiler's murine encephalomyelitis virus) (TMEV или GD-7) относится к роду энтеровирусов (*Enterovirus*) семейства пикорнавирусов (Picornaviridae), содержащего одноцепочечную

РНК. Вызывает поражение ЦНС у мышей. Очистка животных от этого вируса эффективно осуществляется редеривацией при помощи переноса эмбрионов (Morrell, 1999; Van Keuren, Saunders, 2004; Fray *et al.*, 2008).

Хорошо известен вирус мышей гемагглютинирующий японский (вирус Сендай) (Sendai virus) (SEND), который относится к парамиксовирусам (Paramyxoviridae). Это семейство РНК-содержащих вирусов, имеющих липопротеиновую оболочку и единичную одноцепочечную линейную РНК. Вирус Сендай имеет общий антиген с вирусом парагриппа, является патогенным для мышей, вызывает у животных воспаление верхних дыхательных путей, в некоторых случаях пневмонию. Данный вирус обладает способностью модифицировать мембраны зараженных клеток и приводит к их слиянию. Успешное избавление от вируса Сендая колонии лабораторных мышей путем трансплантации эмбрионов описано в работе P. Carthew с соавт. (1983).

Одним из достаточно редко встречающихся заболеваний лабораторных мышей, но представляющим опасность для работников вивария, является лимфоцитарный хориоменингит (lymphocytic choriomeningitis virus) (LCMV). Болезнь вызывается вирусом из семейства аренавирусов. Источником служат больные мыши. Заболевание схоже с энцефалитом. Вирус поражает ЦНС, приводит к воспалению мозговых оболочек и развитию гидроцефалии. Во время беременности самки мышей могут передать лимфоцитарный хориоменингит плоду. У больных животных концентрация вируса высока во всех тканях в течение всей жизни. Вирус опасен и для человека, так как люди могут заразиться этим заболеванием от мышей через загрязненную патогеном пыль, попадающую в дыхательные пути. При появлении данного вируса в колонии мышей под угрозой заражения могут оказаться работники вивариев. При использовании трансплантации эмбрионов на ранних стадиях развития можно избавить животных от этого заболевания (Ike *et al.*, 2007), что представляется задачей исключительно важной и с точки зрения биоэтики, так как при контакте с зараженными животными могут заразиться люди (работники вивария, научные сотрудники), что является недопустимым.

Редеривация при помощи трансплантации эмбрионов позволяет очистить колонии лабораторных животных не только от вирусов, но и от бактериальных инфекций, а также экто- и эндопаразитов.

Данный метод редеривации эффективен при очистке колоний животных от бактериальных инфекций, возбудителей различных заболеваний печени, в частности рода хеликобактер (*Helicobacter bilis*) (Van Keuren, Saunders, 2004), (*Helicobacter hepaticus*) (Van Keuren, Saunders, 2004; Fray *et al.*, 2008), которые вызывают хроническую и острую формы гепатита, а также воспаление желчного пузыря.

Заболевания легких и органов дыхания, вызываемые бактериями рода пастерелла (*Pasteurella pneumotropica*), приводят к воспалению легких. Редеривация посредством трансплантации эмбрионов позволяет избавиться от этого заболевания (Fray *et al.*, 2008).

Кроме вирусных и бактериальных инфекций, часто колонии мышей страдают от эктопаразитов (разные виды клещей) и эндопаразитов, в частности гельминтов (Morrell, 1999; Van Keuren, Saunders, 2004; Fray *et al.*, 2008). Метод редеривации при помощи трансплантации эмбрионов позволяет с высокой эффективностью очистить колонии мышей от клещей, например волосяных клещей (*Myocoptes musculus* и *Myobia musculi*) (Van Keuren, Saunders, 2004; Fray *et al.*, 2008), а также с высокой эффективностью устранить эндопаразитов, например гельминтов *Syphacia obvelata*, остриц (Morrell, 1999; Van Keuren, Saunders, 2004; Fray *et al.*, 2008).

Согласно существующей в европейских центрах практике, после прохождения процессов редеривации рожденных в условиях SPF зоны животных следует протестировать на отсутствие бактерий, вирусов и иных инфекций в соответствии с рекомендациями FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) (Nicklas *et al.*, 2002). Пробы для проверки рекомендовано посылать в специализированные диагностические лаборатории, аккредитованные согласно существующим международным стандартам (Homberger *et al.*, 1999; Nevalainen *et al.*, 1999). Существует несколько методов для определения наличия вирусной инфекции (ИФА, ПЦР и др.) (Nicklas *et al.*, 2002). Для тестирования

на наличие бактериальных инфекций делают посеы соскобов верхних дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта и репродуктивных путей. Тест на наличие экто- и эндопаразитов производят путем тщательного осмотра кожных покровов, экскрементов, а также с помощью серологических тестов. Для гарантии защиты основного поголовья от возможного проникновения патогенов через редеривированных животных проводят их обязательное карантинирование и только после подтверждения SPF статуса их переводят в основную колонию. Следует отметить, что в центрах генетических ресурсов, ориентированных на накопление и поддержание линейного разнообразия лабораторных животных, как правило существуют возможности самостоятельного внутреннего контроля качества редеривации (Mahabir *et al.*, 2009). Наличие оперативного контроля является обязательным условием эффективной работы центров на фоне динамично развивающегося производства различных генетических вариантов лабораторных животных.

Сравнительная характеристика различных способов редеривации

Различные способы редеривации, описанные в предыдущих разделах, имеют как свои преимущества, так и недостатки. Положительный результат обычно складывается из четырех составляющих: эффективности избавления от патогена, общей результативности (выживаемости потомства), материальных затрат и, наконец, трудоемкости метода включая время, необходимое для его проведения. Ниже приведено сравнение разных способов редеривации с учетом этой комплексной оценки.

Кросс-фостеринг является самым простым и наименее эффективным способом избавления от большинства вирусных инфекций, хотя достаточно эффективен при очистке от бактериальных инфекций, экто- и эндопаразитов. Выживаемость потомства при использовании этого метода самая максимальная, а затраты труда и времени – минимальные. Исходя из этого (простота метода, низкие затраты, высокая выживаемость потомства) кросс-фостеринг может быть рекомендован для избавления колоний мышей от некоторых видов клещей, таких,

как волосяные клещи (*Myocoptes musculinus* и *Myobia muscili*) (Bergin *et al.*, 2005), а также эндопаразитов за исключением *Syphacia obvelata* (Artwohl *et al.*, 2008). Метод эффективен также при некоторых вирусных инфекциях, например при очистке мышинных колоний от мышинного норовируса (Yeom *et al.*, 2009) и вируса гепатита мыши (Artwohl *et al.*, 2008). Метод может быть рекомендован и для избавления от некоторых бактериальных инфекций. Хорошие результаты были получены при очистке мышинных колоний от *Helicobacter hepaticus* (Okoli *et al.*, 2009; Yeom *et al.*, 2009) и от *Pneumocystis carinii* мышей (Yeom *et al.*, 2009). Этим же методом удалось очистить от *Helicobacter hepaticus* и колонию монгольской песчанки (Glage *et al.*, 2007).

При кросс-фостеринге в сочетании с обработкой потомков слабым раствором йода выживаемость потомства ниже, чем без обработки. Метод максимально пригоден для избавления от эктопаразитов, в меньшей степени – от эндопаразитов; дает хороший результат при бактериальных инфекциях, таких, как *Helicobacter hepaticus* (Watson *et al.*, 2005), а также вирусных включая вирус гепатита мыши (Watson *et al.*, 2005), вирус энцефаломиелимита мыши (Watson *et al.*, 2005) и ротавирус мыши (Watson *et al.*, 2005). Материальные затраты и время проведения процедур при данной разновидности метода несколько повышаются из-за появления стадии отмывания потомков в растворе йода.

Применение антибиотиков эффективно при таких бактериальных инфекциях, как *Helicobacter bilis* (Bergin *et al.*, 2005), *Helicobacter hepaticus* (Kostomitsopoulos *et al.*, 2007) и *Pasteurella pneumotropica* (Goelz *et al.*, 1996), в меньшей степени – при очистке от экто- и эндопаразитов. От этой процедуры животные не погибают, выживаемость высокая. Применение антибиотика должно быть постоянным, что влечет за собой дополнительные финансовые траты. Этот способ редеривации длителен по времени. Продолжительность составляет 7–8 недель. Успешность метода доказана для *Helicobacter bilis* на монгольской песчанке (Bergin *et al.*, 2005) и *Helicobacter hepaticus* – на мышях (Kostomitsopoulos *et al.*, 2007). От вирусных инфекций метод не избавляет, что является существенным недостатком. К ми-

нусам также относятся большие финансовые затраты на антибиотики, а чрезмерное их применение приводит к развитию дисбактериоза у животных.

Редеривация путем кесарева сечения имеет больше преимуществ для очистки животных от патогена по сравнению с предыдущими способами, хотя выживаемость потомства несколько ниже. Эффективно используется при избавлении от паразитарных заболеваний, а также бактериальных, таких, как *Helicobacter hepaticus* монгольской песчанки (Glage *et al.*, 2007), *Pneumocystis carinii* у мышей (Marcotte *et al.*, 1996; Masy *et al.*, 2000), *Pasteurella pneumotropica* у мышей (Masy *et al.*, 2000), но не дает 100 %-й гарантии. Этот способ редеривации связан с достаточно большими затратами средств и времени, так как этапы данного метода являются достаточно сложными.

Экстракорпоральное оплодотворение является одним из самых эффективных способов редеривации, связанных с тонкими манипуляциями с гаметам (сперматозоидами и ооцитами). Этот способ, однако, является далеко не дешевым и весьма трудоемким. Несмотря на низкую выживаемость эмбрионов, этот способ обладает несомненным достоинством по сравнению с перечисленными выше. Это достоинство заключается в эффективности очистки от инфекций. При применении этого способа для очистки колоний мышей от вирусных (вирус гепатита мыши) и бактериальных патогенов (*Pasteurella pneumotropica*) (Suzuki *et al.*, 1996) был получен стойкий позитивный результат. Однако имеются данные и о неэффективности этого способа при очистке крупного рогатого скота от бычьего герпесвируса типа 1 (Bovine herpesvirus type 1) (BHV-1) даже после отмывания эмбрионов в питательной среде с добавлением трипсина (Angelo, 2009).

Трансплантация эмбрионов – широко распространенный способ очистки животных от патогенов. При этом методе высока эффективность избавления практически от всех типов инфекций, однако следует помнить, что далеко не все трансплантированные эмбрионы имплантируются. Так же, как и редеривация посредством экстракорпорального оплодотворения, эта процедура достаточно длительна, требует немалых финансовых затрат, больших

усилий и высокой квалификации персонала. В отличие от редеривации при помощи экстракорпорального оплодотворения (*in vitro*) в данном случае работа осуществляется с преимплантационными эмбрионами, развившимися до нужной стадии в организме матери (*in vivo*). Данный способ на сегодняшний день признается большинством специалистов как оптимальный и наиболее универсальный подход к редеривации, являясь способом выбора в подавляющем большинстве случаев. При помощи этого способа редеривации удавалось успешно очистить колонии мышей от аденовирусов (Morrell, 1999; Van Keuren, Saunders, 2004; Fray *et al.*, 2008), ротавирусов (Van Keuren, Saunders, 2004), коронавируса (Homberger, 1996, 1997; Morrell, 1999; Van Keuren, Saunders, 2004; Fray *et al.*, 2008), парвовирусов (Van Keuren, Saunders, 2004; Besselsen *et al.*, 2008; Janus *et al.*, 2009), вируса энцефаломиелита мышей (Morrell, 1999; Van Keuren, Saunders, 2004; Fray *et al.*, 2008), вируса Сендай (Carthew *et al.*, 1983), вируса лимфоцитарного хориоменингита (Ike *et al.*, 2007), а также от бактериальных инфекций, обусловленных бактериями рода *Helicobacter* (Van Keuren, Saunders, 2004; Fray *et al.*, 2008) и *Pasteurella pneumotropica* (Fray *et al.*, 2008). Данный способ был также весьма эффективным для очистки мышинных колоний от разных видов клещей и эндопаразитов (Morrell, 1999; Van Keuren, Saunders, 2004; Fray *et al.*, 2008).

В заключение хотелось бы отметить следующее. В настоящее время отсутствует идеальный способ редеривации колоний лабораторных животных, который давал бы полную гарантию избавления их от всех существующих патогенов и был бы при этом дешевым и легким в исполнении. Однако на сегодняшний день редеривация путем трансплантации эмбрионов становится все более популярным подходом к этой проблеме и признается современными экспертами в качестве «золотого стандарта» редеривации (Mahabir *et al.*, 2008). Длительность и высокие материальные затраты при редеривации посредством эмбриотрансплантации компенсируются эффективностью данной процедуры. При помощи этого способа можно избавиться практически от всех распространенных патогенов, поскольку большинство вирусов не могут проникнуть внутрь эмбриона из-за имеющейся

на нем прозрачной оболочкой, играющей роль защитного барьера. Это обеспечивает защиту от подавляющего большинства вирусов и бактерий при последовательной отмывке эмбрионов в стерильных средах, но не гарантирует полной чистоты, так как некоторые вирусы имеют очень мелкие размеры и могут прикрепляться к наружной поверхности оболочки (Mahabir *et al.*, 2008). В этих случаях приходится не только отмывать эмбрионы в стерильных средах, но и прибегать к дополнительным ухищрениям, например к инкубации эмбрионов в растворе трипсина (Stringfellow, 1998; Angelo, 2009), что усложняет процедуру, увеличивая тем самым затраты на ее проведение и потенциально (хотя и не всегда) снижая выживаемость потомства. Перспективным подходом, на наш взгляд, является сочетание двух способов, когда полученные *in vivo* зародыши некоторое время культивируют *in vitro* в средах, содержащих антибиотики, и лишь после этого трансплантируют реципиенту (Suzuki, 1996; Angelo, 2009). Другим перспективным сочетанием является комбинация трансплантации и криоконсервации эмбрионов (Амстиславский, Трукшин, 2010), при этом после размораживания эмбрионов непосредственно перед их трансплантацией необходимо провести процедуры очистки эмбрионов так, как описано выше.

В 2010 г. в Новосибирском научном центре запущен уникальный SPF-виварий, в котором внедрены (или находятся в процессе освоения) самые современные технологии работы с лабораторными животными. Авторами данной статьи совместно с сотрудниками ИЦиГ СО РАН: к.б.н. И.Н. Рожковой, Т.Н. Уколовой, Н.А. Морозовым, О.Н. Никитиной и к.б.н. И.Ф. Плюсниковой проведен пилотный эксперимент по редеривации линии ручных крыс, полученных путем селекции из диких крыс пасюков. В результате трансплантации эмбрионов от самок-доноров линии ручных крыс самкам-реципиентам линии Sprague-Dawley родились крысята линии ручных крыс, успешно прошедшие процедуру редеривации. Таким образом, в SPF-виварии Новосибирского научного центра был сделан первый важный шаг для перевода этой линии в SPF-статус редеривацией путем трансплантации эмбрионов.

Благодарности

Авторы выражают благодарность сотрудницам ЦКП «SPF-виварий» Сальниковой Наталье Юрьевне и Приваловой Ольге Григорьевне за помощь и сотрудничество при проведении пилотного эксперимента по редеривации линии ручных крыс.

Литература

- Абдрашитова Э.Х., Конопленько Л.А. Экстремелия лабораторных мышей и методы ее диагностики // Биомедицина. 2005. № 1. С. 118–121.
- Амстиславский С.Я. Межвидовая трансплантация эмбрионов и клеточных ядер как подход к сохранению исчезающих видов млекопитающих // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 1. С. 3–11.
- Амстиславский С.Я., Бульгина В., Маслова Л.Н. и др. Влияние перекрестного воспитания на некоторые физиологические и поведенческие признаки у крыс линий Вистар и ГК (генетическая каталепсия) // Рос. физиол. журнал им. Сеченова. 2000. Т. 86. С. 1630–1637.
- Амстиславский С.Я., Максимовский Л.Ф., Вороников М.Т. Методы биотехнологии в практике разведения животных. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 1991. 170 с.
- Амстиславский С.Я., Маркель А.Л., Якобсон Г.С. Повышение артериального давления у приемных матерей крыс НИСАГ и Вистар: эффект перекрестного воспитания потомства // Рос. физиол. журнал им. Сеченова. 1999. Т. 85. С. 1496–1502.
- Амстиславский С.Я., Попова Н.К., Томилова Ю.Э. и др. Влияние материнской среды на артериальное давление и рефлекс испуга у крыс с наследственной артериальной гипертензией // Рос. физиол. журнал им. Сеченова. 1998. Т. 84. С. 783–789.
- Амстиславский С.Я., Трукшин И.С. Криобанк эмбрионов млекопитающих: выбор приоритетов и оптимальных репродуктивных технологий // Онтогенез. 2010. № 1. С. 19–31.
- Abbott A. Geneticists prepare for deluge of mutant mice // Nature. 2004. V. 432. P. 541.
- Allen W.R. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding // Reprod. Domest. Anim. 2005. V. 40. P. 310–329.
- Amstislavsky S., Aalto J., Järvinen M. *et al.* Transfer of European mink (*Mustela lutreola*) embryos into hybrid recipients // Theriogenology. 2004. V. 62. P. 458–467.
- Amstislavsky S., Alekhina T., Barykina N. *et al.* Effects of maternal environment during early postnatal de-

- velopment on behavior in cataleptic rats // *Behav. Proc.* 2001. V. 56. P. 41–47.
- Amstislavsky S., Kizilova E., Ternovskaya Y. *et al.* Embryo development and embryo transfer in the European mink (*Mustela lutreola*), an endangered mustelid species // *Reprod. Fertil. Dev.* 2006. V. 18. P. 459–467.
- Angelo M., Visintin J.A., Richtzenhain L.J., Gonçalves R.F. Evaluation of trypsin treatment on the inactivation of bovine herpesvirus type 1 on *in vitro* produced pre-implantation embryos // *Reprod. Domest. Anim.* 2009. V. 44. № 3. P. 536–539.
- Artwohl J.E., Purcell J.E., Fortman J.D. The use of cross-foster rederivation to eliminate murine norovirus, *Helicobacter* spp., and murine hepatitis virus from a mouse colony // *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2008. V. 47. № 6. P. 19–24.
- Bedford J.M. Enigmas of mammalian gamete form and function // *Biol. Rev.* 2004. V. 79. P. 429–460.
- Bergin I.L., Taylor N.S., Nambiar P.R., Fox J.G. Eradication of enteric helicobacters in Mongolian gerbils is complicated by the occurrence of *Clostridium difficile* enterotoxemia // *Comp. Med.* 2005. V. 55. № 3. P. 265–268.
- Besselsen D.G., Romero-Aleshire M.J., Munger S.J. *et al.* Embryo transfer rederivation of C.B-17/Icr-Prkdc(scid) mice experimentally infected with mouse parvovirus 1 // *Comp. Med.* 2008. V. 58. № 4. P. 353–359.
- Betteridge K.J. The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer // *Equine. Vet. J.* 1989. Suppl 8. P. 92–100.
- Böving B.G. Rabbit egg coverings // *Anat. Rec.* 1957. V. 127. P. 270.
- Chapman J.L., Nichols D.K., Martinez M.J., Raymond J.W. Animal models of orthopoxvirus infection // *Vet. Pathol.* 2010. V. 47. № 5. P. 852–870.
- Carthew P., Wood M.J., Kirby C. Elimination of Sendai (parainfluenza type 1) virus infection from mice by embryo transfer // *J. Reprod. Fertil.* 1983. V. 69. № 1. P. 253–257.
- Chin H.J., Wang C.K. Utero-tubal transfer of mouse embryos // *Genesis.* 2001. V. 30. № 2. P. 77–81.
- Denker H.-W. Structural dynamics and function of early embryonic coats // *Cell Tiss. Organs.* 2000. V. 166. P. 180–207.
- Dennenberg V.H., Rosenberg K., Zarrow M.X. Mice reared with rat aunts: effect in adulthood upon plasma corticosterone and openfield activity // *Physiol. Behav.* 1969. V. 4. P. 705–707.
- Dudkiewicz A., Williams W. Fine structural observations of the mammalian *zona pellucida* by scanning electron microscopy // *Scan. Electron. Microsc.* 1977. V. 2. P. 317–324.
- Erez N., Paran N., Maik-Rachline G. *et al.* Induction of cell-cell fusion by ectromelia virus is not inhibited by its fusion inhibitory complex // *Virology.* 2009. V. 6. P. 151.
- Fekete E., Little C.C. Observation on the mammary tumor incidence of mice born from transferred ova // *Cancer Res.* 1942. V. 2. P. 525–530.
- Fray M.D., Pickard A.R., Harrison M., Cheeseman M.T. Upgrading mouse health and welfare: direct benefits of a large-scale rederivation programme // *Lab. Anim.* 2008. V. 42. № 2. P. 127–139.
- Glage S., Dorsch M., Hedrich H.J., Bleich A. Rederivation of *Helicobacter hepaticus*-infected Mongolian gerbils by Caesarean section and cross-fostering to rats and mice // *Lab. Anim.* 2007. V. 41. № 1. P. 103–110.
- Goelz M.F., Thigpen J.E., Mahler J. *et al.* Efficacy of various therapeutic regimens in eliminating *Pasteurella pneumotropica* from the mouse // *Lab. Anim. Sci.* 1996. V. 46. № 3. P. 280–285.
- Gwatkin R.B. Passage of mengovirus through the *zona pellucida* of the mouse morula // *J. Reprod. Fertil.* 1967. V. 13. № 3. P. 577–578.
- Heap W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother // *Proc. R. Soc. (London).* 1891. V. 48. P. 457–458.
- Hogan B., Constantiny F., Lacy E. Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. N.Y.: Spring Harbor Laboratory, 1986.
- Homberger F.R. Mouse hepatitis virus // *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 1996. V. 138. № 4. P. 183–188.
- Homberger F.R. Enterotropic mouse hepatitis virus // *Lab. Anim.* 1997. V. 31. № 2. P. 97–115.
- Homberger F., Boot R., Feinstein R. *et al.* FELASA guidance paper for the accreditation of laboratory animal diagnostic laboratories // *Lab. Anim.* 1999. V. 33. Suppl 1. P. 19–38.
- Ike F., Bourgade F., Ohsawa K. *et al.* Lymphocytic choriomeningitis infection undetected by dirty-bedding sentinel monitoring and revealed after embryo transfer of an inbred strain derived from wild mice // *Comp. Med.* 2007. V. 57. № 3. P. 272–281.
- Janus L.M., Smoczek A., Hedrich H.J., Bleich A. Risk assessment of minute virus of mice transmission during rederivation: detection in reproductive organs, gametes, and embryos of mice after *in vivo* infection // *Biol. Reprod.* 2009. V. 81. № 5. P. 1010–1015.
- Kendrick K.M., Haupt M.A., Hinton M.R. *et al.* Sex difference in the influence of mothers on the social preferences of their offspring // *Hormones and Behavior.* 2001. V. 40. P. 322–338.
- Kostomitsopoulos N., Donnelly H., Kostavasili I. *et al.* Eradication of *Helicobacter bilis* and *H. hepaticus* from infected mice by using a medicated diet // *Lab. Anim. (N.Y.).* 2007. V. 36. № 5. P. 37–40.
- Lee A.Y., Kent Lloyd K.C. Rederivation of transgenic

- mice from iPS cells derived from frozen tissue // *Transgenic Res.* 2010. V. 20. № 1. P. 167–175.
- Liu C., Litscher E.S., Mortillo S. *et al.* Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of eggs lacking a *zona pellucida* and infertility in female mice // *PNAS.* 1996. V. 93. P. 5431–5436.
- Macy J.D.Jr., Weir E.C., Compton S.R. *et al.* Dual infection with *Pneumocystis carinii* and *Pasteurella pneumotropica* in B cell-deficient mice: diagnosis and therapy // *Comp. Med.* 2000. V. 50. № 1. P. 49–55.
- Mahabir E., Bauer B., Schmidt J. Rodent and germplasm trafficking: risks of microbial contamination in a high-tech biomedical world // *ILAR J.* 2008. V. 49. № 3. P. 347–355.
- Mahabir E., Bulian D., Needham J. *et al.* Transmission of mouse minute virus (MMV) but not mouse hepatitis virus (MHV) following embryo transfer with experimentally exposed *in vivo*-derived embryos // *Biol. Reprod.* 2007. V. 76. № 2. P. 189–197.
- Mahabir E., Bulian D., Needham J., Schmidt J. Lack of transmission of mouse minute virus (MMV) from *in vitro*-produced embryos to recipients and pups due to the presence of cumulus cells during the *in vitro* fertilization process // *Biol. Reprod.* 2009. 81(3). P. 531–538.
- Marcotte H., Levesque D., Delanay K. *et al.* *Pneumocystis carinii* infection in transgenic B cell-deficient mice // *J. Infect. Dis.* 1996. V. 173. № 4. P. 1034–1037.
- Mayer A., Bulian D., Scherb H. *et al.* Emergency prevention of extinction of a transgenic allele in a less-fertile transgenic mouse line by crossing with an inbred or outbred mouse strain coupled with assisted reproductive technologies // *Reprod. Fertil. Dev.* 2007. V. 19. № 8. P. 984–994.
- Menkhorst E., Selwood L. Vertebrate extracellular preovulatory and postovulatory egg coats // *Biol. Reprod.* 2008. V. 79. P. 790–797.
- Mertens E.M. Der Einfluss der *in vitro* Kultur boviner Embryonen auf die Struktur der extraembryonalen Matrix (*Zona pellucida*): eine rasterelektronen- und lichtmikroskopische Studie: Ph.D. Thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany. 2006.
- Morrell J.M. Techniques of embryo transfer and facility decontamination used to improve the health and welfare of transgenic mice // *Lab. Anim.* 1999. V. 33. № 3. P. 201–206.
- Moulton E.A., Bertram P., Chen N. *et al.* Ectromelia virus inhibitor of complement enzymes protects intracellular mature virus and infected cells from mouse complement // *J. Virol.* 2010. V. 84. № 18. P. 9128–9139.
- Nevalainen T., Berge E., Gallix P. *et al.* FELASA guidelines for education of specialists in laboratory animal science (Category D) // *Lab. Anim.* 1999. V. 33. № 1. P. 1–15.
- Nicholas J.S. Development of transplanted rat eggs // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1933. V. 30. P. 1111–1113.
- Nicklas W., Baneux P., Boot R. *et al.* Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units // *Lab. Anim.* 2002. V. 36. № 1. P. 20–42.
- Oguri N., Tsutsumi Y. Non-surgical egg transfer in mares // *J. Reprod. Fertil.* 1974. V. 41. P. 313–320.
- Okamoto M., Matsumoto T. Production of germfree mice by embryo transfer // *Exp. Anim.* 1999. V. 48. № 1. P. 59–62.
- Okoli A.S., Menard A., Mendz G.L. *Helicobacter* spp. other than *Helicobacter pylori* // *Helicobacter.* 2009. V. 14. № 1. P. 69–74.
- Papanikolaou E.G., Kolibianakis E.M., Tournaye H. *et al.* Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis // *Hum. Reprod.* 2008. V. 23. № 1. P. 91–99.
- Perdue K.A., Green K.Y., Copeland M. *et al.* Naturally occurring murine norovirus infection in a large research institution // *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2007. V. 46. № 4. P. 39–45.
- Peters D.D., Marschall S., Mahabir E. *et al.* Risk assessment of mouse hepatitis virus infection via *in vitro* fertilization and embryo transfer by the use of zona-intact and laser-microdissected oocytes // *Biol. Reprod.* 2006. V. 74. № 2. P. 246–252.
- Pluck A., Klasen C. Surgical techniques for the generation of mutant mice // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 561. P. 231–243.
- Rankin T., Soyal S., Dean J. The mouse *zona pellucida*: folliculogenesis, fertility and preimplantation development // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2000. V. 163. P. 21–25.
- Rosenberg K., Dennenberg V.H., Zarrow M.X. Mice reared with rat aunts: the role of rat-mouse contact in mediating behavioral and physiological changes in the mouse // *Anim. Behav.* 1970. V. 18. P. 138–143.
- Schwartz P., Magerkurth C., Michelmann H.W. Scanning electron microscopy of the *zona pellucida* of human oocytes during intracytoplasmic sperm injection (ICSI) // *Hum. Reprod.* 1996. V. 11. P. 2693–2696.
- Shek W.R. Role of housing modalities on management and surveillance strategies for adventitious agents of rodents // *ILAR J.* 2008. V. 49. № 3. P. 316–325.
- Sills E.S., Palermo G.D. Human blastocyst culture in IVF: current laboratory applications in reproductive medicine practice // *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2010. V. 51. № 3. P. 441–445.
- Steptoe P.C., Edwards R.G. Birth after reimplantation of human embryo // *Lancet.* 1978. V. 2. P. 366.
- Stringfellow D.A. Recommendation for the sanitary handling of *in vivo*-derived embryos // *Manual of*

- the International Embryo Transfer Society. 1998. P. 79–84.
- Suzuki H., Yorozu K., Watanabe T. *et al.* Rederivation of mice by means of *in vitro* fertilization and embryo transfer // *Exp. Anim.* 1996. V. 45. № 1. P. 33–38.
- Umbaugh R.E. Superovulation and ovum transfer in cattle // *Fertil. Steril.* 1951. V. 2. P. 243–252.
- Van Soom A., Nauwynck H.J., Wrathall A.E. Scientific foundations of the epidemiological safety of embryo transfer // *Manual of the International Embryo Transfer Society: a Procedural Guide* <http://www.publish.csiro.au/journals/rfd> and General Information for the Use of Embryo Transfer Technology, Emphasizing Sanitary Procedures. 2009. 4th ed. P. 13–40.
- Van Soom A., Wrathall A.E., Herrler A., Nauwynck H.J. Is the *zona pellucida* an efficient barrier to viral infection? // *Reprod. Fertil. Dev.* 2010. V. 22. P. 21–31.
- Van Keuren M.L., Saunders T.L. Rederivation of transgenic and gene-targeted mice by embryo transfer // *Transgenic Res.* 2004. V. 13. № 4. P. 363–371.
- Warwick B., Berry R. Inter-generic and intra-specific embryo transfers in sheep and goats // *J. Hered.* 1949. V. 40. P. 297–303.
- Warwick B.L., Berry R.O., Horlacher W.R. Resulting of mating rams to Angora female goats // *Proc. 27th Ann. Meet. Am. Soc. Anim. Prod.* 1934. P. 225–227.
- Wassarman P.M. *Zona pellucida* glycoproteins // *Annu. Rev. Biochem.* 1998. V. 57. P. 415–442.
- Watson J., Thompson K.N., Feldman S.H. Successful rederivation of contaminated immunocompetent mice using neonatal transfer with iodine immersion // *Comp. Med.* 2005. V. 55. № 5. P. 465–469.
- Yamamoto H., Sato H., Yagami K. *et al.* Microbiological contamination in genetically modified animals and proposals for a microbiological test standard for national universities in Japan // *Exp. Anim.* 2001. V. 50. № 5. P. 397–407.
- Yeom S.C., Yu S.A., Choi E.Y. *et al.* Prevalence of *Helicobacter hepaticus*, murine norovirus, and *Pneumocystis carinii* and eradication efficacy of cross-fostering in genetically engineered mice // *Exp. Anim.* 2009. V. 58. № 5. P. 497–504.
- Zenner L., Regnault J.P. Ten-year long monitoring of laboratory mouse and rat colonies in French facilities: a retrospective study // *Lab. Anim.* 2000. V. 34. № 1. P. 76–83.

REDERIVATION AS A MEANS FOR LABORATORY ANIMAL PURIFICATION

E.Yu. Brusentsev¹, V.A. Naprimerov^{1,3}, S.Ya. Amstislavsky^{1,2}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;

³ Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

Summary

Standards for biological studies are constantly increasing. So is the number of transgenic and knockout mouse strains. For this reason, Laboratory Animal Science focuses its attention on specified pathogens free (SPF) animals. Use of these animals minimizes the variance of experimental data related to animal pathogens. Rederivation provides means for purification of laboratory animal stocks and elimination of specified pathogens. The main methods of rederivation are outlined and compared with regard to their effectiveness, labor input and some other parameters. Rederivation by embryo transfer is described more comprehensively, for this approach is presently considered the best.

Key words: laboratory animals, rederivation, reproduction techniques.

ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ВАКЦИН НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

С.И. Татьков¹, Е.В. Дейнеко¹, Д.П. Фурман^{1,2}

¹ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия;

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия,
e-mail: tatkov@bionet.nsc.ru

В обзоре рассматриваются современные достижения в разработке новых вакцин против туберкулеза. Представлены данные по применению различных секретируемых антигенов *M. tuberculosis* в качестве компонентов субъединичных вакцин. На конкретных примерах рассматривается положение о необходимости конструирования искусственных антигенов, объединяющих в своем составе по несколько антигенов (эпитопов) из *M. tuberculosis*. Обсуждается перспектива создания «съедобной» вакцины против туберкулеза на основе трансгенных растений.

Ключевые слова: туберкулез, вакцина, антигены, субъединичная вакцина, трансгенные растения, эпитоп, съедобная вакцина.

Введение

В последние годы в России так же, как и во многих других странах мира, сложилась катастрофическая ситуация по туберкулезу, который в настоящее время является инфекционным заболеванием с наибольшим летальным эффектом. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), туберкулезом ежегодно заболевает около 8 млн человек и около 3 млн заболевших погибает. Наблюдаемый в мире с начала 1990-х годов неуклонный рост показателя смертности связан с распространением ВИЧ, поскольку туберкулез является основной причиной смерти больных с синдромом приобретенного иммунного дефицита: при сочетании этих патологий продолжительность выживания составляет в среднем два месяца (Ormerod *et al.*, 1994).

Серьезной проблемой в лечении туберкулеза стало возникновение лекарственно-резистентных штаммов микобактерий туберкулеза *M. tuberculosis*. Вызываемые ими лекарственно устойчивые формы туберкулеза получили значительное распространение во многих странах Азиатского и Африканского континентов.

По числу и спектру препаратов, к которым обнаруживается лекарственная устойчивость *M. tuberculosis*, различают варианты с множест-

венной лекарственной устойчивостью (МЛУ), широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) и тотальной лекарственной устойчивостью (ТЛУ). МЛУ-штаммы устойчивы как минимум к двум антибиотикам – рифампицину и изониазиду, наиболее эффективным противотуберкулезным препаратам первого ряда. ШЛУ-штаммы устойчивы, кроме того, к любому из фторхинолонов, а также к одному или большему числу инъекционных препаратов – капреомицину, канамицину, амикацину. ТЛУ-штаммы устойчивы к любым из известных в настоящее время противотуберкулезных препаратов.

Очевидно, что распространение лекарственно устойчивых штаммов требует как создания новых лекарственных препаратов, так и интенсификации усилий по созданию принципиально новых иммунопрофилактических средств. По инициативе ВОЗ с 2006 г. объявлена глобальная программа борьбы с туберкулезом «The Global Plan to Stop TB», в рамках которой одно из ведущих мест занимает программа разработки вакцин нового поколения.

Туберкулез: краткие сведения

Туберкулез – это заболевание человека и животных, вызываемое некоторыми видами

микобактерий. Микобактерии (*Micobacterium*) – родовое название аэробных, не образующих спор неподвижных бацилл с большим содержанием липидов в клеточной стенке, широко распространенных в окружающей среде. Известно более 40 видов микобактерий, но лишь немногие из них способны вызывать заболевание. Такие виды близкородственных медленно растущих микобактерий называют микобактериями туберкулезного комплекса (МТК). К нему относят *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. bovis*, *M. microti* и *M. avium*. В патогенезе туберкулеза у человека ведущая роль принадлежит открытому в 1882 г. Р. Кохом *M. tuberculosis*, однако в районах Африки, прилегающих к Сахаре, случаи заболевания туберкулезом обусловлены инфицированием населения *M. africanum* и *M. canetti*. *M. bovis* вызывает заболевание у широкого круга теплокровных, включая человека, *M. microti* – патогенен для мышей, *M. avium* – для птиц. В современной микробиологической классификации микобактерии вида *M. avium* относят к нетуберкулезным микобактериям комплекса avium-intracellular, которые вызывают менее распространенные болезни человека и животных – микобактериозы.

Генотипически микобактерии туберкулезного комплекса очень похожи. Уровень гомологии их ДНК – 99,9 %, однако ряд фенотипических различий и особенно круг хозяев позволили сохранить за ними видовые названия.

Основным резервуаром и источником аэрогенной туберкулезной инфекции является бациллярный больной, выделяющий большое количество микобактерий с мокротой или слюной. Кроме того, заражение может происходить алиментарным путем – через употребление молока и молочнокислых продуктов от коров, пораженных *M. bovis*, или яиц от кур, инфицированных *M. avium*. Возможна и контактная передача инфекции через поврежденные кожные покровы, например, при доении больных животных. В результате аэрогенного заражения туберкулезный процесс чаще возникает в органах дыхания, при алиментарном инфицировании могут поражаться почки, легкие, кости и суставы, периферические лимфоузлы, мочеполовые органы, глаза, центральная нервная система. В зависимости от основных клинических

проявлений различают легочную и нелегочные формы туберкулеза. Туберкулез легких остается наиболее распространенной и опасной формой заболевания. При этом инфицированным может оказаться любой орган, в том числе кожа. Из внелегочных форм наиболее часто встречаются туберкулез мочеполовой системы, костей и суставов, а также периферических лимфоузлов.

Однако заражение человека или животных микобактериями туберкулезного комплекса не является достаточным условием для развития заболевания, так как у 90 % инфицированных *M. tuberculosis* людей никогда не возникает активных форм туберкулеза (Nagelkerke, De Vlas *et al.*, 2006). Предполагается, что заболевание начинает прогрессировать в результате каких-то, зачастую временных или даже кратковременных, нарушений функционирования иммунной системы. В литературе обсуждается несколько возможных механизмов возникновения таких нарушений, в том числе и недавно сформулированное предположение о вовлечении в формирование дисфункций иммунитета вирусных сопутствующих инфекций, в первую очередь ВИЧ (Hussain *et al.*, 2007).

Совершенствование вакцины против туберкулеза

В настоящее время для предупреждения туберкулеза широко используется вакцинирование новорожденных детей живой вакциной БЦЖ. БЦЖ представляет собой живой аттенуированный штамм *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guerin, Бацилла Кальметта-Герена), сохранивший свои антигенные и иммуногенные свойства. Дешевизна производства этой вакцины и безопасность ее применения обеспечили широкое распространение вакцинирования как основного средства профилактики туберкулеза (Orme, 1999). С 1948 по 1986 гг. БЦЖ были вакцинированы около 2,5, а к 1995 г. – уже около 3 млрд человек (Jacobs *et al.*, 1987; Hanson *et al.*, 1995). Опыт применения вакцины БЦЖ показал ее высокую эффективность против развития туберкулеза у детей и слабую протективную активность или полное отсутствие защитного эффекта против легочных форм туберкулеза у взрослых (Jacobs *et al.*, 1987; Haile, Kallenius, 2005; Kallenius *et al.*, 2007). Вакцинация БЦЖ

в детском возрасте эффективно предохраняет от заболевания мiliary формой туберкулеза легких и туберкулезным менингитом (Surekha Rani *et al.*, 2005). В последние годы, однако, усиливаются сомнения относительно ее универсальности и эффективности (Mustafa, 2002).

Отмечаемые вариации протективной активности БЦЖ могут быть следствием различий как в иммунологическом статусе вакцинированных людей, так и между вакцинными штаммами (Maes *et al.*, 1996; Collins, Kaufmann, 2001). Завершенное 60-летнее изучение результатов вакцинации американских индейцев показало, что долгосрочная эффективность БЦЖ-вакцинирования составила 52 % (Haile, Kallenius, 2005). Следует отметить, что БЦЖ, подобно другим живым вакцинам, способна вызывать отрицательные побочные эффекты (Klein, 2000). Осложнения при вакцинации БЦЖ наблюдаются, в частности, у детей, инфицированных ВИЧ еще до рождения (Hesseling *et al.*, 2004). Часто отмечается воспаление подмышечных лимфоузлов со стороны введения вакцины. При этом БЦЖ высевается как из материала пораженного лимфоузла, так и из желудочного сока, и высеваемые бактерии уже могут быть устойчивыми к некоторым из противотуберкулезных препаратов, например к изониазиду. В ходе лечения этих побочных проявлений вакцинирования БЦЖ может приобретать лекарственную устойчивость и к рифампицину, обусловленную, как показано, мутацией в гене *rpoB*. Таким образом, оказывается необходимым контролировать лекарственную устойчивость вакцины как до ее использования, так и в ходе лечения побочных эффектов вакцинации (Hesseling *et al.*, 2004).

К настоящему времени назрела необходимость разработки вакцин нового поколения как наиболее эффективных иммунопрофилактических средств борьбы с туберкулезом, в первую очередь с его легочной формой (Sierra, 2006). Очевидно, что их получение требует более глубокого понимания ключевых событий, происходящих на клеточном и молекулярном уровнях и обеспечивающих формирование иммунитета (Xing, 2001). Кроме того, поскольку приблизительно 1/3 населения Земли уже инфицирована *M. tuberculosis*, речь должна идти о создании «постинфекционной» вакцины. Такая вакцина должна удовлетворять ряду требований: вызы-

вать стойкий специфический иммунитет; иметь минимум побочных эффектов и быть приемлемой по цене для повсеместного использования, что особенно важно для стран третьего мира. По-настоящему эффективная вакцина должна индуцировать более сильный иммунный ответ, чем тот, что формируется при естественном инфицировании *M. tuberculosis*. Кроме того, новая вакцина должна эффективно защищать группы населения как ранее вакцинированные БЦЖ, так и инфицированные *M. tuberculosis* и/или ВИЧ, и предупреждать возникновение легочных форм туберкулеза (Martin, 2005).

В ближайшее время, видимо, появится вакцина, способная усиливать протективный эффект вакцинирования БЦЖ при комбинированном воздействии. В более долгосрочной перспективе будет разработана вакцина, которая придет на смену БЦЖ. Скорее всего, одним из кандидатов может оказаться безопасная живая вакцина на основе новых штаммов *M. tuberculosis* (Martin, 2005).

К середине 1990-х гг. обозначилось три основных направления разработки противотуберкулезной вакцины: получение аукоотрофных мутантов *M. tuberculosis*, совершенствование БЦЖ путем создания ее рекомбинантных аналогов, секретирующих цитокины или содержащих гены вирулентного штамма *M. tuberculosis* (Nor, Musa, 2004); создание ДНК-вакцин (Mollenkopf *et al.*, 2001) или субъединичных вакцин с использованием основных белков *M. tuberculosis* (Orme, 1995, 1999; Smith, 2003), а также использование рекомбинантных штаммов БЦЖ в качестве средства доставки гетерологичных антигенов (Hanson *et al.*, 1995).

Исследования по этим же направлениям, но дополненные использованием микобактериальных липидов в качестве вакцины или адъювантов, продолжались и в 2000-е гг. (Agger, Andersen, 2002; Young, Stewart, 2002; Kumar *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2010a, b). Адъювантами называются вещества, усиливающие специфический иммунный ответ при вакцинировании. Механизмы действия адъювантов различны, поэтому их подбирают с учетом желаемого конкретного типа формируемого иммунного ответа (гуморальный, клеточный или мукозальный) и способа введения вакцины (Vogel, 2000). В качестве адъювантов могут быть исполь-

зованы и цитокины (Xing, 2001), в том числе γ -интерферон или его аналоги (Азаев и др., 2004, 2007).

Важным направлением повышения эффективности вакцины является оптимизация ее формы в целях преимущественной индукции иммунного ответа клеточного типа (Young, 2000). В качестве векторов доставки рассматривались внутриклеточные паразиты: *M. tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* (Mollenkopf *et al.*, 2001; Hall *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009) и ряд вирусов (Xing, Lichty, 2006; Perera *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010). Определенные возможности просматриваются и в использовании различных нуклеопротеиновых комплексов (Азаев и др., 2007).

Совершенствование методов подбора адъювантов и систем доставки позволяет с оптимизмом оценивать перспективы создания субъединичных вакцин против туберкулеза, которые бы стимулировали Т-клеточный иммунный ответ (Reed *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2009; Kamath *et al.*, 2009; Henriksen-Lacey *et al.*, 2010, 2011).

К началу 2000 г. уже имелось несколько вакцин-кандидатов, для которых были получены положительные результаты в доклинических испытаниях на моделях мышей и морских свинок при аэрозольном введении (Orme *et al.*, 2001). Три из них с 2003 г. находятся на стадии клинических испытаний (Orme, 2001, 2005; Reed *et al.*, 2003). К 2005 г. различными группами исследователей было разработано более 200 новых кандидатных вакцин против туберкулеза (Haile, Kallenius, 2005) и для некоторых из них начаты клинические испытания. Наибольшие успехи достигнуты при использовании вакцин на основе рекомбинантных штаммов *M. bovis* БЦЖ, живых аттенуированных *M. tuberculosis*, ДНК-вакцин и субъединичных вакцин с добавкой новых адъювантов (Brennan *et al.*, 2004).

В 2005 г. была начата подготовка к клиническим испытаниям кандидатных вакцин в США (Rowland *et al.*, 2005), а в Европе был создан противотуберкулезный кластер (TB Vaccine Cluster), который финансировался 5-й рамочной программой Евросоюза. Участниками европейского кластера было разработано не менее 24 кандидатных вакцин, показавших свою эффективность на различных животных моделях (Williams *et al.*, 2005). Иммунологическая оценка

кандидатных вакцин осуществляется на основе рекомендаций ВОЗ (Hanekom *et al.*, 2008).

Антигены, перспективные для создания вакцин

К началу 2000 г. уже было получено несколько вариантов субъединичных вакцин, однако их протективный эффект при испытаниях оказался в ряде случаев непредсказуемым и сильно варьировал. Для преодоления этого недостатка предлагалось создавать и использовать конструкции, обеспечивающие коэкспрессию рекомбинантных антигенов с цитокинами, или использовать рецептуры, содержащие рекомбинантные антигены и цитокины (Sharma, Khuller, 2001; Xing, 2001).

Среди нескольких групп антигенов *M. tuberculosis* с протективной активностью центральное место занимают секретируемые белки (Mustafa *et al.*, 2002).

Секретируемые белки *M. tuberculosis*

Аннотирование генома *M. tuberculosis* штамма H37Rv показало, что он содержит 3995 открытых рамок трансляции (ОРТ), но лишь для 52 % из них удалось предсказать функциональную активность (Camus *et al.*, 2002). Все выявленные гены получили порядковые номера, следующие за аббревиатурой Rv.

Анализ протеома *M. tuberculosis* с применением методов двумерного электрофореза в сочетании с MALDI-MS фингерпринтингом (Jungblut *et al.*, 1999) позволил выявить не менее 1800 клеточных и 800 секретируемых белков.

По-видимому, именно среди секреторных белков в первую очередь следует искать антигены, перспективные для создания новых вакцин (Skjot *et al.*, 2000). Однако идентификация таких потенциальных антигенов представляет собой непростую задачу, поскольку, с одной стороны, все еще отсутствуют точные данные о полном спектре секретируемых белков, выделяемых *M. tuberculosis* в организме больного, а с другой стороны, известно, что их количественный и качественный составы могут существенно изменяться в зависимости от реакции организма при инфицировании и от течения заболевания (Laal, Skeiky, 2005).

Для идентификации генов, кодирующих белки, накапливающиеся в культуральной жидкости в ходе роста микобактерий туберкулеза, применяется иммунохимический скрининг геномных экспрессионных библиотек *M. tuberculosis* высокоцитотражными кроличьими антисыворотками, полученными в ответ на иммунизацию животных очищенными секретруемыми белками (CFPs). С этой же целью проводится инкубирование различных фракций секретруемых белков *M. tuberculosis* с мононуклеарными клетками крови доноров, вакцинированных БЦЖ, невакцинированных или больных туберкулезом (Surekha *et al.*, 2005).

В эксперименте по исследованию влияния 10 фракций секретруемых белков *M. tuberculosis* (14–90 кДа) на лимфоцитарный пролиферативный индекс и синтез γ -интерферона и ИЛ-2 мононуклеарными клетками периферической крови детей-доноров из перечисленных групп было показано, что для создания вакцины наиболее перспективны секретруемые белки фракции 30–34 кДа вызывающие наиболее выраженный иммунный ответ (Surekha *et al.*, 2005).

Семейство ESAT-6

К семейству ESAT-6 относят низкомолекулярные ранние секретруемые белки, которые кодируются более чем 20 генами (Brosch *et al.*, 2007). К их числу относят не только собственно ESAT-6 (синонимы: *esxA*, *Rv3875*, *MT3989*, *MTV027.10*), но и белки, кодируемые рамками *Rv0287*, *Rv0288* (*TB10.4*), *Rv2346c*, *Rv2347c*, *Rv3619c*, *Rv3620c*, *Rv3890c* (*Mb3919c*), *Rv3905c* (*Mb3935c*) и *CFP-10* (*Rv3874*) (Smith, 2003; Brosch *et al.*, 2007), по нуклеотидным последовательностям которых между *M. bovis* и *M. tuberculosis* наблюдаются различия.

Белки семейства высокоиммуногенны и специфичны (Skjot *et al.*, 2000). По уровню синтеза γ -интерферона мононуклеарными клетками периферической крови доноров в ответ на их контакт с соответствующими антигенами наибольшую иммуногенность демонстрируют *TB10.4* > *CFP-10*, \approx *ESAT-6*. Два из членов семейства – *ESAT-6*, *CFP-10* – кодируются *esx-lhp*-опероном в *RD1*-области генома *M. tuberculosis* и являются иммунодоминантными

T-клеточными антигенами (Okkels *et al.*, 2003). *TB10.4* – продукт гена *Rv0288* – был впервые выделен из низкомолекулярной фракции культурального фильтрата *M. tuberculosis* на ранней стадии культивирования (Skjot *et al.*, 2000).

Функция названных белков пока неизвестна, но они, как экспериментально доказано, опознаются Th1-клетками и могут быть использованы при создании субъединичной вакцины (Mustafa, Shaban, 2006). Для этой же цели, по видимому, может оказаться перспективным и способным к образованию комплекса с *TB10.4* белок *Rv0287*.

Семейство сериновых протеаз

Среди секретруемых белков *M. tuberculosis* были обнаружены и идентифицированы два антигена *MTB32* (A и B) (Skeiky *et al.*, 1999), гомология которых составляет 66 %. Масса каждого из белков без сигнального пептида около 32 кДа. Оба относятся к семейству сериновых протеаз. Ген *mtb32a* представлен в геноме *M. tuberculosis* единственной копией. Соответствующий белок обнаруживается среди секретруемых белков как вирулентных (*H37Rv*, Erdman, клинический изолят *CSU93*), так и невирулентных (*H37Ra*) штаммов *M. tuberculosis*. Гомолог *MTB32* был обнаружен и у *M. bovis* БЦЖ. Однако в качестве кандидата для субъединичной вакцины рассматривается *MTB32A*, а не *MTB32B*, поскольку на него не реагируют мононуклеарные клетки из периферической крови инфицированных лиц. Он может быть также перспективен для создания диагностикумов туберкулеза.

Другие семейства

CFP32 (*Rv0577*) – секретруемый белок, предположительно глиоксилаза, с молекулярной массой 32 кДа, который присутствует только у микобактерий туберкулезного комплекса (МТК). Первичная структура *CFP32* одинакова у всех представителей комплекса. При секвенировании ПЦР-фрагментов соответствующего гена какого-либо полиморфизма не обнаружено. При культивировании микобактерий белок детектируется иммуноблоттингом в культуральной жидкости и клеточных цитозольных компартаментах. По результатам иммуноферментного

анализа (ИФА) у 32 % больных легочной формой туберкулеза в сыворотке обнаруживаются антитела против CFP32, а сам белок выявляется в сыворотке 56 % больных. Уровень CFP32 в сыворотке коррелирует с концентрацией в ней интерлейкина-10 (иммуносупрессивного цитокина, предположительно играющего важную роль в прогрессировании заболевания) и не показывает корреляции с уровнем γ -интерферона, ключевого фактора при формировании протективного иммунитета (Huard *et al.*, 2003). Белок перспективен как для использования в качестве мишени противотуберкулезных лекарственных средств, так и для диагностики заболевания.

Антигенный комплекс 85

Среди белков, секретируемых *M. tuberculosis*, а также в клеточной оболочке бактерии были обнаружены белки трехкомпонентного антигенного комплекса Ag85 в составе Ag85A, Ag85B и Ag85C (Belisle *et al.*, 1997). Все они обладают мукозил-трансферазной активностью и катализируют биосинтез наиболее распространенных гликолипидов клеточной стенки (Dover *et al.*, 2007; Goude, Parish, 2008), в том числе и вирулентного корд-фактора (Elamin *et al.*, 2009). Белки Ag85 обладают близкой молекулярной массой, составляющей 30–32 кДа (Daniel, Janicki, 1978; Sada *et al.*, 1990; Laal, Skeiky, 2005). Установление рентгеноструктурным методом их пространственной структуры (Ronning *et al.*, 2000) открыло возможности для целенаправленного синтеза ингибиторов ферментной активности и создания новых противотуберкулезных препаратов. Концентрация белков комплекса среди других секретируемых белков в зависимости от условий культивирования варьирует от 14 до 60 % (Wiker, Harboe, 1992). Показано, что рекомбинантный антиген 85A обеспечивает протективный иммунитет, и некоторые из вариантов субъединичных вакцин на его основе уже находятся на стадии клинических испытаний в Африке (McShane *et al.*, 2005). Большой интерес вызывает и антиген 85B, который в сочетании с другими антигенами *M. tuberculosis*, в частности ESAT6, рассматривается в качестве серьезного кандидата для создания субъединичной вакцины (Olsen *et al.*, 2004; Langermans *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2009,

2010; Christensen *et al.*, 2010; Clark *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2010; van Dissel *et al.*, 2010, 2011).

Мультиэпитопные белки

По-видимому, невозможно создать субъединичную вакцину против туберкулеза, основанную на одном каком-нибудь рекомбинантном антигене. Более перспективным является использование для этих целей гибридных белков, в составе которых объединяются несколько антигенов или несколько эпитопов из различных антигенов (Andersen, Doherty, 2005; Luo *et al.*, 2009; Davila *et al.*, 2010; Aagaard *et al.*, 2011). Рассмотрим некоторые примеры таких искусственных белков.

Гибридный белок ESAT-6-Ag85. Очень хорошую индукцию протективного иммунитета на модели туберкулеза у морских свинок показал белок, полученный слиянием эпитопов антигенов 85A и ESAT-6 (Olsen *et al.*, 2004). Слитный белок Ag85A-ESAT-6 проявил существенно более выраженное иммуногенное действие, чем его составляющие. При введении в адьюванте морским свинкам он защищал их от инфицирования *M. tuberculosis* в той же степени, что и БЦЖ. В результате иммунизации животных развитие заболевания после инфицирования *M. tuberculosis* существенно замедляется и увеличивается продолжительность жизни, однако проблема выбора наиболее эффективного средства доставки препарата сохраняется (Williams *et al.*, 2005).

Mtb72f – антиген, по-видимому, один из самых перспективных для создания субъединичной вакцины (Mitsuyama *et al.*, 2003). Он был получен тандемным объединением трех эпитопов Mtb32C-Mtb39-Mtb32N (Skeiky *et al.*, 2004). Соответствующий объединенный ген кодирует полипептид массой 72 кДа. При иммунизации мышей C57BL/6 «голой» ДНК с этим геном возникает сильный γ -интерфероновый ответ на инкубацию моноцитов с первыми двумя компонентами полипептида (Mtb32C, Mtb39) и сильный ответ CD8 Т-клеток, направленный исключительно против Mtb32C. Если же вводить мышам полипептид Mtb72f, то сила и направленность иммунного ответа формируются в зависимости от используемого адьюванта. При введении в адьюванте AS02A

индуцируется умеренный γ -интерфероновый и слабый CD8-T-клеточный ответ. При введении в адьюванте AS01B – мощный иммунный γ -интерфероновый и гуморальный ответ против всех трех компонент полипептида, в дополнение к которому наблюдается такой же по силе, как и при введении ДНК Mtb72f, CD8-T-клеточный ответ, направленный исключительно против Mtb32C-эпитопа. Все три способа иммунизации (ДНК-, в адьювантах AS01 и AS02) привели к формированию протективного иммунитета у мышей C57BL/6 против аэрозольного заражения вирулентными штаммами *M. tuberculosis*. Также, что особенно важно, был сформирован протективный иммунитет у морских свинок (выживаемость более 1 года после аэрозольной инфекции), сравнимый по параметрам с вакцинированием БЦЖ. В 2004 г. субъединичная вакцина Mtb72f в AS02 была одной из первых кандидатных вакцин выведена на 1-ю фазу клинических испытаний на добровольцах. Была также получена рекомбинантная БЦЖ (72f BCG), экспрессирующая данный антиген (Okada, Shirakawa, 2005).

Среди секретируемых белков *M. tuberculosis* наиболее интересны для создания вакцины те, которые способны вызывать сильный T-клеточный ответ и секрецию γ -интерферона, интегральных компонентов защиты против туберкулеза (Ben Amor *et al.*, 2005; McMurry *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2009). Очевидно, что такие белки должны содержать T-клеточные эпитопы или мотивы связывания с белками МНС II (белками класса II главного комплекса гистосовместимости).

Дополнительные возможности поиска кандидатных вариантов для создания мультиэпитопных вакцин открывает внедрение компьютерных методов анализа нуклеотидных и белковых последовательностей.

С помощью интернет-доступных программ SignalP и Prosite в полногеномных последовательностях штаммов H37Rv и CDC 1551 *M. tuberculosis* были определены рамки считывания предполагаемых секретируемых белков (McMurry *et al.*, 2005). Далее с использованием собственной запатентованной программы эти авторы проанализировали соответствующие белки на наличие мотивов связывания с МНС II и обнаружили 65 тыс. таких последо-

вательностей или 5 % от проскринированных 1,3 млн первичных структур. Было синтезировано 17 полипептидных последовательностей с наибольшим рангом и изучена их возможность стимулировать синтез γ -интерферона и пролиферацию T-лимфоцитов *in vitro*. Для этих целей отбирали периферическую кровь у здоровых доноров, у которых, однако, результаты кожной пробы с туберкулином были положительными. В экспериментах *in vitro* 8 полипептидов стимулировали пролиферацию лимфоцитов, 15 – синтез γ -интерферона (IFN- γ ELISpot), причем один из них, MT2281-26-J (WRRRPLSSALLS-FGLLLGGLPL), индуцировал синтез γ -интерферона в пробах от 11 из 25 доноров (44 %). В целом выявленные 15 эпитопов, и в особенности MT2281-26-J, представляются хорошими кандидатами для включения в мультиэпитопную противотуберкулезную вакцину (McMurry *et al.*, 2005).

Поиск T-эпитопов возможен и с помощью другой программы, доступной через Интернет, – ProPred (Mustafa, Shaban, 2006). С ее помощью были отысканы мотивы в ESAT-6, CFP10, MPT70, связывающие более 50 % из панели белков главного комплекса гистосовместимости HLA-DR, насчитывающей 51 полипептид. К таким мотивам относится район 69–77 а.о. в ESAT-6, две области в CFP10 (55–66 и 76–84 а.о.) и четыре – в MPT70 (1–11, 81–95, 124–140 и 192–191 а.о.). Для проверки антигенности этих участков были синтезированы перекрывающиеся пептиды и изучена их презентация T-клеткам, в результате которой подтвердилось, что мотивы 69–77 а.о. (ESAT-6), 76–84 (CFP10), 182–191 (MPT70) узнаются Th1-клетками и могут быть отнесены к T-эпитопам.

Дополнительный источник перспективных антигенов появился после сравнительного анализа геномов *M. tuberculosis*, *M. bovis* и *M. bovis* БЦЖ, в результате которого были выявлены области, присутствующие только у *M. tuberculosis* и содержащие открытые рамки считывания (Mustafa *et al.*, 2002). Эти области получили название районов различий – RD (region of difference). Среди белков, кодируемых RD, наряду с уже идентифицированными ESAT-6 и CFP-10 могут оказаться и новые белки с высокой иммунологической реактивностью, перспективные в качестве компонентов субъ-

единичных вакцин или реагентов для диагностики туберкулеза. Суммарно во всех RD закодировано до 100 белков (Mustafa, 2005). Наиболее иммунологически реактивные из них могли бы быть хорошими кандидатами как для создания вакцин, так и для разработки специфических тест-систем для выявления туберкулеза.

Одними из направлений изучения белков в этом аспекте являются получение их рекомбинантных аналогов или перекрывающихся синтетических пептидов и изучение их серологической и Th1-клеточной реактивности. Таким образом был выявлен ряд антигенов, кодируемых в RD1-области, перспективных для создания специфичных диагностикумов в низкокэндемичных районах и кандидатных вакцин (Mustafa, 2005). К их числу относятся ORF14, ESAT6, присутствующие во всех вирулентных штаммах *M. tuberculosis* и определяющие степень вирулентности (Okkels *et al.*, 2003), а также CFP10, PE, PPE.

Для разработки вакцин широко используются специальные компьютерные программы, ориентированные на выявление в структуре антигенов мотивов, способных к связыванию с несколькими HLA-белками. Такие мотивы и содержащие их антигены, опознаваемые Т-клетками, могут иметь перспективы для создания субъединичных вакцин для профилактики туберкулеза и диагностических тест-систем для его выявления (Mustafa, 2005).

Способы введения противотуберкулезных вакцин

Существует два основных способа введения живой вакцины БЦЖ: пероральный и парентеральный (внутрикожный, подкожный). Первоначально БЦЖ предназначалась исключительно для перорального введения. В Бразилии до сих пор коммерчески доступен штамм *M. bovis* БЦЖ Mogueau Rio de Janeiro, пригодный для пероральной вакцинации детей и взрослых (Badell *et al.*, 2009).

От способа вакцинации БЦЖ зависит структура поствакцинальных осложнений. При пероральном введении встречаются шейные лимфадениты, грануляционные отиты. Причиной осложнений у прививаемых младенцев является проникновение жидкой вакцины из носовой

части глотки через слуховую трубу в среднее ухо, особенно при срыгивании. При переходе на внутрикожный метод стали регистрироваться осложнения в виде локальных воспалительных реакций на коже в месте введения вакцины или в региональных лимфатических узлах.

От практики перорального введения вакцины БЦЖ отказались по двум причинам: во-первых, из-за резкого (в 10–100 раз) снижения жизнеспособности БЦЖ под действием низкого pH желудочного сока и действия пищеварительных ферментов, что приводило к необходимости назначения повышенных доз вакцины, и, во-вторых, из-за частого развития шейных лимфаденопатий (Блум, Файн, 2002).

В настоящее время широко применяется подкожное введение БЦЖ (Badell *et al.*, 2009). Новые кандидатные вакцины против туберкулеза также в основном вводятся парентеральным способом, т. е. минуя пищеварительный тракт.

Однако *M. tuberculosis* попадает в организм человека преимущественно аэрогенным путем через слизистую или мукозальную оболочку легких. Вакцины, ориентированные на формирование иммунного ответа на уровне слизистых и предназначенные для введения через дыхательные пути, бесспорно, перспективны для вакцинирования против туберкулеза, поскольку они стимулируют иммунную реакцию уже в месте внедрения активного начала (Hall *et al.*, 2010).

Так, было доказано, что всего 10 бактерий БЦЖ, введенных в виде аэрозоля морским свинкам, обеспечивают такой же или даже более высокий уровень иммунитета, чем гораздо большие дозы вакцины, введенные внутрикожно или подкожно. В эксперименте на макаках резус аэрозольное введение БЦЖ или материала ее клеточных стенок обеспечивало достаточный уровень протекции и не сопровождалось выражением туберкулиновых проб, т. е. не наблюдалось перехода ранее отрицательной туберкулиновой пробы в положительную, что свидетельствовало о сохранении статуса иммунизации. Кроме того, было установлено, что аэрозольное введение здоровым добровольцам вакцины БЦЖ не сопровождалось какими-либо побочными реакциями (Блум, Файн, 2002).

Важным аргументом в пользу применения мукозальных вакцин является и отсутствие

травматизации пациента, неизбежной при инъекционном способе введения.

Учитывая, что местный и системный иммунные ответы тесно связаны, а вакцинирование через слизистые оболочки минимизирует риски, обусловленные повреждением кожных покровов при вакцинации, следует, видимо, ожидать постепенного перехода от инъекционных к мукозальным вакцинам (Reljic *et al.*, 2006; Xing, Lichty, 2006).

Новые возможности для введения субъединичных вакцин против туберкулеза открылись с развитием биотехнологических методов, давших, в частности, возможность получения трансгенных растений и их использования как средства доставки вакцин в организм (Salyaev *et al.*, 2010).

Трансгенные растения – продуценты «съедобных» вакцин

При разработке вакцин нового поколения, основанных на получении рекомбинантных антигенов, актуальным остается вопрос о поиске высокоэффективных и экономически выгодных систем экспрессии для наработки соответствующих белков-антигенов. В настоящее время для этих целей используются *E. coli*, *S. cerevisiae*, культуры клеток человека и насекомых (Sourrouille *et al.*, 2009). Однако эти системы не лишены недостатков, связанных с посттрансляционными модификациями рекомбинантных белков, продолжительностью наработки продукта, ограниченным пролиферативным потенциалом, высокой стоимостью компонентов культуральных сред и т. д.

Новые перспективы получения рекомбинантных фармацевтических белков открываются с использованием генетически модифицированных растений (Ma *et al.*, 2005; Hefferon, 2010). Генетически модифицированные растения могут служить более дешевым и безопасным источником рекомбинантных белков по сравнению с традиционными системами экспрессии на основе бактерий, дрожжей, культур клеток насекомых и млекопитающих (Menkhaus *et al.*, 2004; Boehm, 2007; Frutos *et al.*, 2008; Sourrouille *et al.*, 2009).

Привлекательность растений в качестве систем экспрессии для накопления рекомбинантных

фармацевтически ценных белков обеспечивается многими обстоятельствами. Прежде всего, в растительных тканях нет риска загрязнения агентами, патогенными для млекопитающих – вирусами и прионами. Растительные клетки обеспечивают правильную посттрансляционную модификацию рекомбинантного белка, характерную для эукариотических клеток, а также его сборку и фолдинг (Ma *et al.*, 2005).

Экспрессированные в растительных клетках рекомбинантные белки могут быть направлены в различные компартменты растительной клетки (вакуоли или люмены эндоплазматического ретикулума), а также в апопласт и различные органы растения (семена, клубни, плоды и т. д.). Благодаря этому рекомбинантные белки в растительных тканях могут сохраняться длительное время (месяцы и годы) без каких-либо изменений и снижения биологической активности (Sourrouille *et al.*, 2009).

Немаловажным является и тот факт, что разработанные к настоящему времени методы агробиологического возделывания хозяйственно важных видов растений, а также системы семеноводства для той или иной культуры делают растения привлекательными для их использования в качестве биофабрик белков медицинского назначения.

Важно отметить, что растения, не подвергаемые термообработке, могут использоваться в качестве готового продукта для профилактики и лечения заболеваний. Такие растения, в тканях которых синтезируются и накапливаются рекомбинантные бактериальные антигены, привлекательны для использования в качестве вакцин и получили специальное название – «съедобные» вакцины (Mason *et al.*, 2002; Rybiski, 2008; Tecson *et al.*, 2008; Yusibov, Rabindran, 2008). Более того, трансгенные растения представляют собой удобные модели для разработки новых альтернативных способов доставки (перорально и интраназально) рекомбинантных белков в организмы теплокровных.

Формирование иммунного ответа при использовании «съедобных» вакцин

Механизм иммунизации съедобными вакцинами основан на антиген-представляющей способности перитонеальных макрофагов тон-

кого кишечника млекопитающих. В кишечнике чужеродный белок, обладающий антигенными свойствами, распознается специальными М-клетками, которые широко представлены в толще слизистого эпителия. М-клетки транспортируют захваченный антиген к перитонеальным макрофагам и В-лимфоцитам, находящимся в лимфоидных образованиях тонкого кишечника (пейеровых бляшках). В результате презентации антигена на поверхности антиген-представляющих клеток происходит активация Т-лимфоцитов-хэлперов, которые в сочетании с антигеном активируют В-лимфоциты. Дифференцированные В-клетки выходят из лимфоидных фолликулов слизистой оболочки и поступают через общую циркуляцию в мезентеральные лимфатические узлы, где происходят их созревание и превращение в плазматические клетки, синтезирующие основной иммуноглобулин секрета слизистых – иммуноглобулин А (sIgA) – так называемый маркер «местного иммунитета».

Плазматические клетки способны снова мигрировать к слизистым оболочкам дыхательных путей, желудочно-кишечного и мочеполового трактов. Секреторный иммуноглобулин блокирует адгезию патогенов к поверхностям слизистых оболочек, предотвращая их проникновение в подлежащие ткани и обеспечивая тем самым барьерную функцию слизистых как первой линии иммунологической защиты на пути патогенных агентов. Микробные антигены являются одним из активных стимулов для синтеза sIgA в кишечнике.

Учитывая, что мукозная вакцинация стимулирует как местный иммунный ответ на уровне слизистых оболочек, так и общий иммунный ответ организма, получение «съедобных» вакцин стало одним из перспективных направлений создания экономически эффективных вакцин (Щелкунова, Щелкунов, 2008). К настоящему времени созданы трансгенные растения табака, томата, салата-латука, масляной репы, арабидопсиса и турнепса, в которые перенесены гены, контролирующие синтез различных антигенов и антител.

Необходимо отметить, что для наработки рекомбинантных белков и создания «съедобных» вакцин в основном используются генетически модифицированные растения с ядерной трансформацией, т. е. со встройкой чужеродного гена

в ядерный геном растения. Кроме этого, используются транспластомные растения с доставкой чужеродного гена в хлоропластный геном, а также метод агроинфильтрации, основанный на транзиентной (временной) экспрессии чужеродных генов в растительных клетках. Более подробную информацию о состоянии исследований по созданию «съедобных» вакцин на основе генетически модифицированных растений можно найти в обзорных статьях специального выпуска Т. 9, № 8 журнала «Expert Review of Vaccines» за 2010 г. и в цитируемых работах (Рукавцова и др., 2006; Sourrouille *et al.*, 2009; Nefferson, 2010).

Разработка «съедобных» вакцин против туберкулеза

Как было установлено, доставка антигенов *M. tuberculosis* через слизистые оболочки (перорально или интраназально) может приводить к формированию протективного иммунного ответа. Этот факт открыл новые перспективы для возрождения перорального способа иммунизации против туберкулеза путем использования трансгенных растений. Накопление антигенов в тканях растений, непосредственно употребляемых в пищу без предварительной кулинарной обработки, вызывает большой интерес для разработки вакцин нового поколения, поскольку целлюлозная оболочка растительной клетки может выступать в качестве микрокапсулы и защищать ее содержимое от повреждающего действия рН среды и ферментов желудочно-кишечного тракта. Более того, для предотвращения иммунологической толерантности в слизистых оболочках кишечника можно создавать такие трансгенные растения, которые бы включали не только гены белков оболочек того или иного возбудителя, но и гены белков, служащих адьювантами. Так, например, в растения арабидопсиса были перенесены в слитой форме ген *esat6 M. tuberculosis* и ген субъединицы В термолабильного токсина (LTВ) энтеротоксигенного штамма *E. coli* (Rigano *et al.*, 2004).

В настоящее время в различных лабораториях мира создается широкий набор антигенов, которые выступают мишенями иммунных ответов на *M. tuberculosis*. Среди таких белков следует назвать семейство секретируемых белков

M. tuberculosis Ag85, члены которого, Ag85A и Ag85B, могут быть использованы при создании вакцин нового поколения. Другой многообещающей мишенью является белок ESAT6. Внимание исследователей привлекает и возможность создания «съедобной» вакцины, содержащей одновременно два антигена, например, ESAT6 и Ag85B, накапливаемых в трансгенных растениях салата (Матвеева и др., 2009; Floss *et al.*, 2010). Растения могут быть эффективно использованы для биосинтеза антигенов *M. tuberculosis* на основе транзientной (временной) продукции целевых белков с использованием растительных вирусов в качестве векторов (Zelada *et al.*, 2006; Dorokhov *et al.*, 2007). Разрабатывается технология создания трансгенных растений – продуцентов антигенов ESAT6 и CFP10 *M. tuberculosis*, а также дельтаферона человека в качестве иммуномодулирующего медиатора, гены которых слиты в одной рамке считывания и методом агробактериальной трансформации перенесены в геном растений моркови (Татьков, Дейнеко и др. Неопубл. данные).

Успешность использования для вакцинирования трансгенных растений, в тканях которых накапливаются антигены *M. tuberculosis*, продемонстрирована в работе Rigano и коллег (Rigano *et al.*, 2006). Авторами установлена стимуляция биосинтеза γ -интерферона клетками CD4+ у мышей, что свидетельствовало о формировании иммунного ответа Th1-типа при поедании трансгенных растений.

Заключение

Распространение штаммов *M. tuberculosis* с множественной и широкой лекарственной устойчивостью делает задачу совершенствования вакцины против туберкулеза еще более важной. Одним из перспективных направлений, как свидетельствуют литературные данные, являются создание искусственных мультиэпитопных антигенов и подбор оптимального способа доставки их в организм человека. Очень хорошие перспективы для возрождения перорального способа вакцинирования против туберкулеза открывают трансгенные растения, в которых происходит биосинтез соответствующих антигенов. Такие растения не только дают возможность с наименьшими

затратами получать необходимые антигены, но и позволяют оптимальным образом решить задачу их доставки к местам формирования иммунного ответа, поскольку их клетки могут выполнять функцию природного «наноконтейнера», обеспечивающего прохождение антигена через желудочно-кишечный тракт и индукцию протективного иммунного ответа.

Литература

- Азаев М.Ш., Лебедев Л.Р., Кузьмичева Г.А. и др. Исследование роли искусственных микобактериальных частиц в реализации иммунологических процессов при экспериментальном туберкулезе животных // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2007. Вып. 2. С. 38–42.
- Азаев М.Ш., Лебедев Л.Р., Туманов Ю.В. и др. Получение искусственных микобактериальных частиц и исследование их иммуногенных свойств // Биотехнология. 2004. Вып. 4. С. 34–40.
- Блум Б.Р., Файн П.Е.М. Опыт вакцинации БЦЖ: будущие вакцины против туберкулеза // Туберкулез. Патогенез, защита, контроль. Пер. с англ. / Под ред. Б.Р. Блума. М.: Медицина, 2002. 696 с.
- Матвеева Н.А., Василенко М.Ю., Шаховский А.М., Кучук Н.В. Агробактериальная трансформация салата (*Lactuca sativa* L.) конструкциями, несущими гены антибактериальных антигенов *Mycobacterium tuberculosis* // Цитология и генетика. 2009. Вып. 2. С. 27–32.
- Рукавцова Е.Б., Бурьянов Я.И., Шульга Н.Я., Быков В.А. Трансгенные растения для фармакологии // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2006. Вып. 2. С. 3–12.
- Щелкунова Г.А., Щелкунов С.Н. Съедобные вакцины на основе трансгенных растений // Молекуляр. медицина. 2008. Вып. 1. С. 3–12.
- Aagaard C., Hoang T., Dietrich J. *et al.* A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure // Nat. Med. 2011. V. 17. № 2. P. 189–194.
- Agger E., Andersen P. A novel TB vaccine; towards a strategy based on our understanding of BCG failure // Vaccine. 2002. V. 21. № 1/2. P. 7–14.
- Andersen P., Doherty T.M. TB subunit vaccines-putting the pieces together // Microbes. Infect. 2005. V. 7. P. 911–921.
- Badell E., Nicolle F., Clark S. *et al.* Protection against tuberculosis induced by oral prime with *Mycobacterium bovis* BCG and intranasal subunit boost based on the vaccine candidate Ag85B-ESAT-6 does not correlate with circulating IFN-gamma producing T-cells // Vaccine. 2009. V. 27. № 1. P. 28–37.

- Belisle J.T., Vissa V.D., Sievert T. *et al.* Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis // *Science*. 1997. V. 276. № 5317. P. 1420–1422.
- Ben Amor Y., Shashkina E., Johnson S. *et al.* Immunological characterization of novel secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis* // *Scand. J. Immunol.* 2005. V. 61. № 2. P. 139–146.
- Boehm R. Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007. № 1102. P. 121–134.
- Brennan M.J., Morris S.L., Sizemore C.F. Tuberculosis vaccine development: research, regulatory and clinical strategies // *Expert. Opin. Biol. Technol.* 2004. V. 4. № 9. P. 1493–1504.
- Brosch R., Gordon S.V., Garnier T. *et al.* Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 13. P. 5596–5601.
- Camus J.C., Pryor M., Medigue J.C., Cole S.T. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv // *Microbiology*. 2002. V. 148. P. 2967–2973.
- Christensen D., Agger E.M., Andreassen L.V. *et al.* Liposome-based cationic adjuvant formulations (CAF): past, present, and future // *J. Liposome Res.* 2009. V. 19. № 1. P. 2–11.
- Christensen D., Lindenstrom T., van de Wijdeven G. *et al.* Syringe free vaccination with CAF01 adjuvated Ag85B-ESAT-6 in bioneedles provides strong and prolonged protection against tuberculosis // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 11. e15043.
- Clark S.O., Kelly D.L., Badell E. *et al.* Oral delivery of BCG Moreu Rio de Janeiro gives equivalent protection against tuberculosis but with reduced pathology compared to parenteral BCG Danish vaccination // *Vaccine*. 2010. V. 28. № 43. P. 7109–7116.
- Collins H.L., Kaufmann S.H. Prospects for better tuberculosis vaccines // *Lancet Infect. Dis.* 2001. V. 1. P. 21–28.
- Daniel T.M., Janicki B.W. Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry and immunological properties // *Microbiol. Rev.* 1978. V. 42. P. 84–113.
- Davila J., Zhang L., Marrs C.F. *et al.* Assessment of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* *esxA*, *esxH*, and *fbpB* genes among clinical isolates and its implication for the future immunization by new tuberculosis subunit vaccines Ag85B-ESAT-6 and Ag85B-TB10.4 // *J. Biomed. Biotechnol.* 2010. V. 2010. P. 208–371.
- Dorokhov Y.L., Sheveleva A.A., Frolova O.Y. *et al.* Superexpression of tuberculosis antigens in plant leaves // *Tuberculosis*. 2007. V. 87. № 3. P. 218–224.
- Dover L.G., Alderwick L.J., Brown A.K. *et al.* Regulation of cell wall synthesis and growth // *Curr. Mol. Med.* 2007. V. 7. № 3. P. 247–276.
- Elamin A.A., Stehr M., Oehlmann W., Singh M. The mycolyltransferase 85A, a putative drug target of *Mycobacterium tuberculosis*: development of a novel assay and quantification of glycolipid-status of the mycobacterial cell wall // *J. Microbiol. Methods*. 2009. V. 79. № 3. P. 358–363.
- Floss D.M., Mockey M., Zanello G. *et al.* Expression and immunogenicity of the mycobacterial Ag85B/ESAT-6 antigens produced in transgenic plants by elastin-like peptide fusion strategy // *J. Biomed. Biotechnol.* 2010. V. 2010. P. 274–346.
- Frutos R., Denise H., Vivares C. *et al.* Pharmaceutical proteins in plants. A strategic genetic engineering approach for the production of tuberculosis antigens // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008. V. 1149. P. 275–280.
- Gao H., Li K., Yu S., Xiong S. A novel DNA vaccine containing multiple TB-specific epitopes cast in a natural structure elicits enhanced Th1 immunity compared with BCG // *Microbiol. Immunol.* 2009. V. 53. № 10. P. 541–549.
- Goode R., Parish T. The genetics of cell wall biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* // *Future Microbiol.* 2008. V. 3. № 3. P. 299–313.
- Haile M., Kallenius G. Recent developments in tuberculosis vaccines // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2005. V. 18. № 3. P. 211–215.
- Hall L.J., Clare S., Dougan G. Probing local innate immune responses after mucosal immunization // *J. Immune Based. Ther. Vaccines*. 2010. V. 8. P. 5.
- Hall L.J., Clare S., Pickard D. *et al.* Characterisation of a live *Salmonella* vaccine stably expressing the *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B-ESAT6 fusion protein // *Vaccine*. 2009. V. 27. № 49. P. 6894–6904.
- Hanekom W.A., Dockrell H.M., Ottenhoff T.H. *et al.* Immunological outcomes of new tuberculosis vaccine trials: WHO panel recommendations // *PLoS Med.* 2008. V. 5. № 7. e145. doi:10.1371/journal.pmed.0050145.
- Hanson M.S., Lapcevich C.V., Haun S.L. Progress on development of the live BCG recombinant vaccine vehicle for combined vaccine delivery // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1995. V. 754. P. 214–221.
- Hefferon K. Biopharmaceuticals in plants: toward the next century of medicine // *CRC Press Taylor and Francis Group 6000 Broken Sound Parkway: N.W.* 2010. 197 p.
- He X.Y., Li J., Hao J. *et al.* Assessment of five antigens from *Mycobacterium tuberculosis* for serodiagnosis of tuberculosis // *Clin. Vaccine Immunol.* 2011.
- Henriksen-Lacey M., Bramwell V.W., Christensen D. *et al.* Liposomes based on dimethyldioctadecylammonium promote a depot effect and enhance immunogenic-

- ity of soluble antigen // *J. Control. Release*. 2010. V. 142. № 2. P. 180–186.
- Henriksen-Lacey M., Christensen D., Bramwell V.W. *et al.* Comparison of the depot effect and immunogenicity of liposomes based on dimethyldioctadecylammonium (DDA), 3beta-[N-(N',N'-Dimethylaminoethane) carbonyl] cholesterol (DC-Chol), and 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium propane (DOTAP): prolonged liposome retention mediates stronger Th1 responses // *Mol. Pharm.* 2011. V. 8. № 1. P. 153–161.
- Hesseling A.C., Schaaf H.S., Victor T. *et al.* Resistant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin disease: implications for management of Bacillus Calmette-Guerin Disease in human immunodeficiency virus-infected children // *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2004. V. 23. № 5. P. 476–479.
- Huard R.C., Chitale S., Leung M. *et al.* The *Mycobacterium tuberculosis* complex-restricted gene *cfp32* encodes an expressed protein that is detectable in tuberculosis patients and is positively correlated with pulmonary interleukin-10 // *Infect. Immun.* 2003. V. 71. № 12. P. 6871–6883.
- Hussain T., Sinha S., Talan S. *et al.* Seroprevalence of HIV infection among paediatric tuberculosis patients in Agra, India: A hospital- based study // *Tuberculosis*. 2007. V. 87. № 1. P. 7–11.
- Jacobs W.R., Jr., Tuckman M., Bloom B.R. Introduction of foreign DNA into mycobacteria using a shuttle plasmid // *Nature*. 1987. V. 327. P. 532–535.
- Jungblut P.R., Schaible U.E., Mollenkopf H. *et al.* Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens // *Mol. Microbiol.* 1999. V. 33. P. 1103–1117.
- Kallenius G., Pawlowski A., Brandtzaeg P., Svenson S. Should a new tuberculosis vaccine be administered intranasally? // *Tuberculosis*. 2007. V. 87. № 4. P. 257–266.
- Kamath A.T., Rochat A.F., Christensen D. *et al.* A liposome-based mycobacterial vaccine induces potent adult and neonatal multifunctional T cells through the exquisite targeting of dendritic cells // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 6. e5771.
- Klein D.L. From pertussis to tuberculosis: what can be learned? // *Clin. Infect. Dis.* 2000. Suppl. 3: S302–S308.
- Kumar H., Malhotra D., Goswami S., Bamezai R.N. How far have we reached in tuberculosis vaccine development? // *Crit. Rev. Microbiol.* 2003. V. 29. № 4. P. 297–312.
- Laal S.Y., Skeiky A.W. Immune-based methods // *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus* / Eds S.T. Cole *et al.* 2005. P. 71–83.
- Langermans J.A., Doherty T.M., Vervenne R.A. *et al.* Protection of macaques against *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6 // *Vaccine*. 2005. V. 23. № 21. P. 2740–2750.
- Luo Y., Wang B., Hu L. *et al.* Fusion protein Ag85B-MPT64(190-198)-Mtb8.4 has higher immunogenicity than Ag85B with capacity to boost BCG-primed immunity against *Mycobacterium tuberculosis* in mice // *Vaccine*. 2009. V. 27. № 44. P. 6179–6185.
- Ma J.K.-C., Barros E., Bock, R. *et al.* Molecular farming for new drugs and vaccines // *EMBO Rep.* 2005. V. 6. № 7. P. 593–599.
- Maes H.H., Causse J.E., Maes R.F. Mycobacterial infections: are the observed enigmas and paradoxes explained by immunosuppression and immunodeficiency? // *Med. Hypotheses*. 1996. V. 46. P. 163–171.
- Martin C. The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG? // *Eur. Respir. J.* 2005. V. 26. № 1. P. 162–167.
- Mason H.S., Warzecha H., Arntzen C.J. Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine // *Trends Mol. Med.* 2002. V. 8. № 7. P. 324–329.
- McMurry J., Sbai H., Gennaro M.L. *et al.* Analyzing *Mycobacterium tuberculosis* proteomes for candidate vaccine epitopes // *Tuberculosis*. 2005. V. 85. № 1/2. P. 95–105.
- McShane H., Pathan A.A., Sander C.R. *et al.* Boosting BCG with MVA85A: the first candidate subunit vaccine for tuberculosis in clinical trials // *Tuberculosis*. 2005. V. 85. № 1-2. P. 47–52.
- Menkhaus T.J., Bai Y., Zhang C. *et al.* Considerations for the recovery of recombinant proteins from plants // *Biotechnol. Prog.* 2004. V. 20. № 4. P. 1001–1014.
- Mitsuyama M., Akagawa K., Kobayashi K. *et al.* Up-to-date understanding of tuberculosis immunity // *Kekkaku*. 2003. V. 78. № 1. P. 51–55.
- Mollenkopf H., Dietrich G., Kaufmann S.H. Intracellular bacteria as targets and carriers for vaccination // *Biol. Chem.* 2001. V. 382. № 4. P. 521–532.
- Mustafa A.S. Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis // *Mol. Immunol.* 2002. V. 39. № 1/2. P. 113–119.
- Mustafa A.S. Recombinant and synthetic peptides to identify *Mycobacterium tuberculosis* antigens and epitopes of diagnostic and vaccine relevance // *Tuberculosis*. 2005. V. 85. № 5/6. P. 367–376.
- Mustafa A.S., Cockle P.J., Shaban F. *et al.* Immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* RD1 region gene products in infected cattle // *Clin. Experim. Immunol.* 2002. V. 130. № 1. P. 37–42.
- Mustafa A.S., Shaban F.A. ProPred analysis and experimental evaluation of promiscuous T-cell epitopes of three major secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis* // *Tuberculosis*. 2006. V. 86. № 2. P. 115–124.

- Nagelkerke N.J.D., De Vlas S.J., Mahendradhata Y. *et al.* The search for a tuberculosis vaccine: An elusive quest? // *Tuberculosis*. 2006. V. 86. № 1. P. 41–46.
- Nor N.M., Musa M. Approaches towards the development of a vaccine against tuberculosis: recombinant BCG and DNA vaccine // *Tuberculosis*. 2004. V. 84. № 1/2. P. 102–109.
- Okada M., Shirakawa T. Frontier of mycobacterium research—host vs. mycobacterium // *Kekkaku*. 2005. V. 80. № 9. P. 613–629.
- Okkels L.M., Brock I., Follmann F. *et al.* PPE protein (Rv3873) from DNA segment RD1 of *Mycobacterium tuberculosis*: strong recognition of both specific T-Cell epitopes and epitopes conserved within the PPE family // *Infection and Immunity*. 2003. V. 71. № 11. P. 6116–6123.
- Olsen A.W., Williams A., Okkels L.M. *et al.* Protective effect of a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion of antigen 85B and ESAT-6 in the aerosol guinea pig model // *Infection and Immunity*. 2004. V. 72. № 10. P. 6148–6150.
- Orme I.M. Prospects for new vaccines against tuberculosis // *Trends Microbiol.* 1995. V. 3. P. 401–404.
- Orme I.M. Beyond BCG: the potential for a more effective TB vaccine // *Mol. Med. Today*. 1999. V. 5. P. 487–492.
- Orme I.M. The search for new vaccines against tuberculosis // *J. Leukoc. Biol.* 2001. V. 70. № 1. P. 1–10.
- Orme I.M. Current progress in tuberculosis vaccine development // *Vaccine*. 2005. V. 23. № 17/18. P. 2105–2108.
- Orme I.M., McMurray D.N., Belisle J.T. Tuberculosis vaccine development: recent progress // *Trends Microbiol.* 2001. V. 9. № 3. P. 115–118.
- Ormerod L.P., Shaw R.J., Mitchell D.M. Tuberculosis in the UK, 1994: current issues and future trends // *Thorax*. 1994. V. 49. № 1. P. 1085–1089.
- Perera P.Y., Derrick S.C., Kolibab K. *et al.* A multivalent vaccinia virus-based tuberculosis vaccine molecularly adjuvanted with interleukin-15 induces robust immune responses in mice // *Vaccine*. 2009. V. 27. № 15. P. 2121–2127.
- Reed S.G., Alderson M.R., Dalemans W. *et al.* Prospects for a better vaccine against tuberculosis // *Tuberculosis*. 2003. V. 83. № 1/3. P. 213–219.
- Reljic R., Williams A., Ivanyi J. Mucosal immunotherapy of tuberculosis: Is there a value in passive IgA? // *Tuberculosis*. 2006. V. 86. № 3/4. P. 179–190.
- Rigano M.M., Alvarez M.L., Pinkhasov J. *et al.* Production of a fusion protein consisting of the enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit and a tuberculosis antigen in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Rep.* 2004. V. 22. P. 502–508.
- Rigano M.M., Dreitz S., Kipnis A.P. *et al.* Oral immunogenicity of a plant-made, subunit, tuberculosis vaccine // *Vaccine*. 2006. V. 24. № 5. P. 691–695.
- Ronning D.R., Klabunde T., Besra G.S. *et al.* Crystal structure of the secreted form of antigen 85C reveals potential targets for mycobacterial drugs and vaccines // *Nat. Struct. Biol.* 2000. V. 7. № 2. P. 141–146.
- Rowland S.S., Mayner R.L., Barker L. Advancing TB vaccines to Phase I clinical trials in the US: Regulatory/manufacturing/licensing issues // *Tuberculosis*. 2005. V. 85. № 1/2. P. 39–46.
- Rybicki E.P. Plant-produced vaccines: promise and reality // *Drug. Discovery Today*. 2008. V. 13. P. 894–901.
- Sada E., Ferguson L.E., Daniel T.M. An ELISA for the serodiagnosis of tuberculosis using a 30,000-Da native antigen of *Mycobacterium tuberculosis* // *Infect. Dis.* 1990. V. 162. P. 928–931.
- Salyaev R.K., Rigano M.M., Rekoslavskaya N.I. Development of plant-based mucosal vaccines against widespread infectious diseases // *Expert. Rev. Vaccines*. 2010. V. 9. № 8. P. 937–946.
- Schelkunov S.N., Salyaev R.K., Pozdnyakov S.G. *et al.* Immunogenicity of a novel, bivalent, plantbased oral vaccine against hepatitis B and human immunodeficiency viruses // *Biotechnol. Lett.* 2006. V. 28. № 13. P. 959–967.
- Sharma A.K., Khuller G.K. Recombinant mycobacterial proteins future directions to improve protective efficacy // *Indian. J. Exp. Biol.* 2001. V. 39. № 12. P. 1214–1219.
- Shen H., Wang C., Yang E. *et al.* Novel recombinant BCG coexpressing Ag85B, ESAT-6 and mouse TNF-alpha induces significantly enhanced cellular immune and antibody responses in C57BL/6 mice // *Microbiol. Immunol.* 2010. V. 54. № 8. P. 435–441.
- Shi C., Chen L., Chen Z. *et al.* Enhanced protection against tuberculosis by vaccination with recombinant BCG over-expressing HspX protein // *Vaccine*. 2010a. V. 28. № 32. P. 5237–5244.
- Shi S., Yu L., Sun D. *et al.* Rational design of multiple TB antigens TB10.4 and TB10.4-Ag85B as subunit vaccine candidates against *Mycobacterium tuberculosis* // *Pharm. Res.* 2010b. V. 27. № 2. P. 224–234.
- Sierra V.G. Is a new tuberculosis vaccine necessary and feasible? A Cuban opinion // *Tuberculosis*. 2006. V. 86. № 3/4. P. 169–178.
- Skeiky Y.A., Lodes M.J., Guderian J.A. *et al.* Cloning, expression, and immunological evaluation of two putative secreted serine protease antigens of *Mycobacterium tuberculosis* // *Infect. Immun.* 1999. V. 67. № 8. P. 3998–4007.
- Skeiky Y.A.W., Alderson M.R., Mark R. *et al.* Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein // *J. Immunol.* 2004. V. 172. P. 7618–7628.

- Skjot R.L.V., Oettinger T., Rosenkrands I. *et al.* Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-Cell antigens // *Infection and Immunity*. 2000. V. 68. № 1. P. 214–220.
- Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence // *Clin. Microbiol. Rev.* 2003. V. 16. № 3. P. 463–496.
- Sourrouille C., Marshall B., Lienard D., Faye L. From neanderthal to nanobiotech: from plant potions to pharming with plant factories // *Methods in Molecular Biology: Recombinant Proteins From Plants* / Ed. Faye L. Gomord V. Humana Press (a part of Springer Science+Business Media). 2009. P. 1–23.
- Surekha R.H., Vijaya Lakshmi V., Sumanlatha G., Murthy K.J.R. Cell-mediated immune responses in children towards secreted proteins of *Mycobacterium bovis* BCG // *Tuberculosis*. 2005. V. 85. № 1/2. P. 89–93.
- Tecson Mendoza E.M., Laurena A.C., Botella J.R. Recent advances in the development of transgenic papaya technology // *Biotechnol. Annu. Rev.* 2008. V. 14. P. 423–462.
- van Dissel J.T., Arend S.M., Prins C. *et al.* Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31 promotes strong and long-lived *Mycobacterium tuberculosis* specific T cell responses in naive human volunteers // *Vaccine*. 2010. V. 28. № 20. P. 3571–3581.
- van Dissel J.T., Soonowala D., Joosten S.A. *et al.* Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31((R)) promotes strong and long-lived *Mycobacterium tuberculosis* specific T cell responses in volunteers with previous BCG vaccination or tuberculosis infection // *Vaccine*. 2011.
- Vogel F.R. Improving vaccine performance with adjuvants // *Clin. Infect Dis.* 2000. V. 30. Suppl. 3. P. S266–S270.
- Wang Q.L., Pan Q., Ma Y. *et al.* An attenuated Salmonella-vectored vaccine elicits protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* // *Vaccine*. 2009. V. 27. № 48. P. 6712–6722.
- Wiker H.G., Harboe M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis* // *Microbiol. Rev.* 1992. V. 56. № 4. P. 648–661.
- Williams A., Hatch G.J., Clark S.O. *et al.* Evaluation of vaccines in the EU TB Vaccine Cluster using a guinea pig aerosol infection model of tuberculosis // *Tuberculosis*. 2005. V. 85. № 1/2. P. 29–38.
- Xing Z. The hunt for new tuberculosis vaccines: anti-TB immunity and rational design of vaccines // *Curr. Pharm. Des.* 2001. V. 7. № 11. P. 1015–1037.
- Xing Z., Lichty B.D. Use of recombinant virus-vectored tuberculosis vaccines for respiratory mucosal immunization // *Tuberculosis*. 2006. V. 86. № 3/4. P. 211–217.
- Xu Y., Liu W., Shen H. *et al.* Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the chimeric protein of antigen 85B and ESAT-6 enhances the Th1 cell-mediated response // *Clin. Vaccine Immunol.* 2009. V. 16. № 8. P. 1121–1126.
- Xu Y., Liu W., Shen H. *et al.* Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing chimaeric protein of Ag85B and ESAT-6 enhances immunostimulatory activity of human macrophages // *Microbes Infect.* 2010. V. 12. № 8/9. P. 683–689.
- Young D.B. Current tuberculosis vaccine development // *Clin. Infect. Dis.* 2000. V. 30. Suppl. 3. S254–S256.
- Young D.B., Stewart G.R. Tuberculosis vaccines // *Br. Med. Bull.* 2002. V. 62. P. 73–86.
- Yusibov V., Rabindran S. Recent progress in the development of plant-derived vaccines // *Expert Rev. Vaccines*. 2008. V. 7. P. 1173–1183.
- Zelada A.M., Calamante G., de la Paz Santangelo M. *et al.* Expression of tuberculosis antigen ESAT-6 in *Nicotiana tabacum* using a potato virus X-based vector // *Tuberculosis*. 2006. V. 86. № 3/4. P. 263–267.
- Zhou H., Chen X., Ji Y. *et al.* Construction of recombinant adenovirus expressing Ag85B of *Mycobacterium bovis* and its cellular immunoproperties in mice // *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 2010. V. 50. № 6. P. 811–816.

PROSPECTS FOR DESIGNING A NEW GENERATION OF ANTI-TUBERCULOSIS VACCINES

S.I. Tat'kov¹, E.V. Deineko¹, D.P. Furman^{1,2}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

Recent progress in designing new vaccines against tuberculosis is concisely reviewed. Data on administration of various secreted *M. tuberculosis* antigens as components of subunit vaccines are considered. The need in constructing artificial antigens comprising several *M. tuberculosis* antigens (epitopes) is illustrated by particular examples. The prospect of developing an «edible» vaccine against tuberculosis involving transgenic plants is discussed.

Key words: tuberculosis, vaccine, antigen, subunit vaccine, transgenic plant, epitope, edible vaccine.

Лучший доклад на Школе молодых ученых
«Биоинформатика и системная биология – 2010»
ИЦиГ СО РАН, Новосибирск

КОНСТИТУТИВНАЯ И ВАРИАБЕЛЬНАЯ КОМПОНЕНТЫ ПРОФИЛЕЙ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ ПЕЧЕНИ СВИНЕЙ

Н.С. Хлопова, Т.Т. Глазко, В.И. Глазко

Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева,
Москва, Россия, email: vglazko@yahoo.com

Выполнен сравнительный анализ профилей генной экспрессии в печени и почках свиней, выделены группы конститутивно и вариабельно экспрессирующихся генов у исследованных животных. Обнаружено, что гены, уровень экспрессии которых варьирует от животного к животному (вариабельная часть профилей генной экспрессии), подразделяются на группы, внутри которых наблюдаются статистически достоверные корреляции по уровню экспрессии у разных животных. Обсуждается зависимость экспрессии таких групп генов от участия в метаболических путях, экзо- и эндогенных регуляторных факторов, а также вклад вариабельной части профилей генной экспрессии в отличия между результатами исследований разных лабораторий, выполненных на одних и тех же объектах.

Ключевые слова: экспрессия генов, индивидуальная изменчивость, перекрестная гибридизация, ДНК микрочипы.

Введение

За последнее десятилетие ДНК микрочипы (DNA microarrays) получили широкое применение в современной фундаментальной и прикладной медико-биологической науке. Использование геномных технологий позволило получить ряд уникальных данных о генах и генных взаимодействиях, работа которых связана с органоспецифичными функциями и их патологией у млекопитающих. Однако анализ данных, получаемых в результате исследований профилей генной экспрессии (ПГЭ) с применением ДНК микрочипов, часто затруднен в связи с наличием ряда источников ошибок, уменьшающих надежность использования данного метода. К таким источникам относятся, в частности, возможность перекрестной гибридизации между разными пробами (фрагментами ДНК на микрочипах) и ДНК копиями одних и тех же транскриптов (Okoniewski, Miller, 2006; Glazko *et al.*, 2009; Глазко и др., 2010),

технические и статистические погрешности обработки данных (Nguyen *et al.*, 2010). Другой проблемой получения неоднозначных данных по органоспецифичным ПГЭ является их индивидуальная изменчивость у исследуемых групп животных, связанная с действием экзо- и эндогенных регуляторных факторов, усиливающих или подавляющих экспрессию отдельных генов (Bai *et al.*, 2003; da Costa *et al.*, 2004; Cheon *et al.*, 2005; Rijk *et al.*, 2010).

Для того чтобы оценить вклад в оценки органоспецифичных ПГЭ тех генов, по которым обнаруживаются выраженные индивидуальные отличия, в настоящей работе выполнен сравнительный анализ ПГЭ в печени и почках свиней, проведен анализ генов с индивидуальной изменчивостью в экспрессии у разных животных. При сравнении органоспецифичного ПГЭ печени свиней (Zhao *et al.*, 2005) с полученным в нашем исследовании обсуждаются возможные причины частичных несовпадений органоспецифичных ПГЭ, выявляемых в разных лабораториях.

Материалы и методы

Исследования выполнялись на 5 свиньях одинакового возраста (6 месяцев) и пола (самки) породы ландрас, содержащихся в условиях экспериментального хозяйства Университета штата Миннесота, США. ДНК-микрочипы для последовательностей EST генома свиньи, используемые для получения экспериментальных данных, были разработаны проф. Гарби с коллегами (Garbe *et al.*, 2010). Работа по получению первичных данных по профилям генной экспрессии на этих микрочипах выполнялась Н.С. Хлоповой в лаборатории биотехнологии под руководством проф. Фаренкруга. Суммарную РНК выделяли из печени и почек, для каждого образца отдельно получали кДНК методом ОТ-ПЦР. Чистота, качество и концентрация суммарной РНК оценивались в каждом эксперименте, в частности по отсутствию «размытых» зон частичной дегградации 28S рРНК и 18S рРНК при электрофоретическом разделении суммарной РНК в 1 %-м агарозном геле. Для получения кДНК зрелых матричных РНК методом ОТ-ПЦР использовали 1–5 мкг суммарной РНК каждого образца. К суммарной РНК (1–10 мкл) добавляли праймеры (1 мкл при концентрации 1 пмоль/мкл) с полиТ повтором и «фиксирующей» нуклеотидной последовательности, к которому при втором цикле гибридизации на ДНК-микрочипе будет гибридизоваться нуклеотидная последовательность на 5'-фланге, несущая около 375 молекул флуорохромного красителя Су3 или Су5.

Для каждого ДНК микрочипа готовилась гибридизационная смесь, состоящая из видоспецифичного Cot-1 DNA (для подавления неспецифического связывания), LNA dT блокатор поли А (2 мкл) и кДНК двух образцов, несущих фиксирующие последовательности для флуорохромов Су3 и Су5 (22,5 мкл). Гибридизационную смесь (50 мкл) накладывали на предварительно подогретый ДНК-микрочип, накрытый покровным стеклом, где она равномерно распределялась по микрочипу. Гибридизация осуществлялась в течение ночи при температуре 52 °С.

Флуоресцирующий 3DNA реагент (3DNA Array 350 Capture Reagent) содержит фиксирующие нуклеотидные последовательности, на

5'-конце которых присутствуют флуорохромы Су3 и Су5. Для гибридизации использовали 48 мкл 3DNA гибридизационной смеси. Гибридизация проводилась в течение 3–4 ч в темной влажной камере при температуре 55 °С. Далее посредством определения отношения Су3/Су5, осуществляемого путем сканирования ДНК-микрочипа, были получены числовые данные, характеризующиеся сигналом интенсивности гибридизации (с.и.) для каждого «пятна». Сканирование ДНК микрочипов с последующим сохранением изображения выполнялось на сканере ScanArray 5000 (Packard BioChip Technologies, Packard BioScience Company) с применением пакета программ ScanArray Express (PerkinElmer, USA). Нормализация данных проводилась с использованием программы BlueFuse для ДНК микрочипов (BlueGnome, Cambridge, UK). Последующая обработка экспериментальных данных, деление генов на группы по величинам с.и. выполнялись с использованием специально созданных макросов на базе Excel. Принадлежность генов к различным метаболическим путям оценивалась с использованием баз данных NCBI. Корреляционный анализ проведен с расчетом коэффициентов корреляции Пирсона (пакет STATISTICA 7, StatSoft, США).

Результаты и обсуждение

В результате проведенного анализа ПГЭ 600 генов, у которых сигнал интенсивности гибридизации с пробами ДНК микрочипов отличался более чем на 20 тыс. с.и. в печени и почках, выделена группа генов, экспрессия которых конститутивна, и группа из 24 генов, экспрессия которых варьировала от одного животного к другому. Среди них выделились 11 генов, по которым уровень экспрессии у исследованных животных коррелировал между печенью и почками ($r > 0,96$; $p < 0,05$). Это позволяет предположить, что экспрессия этих генов находится под влиянием общих для обоих органов регуляторных факторов. Оказалось также, что 24 гена, экспрессия которых варьировала от животного к животному, разбиваются на группы, внутри которых обнаруживаются статистически достоверные корреляции между уровнем экспрессии для разных животных ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$). В большинстве случаев

гены, между экспрессией которых обнаруживались такие корреляции, принадлежали к общему метаболическому пути. Суммарно выделились 8 таких групп: 6 генов, продукты которых участвуют в формировании кровяного сгустка (*FGB*, *FGG*, *VTN*, *F2*, *PAI2*, *PLG*)¹; 6 генов – в транспорте и метаболизме липидов (*ApoC3*, *Apo-E*, *ApoA-I*, *AGP2*, *PRBP*, *FHR2*); 5 генов представляют маркеры клеток крови и лизосом (*TMEM8*, *PAI2*, *ST7*, *AGAP1*, *NAGA*); продукты 3 генов участвуют в апоптозе клеток (*CLU*, *TNFRSF19*, *PLG*) и регулируются гормонами (*FGB*, *ALR*, *VTN*). Три группы, включающие в себя по 2 гена, относились к транспортной системе Ca^{2+} (*Grin2b*, *KLHL1*), кодировали белки межклеточного матрикса (*HAPLN2*, *AHSG*), отражали функциональную активность митохондрий (*ALR*, *TrpRS*). Пять генов из вышеперечисленных вошли одновременно в разные группы, как, например, ген фибриногена бета (*FGB*) и витронектина (*VTN*), поскольку их экспрессия гормон-зависима и кодируемые ими белки участвуют в формировании кровяного сгустка. Гены плазминогена (*PLG*) и ингибитора активатора плазминогена 2 (*PAI2*) входят в группы генов, продукты которых участвуют в формировании кровяного сгустка, в регуляции апоптоза (*PLG*), а также относятся к маркерам клеток крови и лизосом (*PAI2*). Ген, экспрессия которого ассоциирована с регенерацией печени (*ALR*), входил в группы гормон-зависимых генов и генов, отражающих функциональную активность митохондрий.

При сравнительном анализе органоспецифического ПГЭ печени свиней, выявленного в наших исследованиях и описанного в работе проф. Зао (*Zhao et al.*, 2005), получены следующие данные. Из 135 генов, отнесенных в работе проф. Зао к органоспецифическому ПГЭ печени, к 14 генам авторы использовали на ДНК-микрочипах две разные пробы, 19 генов не имели белково-функциональной аннотации либо не были представлены на наших ДНК микрочипах. Эти 33 транскрипта нами в анализ не включались. Из выборки оставшихся 102 генов далее были исключены 25 генов, транскрипты которых в наших исследованиях гибридизовались с двумя и более пробами.

¹ Биохимические функции генов, упомянутых в тексте, указаны по данным NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Далее при анализе оставшихся 77 транскриптов, отнесенных в работе проф. Зао с коллегами к тканеспецифическим для печени, была исключена из нашего анализа группа из 26 генов, экспрессия которых хотя бы у одного из исследованных нами животных не превышала порог в 400 с.и., соответствующий среднему значению интенсивности свечения пустых ячеек ДНК микрочипа. То есть по результатам наших исследований транскрипция этих генов не может рассматриваться как органоспецифичная для печени. В результате была сформирована выборка для анализа, состоявшая из 51 гена.

При анализе интенсивности гибридизации проб ДНК микрочипов к кДНК транскриптам этих генов в наших исследованиях было выделено 2 группы. Первая группа включала 26 генов с относительно небольшими отличиями в с.и. между животными (менее чем в 3,5 раза), которых мы отнесли к группе генов с конститутивной экспрессией. Во вторую группу входило 25 генов с выраженными (более чем 3,5-кратными) индивидуальными отличиями по уровню экспрессии. Так же, как и при выполненном нами анализе варибельной части ПГЭ печени и почек у свиней, результаты которого описаны выше, эти 25 генов разбивались на 8 групп, внутри которых наблюдались статистически достоверные корреляции между уровнем экспрессии у разных животных (табл. 1).

В группу из 5 генов входили те, продукты которых участвуют в формировании и расщеплении кровяного сгустка – *VTN*, *PLG*, *FGG*, *ATIII*, *TAFI* (табл. 1.1).

Вторая группа из 8 генов включала в себя кодирующие белки-транспортёры. В нее входили *SHAP*, *TF*, *AGP2*, *MFE-2*, *HSD17B6*, *PRBP*, *SYND2*, *IGFBP-2*. Уровень экспрессии этих генов у разных животных в печени, по нашим данным, коррелировал с $r > 0,95$; $p < 0,05$ % (табл. 1.2).

Третья группа объединяла 6 генов, транскрипция которых субстрат-зависима: *HSD17B6*, *PRBP*, *MFE-2*, *SCAMOL*, *SCEH* и *CAT*. Уровень экспрессии генов этой группы в печени у разных животных коррелировал с $r > 0,97$, $p < 0,05$ % (табл. 1.3).

Четыре группы, объединенные на основании корреляций в изменчивости экспрессии между индивидуальными животными, включали по

Таблица 1

Деление генов варибельной части на функциональные группы и результат расчета статистически достоверных коэффициентов корреляции между уровнем экспрессии генов для разных животных внутри каждой группы

1.1. Группа генов, продукты которых участвуют в формировании и лизисе кровяного сгустка ($p < 0,05$ %)	<i>VTN</i>	<i>PLG</i>	<i>FGG</i>	<i>ATIII</i>	<i>TAFI</i>
Предшественник витронектина (<i>VTN</i>)	1,00	0,98	0,99	0,99	0,99
Предшественник плазминогена (<i>PLG</i>)	0,98	1,00	0,99	1,00	0,99
Предшественник γ -цепи фибриногена (<i>FGG</i>)	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00
Предшественник антитромбина III (<i>ATIII</i>)	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99
Предшественник карбоксипептидазы B (<i>TAFI</i>)	0,99	0,99	1,00	0,99	1,00

1.2. Группа генов-транспортеров ($p < 0,05$ %)	<i>SHAP</i>	<i>TF</i>	<i>AGP2</i>	<i>MFE-2</i>	<i>HSD17B6</i>	<i>PRBP</i>	<i>HSPG</i>	<i>IGFBP-2</i>
Предшественник сывроточного гиалурон-ассоциированного белка (<i>SHAP</i>)	1,00	–	–	1,00	0,96	–	0,96	1,00
Предшественник трансферрина (<i>TF</i>)	–	1,00	0,96	–	1,00	0,99	1,00	0,97
Предшественник α -1-кислого гликопротеина 2 (<i>AGP2</i>)	–	0,96	1,00	–	0,96	–	–	–
Пероксисомный мультифункциональный фермент типа 2 (<i>MFE-2</i>)	1,00	–	–	1,00	–	–	0,95	0,99
3-гидроксистероид эпимераза (<i>HSD17B6</i>)	0,96	1,00	0,96	–	1,00	0,98	1,00	0,98
Предшественник плазменного ретинол-связывающего белка (<i>PRBP</i>)	–	0,99	–	–	0,98	1,00	0,99	0,97
Предшественник синдекана 2 (<i>HSPG</i>)	0,96	1,00	–	0,95	1,00	0,99	1,00	0,98
Предшественник связывающего инсулиноподобного фактора роста (ИФР) 2-го типа (<i>IGFBP-2</i>)	1,00	0,97	–	0,99	0,98	0,97	0,98	1,00

1.3. Группа субстрат-зависимых генов ($p < 0,05$ %)	<i>HSD17B6</i>	<i>PRBP</i>	<i>MFE-2</i>	<i>SC4MOL</i>	<i>SCEH</i>	<i>CAT</i>
3-гидроксистероид эпимераза (<i>HSD17B6</i>)	1,00	0,98	–	0,97	0,99	0,98
Предшественник плазменного ретинол-связывающего белка (<i>PRBP</i>)	0,98	1,00	–	–	0,99	–
Пероксисомный мультифункциональный фермент типа 2 (<i>MFE-2</i>)	–	–	1,00	0,99	0,98	0,98
C-4 метилстерол оксидаза (<i>SC4MOL</i>)	0,97	–	0,99	1,00	0,99	1,00
Митохондриальный предшественник еноил-КоА-гидратазы (<i>SCEH</i>)	0,99	0,99	0,98	0,99	1,00	0,99
Каталаза (<i>CAT</i>)	0,98	–	0,98	1,00	0,99	1,00

1.4. Группа генов, участвующих в апоптозе, регуляции клеточного деления ($p < 0,05$ %)	<i>IGFBP-2</i>	<i>PLG</i>	<i>CAT</i>
Предшественник связывающего инсулиноподобного фактора роста (ИФР) 2-го типа (<i>IGFBP-2</i>)	1,00	0,99	0,99
Предшественник плазминогена (<i>PLG</i>)	0,99	1,00	0,98
Каталаза (<i>CAT</i>)	0,99	0,98	1,00

Окончание таблицы 1

1.5. Группа генов, связанных с функцией митохондрий ($p < 0,05$ %)	<i>PCB</i>	<i>SCEH</i>	<i>AT</i>
Пируват карбоксилаза (<i>PCB</i>)	1,00	0,99	0,96
Митохондриальный предшественник ацил-КоА-гидратазы (<i>SCEH</i>)	0,99	1,00	0,97
Глицин-амидинотрансфераза (<i>AT</i>)	0,96	0,97	1,00
1.6. Группа генов, ассоциированных с функцией иммунной системы ($p < 0,05$ %)	<i>AGP 2</i>	<i>C1R</i>	<i>TF</i>
Предшественник альфа-1-кислого гликопротеина 2 (<i>AGP 2</i>)	1,00	–	0,96
Компонент C1г системы комплемента (<i>C1R</i>)	–	1,00	–
Трансферрин (<i>TF</i>)	0,96	–	1,00
1.7. Группа генов-предшественников цикла Кребса ($p < 0,05$ %)	<i>FAH</i>	<i>4HPPD</i>	<i>PCB</i>
Фумарилацетоацетат-гидролаза (FAH)	1,00	0,98	1,00
4-диоксифенилпируватдиоксигеназа (4HPPD)	0,98	1,00	0,99
Пируваткарбоксилаза (PCB)	1,00	0,99	1,00
1.8. Группа генов, участвующих в детоксикации алкоголя	<i>CLDN1</i>	<i>ZADH2</i>	
Клаудин 1 (<i>CLDN1</i>)	1,00	–0,99	
Цинк-связывающая алкоголь дегидрогеназа, содержащая домен с белком 1 (<i>ZADH2</i>)	–0,99	1,00	

3 гена, связанных с функцией митохондрий, участвующих в контроле клеточного деления и апоптоза, а также с некоторыми функциями иммунной системы (табл. 1.4–1.7). Уровень экспрессии по всем генам внутри каждой из этих групп коррелировал от одного животного к другому с коэффициентом корреляции более 0,98 для четвертой и третьей групп (табл. 1.4, 1.5) и более 0,96 для остальных (табл. 1.6, 1.7) при $p < 0,05$ %.

В 8-ю группу входили два гена, уровень экспрессии которых у индивидуальных животных отрицательно коррелировал с высоким статистически достоверным коэффициентом корреляции $r = -0,99$ при $p < 0,05$ % (табл. 1.8). Это были ген алкогольдегидрогеназы *ZADH1* – главный фермент детоксикации алкоголя, и клаудин – *CLDN1*, продукт которого участвует в формировании плотных межклеточных контактов между эпителиальными клетками. По-видимому, выявленная отрицательная корреляция между экспрессией этих двух генов может быть обусловлена тем, что повышенная активность алкогольдегидрогеназы ассоциирована с пониженной плотностью межклеточных контактов,

определяемых активностью клаудина, в ответ на активацию процессов детоксикации алкоголя.

Ген, катализирующий деградацию РНК, рибонуклеаза *UK114*, не вошел ни в одну группу.

Большая часть генов в представленных группах выполняют специализированные печеночные функции: участие в регуляции липидного обмена, синтез многих транспортных белков, белков формирования сгустка крови, ферментов детоксикации, энергетического метаболизма. Функция многих из этих генов тесно связана с митохондриями, что может быть обусловлено органоспецифическими особенностями митохондрия печени: до 2 тыс. митохондрий на один гепатоцит (David, 1979).

В результате анализа 25 генов, отнесенных к работе проф. Зао с сотр. к тканеспецифичным для печени и представленных на ДНК микрочипах в наших исследованиях двумя и более пробами, было выделено 3 гена, у которых интенсивность гибридизации разных участков была относительно постоянной (отличалась между разными пробами к одному транскрипту у индивидуальных животных менее чем в 2 раза). Среди них ген катепсин L (*MEP*), который

по уровню экспрессии в наших исследованиях был отнесен к ПГЭ почек. Компонент C1S системы комплемента (C1S) и цитоплазматическая ГМГ-КоА-синтаза (HMGCS1) имели конститутивную экспрессию в печени, но HMGCS1 по интенсивности гибридизации нескольких проб не превзошел порог в 400 с.и., вследствие чего HMGCS1 не может быть отнесен к ПГЭ печени.

Кроме того, в наших исследованиях была выявлена группа из 22 генов, представленных на ДНК микрочипах более чем одной пробой, у которых с.и. существенно отличались между пробами к кДНК одной и той же мРНК. Половина из них (11 генов) характеризовалась воспроизводимостью от животного к животному более чем двукратными различиями по интенсивности гибридизации разных участков кДНК одной мРНК с пробами ДНК микрочипов. То есть у исследованных животных наблюдалось

воспроизводимое участие в гибридизации кДНК транскрипта более чем одного гена. Вторая половина генов этой группы (11 генов) включала транскрипты, гибридизация разных участков которых варьировала у индивидуальных животных. Таким образом, по всем этим генам отчетливо выявлялась перекрестная гибридизация проб к транскриптам разных генов, причем вторая группа генов обнаруживала индивидуальную изменчивость по такой гибридизации.

Сравнительный анализ наших данных и данных, представленных в работе проф. Зао с соавт., позволил получить полные совпадения по органоспецифичному ПГЭ печени свиней только по 27 генам (~27%). Эти 27 генов имели конститутивную экспрессию в печени, превосходящую порог в 400 с.и. у всех исследованных животных (табл. 2). Основные отличия были обусловлены вариабельной частью ПГЭ печени свиней, выявленной нами.

Таблица 2

Список генов, экспрессия которых в наших исследованиях была конститутивна и превосходила порог в 400 с.и.

№	Название гена
1	Стероил КоА десатураза (SCD)
2	Субъединица бета электронпереносащего флавопротеина (ETFB)
3	Предшественник ангиопэтин-подобного белка 4 (ANGPTL4)
4	Митохондриальный предшественник 2,3-транс-еноил-КоА-изомеразы (DCI)
5	Предшественник кортикостероид-связывающего глобулина (CBG)
6	Транспортный белок натрия / таурохолата (SLC10A1)
7	Пальцевый кольцевой белок 170 (RNF170)
8	Фактор пероксисомного биогенеза 1 (PEX1)
9	Кардиолипин синтаза (CRLS1)
10	Нуклеотидсвязывающий гистидинтриадный белок 2 (HINT2)
11	Предшественник маннозосвязывающего белка С (MBP-C)
12	ДОФА-хром-таутомераза (DDT)
13	Предшественник макрофаг-стимулирующего белка (MSP)
14	Предшественник компонента C1S системы комплемента (C1S)
15	Предшественник матриксной металлопротеиназы 19 (MMP-18)
16	NDRG2 белок (NDRG2)
17	Трансмембранная сериновая протеаза I (HPN)
18	Фенилаланин-4-монооксигеназа (PAH)
19	Малеилацетоацетат-изомераза (GSTZ1)
20	Эпоксид гидролаза 2 (EPHX2)
21	Протеин-тирозин-фосфатаза 4 a1 (PRL1)
22	Инициатор ввода в митоз 1 (CDCA3)
23	Предшественник бета-2-гликопротеина-1 (APOH)
24	Предшественник витамин К-зависимого белка С (PROC)
25	Гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза (HPRT1)
26	УДФ-глюкоза-пирофосфорилаза 2 (UGP2)
27	Аланин-глиоксилат аминотрансфераза 2 (AGXT2L1)

Полученные данные свидетельствуют о том, что при анализе органоспецифичных ПГЭ необходимо выделять конститутивную и переменную части, поскольку гены, попадающие в переменную составляющую ПГЭ, отчетливо группируются по функциям и могут отражать отличия между животными по действию экзо- и эндогенных факторов, регулирующих их транскрипцию.

Обращает на себя внимание функциональная близость групп генов, изменчивость которых была скоррелирована у разных животных при сравнении ПГЭ печени и почек у одних и тех же животных в наших исследованиях, а также при сравнении ПГЭ только печени, полученных нами и проф. Зао с соавторами. В обоих случаях к одной из наиболее крупных групп переменных генов в ПГЭ печени относились гены, продукты которых участвуют в формировании сгустка крови.

Следует отметить, что отсутствие полного совпадения между генами, входящими в такие функциональные группы, для которых характерна скоррелированная изменчивость экспрессии у разных животных, может быть обусловлено тем, что биохимические основы формирования каждой функции зависят от генных взаимодействий, образующих общую

функциональную сеть. Структура таких генных сетей может быть достаточно сложной (Sole, Valverde, 2006), и одни и те же органоспецифические функции, отраженные в ПГЭ органа, могут обеспечиваться относительно повышенной экспрессией разных эффекторных генов такой сети (Flori *et al.*, 2009).

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что в качестве основных причин отличий в ПГЭ одних и тех же органов, получаемых в разных лабораториях на одних и тех же объектах, необходимо выделить возможности перекрестной гибридизации проб с кДНК транскриптами более чем одного гена, а также изменчивость экзо- и эндогенных регуляторных факторов, контролирующих органоспецифичные функции и соответственно приводящих к индивидуальным отличиям животных по экспрессии генов, входящих в соответствующие функциональные сети (в нашем случае 25 генов из 51).

Благодарности

Авторы выражают благодарность проф. Фаренкргу за руководство работой при получении первичных экспериментальных данных по профилям генной экспрессии.

Сокращения, используемые в тексте

- ПГЭ – профиль генной экспрессии;
- с.и. – сигнал интенсивности гибридизации;
- FGB – предшественник α -цепи фибриногена;
- FGG – предшественник γ -цепи фибриногена;
- VTN – предшественник витронектина,
- F2 – предшественник протромбина,
- PLG – предшественник плазминогена,
- PAI2 – ингибитор активатора плазминогена 2;
- АроС3 – предшественник аполипопротеина С3;
- Аро-Е – предшественник аполипопротеина Е,
- АроА-I – предшественник аполипопротеина А-I;
- AGP2 – предшественник α -1-кислого гликопротеина 2;
- PRBP – предшественник плазменного ретинол-связывающего белка;
- FHR2 – фактор дополнения Н-родственного белка 2;
- TMEM8 – трансмембранный белок 8;
- PAI2 – ингибитор активатора плазминогена 2;
- ST7 – ген изоформы b супрессии онкогенности;
- AGAP1 – centaурин-гамма 2;
- NAGA – предшественник α -N- ацетилгалактозаминидазы;

CLU – предшественник кластерина;
 TNFRSF19 – предшественник гена рецептора к фактору некроза опухоли 19;
 PLG – предшественник плазминогена;
 Grin2b – предшественник субъединицы эpsilon 2 глутаматного [MNDА] рецептора;
 KLHL1 – Kelch-like белок 1;
 HAPLN2 – ген гиалурон- и протеогликансвязывающего белка 2;
 AHSГ – предшественник α -2-HS гликопротеина;
 ALR -; TrpRS – триптофанил-тРНК синтетаза;
 АТIII – предшественник антитромбина III;
 TAFI – предшественник карбоксипептидазы В;
 SHAP – предшественник сывороточного гиалуронассоциированного белка;
 TF – предшественник трансферрина;
 MFE-2 – пероксисомный мультифункциональный фермент типа 2;
 HSD17B6 – 3-гидроксистероид эпимераза;
 SYND2 – предшественник синдекана 2;
 IGFBP-2 – предшественник связывающего инсулиноподобного фактора роста (ИФР) 2-го типа;
 SC4MOL – С-4 метилстерол оксидаза;
 SCEH – митохондриальный предшественник еноил-КоА-гидратазы;
 CAT – каталаза;
 PCB – пируват карбоксилаза;
 AT – глицин-аминотрансфераза;
 C1R – компонент C1г системы комплемента;
 CLDN1 – клаудин 1;
 ZADH2 – цинк-связывающая алкоголь дегидрогеназа, содержащая домен с белком 1;
 HMGCS1 – предшественник цитоплазматической ГМГ-КоА-синтазы;
 MEP – катепсин L;
 C1S – C1S-системы комплемента.

Литература

- Глазко В.И., Хлопова Н.С., Глазко Т.Т., Фаренкруг С. Сравнение профилей генной экспрессии в печени и почках свиней (*Sus scrofa*) // Докл. РАСХН. 2010. № 1. С. 34–39.
- Bai Q., McGillivray C., da Costa N. *et al.* Development of a porcine skeletal muscle cDNA microarray: analysis of differential transcript expression in phenotypically distinct muscles // available at <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/4/8>. 2003.
- Cheon Y., Nara T.Y., Band M.R. *et al.* Induction of overlapping genes by fasting and a peroxisome proliferator in pigs: evidence of functional PPARalpha in nonproliferating species // Amer. J. Physiol. 2005. V. 288. № 6. P. 1525–1535.
- David H. Quantitative and qualitative changes in the mitochondria in hepatocytes during postnatal development of male rats // Exp. Pathol. 1979. V. 17. P. 359–373.
- da Costa N., McGillivray C., Bai Q. *et al.* Restriction of dietary energy and protein induces molecular changes in young porcine skeletal muscles // J. Nutrition. 2004. V. 134. № 9. P. 2191–2199.
- Flori L., Fritz S., Jaffrezic F. *et al.* The genome response to artificial selection: A case study in dairy cattle // PLoS ONE. 2009. 4(8): e6595. doi:10.1371/journal.pone.0006595.
- Garbe J.R., Elsik C.G., Antoniou E. *et al.* Development and Application of Bovine and Porcine Oligonucleotide Arrays with Protein-Based Annotation. 2010. available at <http://www.hindawi.com/journals/jbb/2010/453638.html>.
- Glazko T.T., Khlopova N.S., Fahrenkrug S., Glazko V.I. Gene expression profiles in liver and kidney of pig // Izvestia of Timiryazev Academy. Spec. Issue. 2009. P. 55–60.
- Nguyen T.T., Almon R.R., DuBois D.C. *et al.* Importance of replication in analyzing time-series gene expression data: Corticosteroid dynamics and circadian patterns in rat liver. 2011. available at <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/11/279>.
- Okoniewski M.J., Miller C.J. Hybridization interactions between probesets in short oligo microarrays lead to spurious correlations // BMC Bioinformatics. 2006. V. 7. P. 276–290.
- Rijk J.C.W., Peijnenburg A., Hendriksen P.J.M. *et al.* Feasibility of a liver transcriptomics approach to

- assess bovine treatment with the prohormone dehydroepiandrosterone (DHEA) // available at <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/6/44>. 2010.
- Sole R.V., Valverde S. Are network motifs the spandrels of cellular complexity? // *Trends Ecol. Evol.* 2006. V. 21. № 8. P. 419–422.
- Zhao S.H., Recknor J., Lunney J.K. *et al.* Validation of a first-generation long-oligonucleotide microarray for transcriptional profiling in the pig // *Genomics*. 2005. V. 86. № 5. P. 618–625.

CONSTITUTIVE AND VARIABLE COMPONENTS OF GENE EXPRESSION PROFILES IN PIG LIVER

N.S. Khlopova, T.T. Glazko, V.I. Glazko

Russian State Agrarian University–Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia,
e-mail: vglazko@yahoo.com

Summary

Comparative analysis of gene expression profiles (GEPs) was carried out in the liver and kidneys of pigs. Groups of genes with constitutive and variable expression were recognized. It was found that the variable part of GEPs could be subdivided into groups whose genes demonstrated expression level correlations from animal to animal. The dependence of the expression of such gene groups on their involvement in metabolic pathways and on exo- and endogenous regulating factors is discussed, as well as the role of the variable GEP portion in the variation of the results of studies performed in different laboratories with the same objects.

Key words: gene expression, individual variability, cross hybridization, microarrays.

АНАЛИЗ ДУПЛИКАЦИИ ГЕНОВ миРНК В ГЕНОМЕ ЧЕЛОВЕКА И РОЛЬ ЭВОЛЮЦИИ ТРАНСПОЗОНОВ В ЭТОМ ПРОЦЕССЕ

И.И. Титов^{1,2}, П.С. Ворожейкин¹

¹ Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия, e-mail: titov@bionet.nsc.ru;

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

Одним из механизмов эволюции миРНК в геномах являются дубликации их генов. В работе показывается, что миРНК человека в основном организованы в кластеры размером до 5 тыс. нуклеотидов, а их копии случайно рассеяны по геному в среднем через $4,3 \times 10^6$ п.о. Мы провели сравнение окрестностей копий миРНК с последовательностями мобильных элементов и установили, что подавляющее большинство (96 %) гомологов миРНК распространилось ДНК-транспозонами и ретроэлементами. Среди них наибольший вклад вносят приматоспецифичные элементы *madel*, копии которого содержат миРНК семейства *hsa-mir-548*. Исследование эволюции *madel* показывает, что эти мобильные элементы возникли и взрывообразно размножились в геноме общего предка приматов и в дальнейшем разошлись со средними для геномов скоростями. Тогда же независимо друг от друга возникли современные миРНК семейства *hsa-mir-548* как результат адаптивных мутаций в части копий транспозона, которые и были рекрутированы в систему молчания генов. Задokumentированные в работе изменения в транспозонах при их эволюции в гены миРНК так же, как и многочисленные найденные последовательности копий миРНК, могут быть полезными для предсказания новых миРНК.

Ключевые слова: миРНК, мобильные элементы, ДНК-транспозон, *madel*, компьютерный анализ, вторичная структура, эволюция.

Введение

МикроРНК (миРНК) – семейство малых, около 22 нуклеотидов (нт), одноцепочечных некодирующих РНК последовательностей, участвующих в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов (Bartel, 2004). В геноме человека миРНК встречаются в интронах, экзонах и межгенных областях. Около 42 % миРНК человека относят к кластерам размером до 3 тыс. нт, а рядом с известными миРНК наблюдаются консервативные пре-миРНК-подобные элементы (Altuvia *et al.*, 2005).

Одним из путей эволюции миРНК является дубликация. Некоторые гены миРНК млекопитающих, включая человека, происходят от мобильных генетических элементов (Smalheiser *et al.*, 2005; Piriyaongsa *et al.*, 2007). В частности,

7 генов миРНК из *hsa-mir-548* семейства предположительно эволюционировали от элемента *madel* (Piriyaongsa *et al.*, 2007). Известно, что мобильные элементы составляют до 45 % генома человека (Consortium, 2001). Большая распространенность и повторяемость мобильных элементов могут объяснить обширное распространение генов миРНК и гомологов миРНК в геноме человека и помочь обнаружению новых миРНК.

В работе проведен компьютерный анализ внутригеномного распределения миРНК человека: оценен размер кластеров миРНК и исследована роль мобильных элементов в распространении генов миРНК по геному. Особое внимание уделяется эволюции приматоспецифичного транспозона *madel*, ответственного за распространение миРНК семейства *hsa-mir-548*.

Материалы и методы

В работе используются 695 известных пре-миРНК человека из базы данных miRBase (Griffiths-Jones *et al.*, 2008), релиз 12.0. Пре-миРНК содержат 343 зрелые миРНК из 5'-ветви предшественника и 349 – из 3'-ветви. Используются геномы *Homo sapiens* (релиз hg19 соответствует релизу 37.1 NCBI), *Pan troglodytes* (релиз panTro2), *Pongo abelii* (релиз ponAbe2), *Macaca mulatta* (релиз rheMac2) и *Callithrix jacchus* (релиз Cal Jac3).

Сравнение последовательностей рассматриваемых миРНК, их генов и повторяющихся геномных последовательностей (в том числе мобильных элементов) проводится с помощью веб-серверов RepeatMasker (Smith, 1999) и UCSC Table Browser (Karolchik *et al.*, 2004). Внутригеномный поиск нуклеотидных последовательностей проводится с помощью программы BLASTN (Altschul *et al.*, 1997). Для построения вторичных структур РНК последовательностей и вычисления их свободной энергии использовались программы RNAfold (Hofacker *et al.*, 1994) и GArna (Titov *et al.*, 2002). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляется с помощью программы CrustalW (Jeanmougin *et al.*,

1998). Построение филогенетических деревьев для нуклеотидных последовательностей проводится с помощью программы MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) методом максимальной парсимонии (Sober, 1983).

Результаты

Взаимное расположение миРНК и их копий

Корреляционная функция парных расстояний является удобным способом характеризовать взаимную зависимость расположения объектов наблюдения. Используя позиции миРНК в геноме человека, мы рассчитали вероятность наблюдения ближайших пар миРНК на определенном расстоянии друг от друга в одной цепи ДНК. Оказалось, что на расстояниях до 5 тыс. нуклеотидов эта функция примерно обратно пропорциональна расстоянию $y \propto x^{-1}$ (рис. 1, а), что свидетельствует о корреляциях в расположении миРНК, например об организации в кластеры. Медленный степенной закон спада автокорреляций нуклеотидов ранее наблюдался в ДНК (Лобзин, Четчин, 2000), а одним из объяснений является блочная организация генома (Karlin *et al.*, 1993; Капитонов,

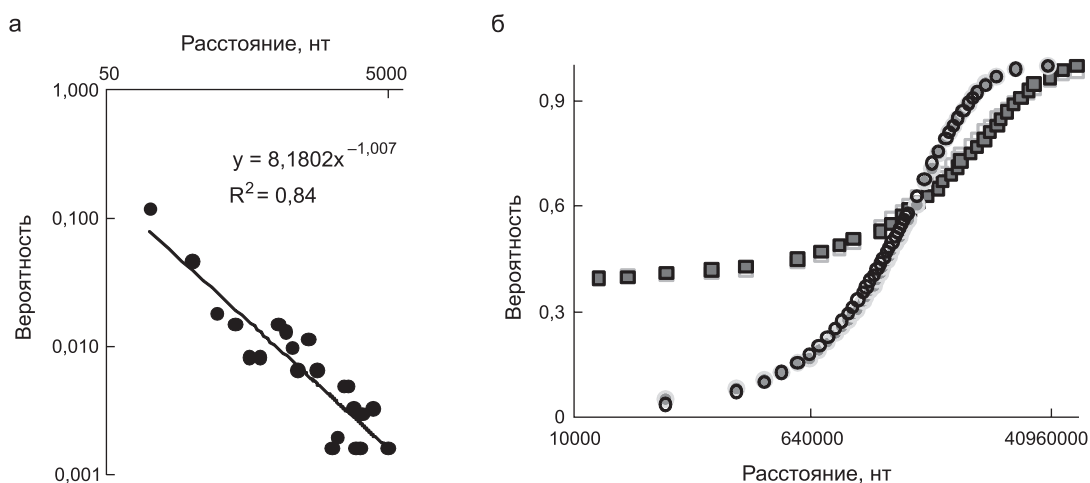


Рис. 1. Функция распределения вероятностей (по оси ординат) парных расстояний (по оси абсцисс) между соседними миРНК.

Расстояния рассчитаны в отдельности для каждой из цепей генома человека. Слева в двойных логарифмических координатах построен график для расстояний до 5 тыс. нт. (а). Аппроксимация линейной функцией отвечает степенному закону спада от расстояния (на врезке). Справа показаны функции распределения вероятностей парных расстояний при расстояниях свыше 10 тыс. нт (б). Функции для миРНК и их копий отмечены закрашенными квадратами и кругами соответственно. Незакрашенные символы показывают аппроксимации функций «затянутой» экспонентой.

Титов, 1994). Отметим, что присутствия двух миРНК в одной пре-миРНК недостаточно для объяснения корреляционного эффекта, поскольку область расстояний, в которой наблюдается степенная зависимость, значительно больше 80 нт – типичной длины пре-миРНК.

На расстояниях более 10^4 нт миРНК располагаются разреженно, поэтому для больших расстояний вместо функции вероятности мы построили ее кумулятивную функцию. Здесь функция распределения по ближайшим расстояниям превращается в «затянутую» экспоненту: кумулятивная функция имеет вид:

$$F = 1 - e^{-\left(\frac{x-G}{D}\right)^E}$$
 (рис. 1, б) (параметры распределения приведены в табл. 1). Подобное распределение при $E = 0,5-0,7$, т. е. с экспоненциальным «толстым хвостом», присуще объектам с флуктуационно-неоднородным распределением и в данном случае характеризует взаимное расположение кластеров миРНК.

Для сравнения с помощью поиска по гомологии мы нашли точные копии миРНК и их позиции и с их помощью построили аналогичную функцию ближайших расстояний между копиями миРНК (рис. 1, б) (подробнее анализ копий описывается в следующих разделах). Показатель степени E для распределения расстояний между копиями оказался близким к единице (табл. 1), что приближенно соответствует случайно-равномерному расположению со средним расстоянием между копиями, равным $4,3 \times 10^6$ п.о. Интересно, что пары миРНК с ее копией находятся в одной и той же хромосоме в малом (164) числе случаев.

Таблица 1

Параметры аппроксимации кумулятивных функций распределения ближайших расстояний между миРНК и между точными копиями миРНК на расстояниях больше 10^4 нт

Тип распределения	C	D	E
Расстояния между миРНК	-2×10^6	$6,2 \times 10^6$	0,6
Расстояния между точными копиями миРНК	$-5,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^6$	0,9

Таким образом, наблюдается сильная скоррелированность расположения миРНК внутри хромосом на расстояниях до 5 тыс. нт в согласии с наблюдениями об организации миРНК в кластеры (Altuvia *et al.*, 2005). В отличие от миРНК их копии располагаются независимо как друг от друга, так и от оригиналов.

Содержание миРНК и их копий в хромосомах: роль мобильных элементов в копировании миРНК

Для исследования механизма распространения миРНК мы рассмотрели распределение известных зрелых миРНК человека и их копий по отдельным хромосомам. Для этого сначала мы нашли все последовательности, которые совпадают с известными миРНК. Общее число найденных последовательностей – 2122 шт., приблизительно поровну в каждой из цепей ДНК.

Далее мы разделили набор из этих 2122 последовательностей миРНК вместе с их окрестностями на две части в зависимости от степени совпадения их окрестностей с известными пре-миРНК. Рассматриваемые окрестности каждой миРНК по размеру соответствовали гену этой миРНК. В группу оригинальных генов входят 785 последовательностей, которые являются либо известными пре-миРНК (695 шт.), либо их точными копиями (90 шт.). Вторую группу копий генов составляют остальные 1337 последовательностей, окрестности которых отличаются от известных пре-миРНК.

Затем мы определили содержание последовательностей из этих двух групп в отдельных хромосомах (рис. 2). Из рис. 2, а видно, что межхромосомное распределение генов миРНК сильно неоднородно. 14-я, Y- и особенно 19-я хромосомы характеризуются наибольшим числом (рис. 2, а) и удельным (в расчете на длину хромосомы рис. 2, в) количеством пре-миРНК. В отличие от самих пре-миРНК распределение их копий более однородно (рис. 2, б), а плотность почти одинакова за исключением 19-й хромосомы (рис. 2, г). Иначе говоря, размер хромосомы является основным параметром, который определяет содержание в ней гомологов пре-миРНК, а интенсивность копирования между хромосомами примерно равна.

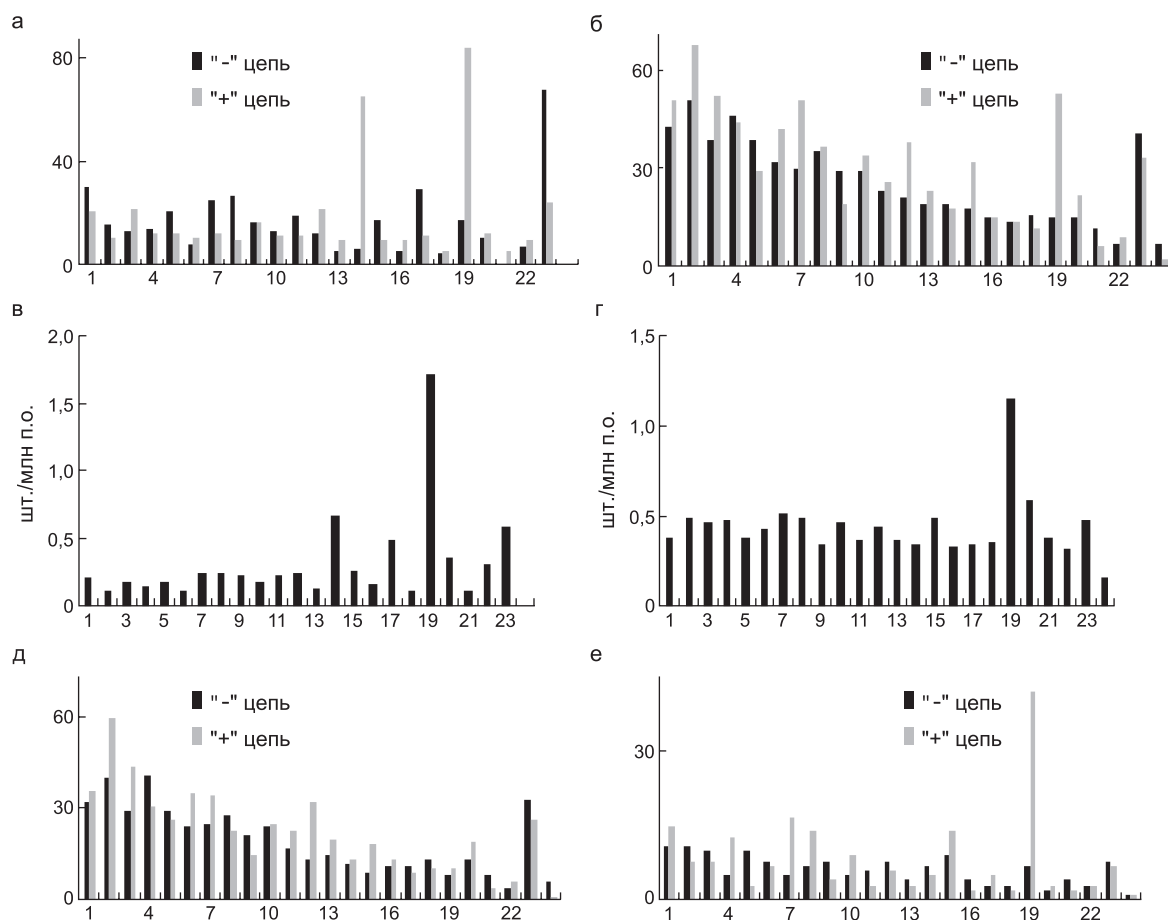


Рис. 2. Межхромосомное распределение генов миРНК и сходных с ними последовательностей в геноме человека.

а – количество генов миРНК; б – количество копий генов миРНК; в – средняя плотность генов миРНК в хромосоме в штуках на 1 млн нт; г – средняя плотность копий генов миРНК; д – количество копий генов миРНК из семейства *hsa-mir-548*; е – количество копий генов миРНК без учета миРНК семейства *hsa-mir-548*. По оси *x* отображается номер хромосомы (позиция 23 соответствует X-хромосоме, 24 – Y-хромосоме). По оси *y* отображается число наблюдений.

Большую часть 19-й хромосомы составляют повторяющиеся последовательности: 55 % против 44,8 % в среднем по геному (Grimwood *et al.*, 2004). Из этих повторов 19-й хромосомы большую часть составляют SINE элементы (Grimwood *et al.*, 2004). Для выявления связи между копированием миРНК и мобильными генетическими элементами мы сравнили последовательности генов миРНК и мобильных элементов посредством веб-сервера RepeatMasker (Smith, 1999), параметры поиска по умолчанию.

Для 116 из 695 известных пре-миРНК мы нашли высокую гомологию с известными ДНК-транспозонами и ретроэлементами. Эти пре-миРНК имеют подавляющее число копий (1285 из 1337, или 96 % от общего числа обна-

руженных копий генов). Наиболее часто гены миРНК копируются мобильными элементами *mde1*, *FLAM_A*, *AluYh9* (рис. 3).

Из этих 1285 копий пре-миРНК большинство (1030, или 83%) являются копиями пре-миРНК из семейства *hsa-mir-548* и принадлежат приматоспецифичному ДНК-транспозону *mde1*, а остальные соответствуют *SINE*, *LINE* и другим ретроэлементам. Межхромосомные распределения копий пре-миРНК из семейства *hsa-mir-548* и остальных копий показаны на рис. 2, д и 2, е соответственно.

Таким образом, обширная распространенность копий миРНК по геному человека объясняется присутствием в мобильных элементах последовательностей некоторых пре-миРНК. В хромосоме 19 гомологи пре-миРНК, в основном

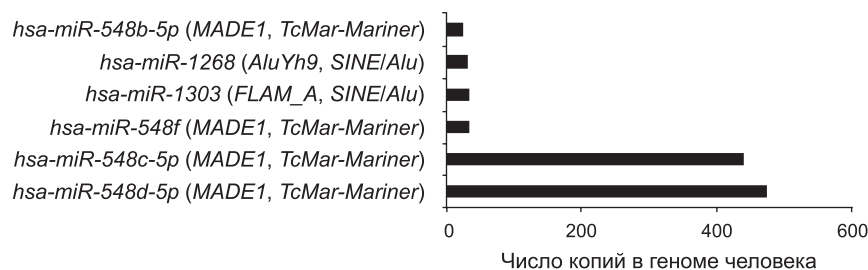


Рис. 3. Пять миРНК с наибольшим числом копий и соответствующие им мобильные элементы.

Ось y – название миРНК (название мобильного элемента, семейство), ось x – число обнаруженных гомологов миРНК в геноме человека.

копии генов недавно обнаруженных миРНК, *hsa-mir-1268* и *hsa-mir-1303*, контролируются внутрихромосомными дупликациями SINE элементов. В целом самую значительную роль в геномной экспансии гомологов пре-миРНК играет транспозон *madel*, который равномерно копирует в другие хромосомы гены семейства *hsa-mir-548*. Особенности эволюции *madel* рассмотрены ниже.

Эволюция мобильного элемента *madel*

Копии транспозона *madel* обнаружены в геномах приматов *H. sapiens*, *P. troglodytes*, *P. abelii*, *M. mulatta* и *C. jacchus*. *Madel* элементы относятся к семейству неавтономных ДНК транспозонов *Tc1/Mariner* и имеют длину 80 п.н. с двумя инвертированными концевыми повторами по 37 п.н. и вставкой 6 п.н. между ними (Morris, 2008). Согласно базе UCSC Table Browser, в геномах этих организмов присутствует более 6 тыс. копий *madel*. Для каждого генома мы рассчитали число копий в зависимости от величины сходства с полной последовательностью транспозона, а также число совпадающих копий между геномами. Оказалось, что это распределение фрагментов приблизительно одинаково для всех пяти геномов (рис. 4), что свидетельствует о сходстве крупномасштабной эволюции *madel* у всех видов.

Само число повторов между геномами изменяется незначительно, что делает маловероятным такой сценарий размножения повторов, при котором ближайший общий предок приматов наследовал небольшое количество *madel*. При этом парные числа совпадающих копий сильно различны: доля консервативных копий меняется от 0,3 до 38 % (табл. 2). Данные из табл. 2 соот-

ветствуют эволюции со средними для геномов скоростями по филогенетическому дереву приматов около 10^{-3} замен на позицию за 1 млн лет (Steiper, Young, 2006). Так, простые вычисления показывают, что ожидаемое при нейтральном расхождении число совпадений между человеком и шимпанзе равно 2935 фрагментам (ср. с наблюдаемым 2949) (табл. 2) для различия их геномов в 0,0012 нуклеотидов на позицию (Mikkelsen *et al.*, 2005) и $7715 = (7823 + 7607)/2$ фрагментам с наблюдаемым средним размером в 60 нт.

В настоящее время в базе miRBase (релиз 12.0) присутствует 29 генов миРНК человека, 18 генов шимпанзе и 6 макаки из семейства *hsa-mir-548*, сходство последовательностей которых с *madel* свидетельствует об их происхождении от этого мобильного элемента. Близки друг к другу и сами миРНК этого семейства, отлича-

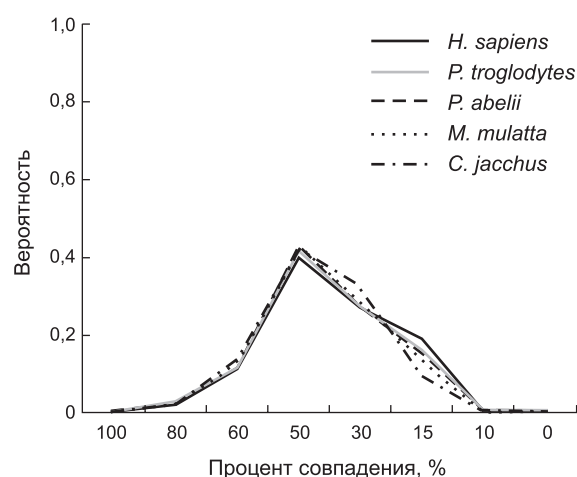


Рис. 4. Распределение вероятностей сходства *madel* и его фрагментов из пяти геномов приматов. Поиск проведен с помощью веб-сервера RepeatMasker (Smith, 1999) с параметрами по умолчанию.

Таблица 2

Количество полностью совпадающих фрагментов *made1* между геномами 5 приматов

Приматы	<i>H. sapiens</i>	<i>P. troglodytes</i>	<i>P. abelii</i>	<i>M. mulatta</i>	<i>C. jacchus</i>
<i>H. sapiens</i>	7823	2949	880	183	32
<i>P. troglodytes</i>	2949	7607	839	191	29
<i>P. abelii</i>	880	839	7705	187	28
<i>M. mulatta</i>	183	191	187	6706	21
<i>C. jacchus</i>	32	29	28	21	6446

ясь не более чем на 4 позиции. Мы сравнили последовательности *made1* и человеческих генов семейства *hsa-mir-548*, нашли одиночные замены и сравнили районы мобильного элемента по числу замен. Оказалось, что мобильный элемент в целом однородно варьирующ: район миРНК и область вне ее имеют одинаковое число замен на позицию. Эволюция пре-миРНК более чем в два раза быстрее среднегеномной и происходит со скоростью $2,3 \times 10^{-3}$ замен на позицию за миллион лет, близкой к скорости быстро эволюционирующей фракции *Alu*-повторов (Ruiz-Narvaez, Campos, 2008).

На основании множественного выравнивания последовательностей пре-миРНК этого семейства и полных последовательностей *made1* нами были построены укорененные филогенетические деревья, отдельно для «+» и «-» цепей ДНК-транспозона (рис. 5).

Из рис. 5 видно, что пре-миРНК семейства *hsa-mir-548* высокомологичны транспозону, а

ветвления дерева определяются малым числом замен, что делает точную топологию дерева вблизи корня малодостоверной, но всегда приближенно звездообразной для разных миРНК. С учетом одинаковой скорости замен в пре-миРНК и консервативности района миРНК вблизи концов дерева можно заключить, что мутации именно в этом районе отвечают за расхождение вблизи корня дерева.

Часто одни и те же миРНК можно обнаружить у разных видов (Griffiths-Jones, 2004). Для семейства *hsa-mir-548* межвидовой консерватизм проявляется в том, что к настоящему моменту эти миРНК обнаружены также у макаки, орангутанга и шимпанзе. В частности, 11 известных миРНК шимпанзе из этого семейства, в том числе 4 пре-миРНК, полностью совпадают с человеческими. Перечисленные в этом разделе обстоятельства приводят к выводу, что включение мобильного элемента *made1* в систему молчания генов произошло у общего предка

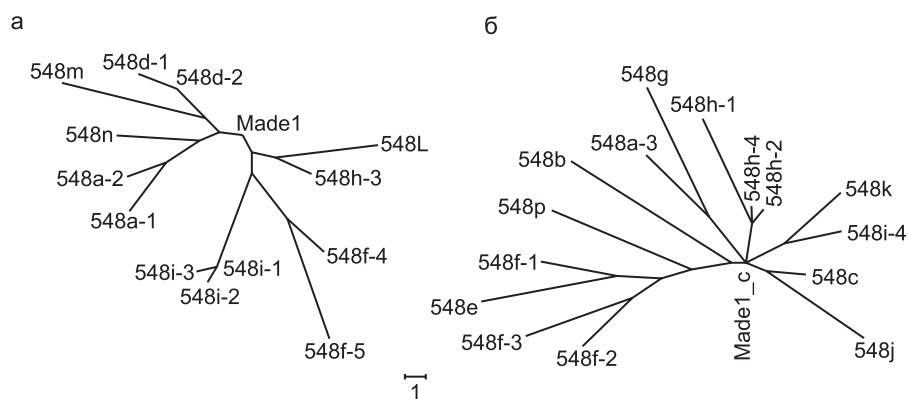


Рис. 5. Укорененные филогенетические деревья для семейства генов *hsa-mir-548* и плюс (а) и минус (б) цепей *made1*, построенные программой MEGA4 методом максимальной парсимонии.

Деревья построены программой MEGA4 методом максимальной парсимонии. Длина ребер пропорциональна величине отличия последовательностей. Не включен ген *hsa-mir-548o*, из-за вставки отличающийся более чем на 60% от *made1*. Гены с числовым суффиксом, например, *hsa-mir-548d-1* и *hsa-mir-548d-2*, содержат одинаковые миРНК.

приматов образованием современных миРНК в канонической форме повтора. Разнообразие миРНК было достигнуто не только нуклеотидными заменами, но и сдвигом позиций миРНК. Незатронутыми мутациями остались короткие повторы U_n и A_n вблизи краев миРНК (рис. 6).

Благодаря палиндромной структуре элемента *madel*, он способен образовывать шпильки, которые сходны по своим характеристикам с вторичными структурами пре-миРНК (рис. 6). Мы провели анализ сохранения канонической шпильки после копирования *madel* в геноме человека. Для этого из почти 8 тысяч копий *madel* в геноме человека мы выделили около 2900 последовательностей, накладывая ограничения, которые характерны для генов миРНК человека (Nam *et al.*, 2005). Затем мы провели их выравнивание с последовательностью полного *madel*-транспозона и среди обнаруженных более 20 тысяч замен рассмотрели те из них, которые изменяют оба нуклеотида в комплементарных парах канонической структуры. Всего в транспозоне было обнаружено 2170 замен пары, из них 1624 сохраняют комплементарность, т. е. являются коадаптивными (рис. 6). Для сравнения мы ввели то же число случайных одиночных замен на том же количестве идентичных последовательностей *madel*. Всего в тесте Монте Карло было получено около 850 замен пары, из которых около 300 сохраняют комплементарность: обе величины примерно на 1300 меньше наблюдаемых значений.

Таким образом, эволюционирующие копии *madel* склонны сохранять каноническую палиндромную структуру, которая способствует формированию транскриптом устойчивой вторичной структуры в виде шпильки (рис. 6).

Обсуждение и выводы

Полицистронная организация миРНК известна для многих организмов, но лучше изучена в человеке (Bartel, 2004; Cullen, 2004). Однако число миРНК в кластерах и типичный размер кластеров остаются предметом для дискуссии. С одной стороны, при компьютерном поиске кластеров миРНК ранее использовался порог в 3 тыс. нт (Altuvia *et al.*, 2005), с другой, была обнаружена коэкспрессия миРНК, которые находятся на расстояниях вплоть до 50 тыс. нт

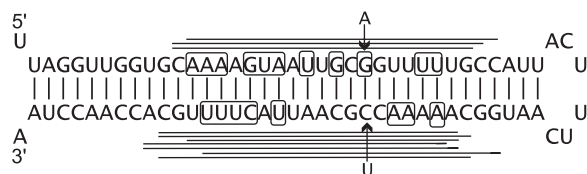


Рис. 6. Вторичная структура транскрипта «+» цепи *madel*.

Горизонтальными линиями обозначены расположения миРНК семейства *hsa-mir-548*. Обведены консервативные нуклеотиды в области миРНК. Стрелками показана коадаптивная замена $GC \rightarrow AU$, наблюдаемая во фрагменте *madel*.

(Baskerville, Bartel, 2005). Здесь при помощи статистических аргументов мы получили промежуточную между упомянутыми выше оценку в 5 тыс. нт. Поэтому число миРНК, которых отнесли к кластерам при компьютерном анализе (Altuvia *et al.*, 2005), является недооцененным.

Дупликации являются основным механизмом распространения миРНК по геному. Главную роль здесь играют короткие приматоспецифичные ДНК-транспозоны и ретроэлементы. Кластеры миРНК в 19-й хромосоме распространяются через *Alu*-повторы, а в целом по геному основная часть копий миРНК дублицирована мобильными элементами *madel* в случайные позиции в среднем через $4,3 \times 10^6$ п.о. По нашим наблюдениям, распространение копий *madel* в приматах произошло взрывообразно до расхождения на *H. sapiens*, *P. troglodytes*, *P. abelii*, *M. mulatta* и *C. jacchus*. Для окончательной проверки такого сценария необходимо сравнение позиций мобильного элемента между геномами.

Тогда же независимо друг от друга возникли современные миРНК семейства *hsa-mir-548* как результат адаптивных мутаций в части копий транспозона, которые и были рекрутированы в механизм молчания генов. Мутации не затронули короткие повторы U_n и A_n вблизи краев миРНК и привели к смещениям позиций референтной миРНК, образовав целое семейство *hsa-mir-548*. Ранее для 7 генов миРНК из *hsa-mir-548* семейства было известно их происхождение от *madel* (Piriyarongsa *et al.*, 2007). В этой работе мы обнаружили 29 таких генов.

Некоторые семейства миРНК имеют высокий уровень экспрессии, древнее происхождение, выполняют важные функции и эволюцион-

но-инвариантны. Вариабельность функций миРНК контролируется как переключениями между мишенями консервативных миРНК, так и узкоконсервативной видоспецифичностью миРНК. Мобильные элементы, соответствующие наиболее копируемому миРНК (*Madel*, *FLAM_A*, *AluYh9*), встречаются только у приматов, что позволяет предположить участие происходящих от них миРНК в фундаментальных регуляторных процессах в данных видах. Интерес представляет проявление этих миРНК в фенотипе, специфичном для приматов. Так, миРНК, которые распространились через *Alu*-повторы по 19-й хромосоме, предпочтительно экспрессируются в плаценте и мозге (Noguer-Dance *et al.*, 2010). МиРНК семейства *hsa-mir-548* предположительно причастны к регулированию экспрессии генов при раке (Piriyaopongsa *et al.*, 2007).

Устойчивая шпилечная структура и широкая распространенность мобильных элементов, которые содержат миРНК, свидетельствуют о существовании большого числа молчащих генов миРНК. В связи с этим исследование механизма превращения транспозона в пре-миРНК оказывается важным как для диагностики и терапии, так и для развития компьютерных методов предсказания миРНК.

Благодарности

Работа поддержана Междисциплинарным интеграционным проектом СО РАН 119 «Постгеномная биоинформатика: компьютерный анализ и моделирование молекулярно-генетических систем» и Госконтрактом № 10104-37/П-24/110-323/020610-004 по теме «Эволюция гео-биологических систем» по подпрограмме 2 программы 24 фундаментальных исследований Президиума РАН «Происхождение биосферы и эволюция гео-биологических систем».

Литература

Капитонов В.В., Титов И.И. Порядок интронов и дальние корреляции в нуклеотидных последовательностях // Докл. АН. 1994. Т. 337. С. 810–812.
Лобзин В.В., Четкин В.Р. Порядок и корреляции в геномных последовательностях ДНК. Спектральный анализ // Усп. физ. наук. 2000. Т. 17. Вып. 1. С. 57–81.

Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 3389–3402.
Altuvia Y., Landgraf P., Lithwick G. *et al.* Clustering and conservation patterns of human microRNAs // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. № 8. P. 2697–2706.
Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function // Cell. 2004. V. 116. № 2. P. 281–297.
Baskerville S., Bartel D. Microarray profiling of human microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes // RNA. 2005. V. 11. P. 241–247.
Consortium I.H.G.S. Initial sequencing and analysis of the human genome // Nature. 2001. V. 409. № 6822. P. 860–921.
Cullen B.R. Transcription and processing of human microRNA precursors // Mol. Cell. 2004. V. 16. № 6. P. 861–865.
Griffiths-Jones S. The microRNA Registry // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. P. D109–D111.
Griffiths-Jones S., Saini H.K., van Dongen S., Enright A.J. miRBase: tools for microRNA genomics // Nucl. Acids Res. 2008. V. 36(Database Issue). P. D154–D158.
Grimwood J., Gordon L.A., Olsen A. *et al.* The DNA sequence and biology of human chromosome 19 // Nature. 2004. V. 428. P. 529–535.
Hofacker I.L., Fontana W., Stadler P.F. *et al.* Fast folding and comparison of RNA secondary structures // Monatshefte f. Chemie. 1994. V. 125. P. 167–188.
Jeanmougin F., Thompson J.D., Gouy M. *et al.* Multiple sequence alignment with Clustal X // Trends Biochem. Sci. 1998. V. 23. № 10. P. 403–405.
Karlin S., Brendel V. Patchiness and correlations in DNA sequences // Science. 1993. V. 259. P. 677–680.
Karolchik D., Hinrichs A.S., Furey T.S. *et al.* The UCSC Table Browser data retrieval tool // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. P. D493–D496.
Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* // Cell. 1993. V. 75. P. 843–854.
Mikkelsen T.S., Hillier L.W., Eichler E.E. *et al.* Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome // Nature. 2005. V. 437. P. 69–87.
Morris K.V. RNA and the regulation of gene expression: a hidden layer of complexity. Norfolk: Horizon Scientific Press, 2008. 228 p.
Nam J.W., Shin K.R., Han J. *et al.* Human microRNA prediction through a probabilistic co-learning model of sequence and structure // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. № 11. P. 3570–3581.
Noguer-Dance M., Abu-Amero S., Al-Khtib M. *et al.* The primate-specific microRNA gene cluster

- (C19MC) is imprinted in the placenta // Hum. Mol. Genet. 2010. V. 19. № 18. P. 3566–3582.
- Piriyapongsa J., Jordan I.K. A family of human microRNA genes from miniature inverted-repeat transposable elements // PLoS ONE. 2007. V. 2. N e203. P. 1–11.
- Ruiz-Narváez E.A., Campos H. Evolutionary rate heterogeneity of *Alu* repeats upstream of the *APOA5* gene: do they regulate *APOA5* expression? // J. Hum. Genet. 2008. V. 53. № 3. P. 247–253.
- Smalheiser N.R., Torvik V.I. Mammalian microRNAs derived from genomic repeats // Trends Genet. 2005. V. 21. P. 322–326.
- Smith A., Green P. RepeatMasker. 1999. available at <http://repeatmasker.org>.
- Sober E. Parsimony in systematics: philosophical issues // Annu. Rev. Ecol. Syst. 1983. V. 14. P. 335–357.
- Steiper M.E., Young N.M. Primate molecular divergence dates // Mol. Phylogenet. Evol. 2006. V. 41. P. 384–394.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol. Biol. Evol. 2007. V. 24. P. 1596–1599.
- Titov I.I., Vorobiev D.G., Ivanisenko V.A., Kolchanov N.A. A fast genetic algorithm for RNA secondary structure analysis // Russ. Chem. Bull. 2002. V. 51. № 7. P. 1135–1144.

THE ANALYSIS OF miRNA DUPLICATION IN HUMAN GENOME AND THE ROLE OF TRANSPOSON EVOLUTION IN THIS PROCESS

I.I. Titov^{1,2}, P.S. Vorozheykin¹

¹ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia, e-mail: titov@bionet.nsc.ru;

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

Summary

MiRNA duplication is one of the modes of their evolution. In this paper we show that human miRNAs lie mainly in clusters of two or more of up to 5 000 nt size while their copies are randomly scattered with the average pair distance of $4,3 \times 10^6$ bp. We have compared neighborhood of miRNA copies with the sequences of the mobile elements and have found that 96 % of miRNA homologs propagate by the DNA transposons and retroelements. Amongst them the primate-specific element *made1*, copies of which contain a family of miRNAs *hsa-mir-548*, brings the greatest contribution. We speculate that *made1* evolution is the following. These mobile elements have emerged and multiplied explosively over the genome of primate common ancestor, and diverged later with the average genomic rates. Simultaneously and independently of each other a modern family of miRNAs *hsa-mir-548* emerged as a result of adaptive mutagenesis in transposon copies, which were recruited into the silencing system. Nucleotide changes found in the transposon during its transformation into the miRNA genes, as well as the numerous miRNA copies could be useful for predicting the new miRNAs.

Key words: miRNA, transposable element, DNA transposon, *made1*, computer analysis, secondary structure, evolution.

ВЛИЯНИЕ ГОЛОДАНИЯ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ И АПОПТОЗ В КЛЕТКАХ ЯИЧНИКОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

М.В. Жукова, Е.В. Киселева

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

В настоящей работе проведен сравнительный анализ влияния на *Drosophila melanogaster* разных экспериментальных условий голодания. В первом варианте условий голодания мухи непосредственно контактировали с влажной средой, а во втором – при высокой влажности воздуха не имели доступа к воде. Обнаружено, что исследованные условия голодания не равнозначны. Установлено, что отсутствие доступа к воде существенно снижает среднюю продолжительность жизни *D. melanogaster* по сравнению с тем, что наблюдается в первом варианте условий. Цитологический анализ яичников с использованием окраски акридиновым оранжевым показал, что во втором варианте условий у самок *D. melanogaster* через сутки регистрируются дегенеративные процессы в клетках яичника на всех стадиях оогенеза. Подобных изменений не наблюдалось в яичниках мух, имевших доступ к воде, у которых апоптоз в яичнике регистрировался только в двух контрольных точках – в гермари и вителлярии на 7–8-й стадии оогенеза. Полученные данные свидетельствуют о том, что при исследовании действия экспериментальных стрессовых условий необходимо обеспечивать доступ мух к воде, поскольку это предотвращает появление дополнительных изменений, обусловленных обезвоживанием организма насекомых.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, голодание, продолжительность жизни, акридиновый оранжевый, апоптоз, яичники.

Введение

Способность животных изменять метаболизм в ответ на постоянно меняющиеся условия окружающей среды необходима для их существования. Функции организма условно можно разделить на несколько групп: выживание, размножение, рост и развитие. В условиях с ограниченными энергетическими ресурсами организмы не могут одновременно максимально удовлетворить все свои потребности (Boggs, 1994; Zera, Harshman, 2001). На какие-то функции в определенный момент времени выделяется больше энергии, в то время как снабжение ресурсами других функций уменьшается. Так, для плодовых мушек *Drosophila melanogaster* было показано сопряжение признака устойчивости к голоданию и функции размножения. В линиях *D. melanogaster*, селектируемых в течение нескольких поколений по признаку устойчивости

к голоданию, самки откладывают меньше яиц в первые 5 дней жизни по сравнению с самками из стандартных лабораторных линий (Wayne *et al.*, 2006). В других экспериментах установлено, что процесс оогенеза у *D. melanogaster* значительно замедляется при недостатке белкового питания (Drummond-Barbosa, Spradling, 2001).

Известно, что в норме в яичнике *D. melanogaster* может происходить запрограммированная гибель клеток (апоптоз) в двух контрольных точках (checkpoint) (рис. 1), одна из которых находится в гермари, а другая – в вителлярии, на 7–8-й стадии оогенеза (Giorgi, Deri, 1976; Drummond-Barbosa, Spradling, 2001). Обнаружено, что при голодании количество яйцевых камер, подвергающихся апоптозу, в обеих контрольных точках увеличивается (Drummond-Barbosa, Spradling, 2001). Продолжительность жизни (ПЖ) *D. melanogaster* в условиях голодания значительно снижается. Максимальная

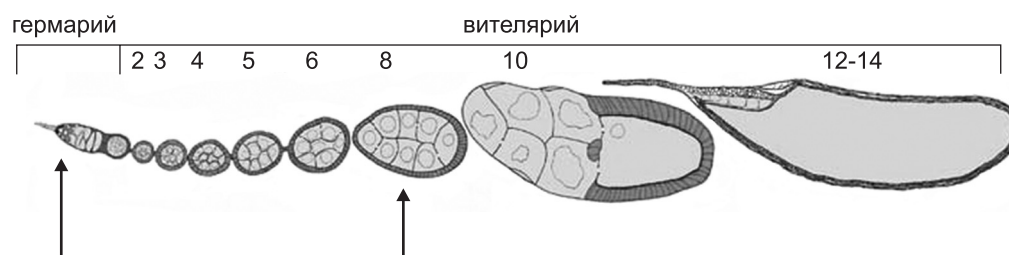


Рис. 1. Схема строения яйцевой трубки в яичнике *D. melanogaster* и локализация контрольных точек (checkpoint).

Цифрами обозначены последовательные стадии оогенеза. Контрольные точки в гермарии и вителлярии отмечены стрелками (модифицировано из: Drummond-Barbosa, Spradling, 2001).

ПЖ мух составляет в среднем 50–80 дней (Grotewiel *et al.*, 2005), в то время как ПЖ мух при голодании может колебаться от 20 часов (у самцов линий *D. melanogaster*, чувствительных к голоданию) до 8 дней (у самок линии мух, селективируемой на устойчивость к голоданию) (Rion, Kaweckі, 2007).

При исследовании реакции организмов на стресс большое значение имеют условия постановки эксперимента. В настоящее время в работах по изучению действия полного голодания на жизнедеятельность *D. melanogaster* используются две модификации экспериментальных условий. Согласно одной из них, мухи помещаются в пустую пробирку, соединенную с небольшой емкостью, содержащей влажную вату. Пробирка и емкость разделяются марлей, что обеспечивает повышенную влажность в пробирке с мухами в отсутствие доступа к воде (Service *et al.*, 1985; Harcombe, Hoffmann, 2004; Hoffmann *et al.*, 2005; Telonis-Scott *et al.*, 2006). Согласно другой модификации эксперимента, насекомые в пробирках непосредственно контактируют с влажной ватой или кормом, состоящим только из агарозы и воды (Wigglesworth, 1949; Harbison *et al.*, 2005; Bauer *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2009). С целью выяснения адекватности обоих методов в настоящей работе был проведен сравнительный анализ влияния этих двух вариантов условий голодания на продолжительность жизни и морфологию яичников *D. melanogaster*.

Материалы и методы

В работе использовали лабораторную линию мух *D. melanogaster* w1118TT, предоставленную

профессором Скоттом О'Нейлом (Университет Квинсленда, Австралия). Мухи содержались в термостате при температуре 25 °С на стандартном дрожжевом-агаровом корме. Корм заменяли свежим каждые 3 дня.

Голодание мух проводили в двух вариантах условий эксперимента. Вариант 1: 5-дневных мух переносили со стандартного корма в пустые пробирки, которые закрывались влажной ватой. Вариант 2: 5-дневных мух переносили со стандартного корма в пустую пробирку, соединенную с невысокой емкостью, в которой находилась вата, смоченная 10 мл воды. Соединенные вместе пробирку и емкость разделяли слоем марли. Смоченная водой вата была необходима для поддержания высокой влажности в пробирке с мухами. В обоих вариантах условий голодания пробирки с мухами помещали в термостат с температурой 25 °С.

Для определения продолжительности жизни *D. melanogaster* в условиях голодания 5-дневных мух наркотизировали диэтиловым эфиром и разделяли на самцов и самок. Каждые 30 особей помещали в пробирку объемом 40 мл согласно описанным выше условиям голодания. Эксперименты повторяли два раза и в каждом из них учитывали продолжительность жизни 120–150 особей каждого пола. Подсчет погибших мух осуществляли каждые 8–10 часов. Обработку результатов проводили с помощью стандартных статистических методов (Васильева, 2007).

Оценку уровня апоптоза в яичниках мух в стандартных условиях и при голодании проводили с помощью окраски клеток яичников акридиновым оранжевым с последующим анализом препаратов в флуоресцентном мик-

роскопе. Акридиновый оранжевый является прижизненным высокоспецифичным красителем, окрашивающим лизосомы и ядра клеток, которые подверглись апоптозу (Мроке, Wolfe, 1997). Окраску проводили согласно описанной ранее методике (Abrams *et al.*, 1993). Для цитологического анализа яичники 5-дневных мух выделяли в растворе Эфрусси-Бидла Рингера (130 мМ NaCl, 4,7 мМ KCl, 1,9 мМ CaCl₂, 10 мМ Hepes, pH 6,9), окрашивали в течение 3 минут в растворе акридинового оранжевого (5 мкг/мл) на 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 7,2 при комнатной температуре. Затем яичники переносили на предметное стекло в каплю галокарбонного масла, покрывали покровным стеклом и анализировали в флуоресцентном микроскопе (Axioscop 2, Zeiss, Германия) с длиной волны возбуждающего света 390 нм и барьерным фильтром 420–450 нм.

Результаты и обсуждение

В условиях голодания, при которых мухи линии *D. melanogaster* w1118T контактировали с влажной ватой (вариант 1), средняя продолжительность их жизни (ПЖ) составила $48,2 \pm 0,5$ ч для самцов и $59,6 \pm 0,7$ ч для самок (рис. 2). Наши исследования показали, что самцы более чувствительны к голоданию по сравнению с самками, хотя и в нормальных условиях продолжительность жизни самцов ниже, чем у самок (Lints *et al.*, 1983). Это согласуется с данными других авторов, исследовавших действие голодания в тех же условиях на продолжительность жизни мух (Lee, Park, 2004; Matzkin *et al.*, 2009). Следует отметить, что наши данные расходятся с результатами, полученными двумя другими группами исследователей (Harshman *et al.*, 1999; Harbison *et al.*, 2005), согласно которым средняя ПЖ мух в этих условиях была существенно ниже, хотя различия между самцами и самками были также отмечены. Возможно, это связано с использованием других линий *D. melanogaster*. Нами установлено, что средняя ПЖ мух, содержащихся в условиях с высокой влажностью воздуха, но без прямого доступа к воде (вариант 2), составляет $40,3 \pm 1,0$ ч и $52,5 \pm 1,3$ ч для самцов и самок соответственно (рис. 2). Таким образом, отсутствие прямого доступа к воде достоверно снижает продолжительность

жизни мух. Полученные нами значения были несколько выше, чем у других авторов, у которых средняя ПЖ мух в аналогичных нашим условиях составила 22 ч для самцов и 40–46,9 ч для самок (Service *et al.*, 1985; Telonis-Scott *et al.*, 2006). Такие различия могут быть связаны, как уже упоминалось выше, с использованием других лабораторных линий *D. melanogaster*, отличающихся устойчивостью к голоданию, и с некоторыми различиями в постановке эксперимента. Наши исследования показали, что средняя ПЖ у самок и самцов, не имевших доступа к воде, была достоверно меньше ($p < 0,001$), чем в условиях прямого контакта насекомых с водой.

Половой диморфизм по признаку ПЖ при голодании был ранее обнаружен у разных видов мух рода *Drosophila* (Service *et al.*, 1985; Sharmila Bharathi *et al.*, 2003; Matzkin *et al.*, 2009). Показано, что выживаемость *Drosophila* в условиях голодания зависит от количества углеводов и жиров в составе их тканей (Maggon *et al.*, 2003). Для нескольких видов *Drosophila* показано, что ПЖ выше у самок, тело которых содержит большее количество углеводов и жиров по сравнению с телом самцов (Maggon *et al.*, 2003; Sharmila Bharathi *et al.*, 2003). Однако самцы способны использовать имеющиеся энергетические запасы более эффективно, чем самки, так как отношение длительности жизни при голодании (часы) к массе липидов в тканях тела (мг) у них выше, чем у самок (Sharmila Bharathi *et al.*, 2003). Кроме того, при голодании ответ на стресс у самок и самцов

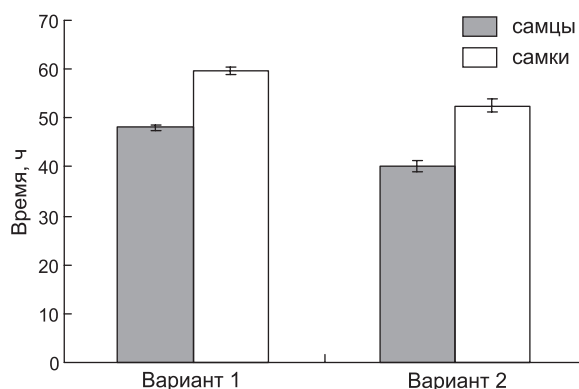


Рис. 2. Средняя продолжительность жизни *D. melanogaster* при голодании в варианте 1 (доступ к влажной вате) и варианте 2 (без прямого доступа к воде).

D. melanogaster различается по уровню экспрессии 715 генов (Harbison *et al.*, 2005). Теми же авторами было установлено, что у самок голодание сопровождается снижением экспрессии генов, вовлеченных в процесс гаметогенеза и молекулярной передачи сигналов, а у самцов – снижением экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию механической чувствительности и полового поведения мух.

После оценки выживаемости *D. melanogaster* в двух вариантах условий голодания нами было исследовано влияние этих двух условий на морфологию репродуктивных органов мух. Для этого яичники *D. melanogaster*, голодавших в течение суток, окрашивали акридиновым оранжевым для выявления клеток, подвергшихся апоптозу. Апоптоз в яичниках самок может происходить в норме в двух контрольных точках: в гермари и в клетках вителлярна на 7–8-й стадии оогенеза (Giorgi, Deri, 1976; Drummond-Barbosa, Spradling, 2001). У самцов в процессе сперматогенеза нет стадий, на которых происходил бы апоптоз ни в нормальных условиях, ни под действием стресса (Gartner *et al.*, 2008). В стандартных лабораторных условиях (мухи содержатся на дрожжевом-агаровом корме) яйцевые трубки яичников *D. melanogaster* имеют типичную морфологию (рис. 3). Среди них

встречаются как яйцевые трубки с клетками, подвергшимися апоптозу, так и не содержащие подобные клетки. Яйцевые трубки, в которых апоптоз отсутствовал, имели зеленую окраску, желтое или оранжевое свечение, характерное для окрашенных акридиновым оранжевым клеток, подвергшихся апоптозу, в них не выявлялось (рис. 3, а). В других яйцевых трубках наблюдались клетки, подвергшиеся апоптозу в гермари и в вителлярна на 7–8-й стадии оогенеза (рис. 3, б).

При голодании мух с доступом к воде морфология яйцевых трубок практически не отличалась от той, что наблюдалась в яичниках мух, содержащихся в стандартных лабораторных условиях (рис. 4, а, б). После голодания в яичниках количество яйцевых камер на 7–8-й стадии оогенеза, подвергшихся апоптозу, увеличилось приблизительно в 2 раза (рис. 4, а). Обнаружено, что через сутки после голодания в условиях высокой влажности без доступа к воде в большом количестве яичников происходят изменения, связанные не только с апоптозом на 7–8-й стадии оогенеза, но и с дегенерацией яйцевых камер на всех стадиях оогенеза (рис. 4, в). Однако в некоторых яичниках яйцевые трубки сохраняли типичную морфологию (рис. 4, г).

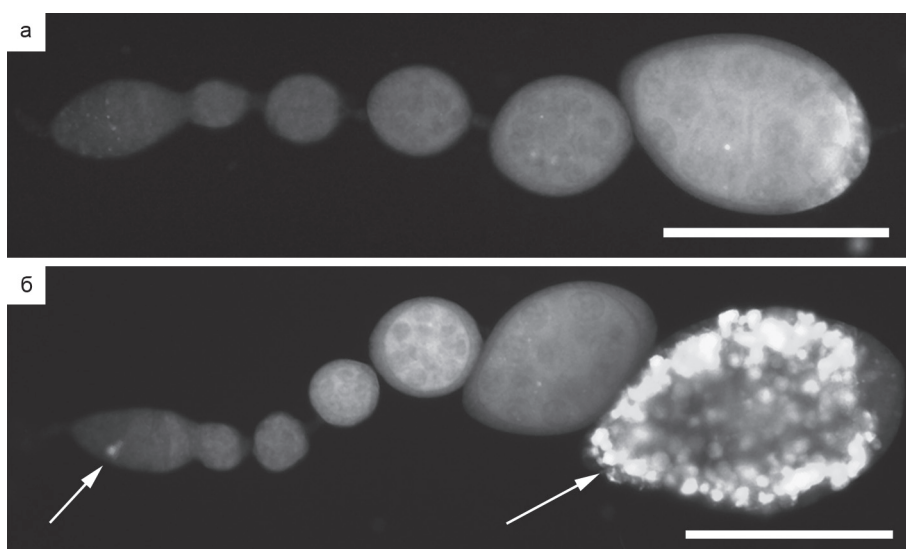


Рис. 3. Морфология яйцевых трубок *D. melanogaster* w1118T, окрашенных акридиновым оранжевым, в яичнике мух, содержащихся в стандартных лабораторных условиях.

а – яйцевая трубка без клеток, подвергшихся апоптозу; б – яйцевая трубка с апоптозом в клетках гермари и вителлярна на 7-й стадии оогенеза. Масштаб: 50 мкм.

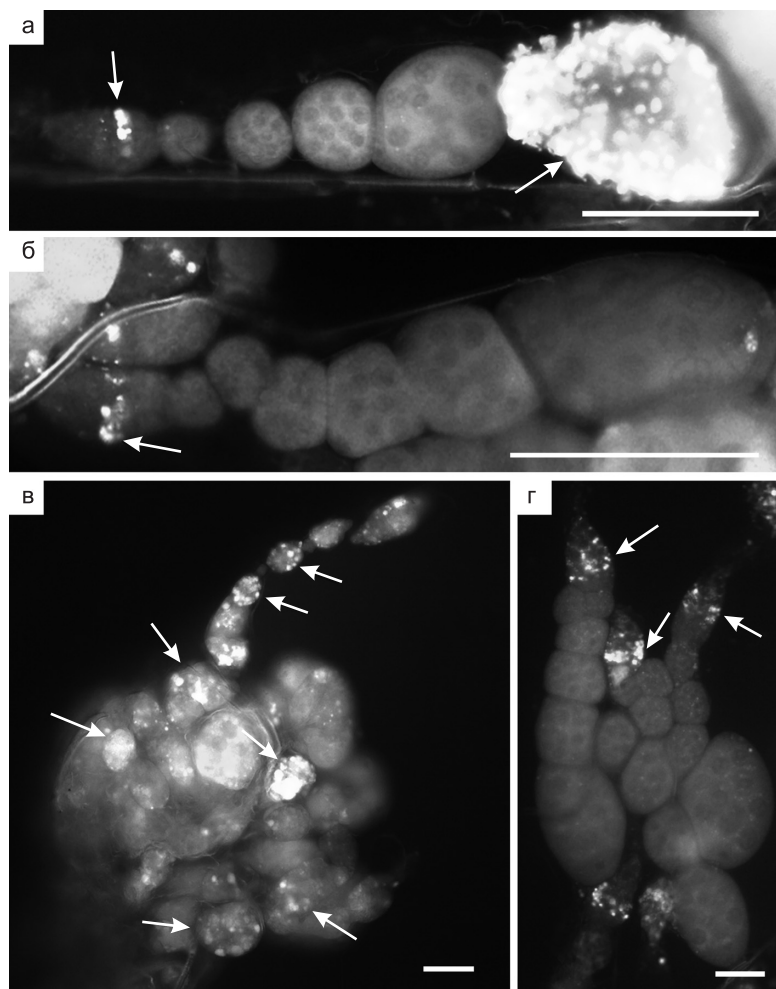


Рис. 4. Морфология яйцевых трубок *D. melanogaster* w1118T, выделенных из яичников мух, голодавших в течение суток (окраска акридиновым оранжевым).

а, б – яйцевые трубки после голодания мух в варианте 1 (с доступом к воде); в, г – яйцевые трубки после голодания мух в варианте 2 (высокая влажность, без доступа к воде). Стрелки указывают на клетки, подвергшиеся апоптозу в гермариин и вителлярии яйцевых трубок. Масштаб: 50 мкм.

Ранее было показано, что количество яйцевых камер, подвергшихся апоптозу на 7–8-й стадии оогенеза *D. melanogaster*, увеличивается при недостатке белкового питания под воздействием на мух излучений с частотой 900 МГц или их обработке различными химическими агентами (Nezis *et al.*, 2000; Drummond-Barbosa, Spradling, 2001; Panagopoulos *et al.*, 2007). Мы показали, что голодание в двух вариантах, включающих либо доступ мух к воде, либо его отсутствие, влияет по-разному на апоптоз в клетках яйцевых камер. Зарегистрирована множественная дегенерация яйцевых камер в яичнике *D. melanogaster* на всех стадиях ооге-

неза в условиях голодания, при которых мухи не имели доступа к воде. Подобные изменения в клетках яичника мух в литературе ранее не были описаны, хотя ряд авторов использовали и продолжают использовать подобные условия голодания в своих экспериментах (Service *et al.*, 1985; Harcombe, Hoffmann, 2004; Hoffmann *et al.*, 2005; Telonis-Scott *et al.*, 2006).

Следует отметить, что использованные нами условия голодания отличаются от экспериментальных условий для изучения засухоустойчивости *D. melanogaster*. Для оценки этого параметра мух не только лишают доступа к воде, но и содержат в присутствии осушите-

ля воздуха, например силикагеля – SiO_2 или хлорида кальция – CaCl_2 (Marron *et al.*, 2003; Sharmila Bharathi *et al.*, 2003). Было показано, что при такой дегидратации воздуха средняя ПЖ *D. melanogaster* значительно ниже, чем в использованных нами условиях голодания: 7,6–9,5 ч для самцов и 13,4–15,6 ч для самок (Service *et al.*, 1985; Matzkin *et al.*, 2009). Таким образом, наш вариант двух условий является промежуточным между условиями голодания мух с непосредственным доступом к воде и при их содержании в сухом воздухе.

Интересно, что признаки устойчивости к двум типам стресса – обезвоживанию и голоданию – связаны между собой. Линии *D. melanogaster*, селективируемые в течение нескольких поколений по признаку засухоустойчивости, демонстрируют также высокую устойчивость к голоданию (Telonis-Scott *et al.*, 2006). В ряде работ было показано, что такие насекомые способны накапливать большее количество гликогена или жиров в тканях (Bradley *et al.*, 1999; Hoffmann *et al.*, 2005; Gefen *et al.*, 2006). Помимо этого была предложена гипотеза о снижении метаболической активности в организме *D. melanogaster* в селективируемых на устойчивость к голоданию линиях (Hoffmann, Parsons, 1989), но дальнейшего подтверждения она не получила (Bradley *et al.*, 1999). Характерным признаком для засухоустойчивых линий мух *D. melanogaster* является более низкая скорость потери воды в воздухе с низкой влажностью. Такое свойство было обнаружено как у селективируемых в лабораторных условиях линий *D. melanogaster* (Bradley *et al.*, 1999), так и при сравнении разных видов *Drosophila*, обитающих в засушливых районах и в районах с умеренной влажностью воздуха (Gibbs, Matzkin, 2001). В то же время при отборе линии мух по признаку устойчивости к голоданию в условиях, подобных нашему варианту 1 (с доступом к воде), показано, что насекомые имели низкий уровень засухоустойчивости, сходный с тем, что наблюдался в контрольной линии, не подвергавшейся какому-либо отбору (Bubliy, Loeschke, 2005). Однако при отборе *D. melanogaster* на устойчивость к голоданию в условиях, подобных нашему варианту 2, насекомые демонстрировали повышенную засухоустойчивость (Hoffmann *et al.*, 2005). Эти данные свидетельствуют о том, что мухи,

селективируемые по признаку устойчивости к голоданию в вариантах 1 и 2, отличаются по засухоустойчивости. Вариант 2 способствует селекции одновременно в двух направлениях – устойчивости к голоданию и засухе.

Что же является причиной дегенерации яйцевых камер в яичниках мух, голодающих в отсутствие доступа к воде? С физической точки зрения как в варианте 1, так и в варианте 2 относительная влажность воздуха через некоторый промежуток времени достигает 100 %, когда замкнутая система воздух–вода в обоих случаях в пробирках приходит в равновесное состояние. Время насыщения воздуха влагой зависит от объема емкости, в которой проводится эксперимент (Плановский и др., 1967). В таких условиях мухи *D. melanogaster* могут терять влагу с поверхности своего тела только на первом этапе эксперимента, но затем при относительной влажности воздуха 100 % они перестают терять влагу за счет испарения. В условиях голодания без доступа к воде мухи используют имеющиеся у них запасы гликогена и жиров, и их организм постепенно обезвоживается. В отличие от этого в варианте 1 при такой же влажности воздуха мухи могут поддерживать свою жизнедеятельность за счет воды, потребляемой из внешней среды. Таким образом, высокая влажность воздуха не является достаточным условием для корректного проведения экспериментов в условиях стресса *D. melanogaster*. Можно предполагать, что причиной наблюдаемых нами нарушений являются изменения метаболических процессов, связанные с обезвоживанием насекомых.

Заключение

Несмотря на то что в недавних работах некоторые исследователи использовали условия голодания *D. melanogaster* в отсутствие доступа мух к воде (Harcombe, Hoffmann, 2004; Hoffmann *et al.*, 2005; Telonis-Scott *et al.*, 2006), следует отметить, что этот метод не является адекватным для анализа действия голодания и других факторов на жизнедеятельность насекомых. В настоящее время многие авторы используют голодание в варианте 1, что обеспечивает получение более достоверных данных по сравнению с вариантом 2 (Harbison *et al.*,

2005; Bauer *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2009). Наши результаты свидетельствуют о высокой чувствительности *D. melanogaster* к недостатку влаги. При исследовании влияния различных стрессовых факторов на *D. melanogaster*, таких, например, как голодание или повышенная температура, необходимо обеспечивать насекомым доступ к воде, так как дефицит влаги может оказать существенное влияние на результаты проводимых экспериментов.

Работа поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие» № 23.30 и грантом РФФИ № 09-04-00872-а.

Литература

- Васильева Л.А. Статистические методы в биологии, медицине и сельском хозяйстве. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2007. 128 с.
- Плановский А.Н., Рамм В.М., Каган С.З. Процессы и аппараты химической технологии. М.: Химия, 1967. 848 с.
- Abrams J.M., White K., Fessler L.I., Steller H. Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis // *Development*. 1993. V. 117. P. 29–43.
- Bauer M., Katzenberger J.D., Hamm A.C. *et al.* Purine and folate metabolism as a potential target of sex-specific nutrient allocation in *Drosophila* and its implication for lifespan-reproduction tradeoff // *Physiol. Genomics*. 2006. V. 25. № 3. P. 393–404.
- Boggs C.L. The role of resource allocation in understanding reproductive patterns // *Individual, populations and patterns in ecology* / Eds S.R. Leather, A.D. Watt, N.J. Mills, K.E.A. Walters. Andover: Intercept Press, 1994. P. 25–33.
- Bradley T.J., Williams A.E., Rose M.R. Physiological responses to selection for desiccation resistance in *Drosophila melanogaster* // *Am. Zool.* 1999. V. 39. P. 337–345.
- Brown A.E., Baumbach J., Cook P.E., Ligoxygakis P. Short-term starvation of immune deficient *Drosophila* improves survival to gram-negative bacterial infections // *PLoS ONE*. 2009. V. 4. № 2. P. e4490.
- Bubliy O.A., Loeschcke V. Correlated responses to selection for stress resistance and longevity in a laboratory population of *Drosophila melanogaster* // *J. Evol. Biol.* 2005. V. 18. P. 789–803.
- Drummond-Barbosa D., Spradling A.C. Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during *Drosophila* oogenesis // *Dev. Biol.* 2001. V. 231. P. 265–278.
- Gartner A., Boag P.R., Blackwell T.K. Germline survival and apoptosis // *WormBook* / Ed. M. Chalfie, J Mendel. 2008. P. 1–20.
- Gefen E., Marlon A.J., Gibbs A.G. Selection for desiccation resistance in adult *Drosophila melanogaster* affects larval development and metabolite accumulation // *J. Exp. Biol.* 2006. V. 209. P. 3293–3300.
- Gibbs A.G., Matzkin L.M. Evolution of water balance in the genus *Drosophila* // *J. Exp. Biol.* 2001. V. 204. P. 2331–2338.
- Giorgi F., Deri P. Cell death in ovarian chambers of *Drosophila melanogaster* // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1976. V. 35. P. 521–533.
- Grotewiel M.S., Martin I., Bhandari P., Cook-Wiens E. Functional senescence in *Drosophila melanogaster* // *Ageing Res. Rev.* 2005. V. 4. P. 372–397.
- Harbison S.T., Chang S., Kamdar K.P., Mackay T.F.C. Quantitative genomics of starvation stress resistance in *Drosophila* // *Genome Biol.* 2005. V. 6. P. R36.
- Harcombe W., Hoffmann A.A. *Wolbachia* effects in *Drosophila melanogaster*: in search of fitness benefits // *J. Invertebr. Pathol.* 2004. V. 87. P. 45–50.
- Harshman L.G., Hoffmann A.A., Clark A.G. Selection for starvation resistance in *Drosophila melanogaster*: Physiological correlates, enzyme activities and multiple stress responses // *J. Evol. Biol.* 1999. V. 12. № 2. P. 370–379.
- Hoffmann A.A., Hallas R., Anderson A.R., Telonis-Scott M. Evidence for a robust sex-specific trade-off between cold resistance and starvation resistance in *Drosophila melanogaster* // *J. Evol. Biol.* 2005. V. 18. P. 804–810.
- Hoffmann A.A., Parsons P.A. Selection for increased desiccation resistance in *Drosophila melanogaster*: additive genetic control and correlated responses for other stresses genetics // *Genetics*. 1989. V. 122. № 4. P. 837–845.
- Lee G., Park J.H. Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. 2004. V. 167. P. 311–323.
- Lints F.A., Bourgeois M., Delalieux A. *et al.* Does the female life span exceed that of the male? A study in *Drosophila melanogaster* // *Gerontology*. 1983. V. 29. № 5. P. 336–352.
- Marron M.T., Markow T.A., Kain K.J., Gibbs A.G. Effects of starvation and desiccation on energy metabolism in desert and mesic *Drosophila* // *J. Insect Physiol.* 2003. V. 49. № 3. P. 261–270.
- Matzkin L.M., Watts T.D., Markow T.A. Evolution of stress resistance in *Drosophila*: interspecific variation in tolerance to desiccation and starvation // *Funct. Ecol.* 2009. V. 23. P. 521–527.
- Mpoke S.S., Wolfe J. Differential staining of apoptotic nuclei in living cells: application to macronuclear elimination in *Tetrahymena* // *J. Histochem. Cyto-*

- chem. 1997. V. 45. № 5. P. 675–683.
- Nezis I.P., Stravopodis D.J., Papassideri I. *et al.* Stage-specific apoptotic patterns during *Drosophila* oogenesis // Eur. J. Cell Biol. 2000. V. 79. № 9. P. 610–620.
- Panagopoulos D.J., Chavdoula E.D., Nezis I.P., Margaritis L.H. Cell death induced by GSM 900-MHz and DCS 1800-MHz mobile telephony radiation // Mutat. Res. 2007. V. 626. P. 69–78.
- Rion S., Kawecki T.J. Evolutionary biology of starvation resistance: what we have learned from *Drosophila* // J. Evol. Biol. 2007. V. 20. № 5. P. 1655–1664.
- Service P.M., Hutchinson E.W., Mackinely M.D., Rose M.R. Resistance to environmental stress in *Drosophila melanogaster* selected for postponed senescence // Physiol. Zool. 1985. V. 58. № 4. P. 380–389.
- Sharmila Bharathi N., Prasad N.G., Shakarad M., Joshi A. Variation in adult life history and stress resistance across five species of *Drosophila* // J. Genet. 2003. V. 82. № 3. P. 191–205. Blackwell Publishing Ltd.
- Telonis-Scott M., Guthridge K.M., Hoffmann A.A. A new set of laboratory-selected *Drosophila melanogaster* lines for the analysis of desiccation resistance: response to selection, physiology and correlated responses // J. Exp. Biol. 2006. V. 209. P. 1837–1847.
- Wayne M.L., Soundararajan U., Harshman L.G. Environmental stress and reproduction in *Drosophila melanogaster*: starvation resistance, ovariole numbers and early age egg production // BMC Evol. Biol. 2006. V. 6. P. 57.
- Wigglesworth V.B. The utilization of reserve substances in *Drosophila* during flight // J. Exp. Biol. 1949. V. 26. № 2. P. 150–163.
- Zera A.J., Harshman L.G. The physiology of life history trade-offs in animals // Annu. Rev. Ecol. Syst. 2001. V. 32. P. 95–126.

INFLUENCE OF STARVATION ON THE LIFESPAN AND APOPTOSIS IN OVARIAN CELLS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

M.V. Zhukova, E.V. Kiseleva

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

Summary

The influence of different experimental conditions of starvation on *Drosophila melanogaster* was compared. Flies of one experimental group were kept with access to wet cotton, whereas the second group was kept in humid air without direct access to water. It was shown that these two starvation conditions were not equivalent. The mean lifespan of *D. melanogaster* without access to water was significantly shorter than in the first group. Degenerative cells at all stages of oogenesis were recorded in acridine orange-stained ovaries of *D. melanogaster* exposed to the conditions of the second experimental variant for twenty-four hours. No such changes were found in the ovaries of flies which had access to water. Apoptosis in the ovaries of such flies was recorded only in two checkpoints located in the germarium and vitelarium on stages 7–8 of oogenesis. The results indicate that it is necessary to provide access of flies to water in order to eliminate the influence of desiccation on *Drosophila* organisms in stress experiments.

Key words: *Drosophila melanogaster*, starvation, lifespan, acridine orange, apoptosis, ovaries.

ПОПУЛЯЦИОННАЯ ГЕНЕТИКА КОЛОРАДСКОГО ЖУКА: ОТ ГЕНОТИПА ДО ФЕНОТИПА

М.Б. Удалов, Г.В. Беньковская

Учреждение РАН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, Уфа, Россия,
e-mail: udalov-m@yandex.ru

Работа посвящена исследованиям, проведенным на популяционном материале колорадского жука. Представлены данные по изучению ДНК, хромосомных, белковых и фенетических маркеров полиморфизма. Приведены сведения о распределении частот встречаемости мутаций, обуславливающих формирование резистентности колорадского жука к инсектицидам. Показана возможность использования молекулярно-генетических методов в оценке уровня неспецифической устойчивости. На основании имеющихся на данный момент данных по полиморфизму колорадского жука обсуждается вопрос его политипичности.

Ключевые слова: колорадский жук, *Leptinotarsa decemlineata* Say, полиморфизм, популяция, кариотип, ДНК, резистентность к инсектицидам, мутации, фенетика.

История формирования современного ареала

Центром происхождения колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say) считают территорию, ограниченную восточными склонами Скалистых гор и северными районами современной Мексики. Здесь произрастают ксерофитные паслёновые (*Solanum rostratum*, *S. cornutum*, *S. carolinense*, *S. angustifolium* и др.), на которых развивается несколько десятков видов жуков рода *Leptinotarsa*, в том числе и *L. decemlineata* (Колорадский картофельный жук ..., 1981; Alyokhin, 2009). Вегетативный период в этой аридной климатической зоне непродолжителен, развитие насекомых-фитофагов длится недолго, вследствие чего их популяции редко достигают значительной численности (Колорадский картофельный жук ..., 1981).

На данный момент нет определенного мнения относительно возраста вида. Имеются предположения о молодости рода *Leptinotarsa* и о том, что ряд видов, в том числе и *L. decemlineata*, дифференцировались недавно. Согласно одной из версий, это произошло в конце XVII–начале XVIII вв. (Tower, 1906). Более правдоподобной кажется точка зрения Р.С. Ушатинской, считавшей, что становление колорадского жука

как вида шло в антропогене, возможно, даже в голоцене (Колорадский картофельный жук ..., 1981). К сожалению, скудные молекулярно-генетические данные пока не позволяют нам судить о возрасте вида (хотя бы приблизительно).

Культурный картофель *S. tuberosum* зародился на Южноамериканском континенте, в Андах, на территории современных Перу и Чили. В Северную Америку картофель завезли только в 1719 г. (Колорадский картофельный жук ..., 1981). Таким образом, формирование *L. decemlineata* как вида шло без взаимодействия с *S. tuberosum*.

Усилившиеся в начале XIX в. миграции населения способствовали переносу дикорастущих пасленовых и расширению ареала многих питающихся ими насекомых. Однако наибольшее преимущество получил вид *L. decemlineata*. В связи с развитием земледелия и освоением западных районов Северной Америки в 40-х годах XIX столетия началось продвижение культурного картофеля *S. tuberosum* на запад. К середине XIX в. плантации картофеля достигли штата Колорадо и распространились вдоль склонов Скалистых гор, где в то время обитал *L. decemlineata*. Первые значительные повреждения картофеля этим жуком были отмечены в штате Небраска в 1855 г. Но особенно большой

ущерб картофелеводству был нанесен в 1859 г. в штате Колорадо, откуда и началось интенсивное расселение жука, получившего название *колорадский картофельный жук* (Яковлев, 1950; Колорадский картофельный жук ..., 1981; Alyokhin, 2009).

Переход колорадского жука на культурный картофель способствовал его интенсивному размножению и расселению, и вскоре жук приобрел значение опасного вредителя культуры картофеля.

После того как в 1874 г. жук, преодолев все преграды на Американском материке, достиг побережья Атлантического океана, возникла реальная опасность завоза его и на другие континенты. Особую опасность этот вредитель представлял для Европы с ее обширными плантациями картофеля и развитыми сетями дорог и мореплаванием. Поэтому карантинной службой торгующих стран был установлен строгий досмотр кораблей, грузов и портов.

Первый незамеченный очаг на Европейском континенте появился у берегов Франции. Предполагается, что в 1916–1918 гг. жук был случайно завезен на американских судах во французский порт Бордо; несмотря на немедленно принятые меры по ликвидации очагов его распространения, уничтожить вредителя полностью не удалось (Feuetaud, 1950). В последующие годы началось расселение колорадского жука на новом для него континенте. Расширение ареала колорадского жука на Европейском континенте шло не только в восточном, в сторону преобладающих ветров, но и в северо-восточном и юго-восточном направлениях; совсем незначительным было продвижение вредителя в северном, южном и юго-западном направлениях (Колорадский картофельный жук ..., 1981).

На территории бывшего СССР первые очаги колорадского жука были отмечены в 1949 г. в Львовской области, но были ликвидированы (Яковлев, 1960; Санин, 1976). Вторичные массовые залеты жука стали происходить с 1953 г. До 1958 г. очаги на территории СССР носили изолированный характер, были малочисленны и ликвидировались. Интенсивное распространение колорадского жука с захватом больших новых территорий наблюдалось в 1975 г., когда заселенная вредителем площадь картофеля составляла 5,35 млн га. Средняя ско-

рость распространения жука на восток в нашей стране в 1975–1977 гг. составляла 50–100 км в год и выше (Колорадский картофельный жук ..., 1981).

Ареал вида за 150 лет расширился более чем в 3 тыс. раз (Фасулати, 2007). На 2009 г. ареал *L. decemlineata* в Северной Америке, Европе и Азии составлял более 16 млн км² (Alyokhin, 2009) против первоначальных 5 тыс. км² (Hare, 1990).

Колорадский жук характеризуется значительным внутривидовым полиморфизмом и экологической пластичностью (Колорадский картофельный жук ..., 1981; Фасулати, 2002). Согласно современному взгляду на популяцию как на единицу эволюции и одновременно единицу управления видами (Яблоков, 1987), очевидна необходимость изучения этого инвазивного вида на популяционном уровне.

Основу для популяционных исследований дает анализ полиморфизма. Развитие понятия «полиморфизм» шло от определения Э. Форда, характеризующего его как «наличие в одном и том же местообитании двух или более дискретно отличающихся внутривидовых форм в таких количественных соотношениях, что самая редкая из них не может поддерживаться лишь давлением повторяющихся мутаций» (Ford, 1940). На молекулярном же уровне организации живой материи полиморфизм трактуется как «наличие в популяции двух или более аллелей одного локуса, встречающегося с ощутимой частотой» (Cavalli-Sforza, Bodmer, 1971). Чаше всего за «ощутимую частоту» принимается частота какого-либо аллеля (либо в более широком понимании какого-либо признака) $\geq 1-5\%$ (Алтухов, 2003; Динамика ..., 2004).

В данном обзоре мы рассмотрим примеры изучения полиморфизма в популяциях колорадского жука на уровне ДНК, хромосомном, белковом и фенетическом. Интересующимся данным вопросом по отношению к другим видам насекомых мы можем рекомендовать ряд как обзорных (Feyereisen, 1995; Roderick, 1996; French-Constant *et al.*, 1998, 2004; Loxdale, Lushai, 1998; Удалов и др., 2003, 2009; Li, 2007), так и практически неподдающееся учету число экспериментальных работ (Sheppard, Berlocher, 1984; Корсун, 1994; Koulianos, Crozier, 1997; Блехман, 2007; Ваулин, Захаров, 2008; Киль, Исмаилов, 2009; Ваулин, Новиков,

2010; Гундерина, Кикнадзе, 2010; Obruski *et al.*, 2001 и др.).

В последние десятилетия в связи с развитием методов молекулярной биологии появилась возможность использовать молекулярные маркеры (фрагменты ДНК) для различного рода исследований от филогении и систематики до анализа количественных признаков, внутри- и межвидового полиморфизма и т. п. В зависимости от способа получения и метода анализа выделяют несколько типов молекулярных маркеров.

Маркеры, полученные в ходе рестрикционного анализа

Метод ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов, RFLP – restriction fragment length polymorphism) заключается в разрезании выделенной ДНК специальными ферментами – рестриктазами – по характерному для каждого фермента сайту рестрикции, состоящему из 4–10 пар нуклеотидов. Полученные в ходе рестрикции фрагменты ДНК разделяют в ходе электрофореза и анализируют по положению зон. Размер рестриктных фрагментов, а также их наличие или отсутствие могут различаться вследствие, например, замены одного или нескольких нуклеотидов, приведшей к появлению или потере сайта рестрикции. Также изменение размера фрагментов может происходить в результате инсерций (вставок) или делеций (выпадения) участков ДНК.

Методом ПДРФ было положено начало изучению полиморфизма митохондриальной ДНК (мтДНК) *L. decemlineata* (Azeredo-Espin *et al.*, 1991; 1996). При этом рестрикции 15 ферментами подвергались препараты очищенной мтДНК из популяций США и Мексики. Размер мтДНК предварительно оценен в 20 т.п.н. Три рестриктазы (*EcoRI*, *HpaI* и *PstI*) позволили дискриминировать полиморфизм мтДНК: было выделено 16 митотипов, в том числе один митотип, характерный для гетероплазмии (Azeredo-Espin, 1996). Наибольшим полиморфизмом отличалась популяция из Техаса, в которой встречалось 14 митотипов, наименьшим – популяции из Вашингтона, Огайо и Майна – по 1 митотипу. В двух популяциях (Техаса и Мерилленда) встречались особи с наличием гетероплазмии.

Секвенирование

В ходе секвенирования определяют нуклеотидную последовательность интересующего исследователя участка нуклеиновой кислоты. Более подробно о данном методе можно узнать в работах Т. Маниатис с соавт. (1984), А.В. Чемерис с соавт. (1999). К сожалению, при всей мощности и функциональности данного метода популяционные исследования отражены только в двух работах, посвященных колорадскому жуку (Grapputo *et al.*, 2005; Udalov, Benkovskaya, 2010a).

Секвенирование 109 образцов фрагмента мтДНК колорадского жука, содержащего 3'-конец гена *coxI* – tRNA^{Ley} – 5'-конец гена *coxII* из 13 североамериканских и европейских популяций, позволило выделить 20 различных митотипов, 3 из которых представлены в нескольких популяциях, а остальные присутствовали только в отдельных популяциях (Grapputo *et al.*, 2005). Интересно, что во всех 8 обследованных европейских популяциях был представлен только 1 митотип, он же был фиксирован и в популяции Айдахо, США (Grapputo *et al.*, 2005). Авторами делается вывод о том, что территория европейской части ареала была заселена в ходе одной успешной инвазии.

Нами были просеквенированы образцы из 5 локальных популяций колорадского жука с территории Башкортостана (Udalov, Benkovskaya, 2010a). Было отмечено 11 нуклеотидных отличий от последовательности, уже имеющейся в базе данных GeneBank (Ass. No AY165708; Hebert *et al.*, 2003). Почти все они, приходясь на третий нуклеотид в кодоне, не повлияли на изменение аминокислотного состава вследствие вырожденности генетического кода. И лишь одна замена 59G > C в последовательности, полученной для образца из одной локальной популяции (Дедово), привела к аминокислотной замене Gly/Ala.

Последующее сравнение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *coxI* колорадского жука южноуральской популяции с имеющимися в базе данных DDBJ/EMBL/GenBank соответствующими фрагментами гена близких видов рода *Leptinotarsa* – *L. haldemani* (Acc.No DQ459377), *L. juncta* (Acc.No AY532655 и AY532656) и *Zygogramma piceicollis* (Acc.

Но AY171413) показало, что наиболее близки между собой оказались особи *L. decemlineata* с Южного Урала, к которым примыкает североамериканский образец данного вида. Наиболее обособленным оказался представитель вида *Z. piceicollis*. Деление на кластеры особей колорадского жука из южноуральских и североамериканских популяций может служить, на наш взгляд, еще одним подтверждением гипотезы об интенсивных микроэволюционных процессах во всем ареале вида (Фасулати, 1993; Вилкова, Фасулати, 2000; Удалов, 2010; Udalov, Benkovskaya, 2010b).

Полимеразная цепная реакция

Маркеры, полученные в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР, PCR – polymerase chain reaction), получили широкое распространение в различных областях исследований, от систематики и филогении до криминалистики и судебной медицины. Метод ПЦР разработал Кэри Бэнк Муллис в 1985 г. (Saiki *et al.*, 1988), за что он и был удостоен Нобелевской премии по химии в 1993 г.

В ходе ПЦР происходит синтез (амплификация) *in vitro* определенных участков ДНК, фланкируемых используемыми праймерами – небольшими затравочными фрагментами ДНК. Полученные в ходе первых циклов реакции ПЦР-продукты служат матрицами в последующих циклах синтеза, вследствие чего число копий амплифицируемой последовательности увеличивается в геометрической прогрессии. Таким образом, присутствие в образце интересующей нас последовательности даже в минимальном количестве (одна или несколько копий) легко выявляется с помощью данного метода.

В зависимости от типа выявляемых ДНК-маркеров различают несколько методов ПЦР.

Метод RAPD-PCR (случайно амплифицируемая полиморфная ДНК, RAPD-PCR – random amplified polymorphic DNA) заключается в синтезе в ходе ПЦР фрагментов ДНК, инициированных произвольно выбранным праймером длиной обычно 10 нуклеотидов (Williams *et al.*, 1993). Электрофоретические спектры полученных при RAPD фрагментов позволяют (после должной статистической обработки) получить информацию об уровне внутри- и

межпопуляционного полиморфизма. При проведении RAPD не нужно заранее знать, какие конкретно последовательности ДНК предстоит амплифицировать. Количество и размер амплифицированных фрагментов зависят от длины и последовательности выбранного праймера, а сайты связывания праймеров случайно распределены по всему геному.

С помощью метода RAPD была предпринята попытка анализа полиморфизма в популяциях колорадского жука (Сидоренко и др., 2000, 2002). Анализировались по 4–6 особей из 4 географически удаленных популяций – киевской (2 точки сбора), московской и курганской. К сожалению, полученные на единичных образцах результаты не позволяют сделать однозначный вывод об уровне как внутривидового, так и межпопуляционного полиморфизма.

Метод AFLP (amplified fragment length polymorphism) основан на избирательной амплификации фрагментов, получаемых при рестрикции геномной ДНК. В этом случае после рестрикции ДНК и связывания «липких» концов фрагментов с олигонуклеотидными адаптерами с помощью лигазы проводят селективную ПЦР-амплификацию полученных рестрикционных фрагментов. (Динамика ..., 2004). Полиморфизм полученных при AFLP спектров фрагментов определяется полиморфизмом рестрикционных сайтов и проявляется в наличии или отсутствии полос в геле после электрофореза. Данный метод обладает высокой разрешающей способностью и в отличие от RAPD хорошей воспроизводимостью результатов (Mueller, Wolfenbarger, 1999).

В работе по анализу ядерного генома колорадского жука методом AFLP было получено 297 фрагментов длиной от 50 до 220 п.о. (Grapputo *et al.*, 2005), из них 99 % были полиморфными. Кластеризация на основе генетических расстояний D (Nei, 1972) показала как наличие значительной удаленности европейских популяций от североамериканских, так и наличие двух хорошо дифференцированных групп среди европейских образцов – западных (Испания, Франция, Италия) и восточных (Польша, Эстония, Финляндия и Россия) групп популяций. Европейские популяции характеризовались некоторым снижением уровня полиморфизма – 48 % против 67 % полиморфных локусов в

североамериканских популяциях, а также меньшим значением ожидаемой гетерозиготности (Grapputo *et al.*, 2005).

Микросателлитные повторы

Маркеры на основе микросателлитных повторов используются для работы на целом ряде объектов, относящихся к типу Arthropoda. Микросателлитные повторы представляют собой повторяющиеся копии длиной от 1 до 6 нуклеотидов, микросателлитный локус может насчитывать от 10 до 100 повторов (Животовский, 2006). Индивидуальные аллели этих локусов отличаются друг от друга числом tandemно повторяющихся копий.

Микросателлиты широко применяются в качестве генетических маркеров для изучения ряда биологических видов, чему способствуют следующие особенности этих маркеров: а) они в большом количестве рассеяны по всему геному; б) локализованы они в основном в некодирующих областях генома и, следовательно, селективно нейтральны (правда, не всегда); в) микросателлиты характеризуются менделевским кодоминантным характером наследования; г) возможен автоматизированный анализ микросателлитов (Алтухов, 2003).

Существует пока только одна работа, положившая начало изучению микросателлитных повторов в геноме колорадского жука (Grapputo, 2006). Было выделено 11 микросателлитных повторов, являющихся полиморфными в популяциях колорадского жука (проанализированы выборки из популяций России, Эстонии и США). Приведем в качестве примера микросателлитный локус *LdAC5-22* (GenBank Ass. No DQ424877), коровая последовательность которого (TCGT)₅. Данный микросателлит в геноме колорадского жука может быть представлен числом от 2 (TCGT-TCGT) до 5 повторов (TCGT-TCGT-TCGT-TCGT-TCGT) и варьироваться при амплификации в ПЦР от 147 до 160 п.н. в длину. Статистическая обработка полученных данных (число аллелей на локус, соответствие равновесию Харди-Вайнберга, соотношение ожидаемых и наблюдаемых гетерозигот) позволяет в дальнейшем использовать выделенные 11 микросателлитных повторов как в качестве маркеров генетических процессов

в популяциях колорадского жука, так и для установления путей заселения территории его ареала (Grapputo, 2006).

Резистентность колорадского жука к инсектицидам

Выше уже упоминалось о сравнительной молодости *L. decemlineata* и его значительном внутривидовом полиморфизме. Как следствие колорадский жук отличается поразительной экологической пластичностью и приспособляемостью (Колорадский картофельный жук ..., 1981; Фасулати, 2002). Все это позволяет ему успешно адаптироваться к биотическим и абиотическим факторам и к антропогенным воздействиям. Так, у колорадского жука развилась резистентность к почти всем используемым на настоящий момент и применявшимся ранее инсектицидам на всем его ареале на территории России и стран СНГ, Евразийского и Американского континентов.

По данным, представленным в международной базе данных (The Database ..., 2011), колорадский жук приобрел устойчивость к 51 препарату из различных классов инсектицидов в 46 регионах мира, хотя, с нашей точки зрения, анализ литературы позволяет несколько увеличить последнюю цифру. Так, Россия в данный список до сих пор не включена, хотя экспериментальных публикаций (в том числе и англоязычных) о резистентности колорадского жука к инсектицидам в России в научной литературе более чем достаточно (Leontieva *et al.*, 2006; Benkovskaya *et al.*, 2006, 2009; Sukhoruchenko, Dolzhenko, 2008; Udalov, Benkovskaya, 2008a, b, 2010b).

Развитие резистентности к инсектицидам в популяциях колорадского жука приводит к увеличению норм расхода препаратов и количества обработок (Рославцева, 2009). Это увеличивает себестоимость конечной продукции, приводит к загрязнению окружающей среды, нарушению равновесия в биоценозах вообще и агроценозах в частности. Формируется кросс-резистентность – устойчивость вредителя к препаратам из разных классов. Так, интенсивные обработки фосфорорганическими инсектицидами в 1980-х гг. и пиретроидами в 1990-х гг. в Ростовской области привели к формированию попу-

ляций с перекрестной резистентностью между препаратами обоих классов (Вилкова, 2005).

Распространение устойчивости к различным инсектицидам в популяциях колорадского жука по скорости превосходит все прогнозы (Вилкова и др., 2005). Объяснить это можно отбором особей, обладающих как специфической, так и неспецифической устойчивостью, к тому же отличающихся высоким уровнем приспособленности в полном смысле этого слова – способных оставить наибольшее количество жизнеспособного потомства (Шмальгаузен, 1968; Солбриг О., Солбриг Д., 1982). Выявленные в локальных популяциях вида на территории Республики Башкортостан эффекты стимуляции жизнеспособности отдельных особей не только сублетальными, но и летальными дозами инсектицидов из различных классов могут вносить заметный вклад в формирование и распространение устойчивости (Беньковская и др., 2010).

Мы рассмотрим как исследования уровня специфической устойчивости, так и неспецифическую устойчивость, вклад которой в формирование резистентных популяций насекомых, по-видимому, до сих пор недооценивали.

Резистентность к фосфорорганическим инсектицидам (ФОИ)

Известно, что один из основных механизмов резистентности насекомых к ФОИ – снижение чувствительности к действию инсектицидов у мутантной формы ацетилхолинэстеразы (AChE) (Feyereisen, 1995; French-Constant *et al.*, 1998). На молекулярном уровне это обусловлено нуклеотидными и, как следствие, аминокислотными мутациями в гене *AChE*, выявленными в резистентных генотипах. Так, в гене *AChE* резистентных линий плодовой мушки дрозофилы отмечено 5 нуклеотидных мутаций в 4 положениях (Mutero *et al.*, 1994), в гомологичном гене комнатной мухи – 4 мутации (Williamson *et al.*, 1996).

Нечувствительность AChE колорадского жука к ФОИ связана с нуклеотидной заменой аденина на гуанин в положении 980 от начала гена, что приводит к замене аминокислоты серин на глицин в положении 291 (Zhu, Clark, 1997; Zhu *et al.*, 1996). Та же мутация в несколь-

ко некорректной форме (мутация аспарагина в глутамин в локусе 980 ацетилхолинэстеразы) упоминается в обзоре «Исследование популяций колорадского жука» (Рославцева, Диденко, 2010).

Для изучения данного полиморфизма в популяциях колорадского жука используют метод двунаправленной ПЦР-амплификации специфических аллелей (bi-PASA, bi-directional PCR amplification of specific allele) (Liu *et al.*, 1997). Данный метод позволяет идентифицировать как чувствительные/резистентные гомозиготные аллели SS и RR, так и гетерозиготные SR (Clark *et al.*, 2001). Данным методом изучается полиморфизм колорадского жука в популяциях США (Clark *et al.*, 2001), России (Беньковская и др., 2008б; Udalov, Benkovskaya, 2008) и Чехии (Zichova *et al.*, 2010).

В популяциях США были генотипированы три возможных аллельных состояния (SS, RR и SR) фрагмента гена *AChE* (Clark *et al.*, 2001). В популяциях Чехии была отмечена преобладающая частота резистентных аллелей RR от 52,9 до 66,7 % в зависимости от популяции, а в одной из популяций – Литомерице – частота SS аллеля оказалась равна нулю (Zichova *et al.*, 2010).

Нами было проведено ДНК-типирование образцов колорадского жука в одной из локальных популяций Уфимского района Башкортостана. Данная популяция была выбрана как модельная, поскольку для нее установлен высокий уровень множественной резистентности не только к децису и карбофосу, но и к неоникотиноидам (Беньковская и др., 2008а; Benkovskaya *et al.*, 2009). Из трех возможных аллельных состояний (SS, RR и SR) фрагмента гена *AChE* были идентифицированы резистентные гомозиготные аллели RR и гетерозиготы SR. Нами было сделано предположение, что долговременные обработки ФОИ на начальном этапе расселения колорадского жука по территории Башкортостана оказали селективное влияние, элиминируя особей с чувствительными генотипами – гомозиготные чувствительные аллели дикого типа SS пока обнаружены не были (Беньковская и др., 2008б). Однако для подтверждения этой гипотезы необходимы дальнейшие исследования, направленные на изучение распределения аллелей *AChE* в онтогенезе вида.

Резистентность к пиретроидам

Широкое применение с середины 1970-х годов пиретроидов (Мигранов, 1994; Thacker, 2002) привело к возникновению резистентных к ним популяций клещей и насекомых. В настоящее время известно более 55 видов членистоногих, устойчивых как к природным пиретринам, так и к синтетическим пиретроидам (Thacker, 2002; The Database ..., 2011). Колорадский жук был одним из первых насекомых, у которых была отмечена устойчивость к ДДТ, перметрину и другим пиретроидам (Alyokhin, 2009).

Основная причина резистентности к пиретроидам (и ДДТ) – снижение чувствительности нервной системы (Williamson *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1999). Впервые этот механизм был обнаружен у комнатной мухи *Musca domestica* L. Выявлен ответственный за это ген *kdr* (knockdown resistance). У комнатной мухи он расположен на аутосомной хромосоме 3 (Перегуда, 1985; Metcalf, 1989), у колорадского жука – на половой X-хромосоме (Hawthorne, 2001).

В основе молекулярных механизмов резистентности к пиретроидным инсектицидам у насекомых лежат нуклеотидные мутации в гене электрончувствительного натриевого канала (voltage-sensitive sodium channel, *Vssc1*) (Williamson *et al.*, 1996). У колорадского жука была выявлена замена цитозина на тимин в 6 сегменте II домена (IIS6) α -субъединицы электрончувствительного натриевого канала *LdVssc1*. Нуклеотидная мутация приводит к замене аминокислоты лейцин на фенилаланин (Lee *et al.*, 1999).

Для изучения полиморфизма фрагмента гена *LdVssc1* в популяциях колорадского жука также используется метод bi-PASA. По наличию данного полиморфизма изучаются популяции колорадского жука в США (Clark *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005) и Чехии (Zichova *et al.*, 2010).

Так, в 16 популяциях США были генотипированы три возможных аллельных состояния (SS, RR и SR) фрагмента гена *LdVssc1*, причем не всегда генотипический статус популяции совпадал с уровнем фенотипической резистентности. Так, в популяции Делавера, характеризующейся высоким уровнем резистентности к инсектицидам (63 % выживших после токсикологических обработок), частота резистентных аллелей со-

ставляла всего 33 % (Kim *et al.*, 2005). Возможно, у особей данной популяции резистентность к пиретроидам обусловлена другими механизмами, например, такими, как снижение активности цитохром P450 монооксигеназы (Argentine *et al.*, 1995). Обратная ситуация: в популяции Миннесоты (низкий уровень фенотипической устойчивости к пиретроидам, всего 11 % выживших после обработок) частота резистентного аллеля составила 67 % (Kim *et al.*, 2005). На наш взгляд, значительные расхождения между данными токсикологических и молекулярно-генетических исследований происходят еще и вследствие малого числа генотипированных особей: по 3–6 особей из популяции.

В Чехии частота резистентных аллелей колебалась в диапазоне от 20,0 до 22,9 % в зависимости от локальной популяции и года сбора образцов (Zichova *et al.*, 2010).

Молекулярные маркеры неспецифической устойчивости колорадского жука

Неспецифическая устойчивость у насекомых и, в частности, у колорадского жука, обусловлена большим количеством разнообразных механизмов. Несмотря на то что данных о молекулярных маркерах неспецифической устойчивости крайне мало, следует обратить внимание на тенденции в исследованиях такого рода. В этом обзоре мы приводим данные о двух наиболее важных компонентах неспецифической устойчивости и генетических системах, их обеспечивающих. Это способность к различным формам покоя – от кратковременного летнего сна до суперпаузы, длящейся до 3–5 лет (Колорадский картофельный жук ..., 1982), а также барьерные механизмы, в первую очередь, покровы и особенности их структуры и функции. Здесь следует отметить и барьерную функцию жирового тела, и детоксицирующую систему, но для этих случаев грань между неспецифической и специфической устойчивостью условна.

Долгая диапауза на имагинальной стадии дает основание считать колорадского жука хорошей моделью для исследований механизмов старения и долголетия (Peferoen *et al.*, 1981). В то же время диапауза является приспособлением, позволяющим легче осваивать новые для вида территории (Biever, Chauvin, 1990). Кроме

всего перечисленного, долгая диапауза позволяет виду восстанавливать свою численность в популяции после прохождения бутылочного горлышка, допустим, в результате обработок инсектицидами. Показанная в работе М. Peferoen с соавт. (1981) равная для диапаузирующих и недиапаузирующих особей возможность достаточно долго жить в лабораторных условиях доказывает существование генетических основ полиморфизма этого признака и подтверждает наличие регуляторных механизмов, переключающих программы поведения и динамики состояния в наибольшем соответствии с изменяющимися условиями.

Подходы к оценке полиморфизма имаго по способности к диапаузе основаны не столько на поиске полиморфных локусов генов, сколько на оценке уровня экспрессии генов, участвующих в регуляции наступления диапаузы, поддержания диапаузного покоя и выхода из диапаузы. Различия уровней экспрессии между имаго, находящимися в состоянии преддиапаузы (живущими в условиях короткого светового дня) и в состоянии нормальной репродуктивной активности, были установлены для генов эстеразы ювенильного гормона *JHE* (Vermunt *et al.*, 1997, 1999), диапаузного протеина 1 (*Dp-1*) и вителлогенина (*Vg*) (De Kort *et al.*, 1997), причем было выявлено влияние инсектицида (пирипроксифен) на экспрессию генов *Dp-1* и *Vg*.

Эти работы были продолжены исследованием экспрессии генов семейства *Hsp70*. Из популяций Северной Дакоты (США) была взята выборка, содержащаяся в дальнейшем в лабораторных условиях. Она была разделена на диапаузирующую и недиапаузирующую линии с помощью метода фотопериодической дифференциации (Yocum, 2001). Удалось выяснить, что экспрессия генов *Hsp70A* и *Hsp70B* изменяется в этих линиях под влиянием условий окружающей среды различным образом. Несколько позже были выделены и охарактеризованы гены, кодирующие продукты, участвующие в регуляции наступления диапаузы – *LdDAT-1*, *LdDAT-2* и *LdDAT-3* (Yocum, 2003). В этих экспериментах объектом служила та же лабораторная культура колорадского жука, и было высказано утверждение о том, что в полевых условиях уровни экспрессии генов, ассоциируемых с диапаузой, будут сильно отличаться

от тех, которые наблюдались в лабораторных условиях.

Использование дифференциального дисплея позволило выделить 55 транскриптов с различными уровнями регуляции экспрессии (Yocum *et al.*, 2009). Наконец, на основе всей предшествовавшей работы был создан и проверен на популяции колорадского жука из Северной Дакоты протокол мультиплексной ПЦР. Мониторинг состояния имаго (по готовности к диапаузе, инициации вхождения в нее, продолжающейся и завершающейся диапаузы) выявил значительный внутривидовой полиморфизм (Yocum *et al.*, 2010) по экспрессионным профилям 5 генов, участвующих в регуляции диапаузы (*DP-1*, сериновая протеаза, цистеиновая протеаза, *DAT-2*, *DAT-3*).

Анализ экспрессии генов дал возможность установить новые факты, характеризующие роль барьерной функции покровов имаго и существующий на этой основе популяционный полиморфизм колорадского жука. Различия в экспрессии генов, кодирующих кутикулярные протеины, между особями чувствительной и резистентной к действию азинфосметила линий выявлены на стадии имаго (Zhang *et al.*, 2008). Эти различия свидетельствуют о существующем механизме регуляции экспрессии генов, еще не изученном у нашего объекта. Способность к регуляции экспрессии генов кутикулярных белков на стадии взрослого насекомого сама по себе является примером адаптации как к резким изменениям температурных условий, так и к воздействию токсикантов.

Хромосомный полиморфизм

Кариотип колорадского жука состоит из 17 аутосомных хромосом, пол у данного вида определяется по типу Protenor, т. е. наличием двух (XX) половых хромосом у самок или одной (X0) – у самцов (Hsiao T., Hsiao C., 1983).

Хромосомный анализ особей *L. decemlineata* из популяций США (Аризона и Юта) и Мексики (Морейоз) показал существование двух хромосомных «рас» по наличию перичентрической инверсии во второй аутосомной хромосоме. Эта инверсия является стабильной и характеризуется менделевским расщеплением в потомстве F₂ (Hsiao T., Hsiao C., 1983).

По числу хиазм на клетку популяции колорадского жука достоверно не различались, однако процент бивалентов с более чем одной хиазмой в мексиканской популяции (7,6 %) был несколько меньше, чем в популяциях США (9,3 и 11,0 %) (Hsiao T., Hsiao C., 1983).

Аллозимный полиморфизм

До недавнего момента анализ полиморфизма в популяциях животных вообще и членистоногих в частности проводили на основе регистрации белкового полиморфизма (см. например Messier, Mitton, 1996; Krafur, 1999; Brown *et al.*, 2000), когда электрофоретические характеристики белков являются маркерами генотипического состава популяционных групп вида. При этом идет сравнение биохимических особенностей разных популяций и детальное изучение в одной и той же популяции. Выборки сравнивают как по частотам определенных электроморф, так и по их набору (Яблоков, 1987; Кайданов, 1996; Динамика ..., 2004).

Аллозимному полиморфизму в популяциях колорадского жука посвящены пока только две работы (Jacobson, Hsiao, 1983; Krafur, 1999). Первая работа нам более интересна, так как в ней рассматривается полиморфизм в 12 популяциях колорадского жука США, Мексики и Европы. Из 11 изоцимов 3 были мономорфны в различных популяциях. Наиболее интересные результаты были получены для супероксиддисмутазы. Уровень гетерозиготности в мексиканской популяции оказался значительно ниже, чем в остальных 11. Средняя гетерозиготность по всем популяциям составила 0,206, что значительно выше такового значения для других видов насекомых (0,151) (Hartl, 1980), но хорошо соотносится с данными по другим видам жесткокрылых.

Генетические расстояния D между мексиканской и остальными 11 изучаемыми европейскими и североамериканскими популяциями колорадского жука, рассчитанные по этому локусу, оказались равны 0,212 (Jacobson, Hsiao, 1983). Эта величина оказалась «соответствующей» генетическим дистанциям между подвидами *Drosophila* (Ayala, 1975). Генетическая дистанция между *L. decemlineata* и близким видом *L. haldemani* равна 0,439. Возможно, подобные генетические различия между мексиканской и

остальными популяциями колорадского жука сложились в результате их раздельной эволюции, начавшейся с перехода колорадского жука на питание культурным картофелем и продолжающейся по сей день в течение 150 лет.

В работе E.S. Krafur (1999) показаны еще 8 ферментов (формальдегид-дегидрогеназа, дегидратаза оксикислот, изоцитрат-дегидрогеназа, малат-дегидрогеназа, фосфоглюкоизомераза, 6-фосфоглюкодегидрогеназа, фосфоглюкомутаза и трегалаза), представленных в популяциях колорадского жука в виде полиморфных локусов и перспективных для использования в популяционных исследованиях в качестве генетических маркеров.

Маркеры белкового полиморфизма используются не только для исследования межпопуляционных различий. Так, внутривидовой полиморфизм по аллелям фосфоглюкомутаза был в качестве нейтрального маркера привлечен к выяснению вопроса о значении конкуренции спермы и количества спариваний в лабораторной линии колорадского жука, производной от популяции вида в штате Калифорния (США), в которой соотношение аллелей фосфоглюкомутаза А и В составляло 0,68 и 0,32 (Roderick *et al.*, 2003).

Электрофоретический спектр эстераз кишечника колорадского жука демонстрирует высокий уровень полиморфизма, обусловленного индуцибельностью отдельных изоформ. Голодание, питание непривычным кормом диагностировали по характерным профилям изоферментных спектров (Хролинский, Хомяк, 1978). В качестве популяционных характеристик опробованы также физико-химические параметры и уровни активности ряда ферментов – каталазы (Кубайчук, 1982), системы ферментов детоксикации (Неделькина и др., 1988), пищеварительных гидролаз (Умаров, 2009).

Фенетический полиморфизм

Изначально в классической популяционной генетике работы по изучению внутривидового полиморфизма насекомых строились на данных изучения фенотипов.

По А.В. Яблокову (1987), фенами называют «любые дискретные альтернативные вариации признаков и свойств особей, которые на всем

имеющемся материале (обязательно многочисленном) далее неподразделимы без потери качества. Фены всегда отражают генетическую конституцию данной особи, а своей частотой – генетическую структуру популяции и других... групп особей данного вида».

Работы по изучению фенетического полиморфизма колорадского жука были начаты еще в начале XX в. (Tower, 1903), что, кстати, позволило автору как создать один из первых видовых каталогов рода *Leptinotarsa*, так и разработать филогению данного рода (Tower, 1906), во многом неоднозначную и спорную, но оставшуюся непременной до работы «Колорадский картофельный жук» (1981).

В качестве дискретно изменяющихся признаков – фенов – у колорадского жука выделяют вариабельность рисунка частей тела имаго и личинок, жилкование крыльев, окраску яиц. Из всего этого разнообразия чаще всего используются фены рисунка частей тела имаго, в частности фены темени, затылка, передне-спинки и надкрыльев (Фасулати, 1985, 1993, 2002; Ерёмкина, Денисова, 1987; Климец, 1988; Зелеев, 2002; Беньковская и др., 2004, 2008а; Удалов и др., 2010). Для ряда признаков показана эколого-генетическая детерминация в наследовании (Овчинникова, Маркелов, 1982; Гриценко и др., 1998).

Фены передне-спинки (пронотума) были использованы для анализа полиморфизма колорадского жука в Саратовской области (Ерёмкина, Денисова, 1987). Авторами показаны различия в частотах определенных вариаций из разных выборок рассматриваемой территории, а также динамика фенов за ряд лет.

В Липецкой области на основе изучения рисунка было выделено две группы популяций: западная и восточная, граница между которыми совпадает с границей агроклиматических районов (Овчинникова, Маркелов, 1982).

На основе 9 вариаций фена рисунка передне-спинки имаго на территории Восточно-Европейской равнины было выделено не менее 5 популяционных комплексов колорадского жука, а также смежный с ними западноказахстанский и изолированный от основного ареала среднеазиатский комплекс (Методические рекомендации..., 1993). У 5 восточноевропейских комплексов прослеживается четкая географическая

изменчивость частот встречаемости почти всех типов и признаков морф. В популяциях Казахстана и Средней Азии эти закономерности не выявлены, что позволяет говорить о возникновении новой, восточной, ветви микроэволюции колорадского жука на основе адаптаций к специфическим условиям картофелеводства в этих районах (Фасулати, 1993). Таксономический статус этих 7 популяционных комплексов колорадского жука до сих пор не уточнен. По мнению С.Р. Фасулати (1993), они, «... видимо, близки к географическим расам по классификации К.М. Завадского...».

Следует отметить, что работы, давшие материал для выделения данных популяционных комплексов, проводились в 1980-е гг. (Фасулати, 1985). Очевидно, что в популяции такого полиморфного вида, как колорадский жук, за прошедшие 20 лет должны были произойти изменения, которые, скорее всего, привели к изменению генетической и, как следствие, фенетической структуры популяций. В качестве примеров можно привести работы, показывающие изменения соотношений частот фенов за продолжительный период времени. В частности, показано отличие этих соотношений «приказанской» популяции от значений частот, полученных в свое время С.Р. Фасулати (Зелеев, 2002). То же самое отмечено для «псковско-новгородской» группы популяций (Калинина, 2007). Отмечены различия в соотношениях частот фенов, определенных с разницей в 10 лет в ряде выборок с территории Башкортостана (Беньковская и др., 2004).

Все это может быть свидетельством активных микроэволюционных процессов в ареале колорадского жука (Кохманюк, 1981; Фасулати, 1993; Вилкова, Фасулати, 2000; Вилкова и др., 2005; Удалов и др., 2008). Были показаны различия между особями из североамериканских и европейских популяций по полиморфизму других фенов рисунка. Так, фен L (желтоватая или бурая продольная полоса на передне-спинке) присутствует в европейских популяциях и отсутствует в североамериканских. Фены H (точка в боковом поле пронотума) и G (поперечная полоса на задних краях пронотума) встречаются у жуков Северной Америки и отсутствуют в европейских популяциях. Авторы объясняют отсутствие фенов H и G в европейских по-

пуляциях дрейфом генов, а наличие фена L – появлением в геноме европейских популяций новой мутации или изменением экспрессии гена (Кохманюк, 1982).

Результаты наших исследований, проводившихся в течение последних двух десятилетий на Южном Урале (территория Башкортостана), показали подразделенность популяции колорадского жука как минимум на две группы локальных популяций. Такое деление характерно для структуры популяции по всем рассмотренным 4 типам фенов – как для темени и затылка, так и для пронотума и элитр. Это, на наш взгляд, говорит о неслучайности отмеченной нами структурированности групп популяций. В целом на территории Башкортостана можно выделить две крупные внутривидовые группы, включающие в себя: (а) локальные популяции в центре рассматриваемой территории и (б) локальные популяции, большая часть которых представлена на периферии (Удалов и др., 2010).

В Башкортостане колорадский жук впервые был обнаружен в 1976 г. в двух районах, Кумертауском и Архангельском (Прогноз появления ..., 1978), после завоза в республику в 1975 г. заготовленных на Украине и в республиках Прибалтики, карантинных по этому вредителю соломы и продовольственного картофеля (Мигранов, 1994).

Возможно, что на начальном этапе формирования популяции колорадского жука на территории Башкирии основой для подобной дифференциации ее структуры послужили первые очаги его появления, т. е. сказался своего рода принцип основателя (Удалов и др., 2010).

Нами также были выявлены изменения фенетической структуры локальных популяций колорадского жука во времени (данные периодов 1994 и 2002 гг.). Отмечено в нативных популяциях и экспериментально подтверждено в лабораторных опытах снижение уровня фенетического полиморфизма – среднего числа вариаций μ (Животовский, 1991) в результате многократных обработок инсектицидами. Это дает нам возможность считать селективное действие инсектицидов основным фактором снижения уровня внутривидового полиморфизма колорадского жука на Южном Урале (Удалов, Беньковская, 2010). Выявленные

эколого-физиологические особенности имаго колорадского жука, относящихся к разным морфотипам, свидетельствуют о полиморфизме жизненных стратегий, позволяющем поддерживать высокий адаптивный потенциал в локальных популяциях вида.

Заключение

Таким образом, анализ литературы, посвященной изучению популяций колорадского жука, показывает, что подобные исследования проводятся как ставшими классическими методами популяционной генетики (белковый полиморфизм, фенетический полиморфизм), так и современными методами изучения ДНК-маркеров. Последние, основанные на ПЦР, секвенировании, рестрикционном анализе, наиболее перспективны и интересны для изучения как внутри- и межвидового полиморфизма, так и путей расселения и микроэволюционных процессов, идущих в ходе формирования современного ареала колорадского жука.

Нам представляются наиболее перспективными и интересными следующие молекулярные маркеры: а) микросателлитные повторы и гены мтДНК как нейтральные маркеры – для изучения общих генетических процессов, идущих в ареале колорадского жука; б) гены *AChE* и *LdVssc1*, нуклеотидные мутации в которых приводят к резистентности к инсектицидам – для изучения популяционных процессов, обусловленных бессознательным отбором (в терминах Яблокова, Юсуфова (2004)).

Однако не следует оставлять без внимания и методы «до-ДНКовой» эпохи исследований, такие, например, как методы фенетики. На начальном этапе исследования популяции такие методы позволяют получить первые данные по популяции и наметить дальнейшие пути ее изучения.

Нельзя считать, что объективная оценка структуры и состояния популяций возможна без учета фенотипических показателей и оценки приспособленности уровня адаптивного потенциала, что предполагает использование всего комплекса как современных, так и традиционных методов популяционной биологии (Фасулати, 1985, 2007; Климец, 1988; Вилкова, Фасулати, 2000; Беньковская и др., 2004, 2008б;

Вилкова и др., 2005; Киль, Головатенко, 2006; Беньковская, 2007; Калинина, Николаева, 2007; Марданшин и др., 2010).

В заключение считаем необходимым акцентировать внимание читателя на следующем моменте. Несмотря на то что *L. decemlineata* занимает столь обширный ареал, обитает в различных природно-климатических условиях и характеризуется полиморфизмом на различном уровне (от ДНК до фенетического) в различных популяциях, он считается видом монотипическим. Впервые о том, что этот вид может состоять из нескольких подвидов, было сказано в работе J.W. Jacobson, T.H. Hsiao (1983) по результатам изучения белкового полиморфизма в североамериканских и европейских популяциях. Авторы, правда, оговариваются, что для однозначного утверждения о политипичности вида на тот момент было недостаточно данных. Затем представление о нескольких подвидах колорадского жука (американском, европейско-сибирском и среднеазиатском) можно найти в работах С.Р. Фасулати (1985, 1993, 2002, 2007), основанных на анализе фенетического полиморфизма рисунка переднеспинки имаго. В исследованиях на молекулярном уровне, рассматривающих хромосомный полиморфизм (Hsiao T.N., Hsiao C., 1983) и полиморфизм ДНК (Grapputo *et al.*, 2005), этому аспекту, к сожалению, не было уделено абсолютно никакого внимания. Мы считаем, что данные, накопленные к настоящему моменту, позволяют с большей вероятностью утверждать о политипичности вида *L. decemlineata*.

Благодарности

Работа была выполнена в рамках проектов, поддержанных Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 09-04-00391-а и 11-04-01886-а). Мы выражаем признательность всем нашим коллегам, любезно предоставившим нам отписки статей, к которым у нас по тем или иным причинам нет доступа. Авторы будут благодарны всем коллегам за возможность получить образцы колорадского жука из различных частей его ареала. Авторы благодарят рецензентов за чтение рукописи нашей статьи и ценные замечания.

Литература

- Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 2003. 531 с.
- Беньковская Г.В. Освоение новых пищевых ресурсов в расселяющихся популяциях колорадского жука // Современные проблемы биологической эволюции: к 100-летию Государственного дарвиновского музея: материалы конференции. 17–20 сентября 2007 г. Москва. М.: ГДМ, 2007. С. 101–103.
- Беньковская Г.В., Леонтьева Т.Л., Удалов М.Б. и др. Стимуляция жизнеспособности имаго колорадского жука летальными дозами инсектицидов как проявление эффектов гормезиса // Агрехимия. 2010. № 8. С. 43–48.
- Беньковская Г.В., Удалов М.Б., Поскрязков А.В. и др. Феногенетический полиморфизм колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say и его чувствительность к инсектицидам на территории Башкирии // Агрехимия. 2004. № 12. С. 23–28.
- Беньковская Г.В., Леонтьева Т.Л., Удалов М.Б. Резистентность колорадского жука к инсектицидам на Южном Урале // Агрехимия. 2008а. № 8. С. 55–59.
- Беньковская Г.В., Удалов М.Б., Хуснутдинова Э.К. Генетическая основа и фенотипические проявления резистентности колорадского жука к фосфорорганическим инсектицидам // Генетика. 2008б. Т. 44. № 5. С. 638–644.
- Блехман А.В. Изменчивость рисунка пронотума у божьей коровки *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera, Coccinellidae) // Экол. генет. 2007. Т. 5. № 2. С. 25–36.
- Ваулин О.В., Захаров И.К. Временная динамика и изменчивость по мультилокусным ДНК-маркерам ISSR-PCR в популяции *Drosophila melanogaster* г. Умань на протяжении двух десятилетий (1984–2004 гг.) // Генетика. 2008. Т. 44. № 3. С. 359–365.
- Ваулин О.В., Новиков Ю.М. Географическая изменчивость ITS2 рДНК и COI мтДНК и криптические виды малярийного комара *Anopheles messeae* Fall. (Diptera: Culicidae) // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 3. С. 546–557.
- Вилкова Н.А., Сухорученко Г.И., Фасулати С.Р. Стратегия защиты сельскохозяйственных растений от адвентивных видов насекомых-фитофагов на примере колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera, Chrysomelidae) // Вестн. защиты растений. 2005. № 3. С. 3–15.
- Вилкова Н.А., Фасулати С.Р. Адаптивные процессы в популяциях как явления микроэволюции видов на примере колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say // Современное состояние проблемы резистентности вредителей, возбудителей

- болезней и сорняков к пестицидам в России и сопредельных странах на рубеже XXI в. СПб, 2000. С. 16–18.
- Гриценко В.В., Глотов Н.В., Орлинский Д.Б. Эколого-генетический анализ изменчивости центральных элементов рисунка переднеспинки у колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*) // Зоол. журнал. 1998. Т. 77. № 3. С. 278–284.
- Гундерина Л.И., Кикнадзе И.И. Эволюция кариофондов видов рода *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) в Голарктике // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 1. С. 31–42.
- Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Ред. Ю.П. Алтухов. М.: Наука, 2004. 619 с.
- Ерёмина И.В., Денисова И.А. Изменчивость некоторых признаков колорадского жука в Саратовской области // Деп. ВИНТИ. М., 1987. С. 59–70.
- Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 269 с.
- Животовский Л.А. Микросателлитная изменчивость в популяциях человека и методы ее изучения // Информ. вестник ВОГиС. 2006. Т. 10. № 1. С. 74–96.
- Зелеев Р.М. Оценка полиморфизма рисунка переднеспинки и надкрылий колорадского жука, *Leptinotarsa decemlineata*, в окрестностях Казани // Зоол. журнал. 2002. Т. 81. № 3. С. 316–322.
- Кайданов Л.З. Генетика популяций. М.: Высш. шк., 1996. 320 с.
- Калинина К.В. Биоэкологическое обоснование защиты картофеля от колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera, Chrysomelidae) в условиях южной части Северо-Западного региона России: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Вел. Луки, 2007. 22 с.
- Калинина К.В., Николаева З.В. Результаты оценки сортов картофеля на устойчивость к колорадскому жуку в условиях Северо-Запада России // Картофель и овощи. 2007. № 8. С. 16–18.
- Киль В.И., Головатенко Н.А. Мониторинг резистентности колорадского жука к трансгенному картофелю по фенетическим маркерам // Агрохимия. 2006. № 2. С. 58–64.
- Киль В.И., Исмаилов В.Я. Идентификация резистентных к инсектицидам генотипов в популяции клопа вредная черепашка по фенам рисунка и RAPD-маркерам // Агрохимия. 2009. № 1. С. 38–49.
- Климец Е.П. Выявление чувствительности колорадского жука к действию инсектицидов с помощью фенов // Фенетика природных популяций. М., 1988. С. 111–117.
- Колорадский картофельный жук. Филогения, морфология, физиология, экология, адаптация, естественные враги / Ред. Р.С. Ушатинская. М.: Наука, 1981. 377 с.
- Корсун О.В. Изменчивость и популяционная структура *Hoplia aureola* Pall. (Coleoptera, Scarabaeidae) // Экология. 1994. Т. 25. № 5. С. 372–379.
- Кохманюк Ф.С. Колорадский жук как модель микроэволюции // Природа. 1981. № 12. С. 86–87.
- Кохманюк Ф.С. Изменчивость фенетической структуры популяций колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say) в пределах ареала // Фенетика популяций: Матер. II Всесоюз. совещ. (Москва, 1982 г.). М.: Наука, 1982. С. 233–243.
- Кубайчук В. Изменчивость каталазы колорадского жука из различных локальных популяций в Украинской ССР // Защита растений (Киев). 1982. Т. 29. С. 50–55.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
- Марданшин И.С., Ибрагимов Р.И., Умаров И.А. и др. Традиционная селекция – экологичный метод решения проблемы защиты картофеля от колорадского жука // Достижения науки и техники АПК. 2010. № 1. С. 22–23.
- Методические рекомендации по изучению и оценке форм картофеля на устойчивость к колорадскому жуку / Под ред. Н.А. Вилковой. М., 1993. 47 с.
- Мигранов М.Г. Пиретроиды: отечественные аналоги и их токсикология. Уфа, 1994. 101 с.
- Неделькина С.В., Соломенникова И.В., Волкотруб Э.Н. и др. Изучение ферментных систем детоксикации инсектицидов у резистентной к перметрину популяции колорадского жука // Биохимия. 1988. Т. 53. № 1. С. 11–17.
- Овчинникова Н.А., Маркелов Г.В. Внутривидовая изменчивость колорадского жука в Липецкой области // Науч. докл. высш. шолы. Биол. науки. № 7. 1982. С. 63–67.
- Перегуда Т.А. Механизмы устойчивости членистоногих к пиретроидам // Агрохимия. 1985. № 8. С. 121–132.
- Прогноз появления и распространения вредителей и болезней сельскохозяйственных культур в Башкирской АССР в 1978 году и меры борьбы с ними. Уфа: Башкир. кн. изд-во, 1978. 94 с.
- Рославцева С.А. Резистентность к инсектицидам в популяциях колорадского жука // Агрохимия. 2009. № 1. С. 87–92.
- Рославцева С.А., Диденко Л.Н. Исследования популяций колорадского жука // Агрохимия. 2010. № 4. С. 80–85.
- Санин В.А. Колорадский жук. М.: Колос, 1976. 112 с.
- Сидоренко А.П., Березовская О.П. Генетическая структура популяций колорадского жука *Leptinotarsa*

- decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) // Генетика. 2002. Т. 38. № 11. С. 1485–1491.
- Сидоренко А.П., Березовская О.П., Созинов А.А. Оценка генетического полиморфизма в популяциях колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* (Say) по RAPD-маркерам // Генетика. 2000. Т. 30. № 5. С. 651–656.
- Солбриг О., Солбриг Д. Популяционная биология и эволюция. М.: Мир, 1982. 488 с.
- Удалов М.Б. Формируются два подвида колорадского жука? // XXIV Любимцевские чтения: сб. докл. Ульяновск: УлГПУ, 2010. С. 189–193.
- Удалов М.Б., Беньковская Г.В. Изменения уровня полиморфизма в популяциях колорадского жука на Южном Урале // Экол. генетика. 2010. Т. VIII. № 3. С. 61–66.
- Удалов М.Б., Беньковская Г.В., Поскряков А.В. и др. Полиморфизм ДНК в изучении популяций членистоногих // Усп. соврем. биологии. 2009. Т. 129. № 1. С. 51–57.
- Удалов М.Б., Беньковская Г.В., Хуснутдинова Э.К. Структура популяции колорадского жука на Южном Урале // Экология. 2010. № 2. С. 126–133.
- Удалов М.Б., Поскряков А.В., Беньковская Г.В. и др. Молекулярно-биологические методы мониторинга резистентности к инсектоакарицидам в популяциях членистоногих // Агрохимия. 2003. № 6. С. 81–88.
- Удалов М.Б., Lindström L., Серебров В.В. и др. Микроэволюционные процессы в формирующихся популяциях колорадского жука // XXII Любимцевские чтения: Сб. докл. Ульяновск: УлГПУ, 2008. Т. 1. С. 249–252.
- Умаров И.А. Экологические и физиолого-биохимические закономерности взаимоотношений в системе «картофель–колорадский жук»: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Уфа, 2009. 24 с.
- Фасулати С.Р. Полиморфизм и популяционная структура колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say в Европейской части СССР // Экология. 1985. № 6. С. 50–56.
- Фасулати С.Р. Полиморфизм, экологические группировки и микроэволюция колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera, Chrysomelidae) // Вид и его продуктивность в ареале. СПб, 1993. С. 260–262.
- Фасулати С.Р. Территориальное расселение колорадского жука в северных районах картофелеводства // Экологические аспекты интенсификации сельскохозяйственного производства: Матер. междунар. науч.-практ. конф. Пенза, 2002. С. 205–207.
- Фасулати С.Р. Изучение адаптивной изменчивости вредителей для экологизации систем защиты растений на примере колорадского жука // Информ. бюл. ВПРС МОББ. СПб, 2007. С. 246–250.
- Хролинский Л.Т., Хомяк В.В. Зависимость состава белкового комплекса и компонентов эстераз кишечника колорадского жука от питающего растения // С.-х. биология. 1978. Т. 13. № 2. С. 294–297.
- Чемерис А.В., Ахунов Э.Д., Вахитов В.А. Секвенирование ДНК. М.: Наука, 1999. 429 с.
- Шмальгаузен И.И. Факторы эволюции. Теория стабилизирующего отбора. М.: Наука, 1968. 450 с.
- Яблоков А.В. Популяционная биология. М.: Высш. шк., 1987. 303 с.
- Яблоков А.В., Юсуфов А.Г. Эволюционное учение. М.: Высш. шк., 2004. 310 с.
- Яковлев Б.В. Колорадский картофельный жук и меры борьбы с ним. М.: Сельхозгиз, 1950. 64 с.
- Яковлев Б.В. Колорадский жук // Гос. инсп. по карантину с.-х. вредит. МСХ СССР. Рига, 1960. 152 с.
- Alyokhin A. Colorado potato beetle management on potatoes: current challenges and future prospects // Fruit, Vegetable and Cereal Sci. and Biotech. 2009. V. 3. № 1. P. 10–19.
- Argentine J.A., Lee S.H., Sos M.A. *et al.* Permethrin resistance in a near isogenic strain of Colorado potato beetle // Pest. Biochem. Physiol. 1995. № 53. P. 97–115.
- Ayala F.J. Genetic differentiation during the speciation process // Evol. Biol. 1975. № 8. P. 1–75.
- Azeredo-Espin A.M.L., Schroder R.F.W., Huettel M.D. *et al.* Mitochondrial DNA variation in geographic populations of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae) // Experientia. 1991. № 47. P. 483–485.
- Azeredo-Espin A.M.L., Schroder R.F.W., Roderick G.K. *et al.* Intraspecific mitochondrial DNA variation in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) // Biochem. Genet. 1996. V. 34. № 7/8. P. 253–268.
- Benkovskaya G.V., Leontieva T.L., Udalov M.B. Colorado beetle resistance to insecticides in South Urals // Resistant Pest Manag. Newslett. 2009. V. 19. № 1. P. 3–4.
- Benkovskaya G.V., Udalov M.B., Nikolenko A.G. *et al.* Temporal and toxicological dynamics in the cover spot patterns of the Colorado potato beetle in South Ural // Resistant Pest Manag. Newslett. 2006. V. 15. № 2. P. 13–15.
- Biever K.D., Chauvin R.L. Prolonged dormancy in a Pacific Northwest population of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) // Can. Entomol. 1990. V. 122. № 1/2. P. 175–177.
- Brown J.K., Perring T.M., Cooper A.D. *et al.* Genetic analysis of Bemisia (Hemiptera: Aleyrodidae) populations by isoelectric focusing electrophoresis

- // Biochem. Genet. 2000. V. 38. № 1/2. P. 13–25.
- Cavalli-Sforza L.L., Bodmer W.F. The Genetics of Human Populations. San Francisco: Freeman, 1971. 962 p.
- Clark J.M., Lee S.H., Kim H.J. *et al.* DNA-based genotyping techniques for the detection of point mutation associated with insecticide resistance in Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* // Pest Manag. Sci. 2001. № 57. P. 968–974.
- De Kort C.A.D., Koopmanschap A.B., Vermunt A.M.W. Influence of pyriproxifen on the expression of haemolymph protein genes in Colorado Potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* // J. Insect Physiol. 1997. V. 43. P. 363–371.
- Feyereisen R. Molecular biology of insecticide resistance // Toxicol. Lett. 1995. № 82/83. P. 83–90.
- Feytaud J. Le Doryphore a la conquete de l'Europe // Proc. VIII Intern. Congr. Entomol. Stockholm, 1950. P. 643–646.
- French-Constant R., Pittendrigh B., Vaughan A. *et al.* Why are so few resistance associated mutations in insecticide target genes? // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 1998. № 353. P. 1685–1693.
- French-Constant R.H., Daborn Ph.J., Le Goff G. The genetics and genomics of insecticide resistance // Trends Genet. 2004. V. 20. № 3. P. 163–170.
- Ford E. Polymorphism and taxonomy // The New Systematics. Oxford: Clarendon Press, 1940. P. 493–513.
- Grapputo A. Development and characterization of microsatellite markers in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* // Mol. Ecol. Notes. 2006. № 6. P. 1177–1179.
- Grapputo A., Boman S., Lindström L. *et al.* The voyage of an invasive species across continents: genetic diversity of North American and European Colorado potato beetle population // Mol. Ecol. 2005. № 14. P. 4207–4219.
- Hare J.D. Ecology and management of the Colorado potato beetle // Ann. Rev. Entomol. Palo Alto, 1990. V. 35. P. 81–100.
- Hartl D.L. Principles of Population Genetics. Singer Assoc. Inc. Sunderland Mass., 1980. 488 p.
- Hawthorne D.J. AFLP-based genetic linkage map of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*: sex chromosomes and a pyrethroid-resistance candidate gene // Genetics. 2001. № 158. P. 695–700.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes // Proc. Roy. Soc. Lond. B. 2003. № 270. P. 313–321.
- Hsiao T.N., Hsiao C. Chromosomal analysis of *Leptinotarsa* and *Labidomera* species (Coleoptera, Chrysomelidae) // Genetica. 1983. № 60. P. 139–150.
- Jacobson J.W., Hsiao T.H. Isozyme variation between geographic populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) // Ann. Entomol. Soc. Am. 1983. № 76. P. 162–166.
- Kim H.J., Hawthorne D.J., Peters T. *et al.* Application of DNA-based genotyping techniques for the detection of kdr-like pyrethroid resistance in field populations of Colorado potato beetle // Pest. Biochem. Physiol. 2005. № 81. P. 85–96.
- Krafsur E.S. Allozyme gene diversities in some leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) // Biochem. Genet. 1999. V. 37. № 718. P. 215–226.
- Koulianos S., Crozier R.H. Mitochondrial sequence characterization of Australian commercial and feral honeybee strains, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae), in the context of the species worldwide // Aust. J. Entomol. 1997. V. 4. № 36. P. 359–364.
- Lee S.H., Dunn J.B., Clark J.M. *et al.* Molecular analysis of kdr-like resistance in a permethrin-resistant strain of Colorado potato beetle // Pest. Biochem. Physiol. 1999. № 63. P. 63–75.
- Leontieva T.L., Benkovskaya G.V., Udalov M.B., Poscryakov A.V. Insecticide resistance level in *Leptinotarsa decemlineata* Say population in the South Ural // Resistant Pest Manag. Newslett. 2006. V. 15. № 2. P. 25–26.
- Li X., Schuler M.A., Berenbaum M.R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics // Ann. Rev. Entomol. 2007. № 52. P. 231–253.
- Liu Q., Thorland E.C., Heit J.A. *et al.* Overlapping PCR, for bidirectional PCR amplification of specific alleles: a rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes // Genome Res. 1997. № 7. P. 389–398.
- Loxdale H.D., Lushai G. Molecular markers in entomology // Bull. Entomol. Res. 1998. № 88. P. 577–600.
- Messier S., Mitton J.B. Heterozygosity at the malate dehydrogenase locus and developmental homeostasis in *Apis mellifera* // Heredity. 1996. V. 76. P. 616–622.
- Metcalf R.T. Insect resistance to insecticides // Pest. Sci. 1989. V. 26. P. 333–358.
- Mueller U.G., Wolfenbarger L.L. AFLP genotyping and fingerprinting // Trends Ecol. Evol. 1999. V. 14. P. 389–394.
- Mutero A., Pralovorio M., Bride J.M. *et al.* Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994. № 91. P. 5922–5926.
- Nei M. Genetic distance between populations // Am. Naturalist. 1972. V. 106. № 949. P. 283–292.
- Obrycki J.J., Krafsur E.S., Bogran C.E. *et al.* Comparative studies of three populations of the lady beetle predator *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae) // Florida Entomologist. 2001. V. 84. № 1. P. 55–62.

- Peferoen M., Huybrechts R., De Loof A. Longevity and fecundity in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* // Entomol. Exp. Appl. 1981. V. 29. P. 321–329.
- Roderick G.K. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses // Ann. Rev. Entomol. 1996. № 41. P. 325–352.
- Roderick G.K., de Mendoza L.G., Dively G.P. *et al.* Sperm precedence in Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae): temporal variation assessed by neutral markers // Ann. Entomol. Soc. Amer. 2003. V. 96. № 5. P. 631–636.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // Science. 1988. V. 239. P. 487–491.
- Sheppard W.S., Berlocher S.H. Enzyme polymorphism in *Apis mellifera* from Norway // J. Apicult. Res. 1984. V. 23. № 2. P. 64–69.
- Sukhoruchenko G.I., Dolzhenko V.I. Problems of resistance development in arthropod pests of agricultural crops in Russia // EPPO Bull. 2008. V. 38. № 1. P. 119–126.
- Thacker J.R.M. An Introduction to Arthropod Pest Control. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2002. 343 p.
- The Database of Arthropods Resistant to Pesticides. 2011. available at <http://www.pesticideresistance.org>
- Tower W.L. Colors and color patterns of Coleoptera. Un. Chicago, 1903. № 10. P. 36–39.
- Tower W.L. An investigation of evolution in Chrysomelid beetles of the genus *Leptinotarsa* // Publ. Carnegie Inst. Wash. 1906. № 48. 320 p.
- Udalov M.B., Benkovskaya G.V. Application of bi-PASA and development of PCR-REN for detection of point mutation 980A>G in AChE gene of Colorado potato beetle in South Ural's local population // Resistant Pest Manag. Newslett. 2008. V. 17. № 2. P. 15–16.
- Udalov M.B., Benkovskaya G.V. Polymorphism *coxI* gene of Colorado potato beetle in South Ural populations // Resistant Pest Manag. Newslett. 2010a. V. 19. № 2. P. 29–32.
- Udalov M.B., Benkovskaya G.V. Two subspecies of Colorado potato beetles are forming? // IX Europ. Congr. of Entomol., 22–27 August 2010b. Budapest, 2010b. P. 217.
- Vermunt A.M., Koopmanschap A.B., Vlak J.M. *et al.* Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a putative juvenile hormone esterase from the Colorado potato beetle // Insect Biochem. Mol. Biol. 1997. V. 27. P. 919–928.
- Vermunt A.M., Koopmanschap A.B., Vlak J.M. *et al.* Expression of the juvenile hormone esterase gene in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*: photoperiodic and juvenile hormone analog response // J. Insect Physiol. 1999. № 45. P. 135–142.
- Williams J.G.K., Hanafey M.K., Rafalsky J.A. *et al.* Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers: Methods in Enzymology // Recombinant DNA. San Diego: Acad. Press, 1993. V. 86. P. 68–77.
- Williamson M.S., Martin-Torrez D., Hick C.A. *et al.* Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides // Mol. Gen. Genet. 1996. № 252. P. 51–60.
- Yocum G.D. Differential expression of two Hsp70 transcripts in response to cold shock, thermoperiod, and adult diapause in the Colorado potato beetle // J. Insect Physiol. 2001. V. 47. P. 1139–1145.
- Yocum G.D. Isolation and characterization of three diapause-associated transcripts from the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* // J. Insect Physiol. 2003. № 49. P. 161–169.
- Yocum G.D., Rinehart J.P., Chirumamilla-Chapara A. *et al.* Characterization of gene expression patterns during the initiation and maintenance phases of diapause in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* // J. Insect Physiol. 2009. V. 55. P. 32–39.
- Yocum G.D., Rinehart J.P., Larson M.L. Monitoring diapause development in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* // J. Insect Physiol. 2010. DOI:10.1016/j.jinsphys. 2010.11.008.
- Zhang J., Goyer C., Pelletier Y. Environmental stresses induce the expression of putative glycine-rich insect cuticular protein genes in adult *Leptinotarsa decemlineata* (Say) // Insect Mol. Biol. 2008. V. 17. № 3. P. 209–216.
- Zhu K.Y., Clark J.M. Validation of a point mutation of acetylcholinesterase in Colorado potato beetle by polymerase chain reaction coupled to enzyme inhibition assay // Pest. Biochem. Physiol. 1997. № 57. P. 28–35.
- Zhu Y.K., Lee S.H., Clark J.M. A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in Colorado potato beetle // Pest. Biochem. Physiol. 1996. № 55. P. 100–108.
- Zichova T., Kocourek F., Salava J. *et al.* Detection of organophosphate and pyrethroid resistance alleles in Czech *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) populations by molecular methods // Pest. Manag. Sci. 2010. № 66. P. 853–860.

POPULATION GENETICS OF THE COLORADO POTATO BEETLE: FROM GENOTYPE TO PHENOTYPE

M.B. Udalov, G.V. Benkovskaya

Institute of Biochemistry and Genetics, RAS, Ufa, Russia,
e-mail: udalov-m@yandex.ru

Summary

Populational studies of the Colorado potato beetle are reviewed. Data on DNA, chromosome, protein and phenetic polymorphism are considered. Data on the prevalence of mutations determining insecticide resistance in the beetles are presented. It is shown that molecular methods can be applied to the assessment of nonspecific resistance. The question whether the Colorado potato beetle is a polytypic species is discussed on the base of the current knowledge of its polymorphism.

Key words: Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say, polymorphism, population, karyotype, DNA, insecticide resistance, mutation, phenetics.

КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ АМАРАНТА (*AMARANTHUS L.*)

А.И. Стасюк, Н.Б. Железнова, А.В. Железнов

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

Определяли коэффициенты корреляции между всеми возможными сочетаниями 9 признаков у 12 видов и 3 форм амаранта. Показано, что каждый из изученных видов характеризуется своей специфической системой взаимосвязей признаков. Выявлены различия в структуре связей, которые, по существу, определяют структуру вида. Также показано, что степень дивергенции корреляционных структур у различных видов амаранта может различаться в зависимости от их филогенетического родства и соотношений внутри рода.

Ключевые слова: амарант, вид, корреляции, коэффициент дивергенции, корреляционная плеяда, изменчивость.

Введение

Амарант, несмотря на свое древнее происхождение, является новым для России культурным растением зернового, кормового, технического и декоративного направлений. Поэтому в отличие от многих традиционных сельскохозяйственных растений он недостаточно изучен с точки зрения генетики и селекции, физиологии и биохимии и других фундаментальных наук. Недостаток знаний о культуре является сдерживающим фактором для широкого внедрения ее в производство. Дальнейшее распространение амаранта связывают с созданием сортов, хорошо приспособленных к почвенно-климатическим условиям различных регионов страны и способных давать высокие и устойчивые урожаи зерна и зеленой массы (Pal, 1972; Железнова и др., 1989; Brenner *et al.*, 2000). При этом требования к сортам кормового и зернового направлений различны. Очевидно, в процессе селекции зерновых форм амаранта будут задействованы признаки: количество продуктивных соцветий на растении, количество зерен на соцветии, средний вес зерна с одного растения, масса 1000 семян и др. При создании сортов кормового направления приоритетное значение займут другие признаки (высота растений, облиственность, образование

боковых ветвей и т. д.). Таким образом, селекционеру придется иметь дело с различными признаками, которые находятся во взаимосвязи, определяемой коэффициентом корреляции.

К настоящему времени накопился достаточно большой, но далеко не полный материал по изучению корреляций различных признаков у амаранта. Так, выявлена высокая степень соответствия между урожайностью и массой 1000 семян ($r = 0,905$), а также между урожайностью и лабораторной всхожестью семян ($r = 0,727$) (Переpravо и др., 1977). Обнаружена высокая положительная зависимость между содержанием протеина и лизина ($r = 0,727$), средняя – между количеством протеина и крахмала ($r = 0,398$) и показано отсутствие корреляционной зависимости между содержанием лизина в протеине и крахмала в семенах амаранта ($r = 0,062$), а также лизина и жира ($r = 0,079$) (Бугайлов и др., 1977). Представлено 70 значений коэффициента генотипической корреляции между парами признаков растений амаранта разного возраста по фазам развития и приведены доказательства сохранения положительной корреляции между 64 парами признаков из 70 на протяжении всего периода вегетации (Абдул Кадер Амин Эль Хажж, 1999). В этом исследовании использовались популяции, специально созданные по

методу Ю.Л. Гужова (Гужов и др., 2003). В работе Н.Б. Железновой, Р.С. Юдиной и А.В. Железнова (2008) выполнен корреляционный анализ 10 признаков амаранта и установлены коэффициенты корреляции между всеми возможными сочетаниями изученных признаков у *A. hypochondriacus* L. Показана различная сила связей одних признаков по сравнению с другими. Так, наиболее сильную, почти функциональную, связь обнаружили признаки «высота растений»–«длина соцветий», «ширина листа»–«длина листа», «урожайность зеленой массы»–«ширина листа». Важным моментом этих исследований является установление того факта, что изученные признаки представляют собой скоррелированный блок – корреляционную плеяду (Терентьев, 1959). Установление этого факта позволило выполнить вторую часть корреляционного анализа – изучить дивергенцию корреляционных структур у различных систематических категорий амаранта (Железнов и др., 2009а).

Цель наших исследований – установить фенотипические корреляции между некоторыми признаками у растений различных видов амаранта, определить коэффициенты дивергенции корреляционных структур (КДК) и на основе КДК определить степень родства изученных видов.

Материал и методы

Материалом для исследования послужили образцы амаранта, принадлежащие к разным видам рода *Amaranthus* L. В частности, в опыт были включены следующие виды: *A. hypochondriacus*, образец ИЦиГ 11010; *A. spinosus*, образец ИЦиГ 11013; форма, у которой вид не определен, *Epinard vert*, образец ИЦиГ 11021; вторая форма, у которой вид не определен, *Epinard brondfira*, ИЦиГ 11025; *A. graecizans*, образец ИЦиГ 11026; *A. mantegazzianus*, образец ИЦиГ 11028; *A. cruentus*, образец ИЦиГ 11031; форма с неопределенной видовой принадлежностью, *Local spinach*, образец ИЦиГ 11056; *A. leucospermus*, образец ИЦиГ 11058; *A. nobilis*, образец ИЦиГ 11062; *A. crispus*, образец ИЦиГ 11063; *A. mantegazzianus chachira*, образец ИЦиГ 11070; *A. hybridus*, образец ИЦиГ 11071; *A. lividus*, образец ИЦиГ 11036 и *A. edulis*, образец ИЦиГ 11072.

Морфобиологическое описание этих образцов дано в книге «Амарант: научные основы интродукции» (Железнов и др., 2009б). Изучали признаки, характеризующие вегетативно-функциональные свойства и продуктивность: высота растений (см), высота растений до основания соцветия (см), длина соцветия (см), длина листа (см), ширина листа (см), листовой индекс (длина/ширина), урожайность зеленой массы (кг/м²), масса 1000 семян (г), масса зерна с одного растения (г), соответственно признаки № 1–9.

Для оценки анализировали 30 растений каждого образца. Коэффициенты корреляции рассчитывали для всех признаков. Статистическую обработку данных проводили по Н.А. Плехинскому (1961).

Для установления межвидовой дивергенции были использованы все виды и формы амаранта, приведенные выше. Коэффициенты дивергенции корреляций рассчитывали по формуле, разработанной В.М. Шмидтом (1964):

$$\text{КДК} = \sum \Delta_r / n,$$

где Δ_r – сумма достоверных отклонений корреляций между двумя систематическими категориями (видами); n – общее число рассчитанных корреляций между парами признаков сравниваемых категорий; КДК – коэффициент дивергенции корреляций. Пример расчета КДК приведен в работе А.В. Железнова с соавт. (2009а).

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены корреляционные кольца 11 видов и 3 форм с неизвестной видовой принадлежностью, построенных на основе корреляционных матриц. Сравнение этих колец показывает сходство и различие корреляционных связей изучаемых признаков у видов и образцов амаранта. На этом рисунке показано, что высота растений тесно коррелирует с высотой растений до основания метелки у таких видов, как *A. hypochondriacus*, *A. leucospermus*, *A. edulis*, *A. spinosus*, *A. mantegazzianus* и образца *Epinard brondfira*; с длиной соцветия – у *A. mantegazzianus* и *A. lividus*; с шириной листа – у *A. hypochondriacus*, *A. edulis*, *A. hybridus*, *A. lividus*, *A. crispus*, *A. mantegazzianus*, *A. nobilis* и образцов *Local spinach* и *Epinard brondfira*. Тесная корреляция этого признака также видна с индексом листа у *A. nobilis*, *A. mantegazzianus*

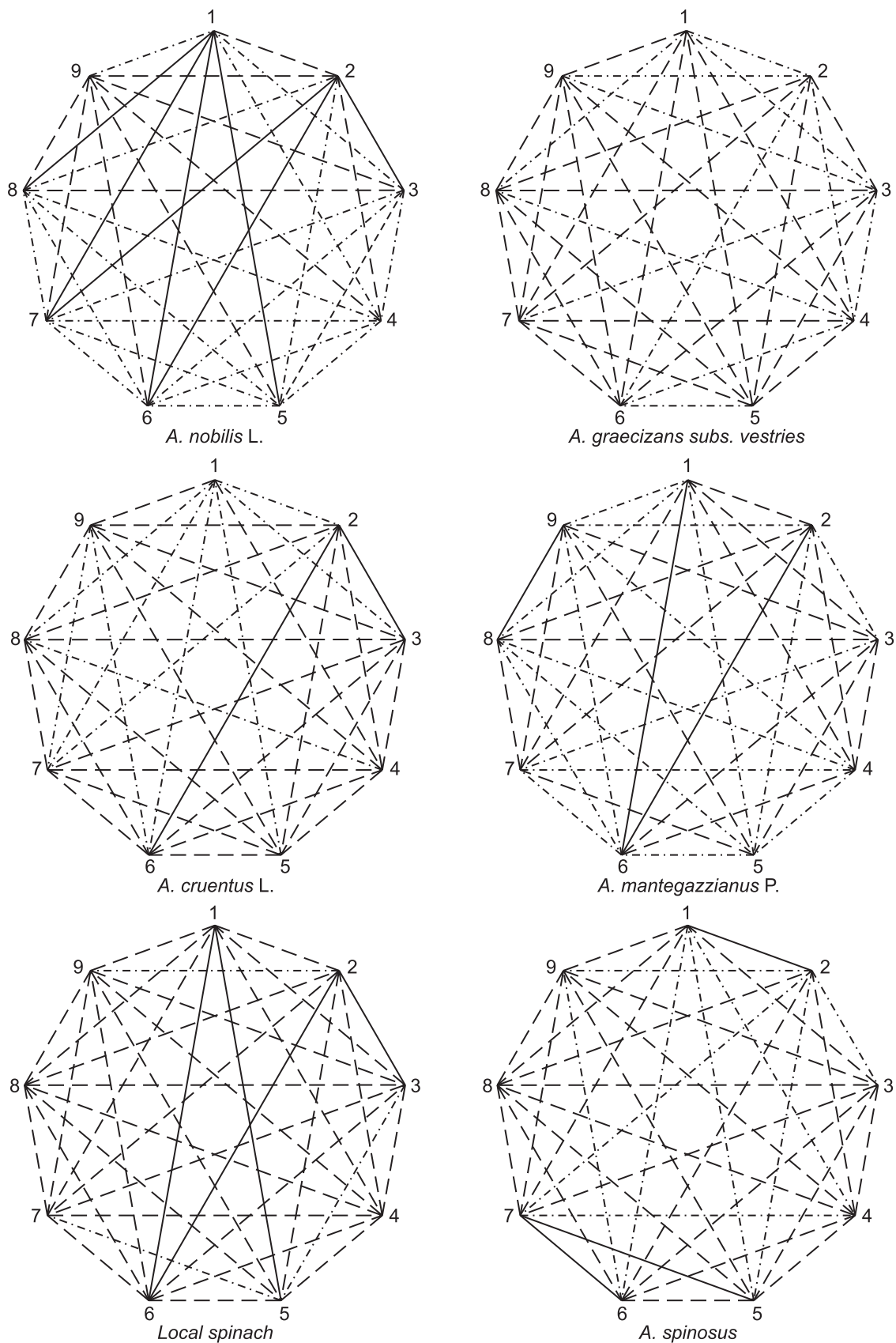


Рис. 1. Начало.

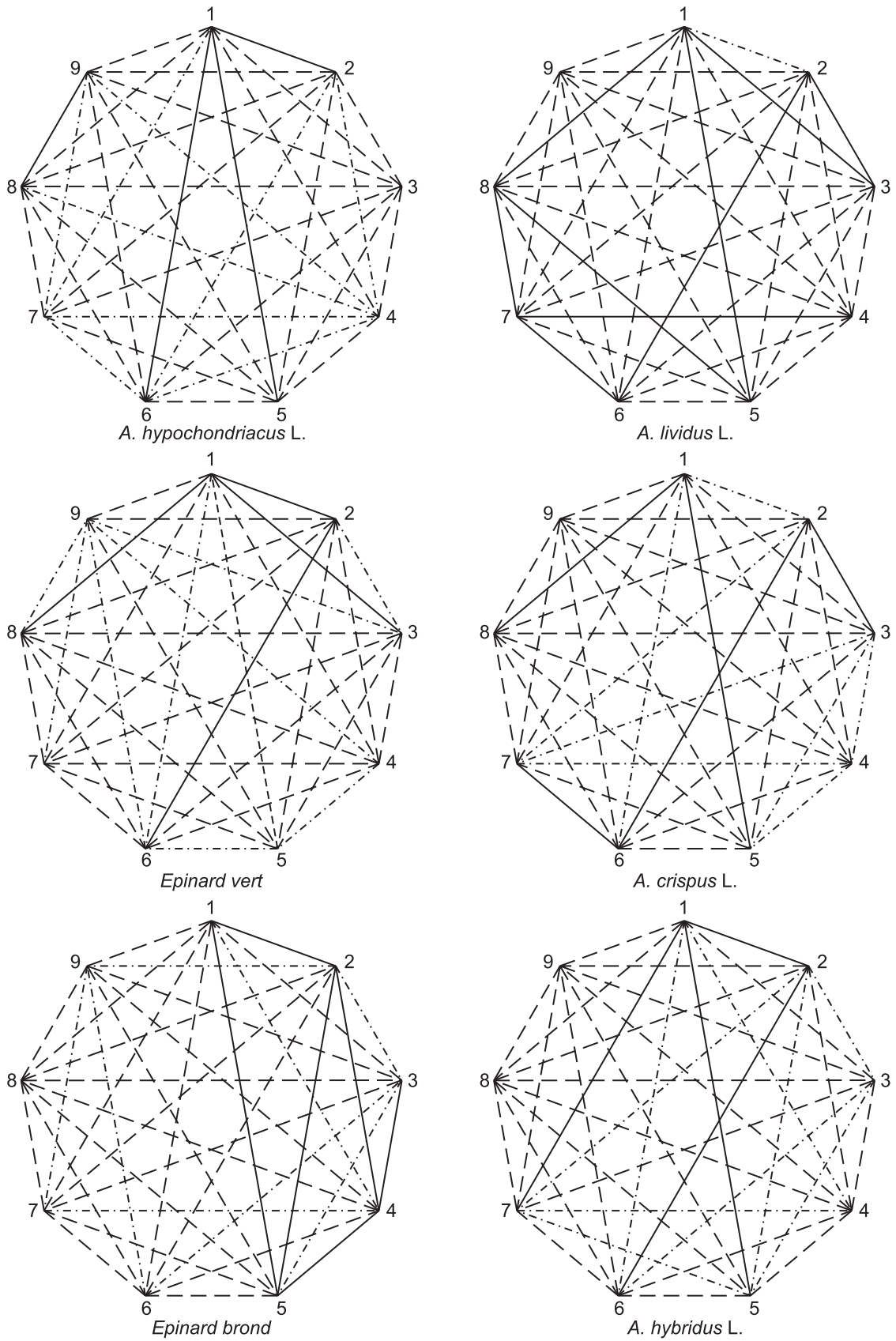


Рис. 1. Продолжение

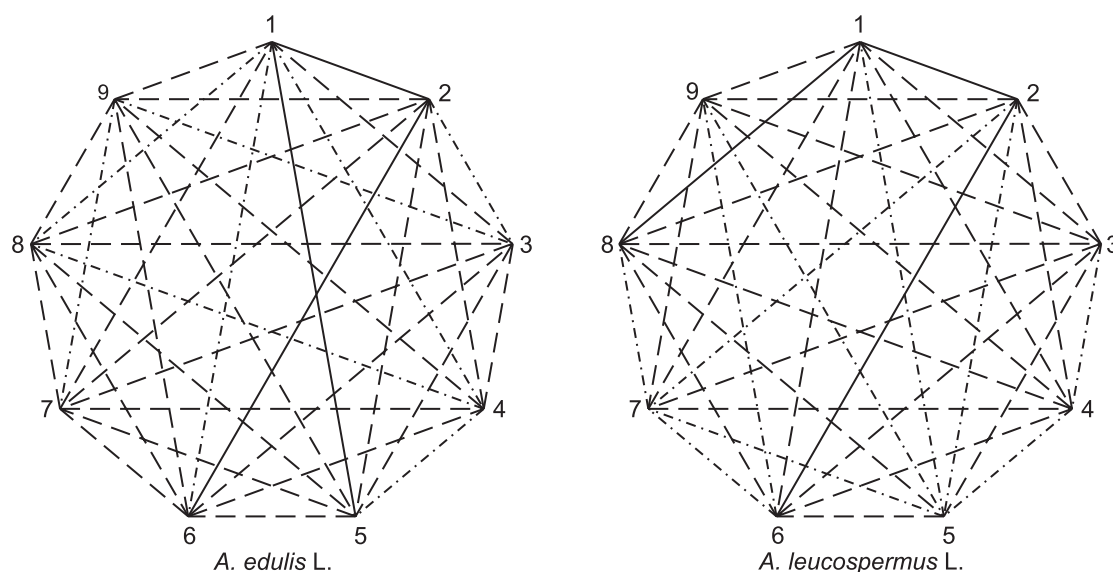


Рис. 1. Корреляционные кольца признаков 11 видов и 3 образцов, у которых вид не определен.

и *A. hypochondriacus*; с урожайностью зеленой массы – у *A. mantegazzianus* и *A. nobilis*; с массой 1000 семян – у *A. leucospermus*, *A. crispus* и *A. hybridus*. Достоверных корреляций между высотой растений и массой зерна с одного растения и высотой растений и шириной листа не обнаружено.

Высота растений до основания соцветия также неоднозначно коррелировала с другими признаками. Наиболее тесная связь этого признака с длиной соцветия наблюдалась у *A. nobilis* ($r = 0,98$), *A. crispus* ($r = 0,71$), *A. hybridus* ($r = 0,88$), *A. lividus* ($r = 0,92$) и образца *Local spinach* ($r = 0,76$).

Сравнение коэффициентов корреляции между высотой растений до основания соцветия и длиной листа выявило тесную связь только у образца *Epinard brondfira* ($r = 0,71$). У других видов и образцов такая связь не обнаружена.

Оценка различий по структуре связей между высотой растений до основания соцветий и шириной листа показала в основном связь средней силы у большинства изученных видов. У таких видов коэффициенты корреляции варьировали в пределах 0,4–0,6. У остальных видов, таких, как *A. cruentus*, *A. mantegazzianus*, *A. hypochondriacus*, *A. edulis*, *A. graecizans*, *A. hybridus*, сила связей определялась коэффициентами корреляции 0,1–0,3.

В отличие от длины и ширины листа листовая индекс показал тесную связь с высотой

растений до основания соцветия почти у всех изученных видов. Коэффициенты корреляции варьировали в пределах 0,75–0,95. Только у *A. spinosus* и *A. hypochondriacus* коэффициенты корреляции равнялись 0,60.

Сравнение корреляционных матриц различных видов показало, что связь высоты растений до основания соцветия с урожайностью зеленой массы не была сильной практически у всех изученных видов. Исключением является *A. lividus*. Коэффициент корреляции вышеуказанных признаков составляет 0,76.

Еще менее заметная связь тестируемого признака установлена с массой 1000 семян, хотя коэффициенты корреляции среди видов варьировали в широких пределах: от 0,0 до 0,55. Практически такое же варьирование коэффициентов корреляции наблюдалось при изучении признаков «высота растений до основания соцветий» и «масса зерна с одного растения».

Длина соцветия и длина листа имели слабую связь почти у всех видов и образцов за исключением образца *Epinard brondfira* ($r = 0,86$). То же можно сказать и о связи признаков «длина соцветия» и «ширина листа»: у всех видов без исключения она была незначительной. С индексом листа этот признак коррелировал очень слабо. Самый высокий коэффициент корреляции, $r = 0,67$, был установлен только у *A. nobilis*. Недостаточно сильные, но достоверные связи ($r = 0,40$ – $0,45$) для признаков «длина соцветий» и «уро-

жайность зеленой массы» были установлены у видов *A. nobilis*, *A. mantegazzianus* и *A. lividus*. У остальных видов коэффициенты корреляции были существенно ниже отмеченного уровня. Для признаков «длина соцветия» и «масса 1000 семян» коэффициенты корреляции не были существенными у всех изученных видов, за исключением *A. nobilis*, у которого $r = 0,59$ с достоверностью на 5 %-м уровне значимости. Не были они существенными для признаков «длина соцветия» и «масса зерна с одного растения» у большинства видов и образцов за исключением *A. mantegazzianus*, у которого существенный коэффициент корреляции составил 0,47.

Взаимосвязь признаков «длина листа» и «ширина листа» у большинства видов характеризуется не очень высокими, но вполне достоверными коэффициентами корреляции. Наиболее высокий коэффициент корреляции ($r = 0,91$) между этими признаками был установлен у образца *Epinard brondfira*. Таким образом, структура корреляционных связей двух рассматриваемых признаков свидетельствует об их относительной стабильности в пределах каждого вида.

Анализ взаимосвязей признаков «длина листа» и «индекс листа» показал широкий спектр коэффициентов корреляции среди изученных видов. Пять видов имели коэффициент корреляции меньше 0,2, три вида – 0,2–0,3, пять видов – 0,3–0,6 и один вид больше 0,63. Этим видом является *A. graecizans*.

«Урожайность зеленой массы» и «длина листа» связаны, в основном, низкими коэффициентами корреляции и только у *A. hybridus*, *A. crispus* и *A. nobilis* установлены коэффициенты корреляции – 0,5–0,7. Еще менее тесная связь признака «длина листа» установлена с признаком «масса 1000 семян». Единственный вид *A. nobilis* имел коэффициент корреляции между этими признаками 0,63. И уж совсем незаметная связь наблюдалась между «длиной листа» и «массой зерна с одного растения». Здесь установлены коэффициенты корреляции в пределах 0,03–0,3 для разных видов. Однако два образца *Epinard vert* и *A. mantegazzianus* показали коэффициенты корреляции 0,57 и 0,45 соответственно.

Между признаками «ширина листа» и «индекс листа», «урожайность зеленой массы»,

«масса 1000 семян», «масса зерна с одного растения» был установлен широкий спектр коэффициентов корреляции, отражающий низкий, средний и высокий уровни связей. Подавляющая часть видов имела низкий уровень связи. И только такие виды, как *A. spinosus* и *A. hybridus* имели коэффициенты корреляции 0,61, 0,85 соответственно.

У подавляющего большинства видов «индекс листа» и «урожайность зеленой массы» оказались слабосвязанными признаками ($r = 0,1–0,3$). Однако у *A. spinosus* и *Local spinach* был установлен коэффициент корреляции $r = 0,93$.

Сильная связь между признаками «индекс листа» и «масса 1000 семян» была установлена у *A. nobilis* ($r = 0,60$). У остальных видов наблюдалась либо средняя ($r = 0,35–0,55$), либо совсем слабая связь ($r = 0,03–0,3$). К числу последних относятся виды *A. spinosus*, *A. cruentus*, *A. lividus*, *A. leucospermus* и две формы – *Epinard vert* и *E. brondfira*.

«Индекс листа» очень слабо коррелировал с «массой зерна с одного растения» у всех изученных видов. Исключение составили *Epinard brondfira* и *A. leucospermus*, у которых соответственно $r = 0,51$ и 0,52. Не было обнаружено также тесной связи между «массой 1000 семян» и «урожайностью зеленой массы» у всех изученных видов за исключением *A. hybridus*, у которого $r = 0,87$. Только у трех видов «масса 1000 семян» хорошо скоррелирована с «массой зерна с одного растения». К таким видам относятся *A. mantegazzianus* ($r = 0,76$), *A. edulis* (0,65) и *A. hypochondriacus* ($r = 0,64$). У остальных видов коэффициенты корреляции ранжировались от 0,17 у *A. crispus* до 0,38 у *A. lividus*.

Таким образом, приведенные данные показали, что каждый из изученных видов характеризуется своей специфичной системой взаимосвязей признаков. Выявлены различия в структуре связей, которые, по существу, определяют структуру вида, обеспечивая ему возможность эволюционировать. Известно, что взаимозависимость признаков любого организма является неотъемлемым условием его существования и сама возникает в результате отбора наиболее устойчивых особей. Поэтому любая, самая незначительная связь признаков приобретает эволюционное значение, «ибо каждый ничтожный, казалось бы, признак об-

A. mantegazzianus (КДК = 0,27), затем следуют *A. nobilis*, *A. mantegazzianus chachiza* (КДК=0,33). Виды *A. spinosus*, *A. cruentus*, *A. leucospermus*, *A. crispus* и форма *Epinard verd* дивергировали с еще большей силой (КДК = 0,38). *A. graecizans* и форма *Local spinach* оказались совсем далекими от *A. hybridus* (КДК = 0,44). Таким образом, полученные нами данные в целом подтверждают сделанное ранее заключение о том, что степень дивергенции корреляционных структур у различных видов может различаться в зависимости от их филогенетического родства и соотношений внутри рода. Вместе с тем корреляционный анализ позволил выделить ключевой вид, который, по-видимому, сыграл решающую роль в происхождении рода *Amaranthus* L. в целом и происхождении зерновых амарантов в частности. Таким видом является *A. hybridus*. На исключительную роль в происхождении зерновых амарантов в свое время указывали многие авторы (Pal *et al.*, 1982; Железнов и др., 1991; Chan, Sun, 1997). Исследования этих авторов подтверждают монофилетическую гипотезу Сауера (Sauer, 1967), которая предполагает, что три зерновых вида (*A. cruentus*, *A. caudatus* и *A. hypochondriacus*) произошли от единственно-

го предка. Более вероятным общим предком, по его мнению, является *A. hybridus*.

Попарное сравнение КДК *A. hybridus* и других видов дало неоднозначные результаты. Одни из них имели высокое значение КДК, другие – низкое, третьи – среднее. И это закономерно, так как в процессе видообразования они могли пройти через бутылочное горлышко или подвергнуться давлению естественного или искусственного отбора в процессе доместикации и расселения в новые географические районы.

На основании табл. 1 был построен график методом многомерного шкалирования (MDS) пакетом XLSTAT (www.xlstat.com) (рис. 2), где более наглядно показана степень филогенетического родства между изучаемыми видами амаранта. При построении графика метрика учитывала только порядок (ord (2)).

Таким образом, анализ литературных данных и наши исследования показали, что корреляции и корреляционные плеяды позволяют ввести количественную меру в изучение процессов эволюции, селекции, систематики и филогении. На нашем материале был обнаружен комплекс согласованных признаков, которые представля-

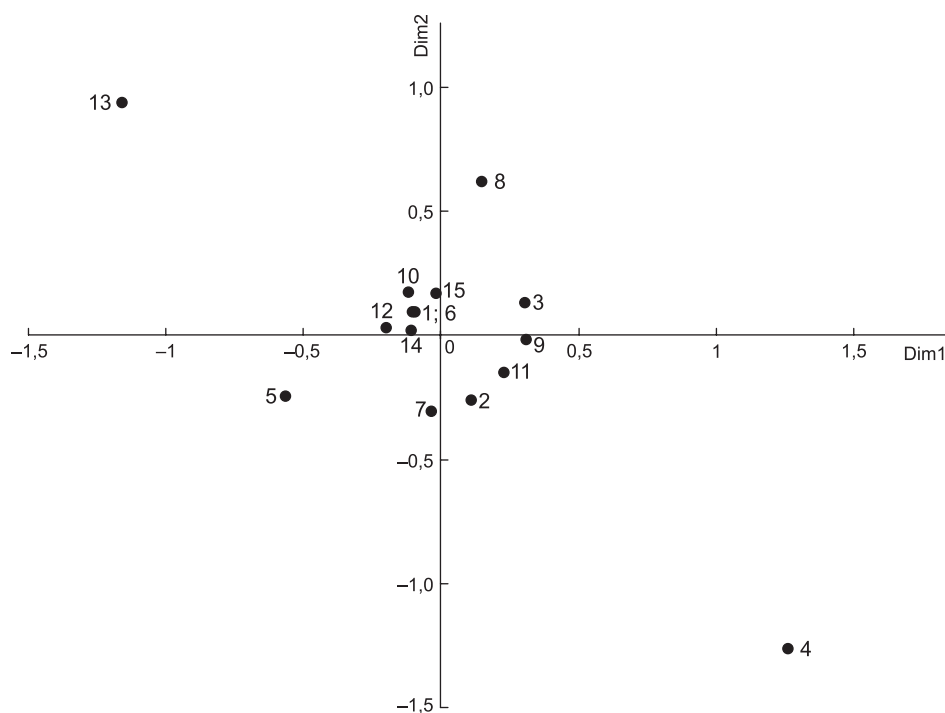


Рис. 2. График многомерного шкалирования.

ют функционально-морфологическую плеяду у амаранта. При установлении корреляции между признаками обнаруживается связь, определяющая влияние одного признака на другой, с одной стороны, с другой – создается база для прогноза результатов отбора и оптимизации селекционного процесса.

Авторы выражают благодарность В.Н. Бабенко за плодотворное обсуждение результатов работы.

Литература

- Абдул Кадер Амин Эль Хажж. Закономерности изменчивости хозяйственно важных признаков и их корреляций у амаранта и перспективы их использования в селекции: Автореф. дис. ... канд. М., 1999. 16 с.
- Берг Р.Л. Корреляционные плеяды и стабилизирующий отбор // Применение математических методов в биологии. Л.: Изд-во ЛГУ, 1964. Т. 3. С. 23–60.
- Бугайлов В.Д., Бабич А.А., Прокопенко Л.С. и др. Оценка качества исходного материала для селекции амаранта зернового // Матер. 2-го Междунар. симп. «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их практического использования». Пушино, 1977. С. 174–175.
- Гужов Ю.Л., Фукс Ф., Валичек П. Селекция и семеноводство культивируемых растений. М.: Мир, 2003. 535 с.
- Железнова Н.Б., Железнов А.В., Шумный В.К., Колосова Л.Д. Перспективы возделывания амаранта на кормовые цели и семена // Сиб. вестн. с.-х. науки. 1989. № 4. С. 45–53.
- Железнов А.В., Железнова Н.Б., Бурмакина Н.В. Оценка степени дивергенции корреляционных структур различных систематических категорий на примере амаранта (*Amaranthus L.*) // С.-х. биология. 2009а. № 1. С. 50–53.
- Железнов А.В., Железнова Н.Б., Бурмакина Н.В., Юдина Р.С. Амарант: научные основы интродукции. Новосибирск: Академ. изд-во «Гео», 2009б. 235 с.
- Железнов А.В., Солоненко Л.П., Железнова Н.Б. Белки семян дикорастущих и культурных видов амаранта (*Amaranthus L.*) // Генетика культурных видов растений: Сб. науч. статей. Новосибирск, 1991. С. 234–250.
- Железнова Н.Б., Юдина Р.С., Железнов А.В. Изменчивость и корреляционные связи некоторых признаков у амаранта печального *Amaranthus hypochondriacus L.* // С.-х. биология. 2008. № 1. С. 40–47.
- Переpravо Н.И., Рябов А.А., Карпин В.И. Особенности семеноводства амаранта и качественные показатели его семян в условиях Центрального района Нечерноземной зоны России // Матер. 2-го Междунар. симп. «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их практического использования». Пушино, 1977. С. 79–81.
- Плохинский Н.А. Биометрия. Новосибирск: Изд-во Сиб. отд-ния АН СССР, 1961. 363 с.
- Терентьев П.В. Метод корреляционных плеяд // Вестн. ЛГУ. 1959. Вып. 9. № 2. С. 137–141.
- Шмидт В.М. Опыт анализа дивергенции корреляционных структур систематических категорий // Применение математических методов в биологии. Л.: Изд-во ЛГУ, 1964. Вып. 3. С. 61–69.
- Brenner D.M., Baltensperger D.D., Kulakov P.A. *et al.* Genetic resources and breeding of *Amaranthus* // Plant Breed. Rev. 2000. V. 19. P. 227–285.
- Chan K.F., Sun M. Genetic diversity and relationship detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus* // Theor. Appl. Genet. 1997. P. 865–873.
- Pal M. Evolution and improvement of cultivated *Amaranthus*. I. Breeding system and inflorescence structure // Proc. Indian Nat. Sci. Acad. 1972. V. 38. P. 28–37.
- Pal M., Panday R.M., Khoshoo T.M. Evolution and improvement of cultivated *amaranthus*. IX. Cytogenetic relationships between the two basic chromosomes numbers // J. Heredity. 1982. V. 73. № 5. P. 353–356.
- Sauer Y.D. The grain *amaranthus* and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey // Ann. Missouri Bot. Garden. 1967. V. 54. № 2. P. 103–137.

**CORRELATION ANALYSIS OF SOME
AMARANTH SPECIES (*AMARANTHUS* L.)**

A.I. Stasyuk, N.B. Zheleznova, A.V. Zheleznov

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

Summary

Correlation analysis of some characters was performed for 12 amaranth species and 3 forms. It was shown that every species had a specific set of correlated characters. Differences in the structure of associations, which in fact determine the structure of the species were revealed. The degree of divergence of correlation structures between different amaranth species depended on their phylogenetic relationship and relationships within the genus.

Key word: amaranth, species, coefficient of divergence, correlation pleiad, variability.

ВАДИМ БОРИСОВИЧ ЕНКЕН: К 110-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ

Н.П. Гончаров

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

Исполнилось 110 лет со дня рождения доктора сельскохозяйственных наук, профессора Вадима Борисовича Енкена, известного ученого – генетика растений, селекционера по зернобобовым культурам, монографа рода *Glycine* L. (соя), одного из «отцов-основателей» Института цитологии и генетики СО РАН.

Ключевые слова: В.Б. Енкен, генетика и селекция растений, *Glycine* L.



24.09.1900–26.01.1981

Вадим Борисович Енкен родился 24 сентября 1900 г. в г. Анапа Кубанской области. Его мать Лидия Клавдиевна (род. в 1876 г. в Полтаве – ум. в 1955 г. в Отраде Кубанской Краснодарского края) была домохозяйкой, отец Борис Карлович (род. в 1873 г. в Тамбове – ум. в 1943 г. в Отраде Кубанской) до Октябрьской революции работал сначала уездным агрономом в Петровском уезде Саратовской губернии, позже помощником заведующего Харьковской опытной станцией и занимался селекцией подсолнечника (Елагин, 1986), а после революции – специалистом по селекции полевых культур на Харьковской

опытной станции, в других научных учреждениях страны и преподавал в вузах¹. Б.К. Енкен не был чужд просветительской деятельности: он принимал участие в написании статей для полутома «Земледелие» «Народной энциклопедии» (1910). Несомненно, что профессия отца, стоявшего у истоков институционализации селекции растений в Российской Империи (Енкен Б., 1911, 1912а) и организации сельскохозяйственного опытного дела (Материалы ..., 1902; Енкен Б., 1912б), предопределила впоследствии и выбор сына.

Среднее образование Вадим Борисович получил в Харькове. В 1920 г., имея отсрочку по состоянию здоровья от службы в Красной Армии, поступил служить в морскую береговую милицию городов Анапа и Новороссийск. В 1921 г. был откомандирован в Краснодарский индустриальный техникум, из которого перевелся на агрономический факультет Кубанского политехнического института, реорганизованный в 1922 г. в самостоятельный Кубанский сельскохозяйственный институт, ныне Кубанский государственный аграрный университет, г. Краснодар) и в феврале 1925 г. его успешно окончил². В 1926 г. защитил квалификационную

¹ После ареста зав. кафедрой генетики, селекции и семеноводства Краснодарского СХИ В.С. Пустовойта с 1930 г. непродолжительное время заведовал этой кафедрой (<http://af.kubagro.ru/kafedry/genetika>).

² Свидетельство № 1789. Кубанский СХИ. 18 февраля 1925 г. (Личное дело В.Б. Енкена. Архив ИЦиГ СО РАН).



Будущий академик ВАСХНИЛ и ведущий селекционер страны по мягкой пшенице Василий Яковлевич Юрьев (крайний слева), отец В.Б. Енкена Борис Карлович (крайний справа) и его мать Лидия Клавдиевна (2-я справа) во время работы на Харьковской опытной станции, Харьков 1910-е гг.

(дипломную) работу, посвященную изучению ботанического состава староместных сортов ячменя «К изучению яровых ячменей Северо-Кавказского края», и получил квалификацию «ученого агронома»³. Зимой 1923/24 гг. в Кубанский СХИ из Ленинграда приезжал Константин Андреевич Фляксбергер⁴ с целью организации опытных посевов зерновых культур на Кубани (Енкен В.Б., 1987б). Участок для посевов был выделен в Круглинке (ныне здесь расположен ГНУ Институт масличных культур им. В.С. Пустовойта РАСХН). На следующий год недалеко от г. Армавира, в четырех верстах от железнодорожной станции Отрада Кубанская был организован Армавирский опорный пункт Института прикладной ботаники и новых культур (ИПБиНК)⁵, где высеяли большой набор различных полевых культур. Опорный пункт

расположили в степной зоне Кубани⁶. Здесь созревало все: от ячменя до поздних форм кукурузы. В числе приглашенных практикантов для работ с посевами злаков оказался и студент последнего курса местного сельхозинститута В.Б. Енкен. С тех пор он проработал в Северо-Кавказском отделении Института (позже Кубанская опытная станция Всесоюзного института растениеводства, КОС ВИР)⁷ 35 лет, с 1925 по 1959 гг., пройдя путь от старшего лаборанта до директора станции⁸. С 4 октября 1942 по 3 марта 1943 гг., находясь в Красноуфимске Свердловской области, заведовал отделом зер-

³ Свидетельство № 36. Кубанский СХИ. 2 июля 1926 г. (Личное дело В.Б. Енкена. Архив ИЦиГ СО РАН).

⁴ О К.А. Фляксбергере см. статью О.П. Митрофановой, Р.А. Удачина (2007).

⁵ Армавирский опорный пункт 24 сентября 1924 г. стал Северо-Кавказским отделением Института (директор А.А. Орлов). В 1924 г. на Армавирском опытном пункте ИПБиНК В.Б. Енкен впервые встретился с Н.И. Вавиловым (Енкен, 1987а).

⁶ До открытия Дербентского пункта Северо-Кавказское отделение было главной базой изучения пшениц, ячменя, нута, сои, льна и других масличных культур, интродукции древесных и главным пунктом по изучению коллекций и селекции кукурузы и сорго. «Это будет наша главная множительная станция по полевым культурам», – писал Н.И. Вавилов Д.Н. Бородину 5 ноября 1925 г. (Николай Иванович Вавилов ..., 1994, С. 144).

⁷ В 1930 г. ИПБиНК был реорганизован во Всесоюзный институт растениеводства (ВИР).

⁸ «Назначен директором КОС 23 июля 1941 г. В ночь с 3 на 4 августа [1942 г. – Н.Г.] эвакуировал коллектив станции. 3 октября прибыл в ВИР, который в это время находился в Красноуфимске...» (Личное дело В.Б. Енкена. Архив ВИР).



В.Б. Енкен с женой Марией Александровной Митюквич (Кубань, 1926 г.). Фото из семейного архива Ольги Вадимовны Енкиной.

нобобовых культур ВИР, куда тот был частично эвакуирован из блокадного Ленинграда. После освобождения Кубани В.Б. Енкен вместе с сотрудниками станции возвращается в Отраду Кубанскую и с марта 1943 г. вновь назначается директором опытной станции. В феврале 1946 г.

по собственному желанию оставляет этот пост и остается заведующим отделом зернобобовых культур КОС ВИР до переезда в Новосибирск.

В 1936 г. по совокупности работ ему были присуждены ученая степень кандидата сельскохозяйственных наук и звание старшего научного сотрудника. В 1956 г. в Ленинграде в ВИР защитил диссертацию «Соя (агроботаническая монография)» на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук. В 1964 г. ему было присвоено звание профессора по специальности «генетика».

Одна из тем, которой В.Б. Енкен занимался на КОС со студенческих времен, – селекционная оценка ячменей в условиях Северного Кавказа. Мировое разнообразие ячменя на станции исследовали под руководством монографа этой культуры А.А. Орлова (1935, 1936). Из этих многократно оцененных тысяч образцов В.Б. Енкены были выведены сорта ячменя: он является автором сорта Армавирский 593 (районирован с 1946 г., создан индивидуальным отбором из местной популяции засухоустойчивого ячменя, ранее возделываемого в Армавирском районе (Трофимовская, 1974)), и соавтором сортов Кубанец (районирован с 1947 г., соавторы С.А. Захарченко, Ф.Х. Бахтеев и А.Н. Снеткова, отобран из грузинского местного сортообразца ячменя из коллекции ВИР)



Коллектив кубанской станции ВИР (13 окт. 1936 г. Отрада Кубанская).

1-й ряд 5-й слева помощник директора по научной работе В.Б. Енкен, 2-й ряд крайний справа (с газетой) Б.К. Енкен – зав. научной библиотекой (Фото из семейного архива Ольги Вадимовны Енкиной).

и Нудум малоазиатский (районирован в 1945 г., создан методом индивидуального отбора из популяции малоазиатского ячменя) этой же культуры. Сорт Кубанец широко возделывался в Ростовской области. При селекции на зимостойкость озимых (зимующих) сортов ячменя им была разработана простая методика оценки по этому признаку – посадка на возвышенных грядах (искусственных гребнях) (Енкен В.Б., 1948)⁹.

Вадим Борисович очень много работал над проблемой повышения устойчивости к болезням зерновых бобовых культур. Им впервые в стране были изучены виды бактериоза фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) и оценена поражаемость различных типов и сортов этой культуры. Была разработана методика селекции на устойчивость нута¹⁰ к аскохитозу (*Ascochyta pisi* Lib.) – основной болезни этой культуры, лимитирующей его распространение в южных областях РСФСР (Енкен В.Б., 1954). Выведение В.Б. Енкеном с сотрудниками аскохитоустойчивых сортов нута Кубанский 199 (районирован с 1939 г., создан с использованием массового отбора из итальянского образца), Кубанский 16 (районирован с 1942 г., создан с использованием массового отбора из ташкентского образца коллекции ВИР), Совхозный 14 (районирован с 1955 г., получен методом гибридизации сортов Кубанский 163 × Кубанский 199), Степной 1 (районирован с 1959 г., получен методом гибридизации Кубанский 163 × к-863 из Малой Азии), Высокоро-слый 30 (районирован с 1958 г., получен методом сложной гибридизации сортов (Кубанский 163 × к-863 из Малой Азии) × (Кубанский 163 × Кубанский 199), ВИР 32 (районирован с 1969 г., соавторы М.А. Матюкевич, Р.Г. Веду-

шева) позволило ввести в производство сначала в Предкавказье, а затем и в Средней полосе России эту нетипичную для данных районов культуру.

Ранее его усилия привели к введению в культуру в европейской части России¹¹ сои и передаче в производство сортов этой культуры Кубанская 276 (передан в производство в 1936 г., создан индивидуальным отбором из маньчжурской популяции сои, привезенной с Дальнего Востока Н.И. Вавиловым) и Береговчанка (районирован с 1979 г., соавторы А.Я. Ала, А.И. Джевжик). Последний сорт создан с использованием индуцированной малой мутации из сорта Пионерка после облучения γ -лучами. Основным направлением увеличения производства зерна этой культуры В.Б. Енкен считал повышение ее урожайности за счет разработки технологии возделывания применительно к конкретным почвенно-климатическим условиям.

В.Б. Енкен по праву считался лучшим знатком сои (*Glycine* L.) – рода растений семейства бобовых. Культурная соя (*Glycine max* (L.) Merr. (син. *Glycine hispida* (Moench) Max.) – одно из богатейших по содержанию белка, близкого по своему составу к животному белку, возделываемых растений (в семенах современных коммерческих сортов белка не менее 40 %). В 1930-е гг. В.Б. Енкеном была опубликована классификация сои, обосновавшая выделение в пределах культурного вида сои *G. max* сначала 4 (Енкен В.Б., 1932), а затем 5 подвидов (Енкен В.Б., 1935). Он полагал, что основной ареал происхождения культурной сои находится в Китае, где сосредоточены древние очаги земледелия. Классификация В.Б. Енкена была детализирована Н.А. Базилевской и В.К. Дагаевой (1937), продолжившими деление вида *G. max* на экологические группы и разновидности.

В 1956 г. Вадимом Борисовичем была разработана новая система рода *Glycine*, обнаруженная сначала в докторской диссертации, а затем в 1959 г. опубликованная в монографии

⁹ В это же время другими селекционерами на КОС были выведены еще два сорта ярового ячменя Спартан II (районирован в 1949 г., автор С.А. Захарченко), Народный 9 (районирован в 1958 г., авторы С.А. Захарченко, Н.А. Цехановская) и передан в производство и районирован в 1963 г. один сорт озимого ячменя Бета Кетзорас (*Beta ketsoras*) венгерского происхождения (Трофимовская, 1974).

¹⁰ Нут, турецкий горох, бараний горох (*Cicer arietinum* L.) – растение семейства бобовых. В бобах современных сортов нута содержится от 20 до 30 % белка, около 40 % углеводов и до 7 % жиров. Культура возделывается главным образом в Турции, Северной Африке, Мексике, Индии, Пакистане, а также в бывших советских республиках Центральной Азии. В России нут выращивают на небольших площадях (120 000 га) в Нижнем Поволжье, Саратовской, Оренбургской, Пензенской, Астраханской и Омской областях.

¹¹ Первые опытные посевы сои в России были произведены в 1877 г. в Таврической и Херсонской губерниях. Селекция же была начата только через 35 лет после этого (1912 г.) на Амурском опытном поле. Однако во время гражданской войны селекционный материал был утерян, и в 1923 г. работы были начаты заново. В результате непрерывного отбора был создан первый отечественный сорт сои Амурская желтая 41 (районирован в 1933 г., автор В.А. Золотницкий).

«Соя» (Енкен В.Б., 1959). При этом он выделяет 6 вместо ранее описанных им 5 географических типов (подвидов сои) (рис. 1): корейский (ssp. *korajensis* Enk.), маньчжурский (ssp. *manshurica* Enk.), славянский (ssp. *slavonica* Kov. et Pinz.), китайский (ssp. *chinensis* Enk.), индийский (ssp.

indica Enk.) и полукультурный (ssp. *gracilis* (Skv.) Enk.) (Енкен В.Б., 1956). В.Б. Енкен отнес три подвида культурной сои – китайский (ssp. *chinensis*), корейский (ssp. *korajensis*), маньчжурский (ssp. *manshurica*) – к первичному генцентру и выделил один подвид индийский (ssp.

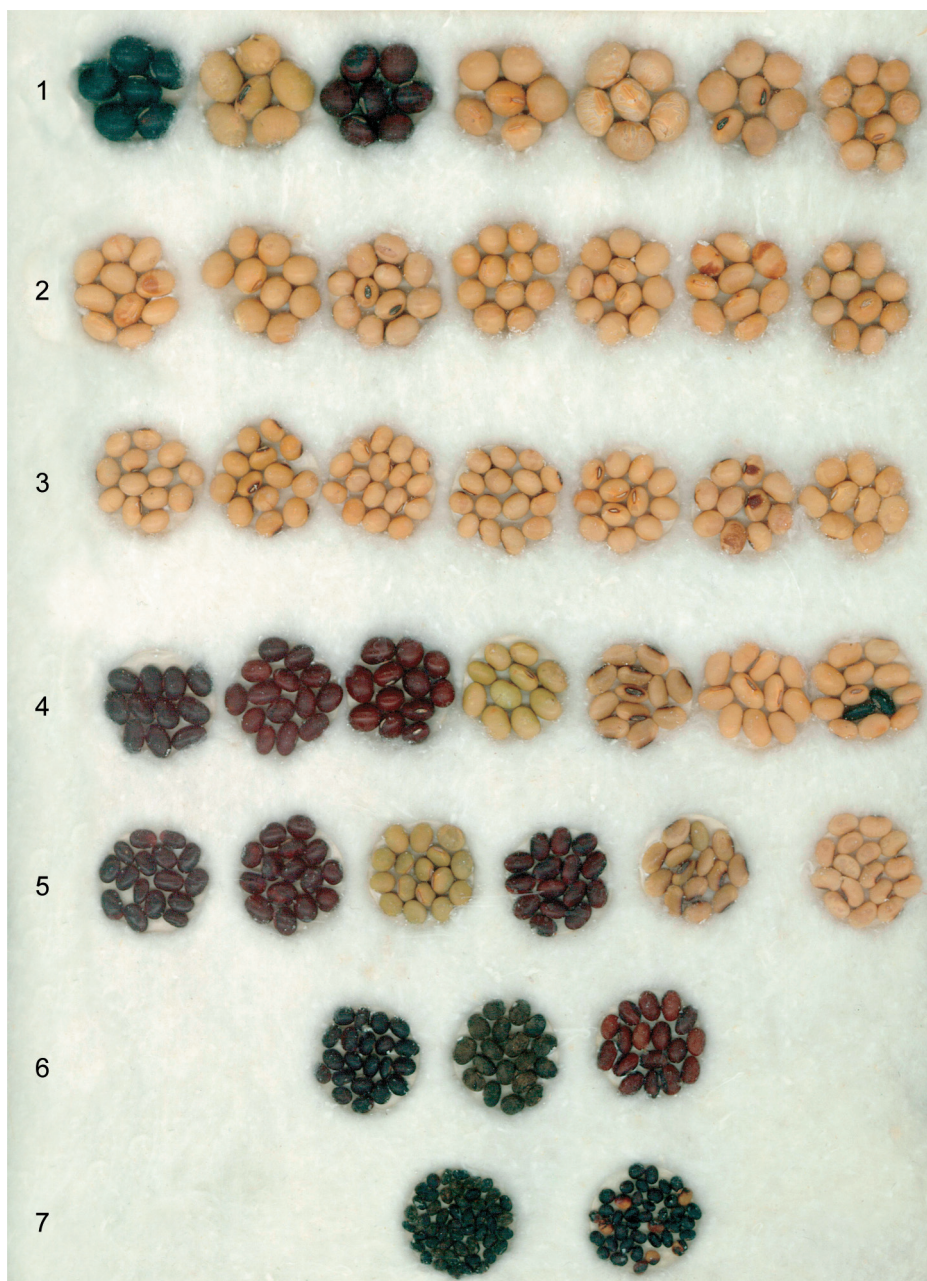


Рис. 1. Полиморфизм семян подвидов сои (планшет собран В.Б. Енкеном из образцов, выращенных на Кубанской опытной станции ВИР).

Ряды сверху вниз: 1 – подвид корейский (ssp. *korajensis* Enk.) ориг. образцы из Кореи и Японии; 2 – подвид маньчжурский (ssp. *manshurica* Enk.) ориг. образцы из Северо-Восточного Китая; 3 – подвид славянский (ssp. *slavonica* Kov. et Pinz.); 4 – подвид китайский (ssp. *chinensis* Enk.) ориг. образцы из Китая и Китайского Туркестана; 5 – подвид индийский (ssp. *indica* Enk.) ориг. образцы из Индии и Индокитая; 6 – подвид полукультурный (ssp. *gracilis* (Skv.) Enk.); 7 – дикая соя (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.).



На прогулке по новосибирскому Академгородку.

Слева направо: А.Н. Лутков, иностранный гость, В.В. Хвостова, В.Б. Енкен, Г.Ф. Привалов.

indica) для генцентра Индии и один – славянский ssp. *slavonica* для Западной Европы (Енкен В.Б., 1959). В связи с переходом на работу в Институт цитологии и генетики СО АН СССР (г. Новосибирск) систематикой этой культуры он больше не занимался. Позже в 1970-е гг. в ВИР после проведения анализа сборов дикорастущей сои из Австралии классификация В.Б. Енкена была пересмотрена. Был выделен второй очаг видообразования сои – австралийский и описаны 9 новых видов рода (Корсаков, 1973; Корсаков, Мякушко, 1975 и др.)¹².

¹² В последнее время австралийскими ботаниками были описаны еще несколько новых видов многолетней сои: *G. pullenii* В.Е. Pfeil, Tindale & Craven, *G. aphyonota* В.Е. Pfeil, *G. gracei* В.Е. Pfeil & Craven, *G. montis-douglas* В.Е. Pfeil & Craven, *G. syndetika* В.Е. Pfeil & Craven, *G. peratosa* В.Е. Pfeil & Tindale, *G. rubiginosa* Tindale & В.Е. Pfeil (Tindale, Craven, 1993; Pfeil, Craven, 2002; Pfeil et al., 2006). В современной классификации род *Glycine* разделен на два подрода *Glycine* Willd. и *Soja* (Moench) F.J. Herm. (Palmer et al., 1996). При этом subgenus *Soja* состоит из 2 видов, произрастающих в северной и центральной частях Китая, Кореи, Японии, российском Дальнем Востоке и Тайване, а subgenus *Glycine* – из 25 видов, произрастающих главным образом в Австралии, а также на различных островах южной и западной частях Тихого океана, Тайване, островах Рюкю и Пескадор (Pfeil et al., 2006).

С 1959 по 1973 гг. В.Б. Енкен работал заведующим лабораторией генетических основ селекции растений ИЦиГ СО АН СССР, а с 1973 по 1981 гг. – профессором-консультантом этой же лаборатории. В Институте, созданном во времена лысенковщины, он после перевода в 1960 г. в Президиум СО АН СССР лаборатории профессора Д.Ф. Петрова и отъезда в 1961 г. в ВИР профессора И.Д. Романова (Кикнадзе и др., 2006) многие годы был единственным доктором наук (Захаров и др., 2000).

Его деятельность в первые годы работы в ИЦиГ СО АН СССР была направлена на восстановление генетических исследований и использование результатов генетики и ее наработок в селекции растений. Им было заложено одно из важнейших направлений работы Института – методические основы селекции растений (Гончаров, Шумный, 2006). С первых лет организации лаборатории общих методов селекции основной темой исследований была «Разработка методов экспериментального получения мутаций у растений, изучение закономерностей развития новых форм и выведение сортов для Западной Сибири» (Информационный отчет ..., 1960).



Енкен с сотрудниками и коллегами.

Первый ряд: И.И. Никоро (Герасименко), В.Б. Енкен, А.И. Железова. Второй ряд: ?, Л.И. Лайкова, В. Вертелецкая, В.В. Рубцова, В.М. Шепелев.

С 1930-х гг. для получения индуцированных мутаций у сельскохозяйственных растений применяют физические реагенты: X-, γ -лучи, тепловые нейтроны и др. (Делоне, 1928, 1930). Химические мутагены начали использовать значительно позже (см. Енкен В.Б. и др., 1967). В настоящее время данные методы получения индуцированных мутаций все реже применяются для создания дополнительной изменчивости у культурных растений (Гончаров Н.П., Гончаров П.Л., 2009).

В ИЦиГ СО РАН Енкеном Вадимом Борисовичем проведены фундаментальные исследования по изучению закономерностей мутационной изменчивости у форм растений, различающихся по генетическим особенностям, происхождению и эколого-географическим условиям произрастания. Им было показано, что частота индуцированных мутаций выше, чем спонтанных, и составляет 10^{-3} – 10^{-5} мутаций на ген на поколение, в то время как спектр их сходен (Enken, 1967).

Очень важным результатом В.Б. Енкена было заключение о том, что закон гомологических рядов в наследственной изменчивости действует

(применим) и для экспериментально полученных мутантов (Enken, 1967). Им было замечено, что чем генетически ближе сорта и другие «низкие» таксоны растений, тем больше наблюдаемое сходство в частотах и спектре индуцированных мутаций при однотипных мутагенных воздействиях, и чем менее они родственны, тем меньше наблюдаемое сходство (Енкен В.Б., 1965). Эти исследования явились теоретической и методической основой большой серии работ по созданию исходного материала для селекции с использованием методов индуцированного мутагенеза (Сидорова, 1971; Енкен, Чекуров, 1968 и др.). Главным методом получения дополнительной изменчивости селективируемых растений в лаборатории (рис. 2) было использование мутагенеза (Енкен В.Б. и др., 1967).

Вадим Борисович организовывал первые экспериментальные работы только что созданного ИЦиГ СО РАН, не имевшего на тот момент времени собственной экспериментальной базы, на полях Новосибирской опытной станции (позже филиал ВИР, ныне ГНУ СибНИИ растениеводства и селекции СРО РАСХН).

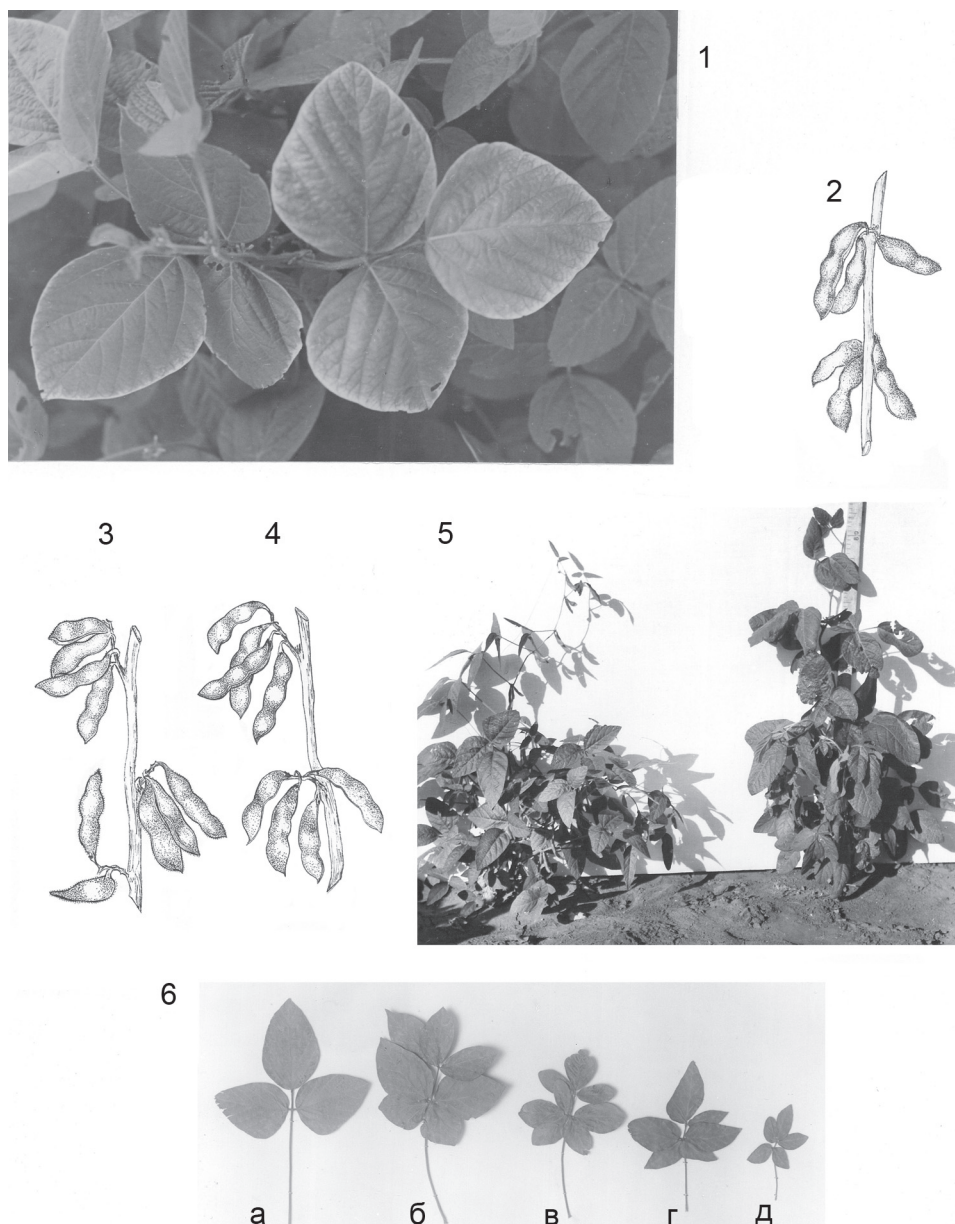


Рис. 2. Мутанты сои.

1 – хлорофильный мутант; 2 – исходный сорт Кубанская 276; 3–4 – продуктивная форма с повышенным числом бобов в кисти; 5 – многолисточковый мутант, полученный под воздействием γ -лучей, у сорта сои Амурская 42, 5 (а) – 1-й лист (контроль), 6 – (б–д) – первые листья мутантных растений.

Совместно с заместителем директора по науке Г.Ф. Приваловым (Чекуров и др., 2005) он занимался организацией южного репродукционного пункта Института в Усть-Каменогорске (бывшая Казахская ССР). Расположенный значительно южнее Новосибирска, Усть-Каменогорский опорный пункт (УКОП) позволял вести работу с такими теплолюбивыми культурами, как кукуруза (Сидоров и др., 1990), сорта которой обычно не дают полноценных семян в

Новосибирске. На УКОП были выполнены фундаментальные исследования: сформулирована и экспериментально подтверждена гипотеза перепределения генетического контроля признаков в различных экологических условиях (Никоро, Сидоров, 1965) и изучен контроль фертильности у тетраплоидной кукурузы (Семенов, 1969). Показана связь между системами размножения и количеством и структурой гетерохроматина (Похмельных, Шумный, 1996). В.М. Чекуровым



В.Б. Енкен с к.с.-х.н. Р.И. Гриценко на экспериментальных полях ИЦиГ СО АН СССР.

была начата селекция озимой пшеницы для Северного Казахстана и Западной Сибири. Самим В.Б. Енкеным с сотрудниками и аспирантами велись работы по селекции сои, нута и ряда других относительно теплолюбивых культур.

Преемником В.Б. Енкена на посту заведующего лабораторией генетических основ селекции растений стал Виктор Александрович Драгавцев, которым интенсивно велся поиск фоновых признаков для экспрессивной оценки генетической изменчивости в растительных популяциях (Драгавцев, Острикова, 1972). В настоящее время лаборатория прекратила свое существование.

Под руководством В.Б. Енкена было защищено 9 кандидатских диссертаций (Захаров и др., 2000). Считая себя учеником Н.И. Вавилова (Енкен В.Б., 1987б), Вадим Борисович сам воспитал высококлассных специалистов, таких, как А.Я. Ала, А.С. Васильев, И.И. Герасименко, Р.И. Гриценко, В.И. Молин, В.В. Рубцова, В.С. Соколов, В.М. Чекуров, В.М. Шепелев. Обе его дочери – Ольга (Енкина О.В., 1963) и Татьяна (Енкина Т.В., 1971) стали кандидатами биологических наук.

В.Б. Енкен – автор 12 районированных сортов и более 100 научных работ, в том числе 10 брошюр, книг и монографий. За научную и научно-организационную деятельность он был награжден орденами «Ленина» (1955 г.) и «Знак почета» (1949 г.), медалями «За оборону Кавказа», «За доблестный труд в годы Великой Отечественной войны 1941–1945 гг.», а также малой золотой медалью ВСХВ (1960 г.), 2 малыми серебряными медалями ВСХВ (1939, 1955 гг.) и 4 бронзовыми медалями ВДНХ. В 1981 г. ему было присвоено почетное звание «Заслуженный деятель науки и техники РСФСР»¹³.

Благодарности

Автор считает своим приятным долгом поблагодарить за помощь в сборе материалов д.б.н. М.А. Вишнякову и к.б.н. И.В. Сеферову (ВИР, г. С-Петербург), к.б.н. Т.В. Герасимову (КОС

¹³ О присвоении почетного звания «Заслуженный деятель науки РСФСР» В.Б. Енкену: Указ Президиума Верховного Совета РСФСР от 9 января 1981 г. // Ведомости Верховного Совета РСФСР. 1981. № 2. С. 53.



В.Б. Енкен с семьей: справа жена, Мария Александровна и дочери: сидит Ольга, стоит Татьяна. Фото из семейного архива Ольги Вадимовны Енкиной.

ВИР, г. Краснодар), к.б.н. О.И. Силаеву (Филиал ГНУ ГНЦ РФ ВИР «Кубанский генетический банк семян», г. Краснодар), проф. Г.Л. Зеленского (Кубанский государственный аграрный университет, г. Краснодар), проф. И.К. Захарова (ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск), к.б.н. Ю.Н. Шаврукова (Australian Centre for Plant Functional Genomics, Аделаида, Австралия), сотрудников библиотеки Украинского института растениеводства им. В.Я. Юрьева (г. Харьков, Украина), а также к.б.н. О.В. Енкину за предоставление фотографий из семейного архива.

Литература

- Базилевская И.А., Дагаева В.К. Соя // Культурная флора СССР. Т. 4. Зерновые бобовые. М.; Л.: Изд-во колх. и совх. лит-ры, 1937. С. 339–385.
- Гончаров Н.П., Гончаров П.Л. Методические основы селекции растений. 2-е изд. испр. и доп. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2009. 427 с.
- Гончаров Н.П., Шумный В.К. Методы генетики в селекции растений: к 80-летию Сибирского НИИ растениеводства и селекции // Информ. вестник ВОГиС. 2006. Т. 10. № 2. С. 395–403.
- Делоне Л. Опыты по рентгенизации культурных растений. 1. Пшеницы // Тр. науч. ин-та селекции. Киев, 1928. Т. IV. С. 1–16.
- Делоне Л. Опыты по рентгенизации пшениц // Тр. науч. ин-та селекции. Киев, 1930. Т. VI. Вып. 2. С. 3–15.
- Драгавцев В.А., Острикова В.М. Поиск фоновых признаков для экспрессивной оценки генетической изменчивости в растительных популяциях // Генетика. 1972. Т. 8. № 4. С. 33–37.
- Елагин И.Н. Выдающийся ученый-селекционер. К 100-летию со дня рождения академика В.С. Пустовойта // Вестник РАН. 1986. № 5. С. 134–139.
- Енкен Б. Необходимость созыва всероссийских съездов по отдельным отраслям опытного дела и немедленной организации областных съездов (комитетов) на местах: докл. // Тр. 1-го Съезда деятелей по селекции сельскохозяйственных растений, семеноводству и распространению семенного материала (10–15 янв. 1911, г. Харьков). Харьков, 1911. Вып. IV: докл. С. 85–94.
- Енкен Б. Письма из заграницы (Заметки селекционера). Харьков: Харьк. о-во с.-х. 1912а. 32 с.
- Енкен Б. Развитие опытного дела в России и его современное положение: докл. пом. директора Харьковской обл. с.-х. селек. ст. Полтава: Электрич. типо-литогр. Фришберга, 1912б. 52 с.
- Енкен В.Б. К познанию эколого-географических типов сои // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1932. Сер. 9. № 1. С. 47–69.
- Енкен В.Б. Селекция сои на Северо-Кавказском отделении ВИР // Тр. Ин-та зернобобовых культур. М.: Сельхозгиз, 1935. Т. 2. Вопросы систематики, генетики и селекции сои. С. 193–210.
- Енкен В.Б. Метод оценки на морозостойкость посевам на возвышенных грядах // Селекция и семеноводство. 1948. № 6. С. 17–20.
- Енкен В.Б. Селекция нута на устойчивость к аско-

- хитозу // Земледелие. 1954. № 7. С.
- Енкен В.Б. Соя. М.: Сельхозгиз, 1959. 622 с.
- Енкен В.Б. Роль генотипа в экспериментальном мутагенезе // Генетика. 1965. Т. 1. № 2. С. 124–136.
- Енкен В.Б. Встречи с Вавиловым // Наука и жизнь. 1987а. № 7. С. 80–86.
- Енкен В.Б. Обаятельный и добрый человек // Николай Иванович Вавилов: очерки, воспоминания, материалы. М.: Наука, 1987б. С. 336–339.
- Енкен В.Б., Чекуров В.М. Мутагенная активность N-нитрозоэтилмочевины на сое // Мутационная селекция. М.: Наука, 1968. С. 83–88.
- Енкен В.Б., Привалов Г.Ф., Сидорова К.К. и др. Методические указания по применению ионизирующих излучений в селекции сельскохозяйственных растений. М.: Колос, 1967. 38 с.
- Енкина О.В. Эффективность фосфоробактерина и некоторые вопросы биологического превращения фосфора в выщелоченных черноземах Кубани: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Краснодар, 1963. 22 с.
- Енкина Т.В. Патогенные микромицеты на растениях Новосибирской области: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 1971. 23 с.
- Информационный отчет лаборатории общих методов селекции за 1960 г. // Архив ИЦиГ СО РАН. 8 с.
- Захаров И.К., Чекуров В.М., Древич В.Ф. Вадим Борисович Енкен (к 100-летию со дня рождения) 24.09.1900–26.01.1981 // Информ. вестник ВОГиС. 2000. № 15. С. 23–24.
- Кикнадзе И.И., Орёл Л.И., Захаров И.К. Профессор Иван Дмитриевич Романов: к 100-летию со дня рождения // Информ. вестник ВОГиС. 2006. Т. 10. № 2. С. 404–417.
- Корсаков Н.И. Соя (систематика и основы селекции): Автореф. дис. ... д.с.-х.н. Л.: ВНИИР, 1973. 44 с.
- Корсаков Н.И., Мякушко Ю.П. Соя. Л.: ВНИИ растениеводства, 1975. 160 с.
- Материалы агрономического совещания при Саратовской губернской земской управе 27 июля 1902 г. Саратов: Тип. т-ва Г.Х. Шельгорна и К^о, 1902.
- Митрофанова О.П., Удачин Р.А. Константин Андреевич Фляксбергер – основоположник научного изучения пшениц в России // Информ. вестник ВОГиС. 2007. Т. 11. № 3/4. С. 591–608.
- Народная энциклопедия. Т. 4. Сельское хозяйство. Полутом 2. Земледелие. М.: Изд. т-ва И.Д. Сытина, 1910. 472 с.
- Николай Иванович Вавилов. Научное наследие в письмах. Международная переписка: В 6 т. Т. I. 1921–1927. М.: Наука, 1994. 556 с.
- Никоро З.С., Сидоров А.Н. Генетический анализ восстановителей фертильности в сорте кукурузы Рисовая 654 // Генетика. 1965. Т. 1. № 4. С. 64–73.
- Орлов А.А. Ячмени (Монография). М.; Л.: Сельхозгиз, 1935. 119 с.
- Орлов А.А. Ячмень // Культурная флора СССР. 1936. Т. 2. С. 97–332.
- Похмельных Г.А., Шумный В.К. Полиморфизм по гетерохроматическим узелковым районам хромосом и системы размножения кукурузы // Докл. АН. 1996. Т. 347. № 6. С. 840–842.
- Семенов В.И. Изучение характера конъюгации хромосом и анеуплоидии в связи с плодовитостью автотетраплоидной кукурузы // Генетика. 1969. Т. 5. № 10. С. 67–83.
- Сидоров А.Н., Шумный В.К., Саенко Л.И. и др. Сорт кукурузы Сибирячка // Генетика – народному хозяйству. (Информационные материалы). Новосибирск, 1990. С. 36–38.
- Сидорова К.К. Экспериментальный мутагенез // Генетика и селекция гороха. Новосибирск: Наука, 1971. С. 161–197.
- Трофимовская А.Я. Дифференциация селекционных признаков в исследованиях мировой коллекции ячменя на Кубанской опытной станции // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1974. Т. 53. Вып. 3. С. 22–32.
- Чекуров В.М., Гончаров Н.П., Захаров И.К. Объект исследований обязывает жить долго // Информ. вестник ВОГиС. 2005. Т. 9. № 2. С. 262–267.
- Enken V.B. Manifestation of Vavilov's law of homologous series in hereditary variability in experimental mutagenesis // Abhandlungen der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin. Klasse für Medizin. 1967. № 2. S. 123–129.
- Palmer R.G., Hymowitz T., Nelson R.L. Germplasm diversity within soybean // Soybean: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology / Eds D.P.S. Verma, R.C. Shoemaker. Wallingford, UK: CAB International, 1996. P. 1–35.
- Pfeil B.E., Craven L.A. New taxa in *Glycine* (Fabaceae: *Phaseolae*) from north-western Australia // Australian Systematic Botany. 2002. V. 15(4). P. 565–573
- Pfeil B.E., Craven L.A., Brown A.H.D. *et al.* Three new species of northern Australian *Glycine* (Fabaceae, *Phaseolae*), *G. gracei*, *G. montis-douglas* and *G. syndetika* // Austral. Syst. Bot. 2006. V. 19 (3). P. 245–258.
- Tindale M.D., Craven L.A. *Glycine pindanica* (Fabaceae, *Phaseolae*), a new species from west Kimberley, Western Australia // Austral. Syst. Bot. 1993. V. 6. P. 371–376.

Список публикаций В.Б. Енкена¹⁴

- Енкен В.Б. Как возделывать сою на Северном Кавказе. Ростов-на-Дону: Сев. Кавказ, 1929. 38 с.
- Енкен В.Б. К изучению инокуляции сои // Семеноводство. 1930. № 2/3. С. 24–26.

¹⁴ Составлено совместно с И.В. Котёлкиной (ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова, С.-Петербург).

- Енкен В.Б. Соя и ее возделывание на Северном Кавказе. Ростов-на-Дону: Северный Кавказ, 1930. 72 с. (Библиотечка сев.-кавк. хлебороба. Техника с.-х. Сер. 1. № 8).
- Енкен В.Б. Соя и ее возделывание на Северном Кавказе. 3-е изд. Ростов-на-Дону: Северный Кавказ, 1930. 84 с.
- Енкен В.Б. Соя и ее возделывание на Северном Кавказе. 4-е изд. Ростов-на-Дону: Северный Кавказ, 1931. 66 с.
- Енкен В.Б. Соя // Новые масличные культуры. ВИР, 1931. С. 5–77.
- Енкен В.Б. Материалы по инокуляции сои // Семеноводство. 1931. № 11/12. С. 55–60.
- Енкен В.Б. К познанию эколого-географических типов сои // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1932. Серия 9. № 1. С. 47–69.
- Енкен В.Б. Нормы высева и размножения сортов сои // Семеноводство. 1932. № 7. С. 17–19.
- Енкен В.Б. Селекция сои на Северо-Кавказском отделении ВИР // Тр. Ин-та зернобобовых культур. М.: Сельхозгиз, 1935. Т. 2. Вопросы систематики, генетики и селекции сои. С. 193–210.
- Енкен В.Б. Поражаемость фасоли бактериозом // Докл. ВАСХНИЛ. 1939. Вып. 7. С. 15–20.
- Енкен В.Б. Поражаемость фасоли бактериозами // Селекция и семеноводство. М., 1939. Вып. 9. С. 17–20.
- Енкен В.Б., Матюкевич М.А. Нут и его возделывание. Краснодар: Изд-во «Большевик», 1944. 25 с.
- Енкен В.Б., Митюкевич М.А. Нут, его свойства и приемы возделывания. Краснодар: Краевое книгоизд-во, 1946. 26 с.
- Енкен В.Б. Метод оценки на морозостойкость посевам на возвышенных грядах // Селекция и семеноводство. 1948. № 6. С. 17–20.
- Енкен В.Б. Поражаемость фасоли бактериозами // Тр. по прикл., ботан., генет. и селекции. 1949. Т. 28. Вып. 2. С. 90–118.
- Енкен В.Б., Генералов Г. Ф. Сорты сои // Руководство по апробации с.-х. культур. М., 1949. Т. 2. С. 300–317.
- Енкен В.Б. Соя // Руководство по апробации с.-х. культур. М., 1949. Т. 2. С. 292–300.
- Енкен В.Б., Матюкевич М.А. Классификация семян сои // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1952. Т. 29. Вып. 3. С. 71–90.
- Енкен В.Б. Соя. М.; Л.: Сельхозгиз, 1952. 180 с.
- Енкен В.Б. Нут // С.-х. энциклопедия. М., 1953. Т. 3. С. 417–418.
- Енкен В.Б., Викторов П.И. Нут – ценный белковый корм // Животноводство. 1953. № 6. С. 19–21.
- Енкен В.Б. Сорты нута // Научные учреждения Краснодарского края. 1953.
- Енкен В.Б. Соя // С.-х. энциклопедия. М.: Сельхозгиз, 1953. С. 569–572.
- Енкен В.Б. Соя // Зерновые бобовые культуры / Под общ. ред. акад. П.М. Жуковского. М.; Л., 1953. С. 174–220.
- Енкен В.Б. Селекция нута на устойчивость к аскохитозу // Земледелие. 1954. № 7. С. 82–87.
- Енкен В.Б., Матюкевич М.А. Нут // Большая Советская энциклопедия. М., 1954. Т. 30. С. 219.
- Енкен В.Б., Давыдов Н.Н., Гуржиева А.В., Галеев Г.С. Новинки селекции // Бюл. Всесоюз. ин-та растениеводства. 1956. № 1. С. 27–30.
- Енкен В.Б. Соя (агроботаническая монография): Автореф. дис... д-ра с.-х. наук. Л.: ВИР, 1956. 39 с.
- Енкен В.Б. Нут – ценная белковая кормовая культура // Наука и передовой опыт в сельском хозяйстве. 1957. № 4. С. 28–30.
- Енкен В.Б. Соя // Большая Сов. энциклопедия. 1957. Т. 40. С. 238–239.
- Енкен В.Б. Соя. М.: Гос. изд-во с.-х. лит-ры, 1957. 624 с.
- Енкен В.Б. Соя // Справочник по семеноводству. М.; Л.: Гос. изд-во с.-х. лит., 1959. С. 310–317.
- Енкен В.Б. Соя. М.: Сельхозгиз, 1959. 622 с.
- Енкен В.Б. Опыт возделывания нута // Земледелие. 1960. № 3. С. 63–67.
- Енкен В.Б. Соя // Зерновые бобовые культуры. М.: Сельхозгиз, 1960. С. 445–467.
- Енкен В.Б. Нут как кормовая культура // Зерновые бобовые культуры. М.: Сельхозгиз, 1960. С. 359–370.
- Енкен В.Б., Матюкевич М.А. Селекция нута // Науч. тр. Кубанской опытной станции ВИР. 1961. Т. 1. С. 82–98.
- Енкен В.Б. Отношение сои к влаге // Тр. Кубанской опытной станции ВИР. 1963.
- Енкен В.Б. Значение сортовых особенностей в экспериментальной мутационной изменчивости // Изв. СО АН СССР. Сер. биол.-мед. наук. 1963. № 12. Вып. 3. С. 52–59.
- Енкен В.Б. Критический период в развитии сои по требовательности ее к влаге // Науч. тр. Кубанской опытной станции ВИР. 1963. Вып. 2. С. 77–92.
- Енкен В.Б. Современное состояние и перспективы возделывания сои в СССР // Зернобобовые культуры. 1963. № 11. С. 5–7.
- Енкен В.Б. Введение // Соя. М.: Сельхозиздат, 1963. С. 3–8.
- Енкен В.Б., Рубцова В.В. Возможности возделывания сои в Западной Сибири // Соя. М.: Сельхозиздат, 1963. С. 134–158.
- Ред.: Соя / под ред. В.Б. Енкена. М.: Сельхозиздат, 1963. 333 с.
- Енкен В.Б. Нут и его селекция // Зернобобовые культуры. 1964. № 1. С. 19–22.
- Енкен В.Б., Рубцова В.В. Селекция и сортоизучение сои в Западной Сибири // Вестник с.-х. науки. 1964. № 5. С. 56–59.

- Енкен В.Б., Сидорова К.К. Различия в мутационной изменчивости двух сортов гороха // Изв. СО АН СССР. Сер. биол.-мед. наук. 1964. Вып. 1. С. 74–82.
- Енкен В.Б. Роль сорта в экспериментальном мутагенезе [с.-х. растений] // Генетика. 1965. Т. 2. № 2. С. 124–135.
- Енкен В.Б. Роль сорта при использовании в селекции радиации и химических мутагенов // Радиация и селекция растений / Ред. Н.П. Дубинин, В.В. Хвостова. М.: Атомиздат, 1965. С. 50–59.
- Енкен В.Б. Совещание по новому методу селекции (Москва, 25–30 янв. 1965 г.) // Зернобобовые культуры. 1965. № 6. С. 11–13.
- Енкен В.Б., Никоро И.И. Различия в мутировании сортов сои // Экспериментальный мутагенез животных, растений и микроорганизмов: Тез. докл. симп. 25–30 янв. 1965 г. М., 1965. С. 100–112.
- Enken V.B. Genotype of variety and experimental mutagenesis // Symp. on the Mutational Process. Section 1. Mechanism of Mutation and Inducing Factors. Praha, 1965.
- Енкен В.Б., Сидорова К.К. Опыт сравнения на горохе мутагенного действия гамма-лучей, этиленимина и этилметансульфоната // Влияние ионизирующих излучений на наследственность / Ред. Н.П. Дубинин. М.: Наука, 1966. С. 287–293.
- Enken V.B. Manifestation of Vavilov's law of homologous series in hereditary variability in experimental mutagenesis // Abhandlungen der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin. Klasse für Medizin, 1967. № 2. S. 123–129.
- Енкен В.Б. Роль генотипа в экспериментальном мутагенезе // Экспериментальный мутагенез у сельскохозяйственных растений и его использование в селекции. Тр. МОИП / Ред. С.А. Валева, В.В. Сахаров, Б.Н. Сидоров, В.В. Хвостова (отв. ред.). М.: Наука, 1966. Т. 23. С. 23–34.
- Енкен В.Б. Использование индуцированных мутаций в селекции зернобобовых // Культура зернобобовых растений. Вопросы биологии, селекции, семеноводства, агротехники и механизации. М.: Колос, 1967. С. 32–37.
- Енкен В.Б. Использование экспериментального мутагенеза в селекции бобовых и других культур (Краткое пособие по самоопылителям). М.: Колос, 1967. 80 с.
- Енкен В.Б. Селекция сои в СССР // Достижения отечественной селекции. М.: Колос, 1967. С. 234–254.
- Енкен В.Б. Селекция сои в СССР за 50 лет // Всесоюз. совещ. по вопросам биологии и возделывания сои в Советском Союзе. 18–22 сент. 1967 г., Благовещенск. Владивосток: Полиграф. комбинат, 1967. С. 98–100.
- Енкен В.Б., Привалов Г.Ф., Сидорова К.К. и др. Методические указания по применению ионизирующих излучений в селекции сельскохозяйственных растений. М.: Колос, 1967. 38 с.
- Енкен В.Б., Чекуров В.М. Мутагенная активность N-нитрозоэтилмочевины на сое // Мутационная селекция. М.: Наука, 1968. С. 83–88.
- Енкен В.Б., Базавлук И.М. Индуцированный мутагенез как метод получения высокобелковых форм сои // Физиология и биохимия сорта. Иркутск: Иркутское кн. изд-во, 1969. Ч. 1. С. 52–57.
- Енкен В.Б. Предисловие к русскому изданию // Соя. М.: Колос, 1970. С. 5–9.
- Енкен В.Б., Ала А.Я. Наследуемость размеров корневой системы у сои под влиянием мутагенов // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук. 1970. № 5. Вып. 1. С. 89–92.
- Ред.: Соя / перевод с англ. К.М. Селивановой; под ред. В.Б. Енкена. М.: Колос, 1970. 296 с.
- Енкен В.Б. Влияние наследственных особенностей исходных сортов на индуцированную мутационную изменчивость // Теория химического мутагенеза. М.: Наука, 1971. С. 154–166.
- Енкен В.Б. Значение исходных сортов при селекции методом индуцированного мутагенеза // Однолетние бобовые культуры на корм. М.: Колос, 1971. С. 35–38.
- Енкен В.Б. Опыт селекции сортов нута // Методы исследований с зернобобовыми культурами (матер. науч.-метод. совещ.). Орел, 1971. Т. 1. С. 234–238.
- Енкен В.Б. Краткий обзор итогов селекции сои в СССР // Биология и возделывание сои: Матер. Всесоюз. совещ. Владивосток, 1971. С. 121–131.
- Ала А.Я., Енкен В.Б. Наследуемость некоторых количественных признаков у сои под влиянием мутагенов // Теория химического мутагенеза. М.: Наука, 1971. С. 178–185.
- Енкен В.Б., Базавлук И.М. Возможности создания высокобелковых форм сои методом индуцированного мутагенеза // Однолетние бобовые культуры на корм. М.: Колос, 1971. С. 270.
- Герасименко И.И., Енкен В.Б., Трошина А.И. Влияние химических мутагенов и гамма-лучей на кормовые бобы // Теория химического мутагенеза. М.: Наука, 1971. С. 145–151.
- Мальченко В.В., Енкен В.Б., Зоз Н.Н. Исследования по экспериментальному мутагенезу сои // Теория химического мутагенеза. М.: Наука, 1971. С. 167–177.
- Енкен В.Б. Использование индуцированных малых мутаций в селекции сои // 2-й съезд ВОГиС. Москва 31 янв.–5 февр. 1972 г. Пленарные заседания: Тез. докл. Вып. 1. М., 1972. С. 183.
- Ала А., Енкен В. Изменчивость генетической структуры популяции сои под воздействием мутагенов // Индуцированный мутагенез у растений. Таллин, 1972. С. 5–11.

- Герасименко И.И., Енкен В.Б. Некоторые особенности индуцированного мутирования различных сортов сои под влиянием гамма-лучей // 2-й съезд ВОГиС. Москва. 31 янв.–5 февр. 1972 г. Выставка III: Тез. работ. Вып. 1. М., 1972. С. 45.
- Герасименко И.И., Енкен В.Б. Данные по совпадению спектров мутантов под влиянием различных мутагенов // 2-й съезд ВОГиС. Москва. 31 янв.–5 февр. 1972 г. Выставка III: Тез. работ. Вып. 1. М., 1972. С. 52–53.
- Герасименко И., Енкен В. Особенности индуцированного мутирования некоторых сортов сои // Индуцированный мутагенез у растений. Таллин, 1972. С. 168–176.
- Чекуров В.М., Енкен В.Б. Влияние пониженной температуры на повышение скрещиваемости мягкой пшеницы с рожью // 2-й съезд ВОГиС. Москва 31 янв. – 5 февр. 1972 г. Выставка III: Тез. работ. Вып. 1. М., 1972. С. 251–252.
- Енкен В.Б. Материалы по генетике и методике селекции растений // Проблемы теоретической и прикладной генетики. Новосибирск: ИЦиГ СО АН СССР, 1973. С. 160–177.
- Герасименко И.И., Енкен В.Б. Особенности индуцированной мутационной изменчивости сортов сои под влиянием гамма-лучей // Чувствительность организмов к мутагенным факторам и возникновение мутаций. Вильнюс, 1973. С. 134–139.
- Гриценко Р.И., Енкен В.Б. Особенности мутирования дикой и полудикой форм гороха *ssp. transcaucasicum* Govogov // Вопросы теоретической и прикладной генетики: Информ. матер. за 1974 г. Новосибирск, 1975. С. 47–48.
- Базавлук И.М., Енкен В.Б. Индукция малых мутаций как метод повышения количества и улучшения качества белка в семенах сои // Генетика. 1976. Т. 12. № 10. С. 46–53.
- Базавлук И.М., Енкен В.Б. Увеличение количества белка и улучшение его качества в семенах сои методом индуцированного мутагенеза // Вопросы теор. и прикл. генетики. Операц. матер. за 1975 г. Новосибирск, 1976. С. 64. 1976. Т. 12. № 10. С. 46–53.
- Енкен В.Б. Опыт использования малых мутаций в селекции сои // 3-й съезд ВОГиС. Ч. 1. (1). Л., 1977. С. 177.
- Енкен В.Б. Некоторые закономерности индуцированного мутирования, обусловленные генотипами исходных сортов // Междунар. генет. конгресс. секц. засед.: Тез. докл. Ч. II (1). М.: Наука, 1978. С. 231.
- Енкен В.Б., Козлова Т.Н. Индуцированный мутагенез в селекции сои // Селекция и семеноводство. 1979. № 5. С. 22–24.
- Енкен В.Б. Возможность возделывания сои в Сибири // Актуальные вопросы генетики и селекции растений: Тез. докл. Сиб. регион. конф. Барнаул, 23–27 июня 1980 г. Новосибирск, 1980. С. 41.
- Енкен В.Б., Гриценко Р.И. Пониженная температура в период прорастания семян сои как мутагенный фактор // Актуальные вопросы генетики и селекции растений. Тез. докл. Сибирской региональной конференции. Барнаул, 23–27 июня 1980 г. Новосибирск, 1980. С. 310.
- Енкен В.Б., Гриценко Р.И. Исследование мутантов сои и гороха // Усп. теор. и прикл. генетики. Новосибирск, 1982. С. 125–126.
- Енкен В. Встречи с Вавиловым // Наука и жизнь. 1987а. № 7. С. 80–88 (публ. подготовила Р. Гриценко).
- Енкен В.Б. Обаятельный и добрый человек // Николай Иванович Вавилов: Очерки, воспоминания, материалы. М.: Наука, 1987б. С. 336–339.
- Енкен В. Встречи с Вавиловым // За науку в Сибири. 1975, 14 дек.; 1976, 11 янв.; 1977, 11 дек., 18 дек.
- Енкен В. Встречи с Вавиловым // Колос Сибири. 2007.

Сорта В.Б. Енкена

1. Сорт сои Кубанская 276 (передан в производство в 1936 г., А.с. №111 от 30 августа 1943 г.).
2. Сорт нута Кубанский 199 (районирован с 1939 г., А.с. № 220 от 10 июня 1948 г.).
3. Сорт нута Кубанский 16 (районирован с 1942 г., А.с. № 219 от 10 июня 1948 г.).
4. Сорт ячменя Нудум малоазиатский (районирован в 1945 г., А.с. № 353 от 7 сентября 1949 г.).
5. Сорт ячменя Армавирский 593 (районирован с 1946 г., А.с. № 352 от 7 сентября 1949 г.).
6. Сорт ячменя Кубанец (районирован с 1947 г., соавторы С.А. Захарченко, Ф.Х. Бахтеев и А.Н. Снеткова, А.с. № 653 от 7 января 1952 г.).
7. Сорт нута Совхозный 14 (районирован с 1955 г., соавтор М.А. Матюкевич, А.с. № 435 от 20 июля 1956 г.).
8. Сорт нута Высокорослый 30 (районирован с 1958 г., А.с. № 1007 от 10 августа 1960 г.).
9. Сорт нута Степной 1 (районирован с 1959 г., А.с. № 1005 от 10 августа 1960 г.).
10. Сорт чины на корм Кормовая 31 (районирован в 1969 г., А.с. № 975 от 16 октября 1969 г., соавторы М.А. Матюкевич, А.А. Батух).
11. Сорт нута ВИР 32 (районирован с 1969 г., А.с. № 1004 от 16 октября 1969 г., соавторы М.А. Матюкевич, Р.Г. Ведышева).
12. Сорт сои на корм Береговчанка (районирован с 1979 г., А.с. № 2665 от 25 сентября 1979 г., соавторы А.И. Джевжик, А.Я. Ала).

Публикации о В.Б. Енкене

Брежнев Д.Д. Главная экспериментальная база ВИР // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1974. Т. 53. Вып. 3. С. 3–16. (С. 6, 9).

Енкен Вадим Борисович // На службе земли Кубанской. Майкоп: РИПО «Адыгея», 1999.

Шумный В., Сидорова К. Юбиляр на трудовом посту [К 80-летию В.Б. Енкена] // За науку в Сибири. 1980. 2 октября. С. 6.

Берг Р. Суховой. New York: Chalidze Publications,

1983. 335 с. (С. 309, 316, 317).

Ростовцева Т.С. Путь в науку или называя фамилии: Воспоминания. Коломна, 2002. 79 с. (С. 49–51, 56, 64, 67, 69, 72).

Захаров И.К., Чекуров В.М., Древич В.Ф. Ученый-селекционер Енкен Вадим Борисович (к 100-летию со дня рождения) // Информ. вестник ВОГиС. 2000. № 15. С. 23–24.

Берг Р.Л. Суховой. Воспоминания генетика. (2-е изд., доп.). М.: Памятники исторической мысли, 2003. 527 с. (С. 399, 406).

VADIM B. ENKEN: TO 110th ANNIVERSARY OF THE BIRTH

N.P. Goncharov

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

Summary

The 110th anniversary of Dr. V.B. Enken is celebrated. He was a prominent plant geneticist, plant breeder of grain legumes, genus *Glycine* L. taxonomist, and one of the founders of the Institute of Cytology and Genetics.

Key words: V.B. Enken, plant genetics and breeding, *Glycine* L.

К 100-ЛЕТИЮ СЕРГЕЯ СПИРИДОНОВИЧА ХОХЛОВА (29.09.1910–23.11.1974)

Н.А. Шишкинская

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия,
e-mail: nashishkinskaya@mail.ru

«К бессмертию в науке приходят разными путями. Одни оставляют в будущее многотомные труды...; другие нечеловеческим взлетом гениальных догадок, граничащих с фантазией, как молнией прорезают темный небосвод неизвестного, озаряя потомкам контуры горных вершин науки...». Эта фраза написана С.С. Хохловым в связи с оценкой вклада в биологию Г. Менделя. Но нет сомнения, что слова о гениальной догадке, граничащей с фантазией, в полной мере можно отнести к самому автору, а точнее к его теории о перспективах эволюции высших растений.

С.С. Хохлов родился 29 сентября 1910 г. в Саратове. В 1931 г. он окончил Красноуфимский техникум кормодобывания, получил специальность агронома. Несколько лет работал по специальности, в том числе во Всесоюзном институте зернового хозяйства Юго-Востока. В 1935 г. по рекомендации профессора Л.И. Казакевича, заведующего лабораторией сорных растений этого института, он поступил в Саратовский государственный университет. В 1939 г. попал в автомобильную катастрофу и на несколько лет оказался прикованным к постели. Несмотря на тяжелые травмы, он сумел закончить аспирантуру и защитить кандидатскую диссертацию.

Уже в начале пути в науке С.С. Хохлову посчастливилось работать под руководством известных ученых, профессоров Л.И. Казакевича, Н.П. Авдулова и А.Д. Фурсаева. В лаборатории Л.И. Казакевича он выполнил первое самостоятельное научное исследование, дав подробное ботаническое описание одного из видов пырея, *Agropyrum ramosum* L., которое позже вошло в руководство по сорным растениям.

На кафедре систематики растений Саратовского госуниверситета С.С. Хохлов специализировался у профессора Н.П. Авдулова, который был превосходным цитологом, специалистом по кариосистематике. С.С. Хохлов очень высоко ценил его труды. Огромное влияние на молодого ученого оказал профессор А.Д. Фурсаев, заведующий кафедрой ботаники Саратовского университета, которого С.С. Хохлов считал своим главным учителем и консультантом, и соавтором которого он был в ряде научных статей.

Несомненно, что работа под началом крупных ученых повлияла на формирование научного мировоззрения и сферу интересов молодого ученого. Уже в этот период проявился его интерес к исследованию важных общебиологических проблем, таких, как видообразование и эволюция растений. Выбрать основное направление научной работы ему помогла консультация с академиком В.Л. Комаровым – председателем Всероссийского ботанического общества, крупным специалистом в области эволюционной ботаники. В результате была определена тема его кандидатской диссертации: «О некоторых вопросах видообразования и эволюции растений». Основное внимание в ней уделено явлению апомиксиса (размножению семенами без оплодотворения). Во всем научном мире в тот период господствовало представление об апомиксисе как случайной аномалии, ведущей к вырождению и вымиранию и не имеющей эволюционных перспектив. Критически пересмотрев и оценив накопившиеся к этому времени сведения, касавшиеся разных сторон этого явления, С.С. Хохлов высказал и обосновал абсолютно новый взгляд на эволюционную роль апомиксиса. Он заключался в

том, что апомиксис – это закономерная ступень в эволюции высших растений, обусловленная развитием эволюционной тенденции к редукции гаметофита, которая должна завершиться его окончательным выпадением.

В диссертации были приведены данные из разных областей биологии, свидетельствующие о прогрессе апомиктических видов, их эволюционной молодости и пластичности. На основании этого С.С. Хохлов сделал вывод о том, что апомиксис – прогрессивное явление, которое ведет к совершенствованию системы размножения покрытосеменных растений и переходу к новому типу растений – бесполосеменному. Диссертация была успешно защищена в июле 1944 г., и вскоре С.С. Хохлов был избран доцентом кафедры ботаники Саратовского педагогического института.

Успешная защита и высокая оценка диссертации со стороны известных ученых стимулировали последующие исследования автора. В 1946 г. выходит из печати ряд работ по апомиксису, главной из которых стала «Бесполосеменные растения: исторические предпосылки и эволюционные перспективы», опубликованная в «Ученых записках Саратовского педагогического института». В 1947 г. Академией наук СССР она была удостоена премии им. В.Л. Комарова. Эта премия присуждается с 1946 г. за выдающиеся работы в области ботаники, систематики, анатомии и морфологии растений, ботанической географии и палеоботаники. Давая критическую оценку этой работы, академик Б.М. Козо-Полянский писал: «Особенностями работы являются ... культурность, широкий кругозор, идейность, значительность проблемы, самостоятельность мысли, применение исторического метода в новой области, стройность и увлекающая убежденность изложения, хороший язык. Работа С.С. Хохлова поднимает множество важных и современных вопросов эволюции растительного мира. И в этом ее крупное преимущество перед преобладающим у нас типом работ».

Автору 36 лет, но это уже зрелый ученый со сложившимся мировоззрением, способный мыслить широко и свободно, ставить и решать важные общепроцессуальные проблемы. Он продолжает работать в избранном им направлении и в 1948 г. успешно защищает

докторскую диссертацию «Опыт исследования перспектив эволюции высших растений» – труд, который, по словам официального оппонента В.Н. Сукачева, «принадлежит к тем, которые прокладывают новые пути в науке». Высоко оценил работу С.С. Хохлова и другой оппонент, выдающийся селекционер А.П. Шехурдин, подчеркнув важное значение затронутых автором проблем для развития селекции. Однако были и те, кто не разделял точку зрения С.С. Хохлова на перспективы эволюции растений. В частности, отрицательный отзыв дал известный ботаник академик П.М. Жуковский, который считал ошибочной концепцию С.С. Хохлова о переходе к бесполосемянности вследствие редукции мужского гаметофита.

Резкая критика взглядов С.С. Хохлова началась после августовской сессии ВАСХНИЛ 1948 г. Он стал очередной жертвой развернувшейся в стране идеологической кампании против «вейсманистов-морганистов» – приверженцев классической генетики, успешно развивавшейся в СССР благодаря работам корифеев генетической науки Ю.А. Филипченко, С.С. Четверикова, Н.К. Кольцова, А.С. Серебровского и др. В результате докторская диссертация С.С. Хохлова, получившая блестящие отзывы и высокую оценку ряда крупных ученых, была отклонена как «в корне противоречащая всем данным мичуринской науки».

Однако, несмотря на жесткую критику со стороны приверженцев «мичуринской биологии», в 1949 г. С.С. Хохлов был избран на должность заведующего кафедрой генетики и дарвинизма Саратовского госуниверситета, а в июне 1950 г. назначен проректором по научной работе. В июле 1950 г. он направил председателю ВАК и одновременно в газету «Культура и жизнь» протест против произвола и групповщины в науке. Этот шаг вызвал резкую реакцию «лысенковцев» в виде обличительных публикаций и частых проверок работы кафедры со стороны местных и министерских комиссий.

В 1951 г. разгорелась острая дискуссия по книге С.С. Хохлова «Перспективы эволюции высших растений», которая была спровоцирована появлением в печати статьи академика И.И. Презента, главного идеолога «лысенковцев», с обвинениями в сторону автора, который, по его словам, «встал на антидарвиновские

позиции, неправильно ориентируя работников сельскохозяйственной практики».

Можно только догадываться, каких моральных и физических сил стоила С.С. Хохлову эта «дискуссия», и какой непоправимый урон нанесла она ему и без того слабому здоровью.

Для того чтобы оградить себя и кафедру от новых обвинений в антидарвинизме и идеализме, С.С. Хохлов временно переключает кафедру на другое направление научных исследований. В 1950 г. он публикует книгу «Деревья и кустарники Нижнего Поволжья», которая стала первой сводкой по дендрофлоре этого региона и практическим руководством для работников сельского хозяйства. В это время сотрудниками и аспирантами кафедры были начаты исследования биологии дуба и биологических основ возделывания винограда. Такое направление научных исследований вполне отвечало проводимой КПСС политике по подъему сельского хозяйства.

В 1954 г. уже после смерти И.В. Сталина С.С. Хохлов рискует выступить в прессе с

критикой взглядов Т.Д. Лысенко, президента ВАСХНИЛ, чье влияние в научных кругах все еще сохранялось. В статье «Новое в науке о биологическом виде и практика сельского хозяйства», опубликованной в «Ботаническом журнале» (1954, Т. 39, № 3, С. 357–378), он на фактическом материале показывает ошибочность взглядов Т.Д. Лысенко и их вред для практики сельского хозяйства.

Судьба вновь сталкивает С.С. Хохлова с «лысенковцами» во главе с И.И. Презентом в 1956 г. при работе председателем комиссии по разработке программ по генетике и дарвинизму для университетов, где приходилось отстаивать классические основы генетической науки. Из-за этого конфликта в 1956 г., несмотря на поддержку академика В.Н. Сукачева и члена-корреспондента АН СССР В.М. Козо-Полянского, ВАК вновь отклонил утверждение докторской диссертации С.С. Хохлова. В 1961 г. ученый совет СГУ направляет в ВАК очередное ходатайство о присвоении С.С. Хохлову ученого звания профессора. Однако после трехлетнего ожидания



С.С. Хохлов с сотрудниками кафедры генетики и дарвинизма СГУ (1956 г.).

В нижнем ряду слева направо: ассистент Людмила Ивановна Лайкова, лаборант Зоя Михайловна Иванова, доцент Галина Сергеевна Зотова, доцент Елена Владимировна Гришина, препаратор Зинаида Петровна (фамилия неизвестна). В верхнем ряду слева направо: старший лаборант Людмила Святославовна Звержанская, аспирант Людмила М. Злобина, С.С. Хохлов, лаборант Валентина Дмитриевна Аристова, препаратор Евгения Каминская.

вновь приходит отказ. И это несмотря на то, что его труды цитируются известными советскими учеными, а его оригинальная концепция апомиксиса завоевывает себе новых сторонников.

Между тем, работая в должности проректора по научной работе, С.С. Хохлов активно способствовал развитию новых актуальных направлений научных исследований на всех факультетах, организации научно-исследовательских подразделений, расширению издательской деятельности университета. Начиная с середины 1950-х гг. С.С. Хохлов ставил перед руководством университета и министерством вопрос о создании на базе кафедры проблемной лаборатории радиационной и экспериментальной генетики. Именно эти направления генетической науки развивались в эти годы особенно интенсивно. При поддержке академика В.А. Энгельгарда идею удалось реализовать в 1960 г., когда после колоссальных затрат моральных сил началось строительство лаборатории.

Созданная С.С. Хохловым проблемная лаборатория развернула полномасштабные исследования явления апомиксиса. В ней получили работу перспективные выпускники кафедры. В 1960-х гг. штат лаборатории насчитывал более двух десятков человек. В основном это были молодые энергичные сотрудники, жаждущие заниматься научной работой.

Постепенно под руководством С.С. Хохлова сложилась оригинальная научная школа, которая вскоре получила признание в нашей стране и за рубежом. Быстрому научному росту сотрудников способствовали регулярные теоретические семинары под председательством С.С. Хохлова, на которых обсуждались разнообразные научные проблемы, отчеты и диссертационные работы, а также широкое участие сотрудников во всесоюзных и международных совещаниях и постоянные контакты с отечественными и зарубежными учеными.

Немаловажную роль в подготовке квалифицированных специалистов сыграли собранная С.С. Хохловым на кафедре обширная библиотека научных статей по апомиксису на английском, немецком, французском и других языках и перевод их сотрудниками кафедры. Аналогичная библиотека была создана и в лаборатории.

С открытием лаборатории исследования апомиксиса стали более масштабными и разносто-

ронными. Одним из приоритетных направлений стало изучение явления гаплоидии, в частности разработка методов выявления и массового получения гаплоидов с использованием культуры клеток. С этими работами лаборатория вскоре смогла выйти на мировой уровень.

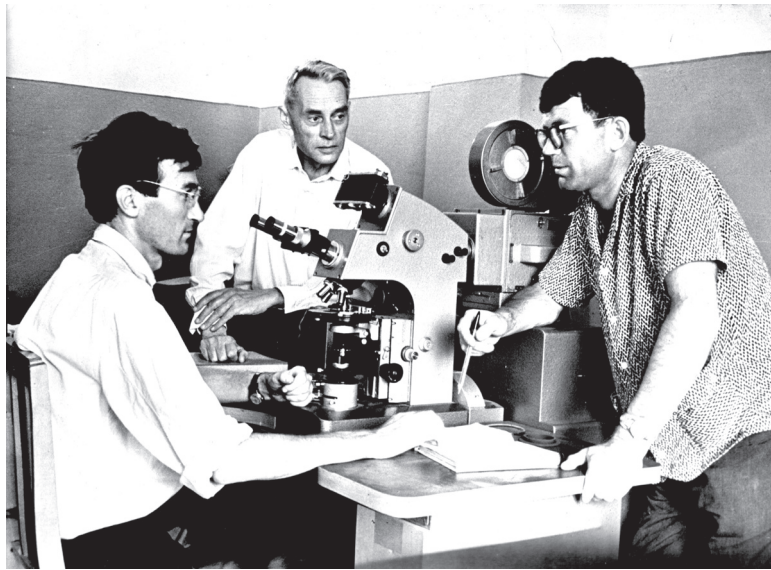
В 1965 г. произошло событие, сильно повлиявшее на преподавание генетики в вузах. В Москве в МГУ состоялся теоретический семинар, на котором произошел окончательный поворот в сторону классической генетики. Был дан последний бой «лысенковщине». С.С. Хохлов не только сам стал активным участником этого исторического события, но и предоставил такую возможность практически всем коллегам по кафедре. На семинаре среди таких «китов» генетической науки, как Н.П. Дубинин, Н.В. Тимофеев-Ресовский, М.Е. Лобашев, В.А. Энгельгард и другие, он был равным среди равных.

После семинара на кафедре кардинальным образом изменилось преподавание генетики, была создана коллекция линий дрозофилы, введены новые современные спецкурсы.

В этом же году Президиум АН СССР утвердил С.С. Хохлова членом оргкомитета по созыву учредительного съезда Всероссийского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС), и в 1966 г. на съезде он был избран членом его Центрального совета.

Признанием лидирующей позиции кафедры в разработке проблемы апомиксиса стало проведение в 1966 г. в СГУ I Всесоюзного совещания по апомиксису. В нем приняли участие представители 46 научных учреждений страны, в том числе ряд известных ученых: профессора В.А. Поддубная-Арнольди, Д.Ф. Петров, А.И. Купцов и др.

В 1967 г. ВАК (наконец-то!) пересмотрела свое решение по докторской диссертации С.С. Хохлова, и ему было присвоена ученая степень доктора биологических наук. Таким образом, получила официальное признание научная концепция автора о прогрессивной роли апомиксиса в эволюции высших растений. В этом же году С.С. Хохловым была опубликована важная монографическая статья «Апомиксис: классификация и распространение у покрытосеменных», в которой предлагалась оригинальная классификация форм апомиксиса и был приведен большой список апомиксичных видов. В



С.С. Хохлов с молодыми сотрудниками лаборатории цитологии и генетики СГУ В.С. Тырновым и Г.С. Козловым. 1974 г.

1970 г. под его редакцией выходит из печати первая, а в 1974 г. – вторая часть коллективной монографии «Гаплоидия у покрытосеменных растений», в которых обобщены результаты работ сотрудников кафедры и лаборатории, выполненные под его руководством.

В конце 1960-х гг. С.С. Хохловым была выдвинута идея об организации постоянных научных экспедиций в разные регионы СССР для сбора образцов апомиктично размножающихся растений. На их основе предполагалось создание коллекции апомиктов. Начиная с 1968 г. были обследованы флоры различных областей СССР, от Украины до Дальнего Востока, от Приполярья до Кавказа. Был собран обширный гербарный и эмбриологический материал для проведения исследований по выявлению апомиксиса во флоре СССР. Результаты этой работы легли в основу нескольких монографий и большого количества научных статей.

В своей научной и преподавательской деятельности С.С. Хохлов не замыкался в узких рамках проблем апомиксиса. Сохраняя приоритет за изучением апомиксиса, он инициировал исследования сотрудников лаборатории в области экспериментального мутагенеза, полиплоидии, культуры клеток, магнито- и радиобиологии на основе использования всех современных методов научного анализа. Под его руководством впервые в стране были

получены гаплоиды в культуре пыльников и растения-регенеранты – в культуре соматических клеток ряда злаков (в том числе и апомиктичных), разработаны методы выделения зародышевых мешков (в том числе живых) с помощью ферментативной мацерации семязачатков, определены пути использования гаплоидов для получения мутантов. В последние годы жизни он живо интересовался проблемой сверхслабого свечения растений, вероятно, справедливо считая, что «... как луч света в астрономии несет большую информацию о звездах и, вообще, о вселенной, так же он может дать информацию о глубинных явлениях внутри клетки». По всем перечисленным проблемам он организовывал для сотрудников стажировки и повышение квалификации в лучших лабораториях страны.

С 1968 г. под редакцией С.С. Хохлова регулярно издавался сборник «Апомиксис и цитозембриология растений», а в 1979 г. издательство «Наука» выпустило сборник трудов I Всесоюзного совещания по апомиксису также под его редакцией, впоследствии переведенный за рубежом на английский язык.

В последние годы жизни С.С. Хохлов уделял особое внимание развитию нового направления в исследовании апомиксиса – эмбриогенетике. Он понимал, что без определения характера генетического контроля апомиксиса невозможно

раскрыть полностью селекционный потенциал этого явления. Он предвидел, в каком направлении пойдет в дальнейшем исследование апомиксиса. И оказался абсолютно прав.

Талант С.С. Хохлова как ученого отражался и на его педагогической деятельности. Его лекции по курсу «Дарвинизм и история эволюционных учений» отличались глубиной и критическим анализом, а лекции по спецкурсу «Апомиксис» были необыкновенно эмоциональны и содержательны. Он был активным популяризатором науки и умел сложные специальные проблемы делать интересными и понятными даже для неподготовленных слушателей.

Он многократно входил в оргкомитеты всесоюзных конференций и симпозиумов по генетике, эмбриологии и эволюции.

Деятельность С.С. Хохлова выходила далеко за пределы Саратовского госуниверситета. Он был руководителем секции «Генетика систем размножения растений» Государственного комитета по науке и технике СССР, председателем Волжского отделения ВОГиС, членом Центральных советов ВБО и ВОГиС, членом Научного совета по проблемам генетики и селекции АН СССР, председателем подсекции апомиксиса этого совета, членом Научно-методического совета Минвуза СССР, членом редколлегии журнала «Генетика».

Вся жизнь С.С. Хохлова – это яркий пример служения науке, верности идеалам, постоянного движения вперед. Его труды наряду с трудами других выдающихся отечественных и зарубежных ученых составили прочный фундамент современной теории апомиксиса, на котором продолжает успешно развиваться созданная им школа. Память о замечательном ученом и человеке С.С. Хохлове живет в сердцах и трудах его учеников.

В конце сентября 2010 г. в Саратовском университете прошла международная научная конференция, посвященная 100-летию юбилею профессора С.С. Хохлова. В ее работе приняли участие ученые из Саратова, Новосибирска, Москвы, Красноярска, Уфы, Краснодара и других городов России и ближнего зарубежья. Эта конференция предоставила возможность его коллегам и ученикам еще раз воздать должное светлой памяти талантливого ученого, чьи труды внесли огромный вклад в

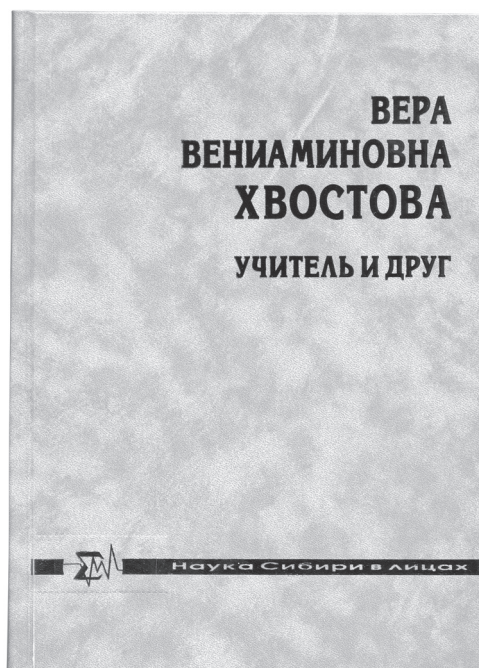
теорию апомиксиса и способствовали успешному развитию этого научного направления в нашей стране.

Основные труды С.С. Хохлова

- Хохлов С.С. О некоторых вопросах видообразования и эволюции растений в связи с процессом их расселения: Дис. ... канд. биол. наук. Саратов, 1944. 239 с.
- Хохлов С.С. Бесполосеменные растения (исторические предпосылки и эволюционные перспективы) // Уч. зап. Сарат. ун-та. Саратов, 1946. Т. 16. Вып. 1. С. 3–14.
- Хохлов С.С. Исторические предпосылки и эволюционное значение апомиксиса покрытосеменных // Докл. АН СССР. 1946. Т. 52. № 9. С. 811–815.
- Хохлов С.С. Опыт исследования перспектив эволюции высших растений: Дис. ... д-ра биол. наук. Саратов, 1948. 272 с.
- Хохлов С.С. Перспективы эволюции высших растений. Опыт исследования // Уч. зап. Сарат. пед. ин-та. Саратов, 1950. Т. 11. С. 3–197.
- Хохлов С.С. Новое в науке о «биологическом виде» и практика сельского хозяйства // Ботан. журнал. 1954. № 3. С. 357–378.
- Хохлов С.С. О теоретических основах использования явления бесполосемянности в селекции и семеноводстве // Науч. докл. высш. школы. Биол. науки. 1958. № 3. С. 130–132.
- Хохлов С.С. Классификация апомиксиса у покрытосеменных // Докл. АН СССР. 1958. Т. 119. № 4. С. 812–815.
- Хохлов С.С. О количестве видов растений, размножающихся бесполосеменным путем // Уч. зап. Сарат. ун-та. 1959. Т. 64. С. 117–123.
- Хохлов С.С. Эволюционно-генетическое значение различных типов развития зародышевых мешков // IV совещание эмбриологов: Тез. докл. по эмбриологии растений. Л.: Изд-во АН СССР, 1963. С. 47.
- Хохлов С.С. Задачи и методы исследования биологии бесполосеменного размножения. Вопросы биологии семенного размножения // Уч. зап. Ульяновск. пед. ин-та. 1965. Т. 20. Вып. 6. С. 17–31.
- Хохлов С.С. Явление апомиксиса и селекция // Сельское хозяйство России. 1968. № 10. С. 10–11.
- Хохлов С.С. Полиплоидия и апомиксис у покрытосеменных растений // Тр. совещ. «Полиплоидия и селекция» 14–18 января 1963 г. М.; Л.: Наука, 1965. С. 62–69.
- Хохлов С.С. Апомиксис у покрытосеменных: классификации и распространение // Усп. соврем. генетики. М.: Наука, 1967. Вып. 1. С. 43–105.
- Хохлов С.С. Некоторые закономерности эволюции

- двойного оплодотворения и проблема апомиксиса // Матер. Всесоюз. симп. по эмбриологии растений. Киев, 1968. С. 236–259.
- Хохлов С.С. К методике выявления апомиксиса у покрытосеменных растений // Апомиксис и цитоэмбриология растений. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1968. Вып. I. С. 136–141.
- Хохлов С.С. Эволюционно-генетические проблемы апомиксиса // Апомиксис и селекция. М.: Наука, 1970. С. 5–21.
- Хохлов С.С., Малышева Н.А. Распространение и формы апомиксиса в семействе злаков // Апомиксис и селекция. М.: Наука, 1970. С. 47–55.
- Хохлов С.С., Гришина Е.В., Зайцева М.И. и др. Гаплоидия у покрытосеменных растений. Ч. I. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1970. 138 с.
- Хохлов С.С. Апомиксис и его элементы у культурных видов и их диких сородичей // Апомиксис и цитоэмбриология растений. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1971. Вып. 2. С. 3–24.
- Хохлов С.С., Зайцева М.И. Программа и методика выявления апомиксиса у растений во флоре СССР // Ботан. журнал. 1971. Т. 56. № 3. С. 369–377.
- Хохлов С.С., Зайцева М.И., Близнюк Л.А. Анатомо-морфологический метод обнаружения апомиксиса у растений в природе // Проблемы апомиксиса у растений и животных. Новосибирск: Наука, 1973. С. 19–21.
- Хохлов С.С., Гришина Е.В., Тырнов В.С. и др. Гаплоидия у покрытосеменных растений. Ч. II. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1974. 180 с.
- Хохлов С.С., Тырнов В.С., Гришина Е.В. и др. Гаплоидия и селекция. М.: Наука, 1976. 221 с.

Вера Вениаминовна Хвостова – учитель и друг / сост. И.И. Кикнадзе, И.К. Захаров, Е.Б. Будашкина, А.Г. Истомина; отв. ред. В.К. Шумный, И.К. Захаров; Рос. акад. наук, Сиб. отд-ние, Институт цитологии и генетики. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2010. 204 с.



Книга посвящена Вере Вениаминовне Хвостовой (1903–1977) – доктору биологических наук, профессору, всемирно известной своими исследованиями в области цитогенетики, радиационной генетики и мутагенеза. Это книга о женщине-ученом, организаторе науки и педагоге, связавшей и разделившей свою жизнь с наукой – генетикой, с непростой историей ее становления и развития в нашей стране.

Работая после окончания аспирантуры в лаборатории генетики Института цитологии, гистологии и эмбриологии АН СССР, В.В. Хвостова выполнила ряд глубоких исследований, посвященных положению гена *cubitus interruptus*, локализованного в хромосоме 4 у *Drosophila melanogaster*. Она получила четкие экспериментальные доказательства зависимости проявления гена *cubitus interruptus* от его положения в хромосоме. Это направление работ стало классическим, а эффект положения гена широко использовали как российские, так и зарубежные генетики. Также В.В. Хвостова активно участвовала в разработке прямого влияния X-лучей на мутационный процесс и механизм возникновения хромосомных aberrаций.

С 1941 по 1956 гг. Вера Вениаминовна занималась преподавательской деятельностью и библиографической работой. Вернувшись к научным исследованиям в 1956 г., В.В. Хвостова активно включилась в разработку проблем радиационной генетики и прежде всего ее приложения к задачам практической селекции.

Особенно важна роль В.В. Хвостовой в становлении и возрождении генетики в нашей стране и в ее развитии в Сибирском отделении АН СССР. В воспоминаниях родных и друзей, коллег и ее учеников отражены жизнелюбие и обаяние В.В. Хвостовой и глубокий след, оставленный ею в науке и в их памяти. Дана биография и отмечены основные направления и результаты ее исследований в разные периоды жизни, в том числе в последнюю десятилетнюю пору жизни – яркую и особенно плодотворную – сибирскую, в Институте цитологии и генетики СО АН СССР. С 1958 г. она принимает активное участие в организации и создании цитогенетического научного направления института, с 1966 г. – она создатель и бессменный руководитель лаборатории цитогенетики. Организовав большой и активно работающий коллектив молодых ученых, В.В. Хвостова смогла развернуть широкий фронт работ по цитогенетике растений: геномному анализу межродовых и межвидовых гибридов злаков, цитогенетическим основам их плодovitости, зимостойкости, устойчивости к грибковым заболеваниям.

Она вела обширную научно-организационную и педагогическую работу, под ее руководством были успешно защищены 30 кандидатских диссертаций. Профессор В.В. Хвостова стала одним из активных создателей кафедры генетики и цитологии в Новосибирском государственном университете.

В книге представлены письма и фотографии, свидетельствующие о ее генеалогических корнях и ветвях, о широте круга ее общения. Она поддерживала научные контакты со многими известными зарубежными учеными и пропагандировала достижения российской генетики за рубежом. Вера Вениаминовна всегда гордилась тем, что вся ее творческая жизнь была отдана отечественной науке.

Будучи одним из создателей и активнейших членов Всесоюзного общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова, она видела свою главную задачу в распространении генетических знаний и с присущей ей энергией организовывала курсы для преподавателей вузов и селекционеров, выездные сессии центрального совета ВОГиС в городах Сибири.

Приведена полная библиография трудов и публикаций о ней. Ею опубликовано более 160 научных работ, переведено с английского, немецкого и французского языков свыше десятка крупных научных трудов, она – редактор большого числа коллективных монографий, многие из которых завоевали всеобщее признание.

Книга издана в серии «Наука Сибири в лицах» и предназначена для широкого круга читателей, но прежде всего она будет интересна биологам – генетикам, цитологам и селекционерам, историкам науки

и читателям, интересующимся прошлым нашей страны и людьми, составляющими ее гордость.

Книга издана при финансовой поддержке Президиума СО РАН и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 10 04 07036) тиражом 500 экземпляров. Книга поступила в фонды центральных научных библиотек и библиотек госуниверситетов.

В 2003 г. к 100-летию со дня рождения материалы о В.В. Хвостовой были опубликованы в журналах «Информационный вестник ВОГиС» (№ 24/25, С. 24–37) и «Генетика» (Т. 39, № 7, С. 1005–1008).

В.Н. Тихонов. Лабораторные мини-свиньи. Генетика и медико-биологическое использование / Отв. ред. д.б.н. В.Л. Петухов. Институт цитологии и генетики СО РАН. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2010. 305 с.



В книге рассматриваются актуальные вопросы генетики и использования карликовых мини-свиней, созданных в качестве нового вида лабораторных животных для исследования широкого круга важнейших проблем биологии, медицины и зооветеринарии. Представлены данные по биологическим и анатомо-физиологическим свойствам мини-свиней, характеризующие этих животных как наиболее адекватную модель для медико-биологических экспериментов, что обусловлено их очень большим сходством с человеком по особенностям липидного обмена веществ, строению сердечно-сосудистой и

пищеварительной систем, а также гомологией строения многих органов. В настоящее время во многих странах мира отчетливо наблюдается определенная тенденция к очень быстрому расширению масштабов использования свиней в качестве лабораторных животных.

В книге рассматриваются методы выведения и использования мини-свиней в разных странах, а также оригинальный метод выведения первых отечественных мини-свиней минисибс, которые были созданы благодаря многолетней исследовательской работе в лаборатории иммуногенетики и гибридизации животных Института цитологии и генетики СО РАН под руководством В.Н. Тихонова.

Уменьшение живой массы мини-свиней в 3–5 раз по сравнению с обычными свиньями значительно экономит расходы на помещения, что позволяет содержать их в обычных институтских вивариях в 2-ярусных клетках и в несколько раз сокращает затраты на их кормление. Такие размеры делают свиней удобными для экспериментальной работы, разработки новых методов хирургических операций и ксенотрансплантаций.

Книга является первым отечественным изданием по лабораторным карликовым свиньям, иллюстрирована более 100 цветными и черно-белыми оригинальными фотографиями; библиографический список включает более 400 названий работ. Книга рассчитана на биологов, медиков, генетиков-селекционеров.

Издание книги осуществлено при финансовой поддержке Президиума Сибирского отделения РАН. Тираж 300 экземпляров. Книга поступила в фонды центральных научных библиотек.

Вилен Николаевич Тихонов – доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник ИЦиГ СО РАН, автор 400 научных трудов, в том числе 15 монографий.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСЕЙ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В «ВАВИЛОВСКОМ ЖУРНАЛЕ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ»

Общие положения

«Вавиловский журнал генетики и селекции» публикует на русском (или английском) языке работы по всем разделам генетики, селекции, а также смежных наук. К публикации принимаются результаты оригинальных экспериментальных исследований; теоретические и обзорные статьи, представляющие интерес для научного сообщества; краткие сообщения, рецензии, письма редактору, персоналии, хроника, информация, сообщения из отделений ВОГиС, материалы и документы по истории генетики и селекции. Печатаются также материалы, касающиеся образовательных программ и методики преподавания генетики и селекции в средней и высшей школах. Журнал печатает заказные обзоры и проблемные статьи. Отдельные тематические выпуски посвящаются актуальным проблемам и направлениям генетики и селекции.

Хотя журнал и является официальным изданием Вавиловского общества генетиков и селекционеров, членство авторов в обществе необязательно – журнал одинаково открыт для всех.

Сайт журнала в Интернете:

http://www.bionet.nsc.ru/vogis/vavilov_journal

В редакцию статьи представляются в электронном виде в формате MS WinWord 6.0 (и выше) на дискетах размером 3,5", на CD, через FTP или по электронной почте в форме присоединенных файлов. Текст статьи, включая аннотацию на русском и английском языках, таблицы, иллюстрации и подписи к ним, а также список литературы оформляются одним файлом. Иллюстрации дополнительно присылаются отдельными файлами. Если пересылаемый материал велик по объему, следует архивировать файлы в формат *.zip или *.rar.

Текст статьи на бумаге обязателен.

Наш адрес: 630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10, Институт цитологии и генетики СО РАН. Редакция «Вавиловского

журнала генетики и селекции». Электронный адрес: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

К публикации в «Вавиловском журнале генетики и селекции» принимаются статьи, прошедшие рецензирование. Решение о публикации принимается редакционной коллегией журнала на основании экспертных оценок рецензентов с учетом соответствия представленных материалов тематической направленности журнала, их научной значимости и актуальности.

Поступившая в редакцию рукопись направляется на отзыв специалистам в данной области исследований. Авторы статьи могут назвать двух–трех потенциальных рецензентов. Наряду с фамилией каждого рецензента обязательно указание его полного имени и отчества, места работы, телефона, адреса электронной почты. Окончательный выбор рецензентов остается за редколлегией журнала. Рукопись, получившая отрицательные отзывы двух независимых рецензентов, решением редколлегии отклоняется.

Статья, нуждающаяся в доработке, направляется авторам с замечаниями рецензента и научного редактора. Авторы должны учесть все замечания, сделанные в процессе рецензирования и редактирования статьи, ответить на каждое из замечаний и указать место в рукописи, где сделаны изменения. В случае несогласия с рецензентом или редактором автор должен кратко и четко обосновать свою позицию. Сделанные автором изменения в рукописи необходимо внести в электронный вариант текста и вернуть в редакцию.

Статья, отправленная редакцией на доработку после рецензии и исправленная в соответствии с замечаниями рецензента, должна быть возвращена в редакцию в течение 15 дней с момента ее получения авторами. Статья, возвращенная в редакцию по прошествии месяца, будет иметь новую дату поступления.

Редакция не предоставляет авторам копии корректуры статьи на бумаге. Статья высылает-

ся автору в виде pdf-файла. На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если в корректуру вносятся исправления, при возвращении ее в редакцию подробный список сделанных исправлений необходимо приложить в виде отдельного файла.

Редакция оставляет за собой право отклонять без рецензии статьи, не соответствующие профилю журнала или оформленные с нарушением правил.

На всех стадиях работы с рукописями и для общения с авторами, редакторами и рецензентами используется электронная почта, поэтому авторы должны быть внимательны при указании своего электронного адреса.

Требования к оформлению рукописей

Статьи должны быть написаны на русском (или английском) языке, отредактированы и оформлены в соответствии с нижеследующими требованиями.

Объем статьи – до 20 страниц формата А4, нумерация страниц сквозная. В этот объем входят текст, аннотация, список литературы, таблицы, иллюстрации и подписи к ним. Основной текст набирается шрифтом Times New Roman через 1,5 интервала с выравнением по ширине и без переносов, размер шрифта 12 pt. Поля – 3 см со всех сторон страницы.

Статьи большего объема принимаются только после предварительного согласования с редакцией.

Латинские названия объектов исследований в названии статьи и в тексте пишутся с соблюдением общепринятых правил таксономической номенклатуры: бинарные видовые – курсивом (*Drosophila melanogaster*), таксонов более высокого ранга – прямым шрифтом (*Drosophila* или *Drosophilidae*). При первом упоминании в тексте родовые и видовые названия приводятся без сокращений, далее по тексту родовое название обозначается одной прописной (первой) буквой, а видовое указывается полностью (*D. melanogaster*).

Названия и символы генов набираются курсивом, а названия их продуктов – с прописной буквы прямым шрифтом. Например: гены *fos*, *c-тус*, *АТМ*; белки Fos, с-Мус, АТМ. Курсивом выделяются обозначения мобильных элементов,

например, *hobo*-элемент, а также три первых буквы названий сайтов рестрикции, например, *HindIII*. Названия фагов и вирусов пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.

Следует использовать общепринятые сокращения и аббревиатуры или приводить их дополнительно в тексте. Все физические размерности рекомендуется приводить в международной системе СИ.

Математические формулы и уравнения набираются в редакторах MS WinWord (версия 6.0 и выше) или MathType. Уравнения располагаются по центру строки и нумеруются арабскими цифрами в круглых скобках в порядке их упоминания в тексте. Номера уравнений выравниваются по правому краю строки. Уравнения отделяются от текста сверху и снизу одной пустой строкой. При написании нескольких уравнений они также разделяются пустой строкой.

Таблицы и иллюстрации (графики, схемы, фотографии, штриховые рисунки) представляются в черно-белом варианте.

Таблицы, иллюстрации и подписи к ним размещаются в тексте статьи при первом их упоминании. При этом не следует использовать опцию «обтекание текста».

Таблицы снабжаются тематическими заголовками и нумеруются арабскими цифрами в порядке их упоминания в тексте. Все графы в таблицах должны иметь заголовки. Сокращение слов в таблицах не допускается. Все аббревиатуры должны быть расшифрованы в сносках к таблице.

Число иллюстраций в статье не должно быть больше 6 (исключения согласовываются с редакцией). Максимальный размер иллюстраций или таблиц не должен превышать размера рабочего поля 15,7 × 23 см. Весь иллюстративный материал должен иметь минимум надписей.

На графиках необходимо указывать величины, значения которых даются на осях, и обозначение их размерностей.

Имеющиеся в схемах детали обозначаются арабскими цифрами или буквами русского алфавита и расшифровываются в подписях.

Иллюстрации нумеруются в порядке их упоминания в тексте. При ссылке в тексте на иллюстрацию указывается ее номер и буквенные и цифровые обозначения ее деталей, например: рис. 1, а, кривая 2.

Графики и схемы должны выполняться с помощью векторных программ (Microsoft Excel, CorelDraw 9, Microsoft PowerPoint), их следует присылать в виде отдельных файлов с сохранением форматов, использованных для их создания. Если они выполнялись в других векторных программах, то необходимо использовать формат EPS.

Фотографии представляются в виде отдельных файлов в форматах JPEG, TIFF, BMP, PNG с разрешением 300–600 dpi.

Штриховые рисунки, выполненные от руки, должны быть отсканированы в режиме bitmap с разрешением 800 dpi и сохранены в формате TIFF.

Структура рукописи

Материалы должны быть размещены следующим образом:

1. Название статьи. Должно быть кратким и отражать содержание работы. Печатается прописными буквами прямым полужирным шрифтом без подчеркивания и разрядки. Латинские названия объектов исследований в названии статьи пишутся без сокращений, с соблюдением общепринятых правил таксономической номенклатуры.

2. Инициалы и фамилия (фамилии) автора(ов) (А.А. Иванов, Б.В. Петров...). Печатаются прямым строчным шрифтом и отделяются от названия статьи пустой строкой.

3. Полное название и адрес учреждения, где работает автор(ы) – шрифт прямой строчной; адрес(а) электронной почты автора(ов) – шрифт прямой строчной.

Отметить арабскими цифрами соответствие фамилий авторов учреждениям, в которых они работают; звездочкой пометить фамилию автора, с которым будет вестись переписка.

4. Аннотация (резюме) статьи на русском и английском языках с кратким изложением основной цели работы и ее результатов (не более 20 строк). Шрифт – прямой строчной.

5. Ключевые слова (не более 10). Шрифт – прямой строчной. В ключевых словах должны быть отражены: (1) объект; (2) метод; (3) область исследования; (4) специфика данной работы.

6. Текст статьи, оформленный в соответствии с правилами.

7. Благодарности и ссылки на источники финансирования работы.

8. Литература.

9. Аннотация (резюме) статьи на английском языке с кратким изложением основной цели работы и ее результатов (не более 20 строк).

Для экспериментальных статей рекомендуются следующие разделы: **Введение; Материалы и Методы; Результаты; Обсуждение; Литература.**

Теоретические, обзорные и проблемные статьи могут иметь произвольную структуру, но обязательно должны содержать резюме. Названия разделов в таких статьях определяются автором.

Названия разделов печатаются строчными буквами на отдельной строке без подчеркивания и отделяются от текста одной пустой строкой. Шрифт – прямой полужирный. Подзаголовки внутри разделов печатаются на отдельной строке строчными буквами. Шрифт – прямой полужирный. Заголовки и подзаголовки выравниваются по центру.

Раздел «Литература» отделяется от текста статьи пустой строкой и содержит перечень цитированных источников с обязательным указанием заглавия (см. ниже образец). Библиографические ссылки внутри текста приводятся в круглых скобках. При этом указывается фамилия автора публикации без инициалов и год публикации, например: (Иванов, 1999). Если у публикации два автора, то указываются обе фамилии и год издания, например: (Gihl, Smith, 2001). Работы трех и более авторов цитируются следующим образом: (Gatsby *et al.*, 1998; Добров и др., 2000).

При ссылках на несколько публикаций ссылки в скобках располагаются в хронологическом порядке, например: «В ряде работ (Смирнов, 1978; Smith, Gatsby, 1998; Павлова и др., 2001)...». При этом если цитируются работы одного и того же года, ссылки располагаются в алфавитном порядке (сначала русские, потом иностранные фамилии). Если цитируются несколько работ одного и того же автора (или одной и той же группы авторов), опубликованных в одном и том же году, то к году добавляются русские или латинские строчные буквы в алфавитном порядке.

Например: Смирнов и др., 1995а, б; Smith 1997а, d; Ulrich *et al.*, 1998b. Порядок расстановки букв определяется положением статьи в разделе «Литература».

Список литературы должен содержать библиографическое описание всех литературных источников, ссылки на которые фигурируют в тексте статьи. Цитированная литература сводится в алфавитные списки сначала на русском языке, потом на иностранных языках с указанием фамилий и инициалов всех авторов каждой публикации. Работы одного и того же автора располагаются в хронологической последовательности. В случае если в списке приводятся несколько работ одного автора, опубликованных в одном и том же году, им дают буквенные обозначения: 1999а, б, в и т. д.; для иностранных авторов – 1999а, b, c и т. д.

При количестве авторов более 4 приводятся только 3 автора, далее используется обозначение *et al.* (и др.).

Оформляйте список по следующему образцу, обращая внимание на знаки препинания и пробелы.

Литература

ДЛЯ КНИГ:

Завадский К.М. Развитие эволюционной теории после Дарвина (1859–1920-е годы). Л.: Наука, 1973. 423 с. (или конкретные страницы, например, С. 22–32).

Searle A.G. Comparative Genetics of Coat Color in Mammals. L.; N.Y.: Logos Press, Acad. Press, 1968. 303 p.

ДЛЯ ЖУРНАЛОВ:

Кольцов Н.К. Проблема прогрессивной эволюции // Биол. журнал. 1933. Т. 2. Вып. 4/5. С. 475–500.

Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer // Cell. 2000. V. 100. № 2. P. 57–70.

Zhao S.H., Recknor J., Lunney J.K. *et al.* Validation of a first-generation long-oligonucleotide microarray for transcriptional profiling in the pig // Genomics. 2005. V. 86. № 5. P. 618–625.

ДЛЯ СБОРНИКОВ:

Розова М.А., Янченко В.И., Мельник В.М. Зависимость урожайности яровой твердой пшеницы от метеорологических факторов в Приобской лесостепи Алтайского края // Современные проблемы и достижения аграрной науки в животноводстве и растениеводстве: Сб. статей Междунар. науч.-практ. конференции. Барнаул, 2003. Ч. 1. С. 71–74.

Golygina V.V., Istomina A.G., Kiknadze I.I. Chromosomal polymorphism in natural populations of *Chironomus balatonicus* Dévai, Wülker et Scholl // Late 20th century research on Chironomidae / Ed. O. Hof-frichter. Aachen: Shaker-Verlag, 2000. P. 89–92.

ДЛЯ ТЕЗИСОВ ДОКЛАДОВ:

Peshkov I.M., Likhoshvai V.A., Matushkin Yu.G., Fadeev S.I. On research into hypothetical networks on ecological nature // Proc. of the 4th Intern. Conf. on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (BGRS'2004). Novosibirsk, 25–30 July 2004. Novosibirsk: Inst. Cytol. Genet., 2004. V. 2. P. 128–130.

ДЛЯ ИНТЕРНЕТ-ПУБЛИКАЦИЙ:

Smith A., Green P. RepeatMasker. 1999. available at <http://ftp.genome.washington.edu/RM/RepeatMasker.html>.

Schwenger G.T.F., Mordvinov V.A., Fournier R. *et al.* (2000). Interleikin-5. In: Academic Press Cytokine Reference Database. DOI:10.1006/rwcy.2000.0902.

На отдельной странице следует привести:

– оригинальное написание иностранных фамилий, встречающихся в тексте статьи, подписях к иллюстрациям и таблицам.

– на русском языке – сведения об авторах (фамилии, имена, отчества полностью, ученые степени, звания, должности, место работы, полные почтовые адреса с индексами, домашние и служебные телефоны, факсы, адреса электронной почты и адреса личных страниц в Интернете);

– на английском языке – название статьи, общепринятую версию названия учреждения, где выполнена работа, и транслитерацию фамилий авторов.