

## Содержание

**ИЗМЕНЕНИЕ СРОДСТВА ТАТА-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА К ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМ, СООТВЕТСТВУЮЩИМ ТАТА-БОКСАМ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА, НЕСУЩИМ ПОЛИМОРФИЗМЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С НАСЛЕДСТВЕННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ**

*И.А. Драчкова, Т.В. Аршинова, П.М. Пономаренко, Т.И. Меркулова, Л.К. Савинкова, Н.А. Колчанов . . . . .* 439

**ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6*, ВЕРОЯТНЫХ МАРКЕРОВ РИСКА ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, В ПОПУЛЯЦИЯХ КОРЕННЫХ ЭТНОСОВ И РУССКИХ СЕВЕРНОЙ СИБИРИ**

*Р.П. Корчагина, Л.П. Осипова, Н.А. Вавилова, Н.А. Ермоленко, Е.Н. Воронина, М.Л. Филипенко . . . . .* 448

**ПРЕДСКАЗАНИЕ АЛЛЕРГЕННОСТИ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНФОРМАЦИИ О КОНФОРМАЦИОННЫХ ПЕПТИДАХ**

*А.О. Брагин, П.С. Деменков, В.А. Иванисенко . . . . .* 462

**ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНА ЦИТОХРОМА *b* МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В ИСКУССТВЕННО СОЗДАННОЙ И ДОНОРНОЙ ПОПУЛЯЦИЯХ КЕТЫ (*ONCORHYNCHUS KETA* WALBAUM) РЕК КУЛЬКУТЫ И ЯМА (СЕВЕРНОЕ ПОБЕРЕЖЬЕ ОХОТСКОГО МОРЯ)**

*Л.Т. Бачевская, В.В. Переверзева . . . . .* 469

**ОСНОВНЫЕ ИТОГИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА СЕВЕРООХОТОМОРСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ ГОРБУШИ (*ONCORHYNCHUS GORBUSCHA*)**

*С.П. Пустовойт . . . . .* 475

**ЭВОЛЮЦИОННАЯ ЭКОЛОГИЯ ПЛОДОВИТОСТИ ЖИВОТНЫХ: АДАПТИВНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПОТОМКОВ ПРЕДОПРЕДЕЛЯЮТСЯ УСЛОВИЯМИ ИХ ПРЕНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ (НА ПРИМЕРЕ ВОДЯНОЙ ПОЛЕВКИ, *ARVICOLA TERRESTRIS* L.)**

*Г.Г. Назарова, В.И. Евсиков . . . . .* 485

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПАРАЛЛЕЛИЗМ В АБЕРРАЦИЯХ ОКРАСКИ ВОЛОСЯНОГО ПОКРОВА У СЕВЕРНЫХ МОРСКИХ КОТИКОВ (*CALLORHINUS URSINUS*), АМЕРИКАНСКИХ НОРОК (*MUSTELA VISON*) И СОБОЛЕЙ (*MARTES ZIBELLINA*)**

*С.В. Фомин, Н.С. Фомина, О.В. Трапезов . . . . .* 493

|  |     |
|--|-----|
| <b>УРОВЕНЬ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ У КОШЕК (<i>FELIS CATUS</i> L.) В ЗАПАДНОЕВРОПЕЙСКИХ, СЕВЕРОАМЕРИКАНСКИХ И ВОСТОЧНОЕВРОПЕЙСКИХ ПОПУЛЯЦИЯХ</b> |     |
| <i>Г.Г. Гончаренко, С.А. Зятков</i> .....  | 516 |
| <b>АНАЛИЗ ГЕТЕРОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ФЕРТИЛЬНЫХ И МУЖКОСТЕРИЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (<i>BETA VULGARIS</i>)</b>      |     |
| <i>А.Г. Брагин, М.К. Иванов, Л.А. Федосеева, Г.М. Дымищ</i> .....  | 524 |
| <b>ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ <i>ELYMUS FIBROSUS</i> (TRITICEAE: POACEAE) ПО ЗАПАСНЫМ БЕЛКАМ ЭНДОСПЕРМА</b>                    |     |
| <i>Д.Е. Герус, А.В. Агафонов</i> .....   | 531 |
| <b>НАСЛЕДОВАНИЕ ОКРАСКИ ПЕРИКАРПИЯ И СОДЕРЖАНИЯ <math>\beta</math>-КАРОТИНА У ОВОЩНОГО ПЕРЦА</b>   |     |
| <i>О.О. Тимина, О.Ю. Тимин, С.К. Федоров, Н. Томлекова</i> .....   | 540 |
| <b>BREEDING OF BULGARIAN COTTON VARIETIES WITH IMPROVED FIBER QUALITY</b>  |     |
| <i>A. Stoilova</i> .....   | 550 |
| <b>ОСОБЕННОСТИ ПЕРЕДАЧИ ХРОМОСОМЫ РЖИ 2R ПРИ БЕККРОССИРОВАНИИ ПШЕНИЧНО-РЖАНЫХ ЗАМЕЩЕННЫХ ЛИНИЙ 2R(2D) РАЗЛИЧНЫМИ СОРТАМИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ</b>          |     |
| <i>Н.М. Красилова, И.Г. Адонина, О.Г. Силкова, В.К. Шумный</i> .....   | 554 |
| <b>ЭВОЛЮЦИЯ И РАЗНООБРАЗИЕ <i>L1</i>-РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ В ГЕНОМАХ ПОКРЫТО-СЕМЕННЫХ РАСТЕНИЙ</b>   |     |
| <i>Г.А. Смышляев, А.Г. Блинов</i> .....  | 563 |
| <b>СЕЛЕКЦИЯ ПШЕНИЦЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ВРЕДНЫМ КЛОПАМ (<i>EURYGASTER SPP.</i>): НЕТ ЛИ РИСКА?</b>   |     |
| <i>В.А. Крупнов</i> .....  | 572 |
| <b>ГЕНОМ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>: СВЯЗЬ СОСТОЯНИЯ ХРОМАТИНА С РЕГУЛЯЦИЕЙ СПЛАЙСИНГА И ТРАНСКРИПЦИИ</b>  |     |
| <i>В.Н. Бабенко, В.Ф. Матвиенко, И.А. Зыков</i> .....  | 579 |
| <b>ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА СПОНТАННЫХ ДОМИНАНТНЫХ ЛЕТАЛЬНЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНОМЕ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i></b>                                       |     |
| <i>Ю.Н. Иванов</i> .....   | 595 |
| <b>ГЕНЕТИКА И ПРИОРИТЕТНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СУПЕРМЕЛКИХ МИНИ-СВИНЕЙ ДЛЯ МЕДИКО-БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ</b>                                 |     |
| <i>В.Н. Тихонов, В.Е. Бобович</i> .....  | 600 |

## Content

|  |     |
|--|-----|
| <b>CHANGE OF THE AFFINITY OF THE TATA-BINDING PROTEIN TO OLIGONUCLEOTIDES CORRESPONDING TO TATA-BOXES IN HUMAN GENE PROMOTERS BEARING POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH HEREDITARY DISEASES</b><br><i>I.A. Drachkova, T.V. Arshinova, P.M. Ponomarenko, T.I. Merkulova, L.K. Savinkova, N.A. Kolchanov . . . . .</i>   | 439 |
| <b>POLYMORPHISM OF GENES FOR XENOBIOTIC BIOTRANSFORMATION, <i>GSTM1</i>, <i>GSTT1</i>, <i>CYP2D6</i>, CANDIDATE MARKERS OF CANCER RISK, IN INDIGENOUS PEOPLES AND RUSSIANS IN NORTHERN SIBERIA</b><br><i>R.P. Korchagina, L.P. Osipova, N.A. Vavilova, N.A. Ermolenko, E.N. Voronina, M.L. Filipenko . . . . .</i> | 448 |
| <b>PROTEIN ALLERGENICITY PREDICTION ON THE BASE OF DISCONTINUOUS PEPTIDES</b><br><i>A.O. Bragin, P.S. Demenkov, V.A. Ivanisenko . . . . .</i>  | 462 |
| <b>VARIABILITY OF MITOCHONDRIAL DNA CYTOCHROME <i>b</i> GENE IN ARTIFICIAL AND DONOR POPULATIONS OF CHUM SALMON (<i>ONCORHYNCHUS KETA</i> WALBAUM) FROM THE RIVERS KULKUTA AND YAMA (THE NORTHERN COAST OF THE SEA OF OKHOTSK)</b><br><i>L.T. Bachevskaya, V.V. Pereverzeva . . . . .</i>                          | 469 |
| <b>PRINCIPAL RESULTS OF GENETIC MONITORING OF PINK SALMON (<i>ONCORHYNCHUS GORBUSCHA</i>) POPULATIONS FROM THE NORTHERN COAST OF THE SEA OF OKHOTSK</b><br><i>S.P. Pustovoit . . . . .</i>   | 475 |
| <b>EVOLUTIONARY ECOLOGY OF ANIMAL FERTILITY: THE FITNESS OF THE PROGENY IS DETERMINED BY THEIR PRENATAL DEVELOPMENT (BY THE EXAMPLE OF THE EUROPEAN WATER VOLE, <i>ARVICOLA TERRESTRIS</i> L.)</b><br><i>G.G. Nazarova, V.I. Evsikov . . . . .</i>   | 485 |
| <b>PHENOTYPIC PARALLELISM OF COLOR ABERRATIONS IN THE NORTHERN FUR SEAL (<i>CALLORHINUS URSINUS</i>), AMERICAN MINK (<i>MUSTELA VISON</i>), AND SABLE (<i>MARTES ZIBELLINA</i>)</b><br><i>S.V. Fomin, N.S. Fomina, O.V. Trapezov . . . . .</i>   | 493 |
| <b>THE LEVEL OF GENETIC DIFFERENTIATION IN WEST EUROPEAN, NORTH AMERICAN, AND EAST EUROPEAN POPULATIONS OF DOMESTIC CATS (<i>FELIS CATUS</i> L.)</b><br><i>G.G. Goncharenko, S.A. Zyatkov . . . . .</i>  | 516 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL DNA HETEROPLASMY IN FERTILE AND OWEN CMS SUGAR BEET (<i>BETA VULGARIS</i>) PLANTS</b><br><i>A.G. Bragin, M.K. Ivanov, L.A. Fedoseeva, G.M. Dymshits</i> . . . . .               | 524 |
| <b>GENETIC DIVERSITY IN NATURAL <i>ELYMUS FIBROSUS</i> (TRITICEAE: POACEAE) POPULATIONS ASSESSED FROM ENDOSPERM STORAGE PROTEINS</b><br><i>D.E. Gerus, A.V. Agafonov</i> . . . . .                           | 531 |
| <b>INHERITANCE OF PERICARP COLOR PATTERN AND <math>\beta</math>-CAROTENE CONTENT IN VEGETABLE PEPPER</b><br><i>O.O. Timina, O.Y. Timin, S.K. Fiodoroff, N. Tomlekova</i> . . . . .                           | 540 |
| <b>BREEDING OF BULGARIAN COTTON VARIETIES WITH IMPROVED FIBER QUALITY</b><br><i>A. Stoilova</i> . . . . .  | 550 |
| <b>TRANSMISSION OF RYE CHROMOSOME 2R IN BACKCROSSES OF WHEAT-RYE 2R(2D) SUBSTITUTION LINES TO VARIOUS COMMON WHEAT VARIETIES</b><br><i>N.M. Krasilova, I.G. Adonina, O.G. Silkova, V.K. Shumny</i> . . . . . | 554 |
| <b>EVOLUTION AND BIODIVERSITY OF <i>LI</i>-RETROTRANSPOSONS OF ANGIOSPERMS</b><br><i>G.A. Smyshlyaev, A.G. Blinov</i> . . . . .  | 563 |
| <b>WHEAT BREEDING FOR RESISTANCE TO SUNN PEST (<i>EURYGASTER</i> SPP.): IS THERE ANY RISK?</b><br><i>V.A. Krupnov</i> . . . . .  | 572 |
| <b><i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> GENOME: CORRELATION OF CHROMATIN STATE WITH SPLICING AND TRANSCRIPTION REGULATION</b><br><i>V.N. Babenko, V.F. Matvienko, I.A. Zykov</i> . . . . .                         | 579 |
| <b>ESTIMATION OF THE NUMBER OF SPONTANEOUS DOMINANT LETHAL MUTATIONS IN THE GENOME OF <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i></b><br><i>Yu.N. Ivanov</i> . . . . .  | 595 |
| <b>GENETICS AND MAJOR APPLICATIONS OF SUPERSMALL PIGS IN MEDICINE AND BIOTECHNOLOGY</b><br><i>V.N. Tikhonov, V.E. Bobovich</i> . . . . .   | 600 |



## ИЗМЕНЕНИЕ СРОДСТВА ТАТА-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА К ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМ, СООТВЕТСТВУЮЩИМ ТАТА-БОКСАМ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА, НЕСУЩИМ ПОЛИМОРФИЗМЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С НАСЛЕДСТВЕННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

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

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

SNPs (Single nucleotide polymorphism) регуляторных районов генов и, в частности ТАТА-боксов, могут определять различную чувствительность каждого человека к бактериальной и вирусной инфекциям и лекарственным препаратам, которые используются для их лечения. Эти SNPs связаны с риском широко распространенных полигенных (комплексных) заболеваний человека, таких, как артрит, гипертония, рак, болезнь Альцгеймера и др. Взаимодействие ТАТА-связывающего белка с ТАТА-боксом на ТАТА-содержащих промоторах запускает сборку преинициаторного комплекса и является начальной стадией регуляции транскрипции.

В работе рассматривается изменение сродства TBP к олигонуклеотидам, идентичным ТАТА-боксам промоторов генов *MBL*, *CYP 2A6*, *SOD1* и *TPI* человека, несущим SNPs, ассоциированные с аутоиммунными, сердечно-сосудистыми заболеваниями, амиотрофическим латеральным склерозом, неврологическими расстройствами дегенеративного характера, повышенной чувствительностью к бактериальным инфекциям и др. Во всех случаях показано снижение сродства TBP к ТАТА-содержащим олигонуклеотидам.

**Ключевые слова:** манноза-связывающий лектин, цитохром P450A6, Cu/Zn супероксид дисмутаза, триозофосфатизомераза, TBP, ТАТА-бокс, сродство.

### Введение

Нормальное функционирование многоклеточных организмов зависит от правильного сочетания регулирующих экспрессию генов событий, которые обеспечивают необходимый уровень экспрессии в нужное время, в нужном месте и на нужном уровне. Большинство регуляторных событий происходит на уровне транскрипции и опосредуется взаимодействием транскрипционных факторов с регуляторными участками ДНК, которые сосредоточены в промоторной области гена, расположенной в 5'-области от стартового участка транскрипции. Уровень экспрессии большинства генов различается между различными клетками и

тканями на разных стадиях развития организма и при различных физиологических состояниях. Но некоторые гены экспрессируются во всех клетках и тканях, и уровни их экспрессии относительно постоянны. Это гены «домашнего хозяйства», они обеспечивают минимальный набор функций, необходимых для жизнедеятельности клеток.

Транскрипция любого белок-кодирующего гена РНК-полимеразой II начинается со сборки базального транскрипционного комплекса на кор-промоторе. Кор-промотором называют область ДНК, расположенную на расстоянии ~ 40 нуклеотидов слева (в 5'-области) и справа (в 3'-области) от старта транскрипции гена, на которой сконцентрировано переменное коли-

чество регуляторных участков (Baumann *et al.*, 2010), таких, как TATA-бокс, BRE (TFIIB-recognition element), Inr (Initiator), MTE (Motif ten element), DPE (downstream promoter element), DCE (downstream core element) и XCPE1 (X core promoter element 1) (Juven-Gershon, Kadonaga, 2010). При исследовании паттернов инициации транскрипции были обнаружены два разных способа инициации транскрипции – с одного сильного стартового участка и с нескольких слабых, расположенных в области 50–100 нуклеотидов от старта транскрипции (фокусированный и диспергированный соответственно) (Smale, Kadonaga, 2003; Juven-Gershon, Kadonaga, 2010). Регулируемые гены транскрибируются чаще всего с фокусированных промоторов, а конститутивные – с диспергированных, на которых сборка базального транскрипционного комплекса мало изучена. Хотя встречаются и комбинированные промоторы, имеющие много стартовых участков, из которых один наиболее сильный (Kim *et al.*, 2005).

Базальный транскрипционный комплекс состоит из РНК-полимеразы II и основных (базальных) факторов транскрипции, включающих TFIID, TFIIA, TFIIB, TFIIIF, TFIIIE и TFIIN (Butler, Kadonaga, 2002). Сборка базального транскрипционного комплекса на TATA-содержащих промоторах начинается с узнавания и связывания TATA-бокса TATA-связывающим белком (TBP-TATA binding protein), субъединицей TFIID. После образования комплекса «TBP-TATA» к нему присоединяется базальный фактор транскрипции TFIIA. Он увеличивает стабильность субкомплекса «TBP-TATA», к которому затем присоединяется TFIIB, связываясь с участками, прилегающими к TATA-боксу слева и справа. Присоединение TFIIB регулирует транскрипционную активность (Lagrange *et al.*, 1998). Затем к субкомплексу «TATA-TBP-TFIIA-TFIIB» присоединяется РНК-полимераза II, чаще всего связанная с TFIIIF. Завершает сборку базального комплекса присоединение TFIIIE и TFIIN к образовавшемуся ансамблю базальных факторов, ведущее к эффективной инициации транскрипции – это последовательный путь сборки преинициаторного комплекса (Burgatowski *et al.*, 1989). Раньше считалось, что строение базального транскрипционного комплекса инвариантно для разных типов клеток, а сейчас

показано существование семейства факторов, родственных TBP – TRF (TBP-related factors), и семейства тканеспецифичных факторов, ассоциированных с TBP, – тканеспецифичных TAFs (TBP – associated factors) (Tora, 2010; Veenstra, Wollfe, 2001).

TATA-бокс является наиболее изученным кор-промоторным элементом, хотя TATA-содержащие промоторы составляют лишь 10–16 % генов, считываемых РНК-полимеразой II. Из них только около 30 % промоторов имеют канонический TATA-бокс, что свидетельствует о вариативности канонической последовательности TATA-бокса – TATAAAA – природных промоторов (Hahn *et al.*, 1989). Показано также, что в контексте разных промоторов одинаковые мутации TATA-бокса оказывают различное влияние на активность промоторов (Wolner, Gralla, 2001). Несмотря на такую вариативность TATA-боксов, некоторые TATA-содержащие промоторы могут быть очень чувствительны к мутациям TATA-боксов. Подтверждают это молекулярно-генетически и клинически выявленные одонуклеотидные полиморфизмы (SNP – single nucleotide polymorphism) TATA-боксов промоторов генов человека, ассоциированные с предрасположенностью к наследственным заболеваниям (Савинкова и др., 2009).

Важность изучения SNPs регуляторных районов генов диктуется еще и тем, что они определяют различную чувствительность каждого человека к бактериальной и вирусной инфекциям и лекарственным препаратам, которые используются для их лечения. Особенно важно идентифицировать и изучать SNPs, которые ассоциируются с риском широко распространенных полигенных (комплексных) заболеваний человека, таких, как артрит, гипертония, рак, болезнь Альцгеймера и др.

В данной работе рассматривается изменение сродства TBP к TATA-боксам промоторов генов *MBL*, *CYP 2A6*, *SOD1* и *TPI* человека, несущим SNPs, ассоциированные с аутоиммунными, сердечно-сосудистыми заболеваниями, с увеличением риска возникновения рака легких у курильщиков, с амиотрофическим латеральным склерозом, неврологическими расстройствами дегенеративного характера, повышенной чувствительностью к бактериальным инфекциям, кардиомиопатией и др.

## Материалы и методы

### Получение рекомбинантного TBP

В работе использовали рекомбинантный TBP человека (hTBP), экспрессированный в клетках *E. coli* BL21(DE3) с плазмиды pAR3038-hTBP (любезно предоставленной профессором В. Puhg, Center for Gene Regulation, Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA), выделение которого описано И.А. Драчковой с соавт. (2010).

### Получение меченых $^{32}\text{P}$ олигонуклеотидов

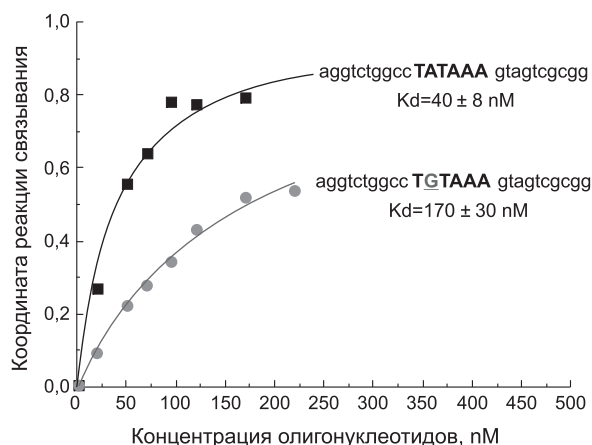
В работе использовали олигонуклеотиды (ODN), синтезированные и дополнительно очищенные электрофорезом в ПААГ (Biosset, Novosibirsk). Получение меченых и немеченых двуцепочечных ODN описано в работе И.А. Драчковой с соавт. (2010).

### Определение равновесных констант диссоциации комплексов

Для определения равновесных констант диссоциации комплексов ( $K_d$ ) hTBP с TATA-содержащими олигонуклеотидами, соответствующими «нормальным» и SNP-содержащим вариантам TATA-боксов, использовали традиционный подход, включающий титрование hTBP в фиксированной концентрации (не менее 0,3 nM и не более 1 nM) TATA-содержащим ODN в возрастающей концентрации в сочетании с методом изотопного разбавления (Драчкова и др., 2010).

Эксперименты по связыванию hTBP с ODN проводили при 25 °C в буфере следующего состава: 20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM KCl, 1 mM DTT, 100  $\mu\text{g/ml}$  BSA, 0,01 % NP-40, 5 % глицерин до установления равновесия. Для отделения комплексов «hTBP-ODN» от несвязавшегося ODN использовали метод «задержки в геле» (EMSA). Электрофорез проводили в 5 % ПААГ на трис-глициновом буфере (pH 8,3) при температуре 10 °C и напряженности поля 25 В/см в течение 40 мин. Гели высушивали и экспонировали с экраном

Imaging Screen-K (Kodak) для фосфоимиджера *Molecular Imager PharoFX Plus* (Bio-Rad). Затем экран сканировали на фосфоимиджере и осуществляли количественный анализ радиоавтографов с помощью программы Quantity One – 4.5.0 (Bio-Rad) (рис. 1). Равновесные  $K_d$  комплексов «hTBP-ODN», характеризующие сродство TBP к TATA-боксам, определяли с помощью программы OriginPro 8.



**Рис. 1.** Пример определения равновесных  $K_d$  комплексов TBP с TATA-боксом промотора гена супероксиддисмутазы 1 здорового человека ( $K_d = 40 \pm 8 \text{ nM}$ ) и SNP-содержащим TATA-боксом этого промотора ( $K_d = 170 \pm 30 \text{ nM}$ ), ассоциированным с амиотрофическим латеральным склерозом.

## Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены результаты экспериментов по определению равновесных  $K_d$  комплексов TBP с TATA-боксами ряда промоторов генов человека, содержащих SNPs, ассоциированные с предрасположенностью к наследственным заболеваниям.

Ген *MBL* (MBL – mannose binding lectin) кодирует белок сыворотки крови, являющийся рецептором маннозы и N-ацетилглюкозаминов клеточной поверхности микробов (Торшин и др., 2003) и важным элементом врожденного иммунитета. При связывании с маннозой и углеводными остатками, входящими в состав клеточной стенки патогенов, и взаимодействии с MBL-ассоциированными сериновыми протеазами (MASP-1, -2, -3 и MAP19), MBL активирует систему лектинового комплемента

Таблица 1

Сродство hTBP к олигонуклеотидам, соответствующим ТАТА-боксам  
промоторов генов человека, несущим SNPs,  
ассоциированные с наследственными патологиями

| Литературные данные |   |  | Экспериментальные данные                        |          |
|---------------------|---|--|---|----------|
| №                   | Ген, SNP                                  | Содержание фермента  | Последовательность олигонуклеотида (5'-3' нити) | Kd, nM   |
| 1                   | <i>MBL</i>                                | Норма  | catctatttcTATATAgcctgcaccc                      | 28 ± 13  |
| 2                   | -35T>C<br>(Boldt <i>et al.</i> , 2006)    | Снижено содержание фермента в сыворотке крови                    | catctatttcTACATAgcctgcaccc                      | 160 ± 64 |
| 3                   | <i>CYP2A6</i>                             | Норма  | tttcaggcagTATAAAggcaaacccac                     | 17 ± 4   |
| 4                   | -48T>G<br>(Pitarque <i>et al.</i> , 2001) | Снижено содержание фермента и синтез РНК <i>in vitro</i> на 50 % | tttcaggcagTAGAAAggcaaacccac                     | 84 ± 22  |
| 5                   | <i>SOD1</i>                               | Норма  | aggctctggccTATAAAgtagtcgcgg                     | 40 ± 8   |
| 6                   | -27A>G<br>(Niemann <i>et al.</i> , 2007)  | Снижено содержание фермента ~ на 40 % <i>in vivo</i>             | aggctctggccTGATAAAgtagtcgcgg                    | 170 ± 30 |
| 7                   | <i>TPI</i>                                | Норма  | cgcgggcgctcTATATAAgtagggcagtc                   | 7 ± 1    |
| 8                   | -24T>G<br>(Watanabe <i>et al.</i> , 1996) | Снижение содержания мРНК до 50 % <i>in vivo</i>                  | cgcgggcgctcTATAGAAgtagggcagtc                   | 290 ± 80 |

и способствует удалению патогенов с помощью комплемент-опосредованного фагоцитоза. MBL может также прямо опсонизировать патогены, связываясь с их клеточной стенкой, и инициировать освобождение провоспалительных цитокинов (Boldt *et al.*, 2006). MBL синтезируется в печени и вместе с другими белками (белки комплемента, сурфактанта легких, фиколина) играет центральную роль во врожденном иммунном ответе (Garred *et al.*, 2006). Эпидемиологические исследования показали, что генетически детерминированная вариабельность концентраций MBL в сыворотке крови человека влияет на чувствительность к различным инфекциям, а также на предрасположенность к аутоиммунным, метаболическим и сердечно-сосудистым заболеваниям (Sisen, Minchinton, 2003). Низкие концентрации MBL предрасполагают к повторяющимся инфекциям (Takahashi, Ezekowitz, 2005).

Ген *MBL* у человека расположен на 10-й хромосоме, его белок-кодирующая область состоит из 4 экзонов и 3 интронов. MBL представляет собой букето-подобную молекулу, состоящую из 6 субъединиц. Каждая субъединица состоит из трех идентичных полипептидных цепей по 32 кДа, которые содержат цистеин-богатые и коллагеновые области и углевод-связывающие

домены (Jack *et al.*, 2001). Для полной функциональной активности MBL, включающей связывание с клеточной поверхностью патогена и активацию системы комплемента, требуется образование структур более высокого порядка (тетрамеры) (Madsen *et al.*, 1998; Jack *et al.*, 2001). Кроме гена *MBL2*, кодирующего единственный функциональный белок человека, имеется также псевдоген *MBL1*. Он кодирует полипептид, экспрессируемый в печени и гомологичный одному из двух генов *MBL* других млекопитающих, который утратил функциональность в ходе эволюции приматов (Guo *et al.*, 1998). Варианты гена, кодирующие низкие концентрации сывороточного MBL, довольно широко распространены во всех этнических группах. На этом основании предполагается, что существуют обстоятельства, благоприятствующие выживанию носителей этих аллелей, т. е. низкие концентрации MBL обеспечивают преимущество хозяину по аналогии с классическим примером серповидно-клеточной анемии (Garred *et al.*, 2006). При изучении вариабельности гена *MBL* в бразильских популяциях (Boldt *et al.*, 2006) обнаружено 8 общих гаплотипов (включающих полиморфизм в промоторной области и в первом экзоне), которые ассоциируются с прогрессивным сни-



жением концентрации сывороточного MBL: MBL\*HYPA>LYQA>LYPA>LXPA>>HYPD=LYPB=LYQC. Гаплотип LYPB, включающий полиморфизм в ТАТА-боксе (-788 Т>С) и в первом экзоне (1052 G>А), и гаплотип LYQC, вызывающий дефицит MBL в гомозиготном состоянии, тем не менее, распространены так же, как и полностью функциональные гаплотипы (Boldt *et al.*, 2006). Итак, показано, что полиморфизм в ТАТА-боксе (-788 Т>С) снижает концентрацию MBL в сыворотке крови, что приводит к снижению эффективности иммунной защиты и повышает чувствительность к различным инфекциям, а также к метаболическим и сердечно-сосудистым заболеваниям. Данных о взаимодействии TBP с SNP-содержащим ТАТА-боксом гена *MBL* или о влиянии SNP на транскрипцию нет. Наши экспериментальные результаты свидетельствуют о том, что SNP -35Т>С в ТАТА-боксе этого гена снижает аффинность TBP к нему в 5,7 раза, что вполне согласуется с перечисленными выше снижением количества фермента в сыворотке крови и серьезными нарушениями в организме человека.

*CYP 450* – суперсемейство генов цитохрома Р450 человека – состоит из 57 функциональных генов и 58 псевдогенов (Zukunft *et al.*, 2005). Члены семейства локализованы в эндоплазматическом ретикулуме печени и внепеченочных тканей. Кодируемые этими генами ферменты относятся к классу монооксигеназ. Цитохромы Р450 опосредуют окислительный метаболизм огромного количества структурно разнообразных экзо- и эндогенных веществ, отвечают за детоксикацию и удаление из организма ксенобиотиков (включая многие лекарственные препараты). С помощью изоформ цитохрома Р450 осуществляются биосинтез и катаболизм холестерина, стероидных гормонов, так называемых «цитохромных» метаболитов и арахидоновой кислоты, обладающих вазотропным действием. Кластер семейства генов *CYP2* человека расположен на 19-й хромосоме и содержит подсемейства *CYP2A*, *CYP2B*, *CYP2F*, *CYP2G*, *CYP2S* и *CYP2T*. Ген *CYP2A6* относится к подсемейству *CYP2A*. *CYP2A6* играет главную роль в метаболизме никотина и кумарина, участвует в детоксикации некоторых лекарств и нитрозаминов, содержащихся в табаке (Pitarque *et al.*, 2005). Кроме печени, *CYP2A6*

экспрессируется в стероид-зависимых тканях, таких, как молочные железы, яичники, матка и надпочечники (Higashi *et al.*, 2007).

Цитохром Р4502А6 (*CYP2A6*) человека является главной никотиноксидазой и играет важную роль в активации некоторых проканцерогенов и детоксикации многих лекарств (Pelkonen *et al.*, 2000). Большие индивидуальные различия в активности этого фермента в большой степени вызываются распределением полиморфных вариантов гена. Обнаруженные популяционные частоты дефектного ТАТА-бокса с мутацией -48Т>G оказались очень высокими: в отдельных популяциях Швеции – 5,2 %, Турции – 7,2 %, Китая – 15,7 % (Pitarque *et al.*, 2001), Японии – 21,3 % и Кореи – 22,3 % (Yoshida *et al.*, 2003), что свидетельствует и о больших межэтнических различиях в распространении аллеля. В работе М. Pitarque с соавт. (2001) показано, что экспрессия плазмидных конструкций, содержащих SNP -48Т>G в ТАТА-боксе промотора гена *CYP2A6*, в клетках В16А2 гепатомы человека составляет 50 % от дикого типа, и на 50 % снижена активность фермента *in vitro*. Так как снижение активности фермента приводит к снижению скорости метаболизма и выведению из организма потенциальных проканцерогенов табака, SNP -48Т>G может увеличивать риск возникновения рака легких у курильщиков (Pitarque *et al.*, 2008). Из табл. 1 видно, что этот SNP приводит к снижению аффинности TBP к ТАТА-боксу в 4,9 раза.

Ген *SOD 1* (*SOD 1* – Cu/Zn superoxide dismutase) кодирует металлофермент, нейтрализует в клетке свободные радикалы, неконтролируемые концентрации которых могут ее повредить. Для нормального функционирования фермент должен связаться с медью и цинком. *SOD1* экспрессируется практически во всех типах клеток организма и относится некоторыми авторами к генам «домашнего хозяйства» (Skvortsova *et al.*, 2001), но ген наиболее активен в печени, почках, надпочечниках и селезенке (Kuźma-Kozakiewicz, Kwiecinski, 2009). Ген *SOD1* человека расположен на длинном плече 21-й хромосомы. Мутации в гене ассоциируются примерно с 10 % семейного амиотрофического латерального склероза (ALS), поражающего двигательные нейроны человека (Rosen *et al.*, 1993), и 90 % спорадического амиотрофического латераль-

ного склероза (Kuźma-Kozakiewicz, Kwiecinski, 2009), основная разница между которыми заключается в продолжительности жизни пациентов (46 и 56 лет соответственно).

ALS – разрушительное заболевание пока не известной полностью этиологии и патогенеза. Выявлено по крайней мере 117 различных мутаций *SOD 1* у больных семейным и спорадическим ALS (Kabashi *et al.*, 2007), что обуславливает большую сложность при выявлении причин, вызывающих повреждение и гибель моторных нейронов, приводящих к тяжелым нейродегенеративным заболеваниям человека. Считается (Kuźma-Kozakiewicz *et al.*, 2009), что аминокислотные замены увеличивают появление популяции молекул белка с частичным фолдингом, что является причиной их агрегации и токсичности. В работах Kayatekin с соавт. (2008), Vonk, Klomp (2008) исследовали роль баланса Zn и Cu в регуляции стабильности и активности SOD1 и пришли к заключению, что в патогенез ALS вовлекается дисбаланс металлов. Другие исследователи склонны считать, что уменьшение количества белка SOD1, присутствие его агрегированных и незрелых (не прошедших фолдинг) форм, не играют определяющей роли в тяжести заболевания амиотрофическим латеральным склерозом, а, скорее, совокупность биофизических и биологических факторов, влияющих на SOD1, делает его токсичным для двигательных нейронов (Vassall *et al.*, 2011). Существует много гипотез для объяснения токсического воздействия SOD1 на двигательные нейроны, но вопрос до сих пор остается открытым. S. Niemann с соавт. (2007) у двух больных семейным амиотрофическим латеральным склерозом обнаружили умеренное снижение экспрессии *SOD 1* в результате SNP -27A>G в ТАТА-боксе промотора этого гена, не ассоциированное с какими-либо аминокислотными заменами в молекуле белка. Нами (табл. 1) показано снижение аффинности взаимодействия TBP с SNP-содержащим ТАТА-боксом в 4,3 раза.

Ген *TPI* (*TPI* – триозофосфатизомераза) кодирует фермент, катализирующий взаимопревращение диоксиацетонфосфата и D-глицеральдегид-3-фосфата, абсолютно необходимое для гликолитического цикла. Ген *TPI* расположен на хромосоме 12, состоит из 7 экзонов и 6 интронов (Valentin *et al.*, 2000), экспрессируется

во всех типах тканей и клеток и относится к генам «домашнего хозяйства» (Brown *et al.*, 1985; Watanabe *et al.*, 1996; Manco *et al.*, 2009). Каталитически активная форма *TPI* является гомодимером, состоящим из двух субъединиц с молекулярной массой 27 кДа (Orosz *et al.*, 2006). Промотор гена *TPI* содержит ТАТА- и СААТ-боксы и так же, как большинство генов «домашнего хозяйства», обогащен GC-динуклеотидами. В геноме человека также содержится 3 псевдогена *TPI*, которые потеряли интроны в процессе эволюции и развивались независимо. Множественные электрофоретические и хроматографические формы *TPI*, обнаруженные во всех тканях человека, кодируются одним геном и являются результатом посттрансляционных модификаций белка (Brown *et al.*, 1985). Ранее показано, что мутации, вызывающие дефицит *TPI*, приводят к снижению активности фермента в эритроцитах до 2–10 % от нормы, хронической гемолитической анемии, неврологическим расстройствам дегенеративного характера, задержке роста и отставанию в развитии, повышенной чувствительности к бактериальным инфекциям, кардиомиопатии, детской смертности и др. (Watanabe *et al.*, 1996; McMullin, 1999). Затем было показано, что снижение активности *TPI in vivo* компенсируется повышением активности других ферментов гликолиза (Orosz *et al.*, 2006). В более поздних работах (Orosz *et al.*, 2010) делается вывод о том, что практически неизлечимые последствия дефицита *TPI* являются проявлением, скорее, конформационных изменений фермента (нарушение белок-белковых взаимодействий), чем каталитической активности. Мутация в ТАТА-боксе –24Т>G, обнаруженная у 3 из 10 обследованных человек, и эта же мутация в составе гаплотипа 5G-8A -24G у гетерозигот ассоциируется с умеренным снижением активности *TPI in vivo* (26–50 %) (Watanabe *et al.*, 1996; Humphries *et al.*, 1999). Мы получили большое снижение аффинности TBP к ТАТА-боксу, содержащему этот полиморфизм, в 41 раз.

### Заключение

Как видно из впервые полученных результатов (табл. 1), уменьшение сродства TBP в 4–6 раз к SNP-содержащим ТАТА-боксам (в 3 слу-

чаях из 4) ассоциируется с повышенным риском возникновения таких тяжелых наследственных патологий человека, как сердечно-сосудистые и аутоиммунные заболевания, предрасположенность к инфекциям (Sisen *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2005), возникновение рака легких у курильщиков (Pitarque *et al.*, 2005), амиотрофический латеральный склероз (Niemann *et al.*, 2007), хроническая гемолитическая анемия, задержка роста и отставание в развитии, детская смертность, кардиомиопатии и др. (Watanabe *et al.*, 1996; McMullin, 1999). Однако это не сказывается критически на жизнеспособности индивидуумов. Очевидно, что в организме человека происходит допустимая компенсация дефицита ферментов (Orosz *et al.*, 2006), вызванного недостаточным количеством их синтеза в результате SNPs. Это особенно хорошо видно при сравнении полученных нами изменений взаимодействия «ТВР-ТАТА» в случае ТАТА-бокса промотора гена триозофосфатизомеразы: сродство ТВР к ТАТА-боксу уменьшается в 41 раз, что приводит к снижению активности фермента в эритроцитах до 2–10 % от нормы, а у некоторых гетерозиготных индивидуумов эта мутация ассоциируется лишь с умеренным снижением активности ТРР *in vivo* – на 26–50 % от нормы (Humphries *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 1996).

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 10-04-00462; проекта 119 СО РАН; проекта Б.27 «Биологическое разнообразие РАН; программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (ФНМ 23).

### Литература

- Драчкова И.А., Аршинова Т.В., Пономаренко П.М. и др. Влияние полиморфизмов ТАТА-бокса промотора гена  $\beta$ -глобина человека, ассоциированных с  $\beta$ -талассемией, на взаимодействие ТАТА-связывающего белка // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 4. С. 698–705.
- Савинкова Л.К., Пономаренко М.П., Пономаренко П.М. и др. Полиморфизмы ТАТА-бокса промоторов генов человека и ассоциированные с ними наследственные патологии // Биохимия. 2009. Т. 74. № 4. С. 149–163.
- Торшин И.Ю., Громова А.О., Никонов А.А. Гены и цереброваскулярная патология (ассоциативные исследования) // Журн. неврол. и психиатрии. 2003. Т. 109. № 5. С. 77–85.
- Baumann M., Pontiller J., Ernst W. Structure and basal transcription complex of RNA polymerase II core promoters in the mammalian genome: an overview // Mol. Biotechnol. 2010. V. 45. P. 241–247.
- Boldt A.B.W., Culpi L., Tsuneto L.T. *et al.* Diversity of the *MBL2* gene in various brazilian populations and the case of selection at the mannose-binding lectin locus // Hum. Immunol. 2006. V. 67. N 9. P. 722–734.
- Brown J.R., Daar I.O., Krug J.R., Maquat L.E. Characterization of the functional gene and several processed pseudogenes in the human triosephosphate isomerase gene family // Mol. Cell. Biol. 1985. V. 5. N 7. P. 1694–1706.
- Buratowski S., Hahn S., Guarente L., Sharp P. Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II // Cell. 1989. V. 56. P. 549–561.
- Butler J., Kadonaga J. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression // Genes Dev. 2002. V. 16. P. 2583–2592.
- Garred P., Larsen F., Seyfarth J. *et al.* Mannose-binding lectin and its genetic variants // Genes Immun. 2006. V. 7. P. 85–94.
- Guo N., Mogues T., Weremowicz S. *et al.* The human ortholog of rhesus mannose-binding protein-A gene is an expressed pseudogene that localizes to chromosome 10 // Mamm. Genome. 1998. V. 9. N 3. P. 246–249.
- Hahn S., Buratowski S., Sharp F., Guarente L. Yeast TATA-binding protein TFIID binds to TATA elements with both consensus and nonconsensus DNA sequences // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 5718–5722.
- Higashi E., Fukami T., Itoh M. *et al.* Human *CYP2A6* is induced by estrogen via estrogen receptor // Drug Metab. Dispos. 2007. V. 35. N 10. P. 1935–1941.
- Humphries A., Ationu A., Wild B., Layton D.M. The consequence of nucleotide substitutions in the triosephosphate isomerase (TPI) gene promoter // Blood Cells Mol. Dis. 1999. V. 25. N 3/4. P. 210–217.
- Jack D.L., Klein N.J., Turner M.W. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis // Immunol. Rev. 2001. V. 180. P. 86–99.
- Juven-Gershon T., Kadonaga J.T. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machiner // Dev. Biol. 2010. V. 339. P. 225–229.
- Kabashi E., Valdmann P.N., Dion B.P., Rouleau G.A. Oxidized/misfolded superoxide dismutase-1: the cause of all amyotrophic lateral sclerosis // Ann. Neurol. 2007. V. 62. P. 553–559.

- Kayatekin C., Zitzewitz J.A., Matthews C.R. Zinc binding modulates the entire folding free energy surface of human Cu, Zn superoxide dismutase // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 384. N 2. P. 540–555.
- Kim T.H., Barrere L.O., Zheng M. *et al.* A high resolution map of active promoters in the human genome // *Nature*. 2005. V. 436. P. 876–880.
- Kuźma-Kozakiewicz M., Kwieciński H. The genetics of amyotrophic lateral sclerosis // *Neurol. Neurochir. Pol.* 2009. V. 43. N 6. P. 538–549.
- Lagrange T., Kapanidis A.N., Tang H. *et al.* New core promoter element in RNA polymerase II–dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB // *Genes Dev.* 1998. V. 12. P. 34–44.
- Madsen H.O., Satz M.L., Hogh B. *et al.* Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from Southeast Africa and South America // *J. Immunol.* 1998. V. 161. N 6. P. 3169–3175.
- Manco L., Machado P., Lopes D. *et al.* Analysis of TPI gene promoter variation in three Sub-Saharan Africa population samples // *A. J. Human Biol.* 2009. V. 21. P. 118–120.
- McMullin M.F. The molecular basis of disorders of red cell enzymes // *J. Clin. Pathol.* 1999. V. 52. P. 241–244.
- Niemann S., Broom W.J., Brown R.H. Jr. Analysis of a genetic defect in the TATA box of the SOD1 gene in a patient with familial amyotrophic lateral sclerosis // *Muscle Nerve*. 2007. V. 36. N 5. P. 704–707.
- Orosz F., Olah J., Ovadi J. Triosephosphate isomerase deficiency fact and doubts // *IUBMB Life*. 2006. V. 58. N 12. P. 703–715.
- Orosz F., Olah J., Ovadi J. Reappraisal of triosephosphate isomerase deficiency // *Eur. J. Haematol.* 2010. V. 86. P. 265–267.
- Pelkonen O., Rautio A., Raunio H., Pasanen M. CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase // *Toxicol.* 2000. V. 144. P. 139–147.
- Pitarque M., Rodríguez-Antona C., Sundberg I. Transcriptional regulation of the human *CYP2A6* gene // *J. Pharmacol. Exptl Ther.* 2005. V. 313. N 2. P. 814–822.
- Pitarque M., Richter O., Oke B. *et al.* Identification of a single nucleotide polymorphism in the TATA box of the *CYP2A6* Gene: Impairment of its promoter activity // *Biochem. Biophys Res. Com.* 2001. V. 284. P. 455–460.
- Rosen D.R., Siddique T., Patterson D. *et al.* Mutation in Cu/Zn superoxid dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis // *Nature*. 1993. V. 362. P. 59–62.
- Rossini A., de Almeida Simro T., Albano R.M., Pinto L.F. *CYP2A6* polymorphism and risk for tobacco-related cancers // *Pharmacogenomics*. 2008. V. 9. P. 1737–1752.
- Sisen D.P., Minchinton R.M. Impact mannose-binding lectin on susceptibility to infection diseases // *Clin. Infect. Dis.* 2003. V. 37. N 1. P. 1496–1505.
- Skvortsova V.I., Limborska S.A., Slominsky P.A. *et al.* Sporadic amyotrophic lateral sclerosis associated with the D90A CuZn-superoxide dismutase mutations in Russia // *Eur. J. Neurol.* 2001. V. 8. P. 167–172.
- Smale S.T., Kadonaga J.T. The RNA polymerase II core promoter // *Annu. Rev. Biochem.* 2003. V. 72. P. 449–479.
- Takahashi K., Ezekowitz R.A. The role of the mannose-binding lectin in innate immunity // *Clin. Infect. Dis.* 2005. V. 41 Suppl. 7. S440–4.
- Tora L.A. Unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription // *Genes Dev.* 2010. V. 16. P. 673–675.
- Valentin C., Pissard S., Martin K. *et al.* Triose phosphate isomerase deficiency in 3 French families: two novel null alleles, a frameshift mutation (TPI Alfortville) and an alteration in the initiation codon (TPI Paris) // *Blood*. 2000. V. 96. N 3. P. 1130–1135.
- Vassall K.A., Stubbs H.R., Primmer H.A. *et al.* Decreased stability and increased formation of soluble aggregates by immature superoxide dismutase do not account for disease severity in ALS // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. N 6. P. 210–215.
- Veenstra G., Wollfe A. Gene-selective developmental roles of general transcription factors // *Trends in Biochem. Sci.* 2001. V. 26. P. 665–671.
- Vonk W.I., Klomp L.W. Role of transition metals in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis // *Biochem. Soc. Trans.* 2008. V. 36. P. 1322–1328.
- Watanabe M., Zingg B.C., Mohrenweiser H.W. Molecular analysis of a series of alleles in humans with reduced activity at the triosephosphate isomerase locus // *Am. J. Hum. Genet.* 1996. V. 58. P. 308–316.
- Wolner B.S., Gralla J.D. TATA-flanking sequences influence the rate and stability of TBP and TFIIB // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 275. P. 6260–6266.
- Yoshida R., Nakajima M., Nishimura K. *et al.* Effects of polymorphism in promoter region of human *CYP2A6* gene (*CYP2A6\*9*) on expression level of messenger ribonucleic acid and enzymatic activity *in vivo* and *in vitro* // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2003. V. 74. N 1. P. 69–76.
- Zukunft J., Lang T., Richter T. *et al.* A natural *CYP2B6* TATA box polymorphism (-82T→C) leading to enhanced transcription and relocation of the transcriptional start site // *Mol. Pharmacol.* 2005. V. 67. P. 1772–1782.



## CHANGE OF THE AFFINITY OF THE TATA-BINDING PROTEIN TO OLIGONUCLEOTIDES CORRESPONDING TO TATA-BOXES IN HUMAN GENE PROMOTERS BEARING POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH HEREDITARY DISEASES

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

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

### Summary

Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the regulatory regions of human genes and, in particular, TATA-boxes, can alter the sensitivity to bacterial and viral infections and to pharmaceuticals used for their treatment. These SNPs are associated with the risk of widespread multifactorial human diseases, such as arthritis, hypertension, cancer, Alzheimer's disease, and others. Interaction of the TATA-binding protein (TBP) with TATA-boxes on TATA-containing promoters nucleates preinitiation complex assemblage, being the initial stage of transcription regulation. This study considers the change of TBP affinity to the TATA-boxes of human genes *MBL*, *CYP 2A6*, *SOD1*, and *TPI*, which bear SNPs associated with autoimmune diseases, cardio-vascular diseases, amyotrophic lateral sclerosis, neurodegenerative disorders, hypersensitivity to bacterial infections, etc. In all cases a decrease in the affinity of TBP to TATA-containing oligonucleotides is observed.

**Key words:** mannose-binding lectin, cytochrome P4502A6, Cu/Zn superoxide dismutase, triosephosphate isomerase, TATA-binding protein, TATA-box, affinity.

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6*, ВЕРОЯТНЫХ МАРКЕРОВ РИСКА ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, В ПОПУЛЯЦИЯХ КОРЕННЫХ ЭТНОСОВ И РУССКИХ СЕВЕРНОЙ СИБИРИ

Р.П. Корчагина<sup>1</sup>, Л.П. Осипова<sup>1</sup>, Н.А. Вавилова<sup>1</sup>,  
Н.А. Ермоленко<sup>2</sup>, Е.Н. Воронина<sup>2</sup>, М.Л. Филипенко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия,  
e-mail: kruosana@mail.ru, ludos@bionet.nsc.ru, senk\_off@mail.ru;

<sup>2</sup> Учреждение РАН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
Новосибирск, Россия, e-mail: kostrykina@gmail.com, voronina\_l@mail.ru, max@niboch.nsc.ru

Гены биотрансформации ксенобиотиков *CYP2D6*, *GSTM1* и *GSTT1* вовлечены в процессы канцерогенеза у человека из-за наличия мутантных вариантов, снижающих или блокирующих экспрессию генов. С середины XX в. онкологические заболевания демонстрируют повсеместный рост в популяциях человека, в том числе и у коренных этносов Сибири. Проблема этнических различий в чувствительности к онкозаболеваниям по-прежнему остается актуальной. Впервые проведено исследование полиморфизма генов *CYP2D6* (аллели *CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4*), *GSTM1* и *GSTT1* («нулевые» генотипы *GSTM1 0/0* и *GSTT1 0/0*), рассматриваемых в качестве генетических маркеров риска онкологических заболеваний, у практически здоровых этнических представителей самодийских этносов (селькупов, лесных ненцев, нганасан) и русских, живущих в Сибири. Исследование выявило существенную вариабельность частот распределения *CYP2D6\*4* и *GSTM1 0/0* в северных популяциях. В то же время частоты вариантов *CYP2D6\*3* и *GSTT1 0/0* достоверно не различаются между собой в коренных популяциях селькупов, лесных ненцев и нганасан. По частотам аллеля *CYP2D6\*4* коренные этносы занимают промежуточное положение между русскими Сибири и монголоидами Китая. Однако частоты нулевых генотипов *GSTM1 0/0* и *GSTT1 0/0* у коренных этносов достоверно ниже, чем в популяциях русских Сибири и монголоидов Китая ( $p < 0,05$ ). В целом по всем 4 изученным полиморфным вариантам можно прогнозировать пониженный риск онкологических заболеваний у коренных самодийских этносов по сравнению с русскими Сибири. Исключение составляет популяция лесных ненцев, у которых зарегистрирована повышенная частота генотипов *GSTM1 0/0*, что может быть обусловлено своеобразием брачной структуры и повышенным коэффициентом инбридинга. Полученные результаты могут также иметь значение при прогнозировании вероятности осложнений и позитивного ответа на используемые лекарственные препараты, которые метаболизируются ферментами *GSTM1*, *GSTT1* и *CYP2D6*.

**Ключевые слова:** коренные этносы Северной Сибири, гены биотрансформации ксенобиотиков, real-time PCR, *CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4*, *GSTT1 0/0*, *GSTM1 0/0*.

### Введение

*CYP2D6*, *GSTM1*, *GSTT1* — гены системы биотрансформации ксенобиотиков, под которой понимается ферментативное превращение чужеродных веществ (экзотоксины, лекарствен-

ные препараты, канцерогены и др.) в полярные водорастворимые метаболиты, легко выводимые из организма. Система защиты организма от ксенобиотиков представлена трехэтапным процессом и состоит из фазы активации ксенобиотиков, в которой ведущее место занимает

система цитохромов P450 или CYP; фазы нейтрализации, которая осуществляется различными трансферазами и эпоксидгидролазами, и фазы выведения из организма (Саприн, 1991; Райс, Гуляева, 2003). Нередко промежуточные продукты биотрансформации могут быть более токсичными, обладать более выраженными мутагенной, канцерогенной и даже тератогенной активностями, чем исходные соединения, и вследствие этого быть причиной различных патологических состояний и болезней (Кулинский, 1999). Способность метаболизировать ксенобиотики различается у индивидов из-за наличия мутантных вариантов, снижающих или блокирующих экспрессию генов, что во многих исследованиях связывают с повышенным риском развития заболеваний, особенно онкологических (Ляхович и др., 1997; Joseph *et al.*, 2004; Gajeckaa *et al.*, 2005; Фрейдин и др., 2006; Shi *et al.*, 2008).

**CYP2D6** – фермент первой фазы биотрансформации ксенобиотиков. Составляет 2–4 % от всех цитохромов в печени человека. Метаболизирует 20–25 % лекарственных препаратов (Rowland *et al.*, 2006; Zhou, 2009). Типичными субстратами CYP2D6 является большинство липофильных оснований: некоторые антидепрессанты, антиаритмики, опиоиды. CYP2D6 ответственен также за метаболизм известных человеку канцерогенов включая нитрозамины, и, возможно, никотин (Abraham, Adithan, 2001). У разных людей активность этого фермента может сильно варьировать. Это связано с тем, что ген CYP2D6, располагающийся в области длинного плеча 13.1 хромосомы 22 (Eichelbaum *et al.*, 1987; Gonzales *et al.*, 1988), является высокополиморфным: описано более 70 его аллельных вариантов (Bertilsson *et al.*, 2002; Zhou, 2009).

Наиболее клинически значимыми являются мутантные аллели CYP2D6\*3 и CYP2D6\*4, поскольку они, не имея ферментативной активности, ответственны за формирование у человека фенотипа «медленный метаболизатор», определяемого замедлением клиренса лекарственных препаратов и изменением ответа организма на действие этих веществ (Zhou, 2009). 75–90 % всех «медленных метаболизаторов» по CYP2D6 являются носителями мутантных аллелей CYP2D6\*3 и CYP2D6\*4 (Bartsch *et al.*, 2000; Zanger *et al.*, 2004).

Аллель CYP2D6\*3 возник в результате мутации A2549del в экзоне 5, которая привела к сдвигу рамки считывания и в итоге – к образованию поврежденного, нефункционального белка. Вариант CYP2D6\*3 (A2549del) встречается в европеоидных популяциях с низкой частотой около 2 % (Sachse *et al.*, 1997; Bertilsson *et al.*, 2002) и отсутствует в популяциях монголоидов (Ryu *et al.*, 1998; Qin *et al.*, 2008). Аллель CYP2D6\*4 возник в результате однонуклеотидной замены G1846A в месте соединения интрона 3 и экзона 4, которая привело к нарушению сплайсинга. В итоге образуется белок, содержащий 181 аминокислотный остаток вместо 497, что влечет за собой полную потерю функции фермента (Gresner *et al.*, 2007). Частота аллеля CYP2D6\*4 в европейских популяциях довольно высока и варьирует от 20 до 25 % (Sachse *et al.*, 1997; Gawronska-Szklarz *et al.*, 1999; Zanger *et al.*, 2004), в то время как среди монголоидов она минимальна, составляя 0–1 % (Ryu *et al.*, 1998; Qin *et al.*, 2008).

Исходя из функциональной неполноценности мутантных аллелей CYP2D6\*3 и CYP2D6\*4 было высказано предположение об их возможном участии в процессах, ведущих к развитию раковых заболеваний. Так, была показана связь аллелей CYP2D6\*3 и CYP2D6\*4 с повышенным риском развития острой лимфобластной лейкемии (Silveira *et al.*, 2010). Вариант CYP2D6\*4 значительно повышает риск развития плоскоклеточной карциномы головы и шеи (Yadav *et al.*, 2010). Гомозиготный генотип CYP2D6\*4/CYP2D6\*4 может быть фактором повышенного риска развития ларингеальной карциномы (Gajeckaa *et al.*, 2005). Проведенные исследования по установлению связи между полиморфизмами гена CYP2D6 и развитием рака легкого однозначных результатов не дали (London *et al.*, 1997; Legrand-Andreoletti *et al.*, 1998; Shaw *et al.*, 1998; Au *et al.*, 2001).

**Глутатион-S-трансферазы (GSTs)** являются ферментами второй фазы метаболизма ксенобиотиков. У человека выделяют несколько классов глутатион-S-трансфераз: alpha (A), kappa (K), mu (M), omega (O), pi (P), theta (T) и микросомальные (McLellan *et al.*, 1997; Frova, 2006). Эти ферменты катализируют реакцию конъюгации окисленного глутатиона через сульфгидрильную группу с электрофильными

центрами большого разнообразия субстратов, тем самым вовлекаясь в процесс защиты организма против вредных экзогенных субстратов, таких, как канцерогены, лекарственные препараты и токсины окружающей среды, а также продуктов эндогенного происхождения (Keen, Jakoby, 1978; Christiansen *et al.*, 2006).

Гены, кодирующие  $\mu$  (M) класс ферментов, организованы в генный кластер, расположенный в области короткого плеча первой хромосомы (1p13.3), который включает в себя 5 сцепленных генов: 5'-*GSTM4-GSTM2-GSTM1-GSTM5-GSTM3*-3' (Xu *et al.*, 1998). Ген *GSTM1* экспрессируется в печени и клетках крови, экспрессия *GSTM2* наблюдается только в мышцах, а экспрессия генов *GSTM3-5* – в тканях мозга (Seidegard *et al.*, 1988). Ген *GSTM1* протяженностью в 6 т.п.н. состоит из 8 экзонов и 7 интронов (Timofeeva, 2009). Лocus *GSTM1* является полиморфным и представлен тремя аллельными вариантами: *GSTM1 A*, *GSTM1 B*, *GSTM1 0*. Аллельные варианты *GSTM1 A* и *GSTM1 B* являются функционально активными, отличаясь единственной заменой K127N, и кодируют белки, мало различающиеся по своей ферментативной активности.

Наиболее значимым для генетических и биомедицинских исследований является «нулевой» вариант *GSTM1 0*, возникший в результате делеции вследствие неравного кроссинговера между гомологичными последовательностями, фланкирующими ген *GSTM1*. В результате делеции соответствующий белковый продукт не синтезируется. Такой генетический вариант снижает чувствительность индивидов к канцерогенам, токсинам и некоторым лекарственным веществам (Seidegard *et al.*, 1988; McLellan *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1998).

Было неоднократно показано, что гомозиготный генотип по делеции гена *GSTM1* связан с повышенным риском развития рака легких (Seidegard *et al.*, 1990; Alexandrie *et al.*, 1994; Ford *et al.*, 2000; Ляхович и др., 2004; Shi *et al.*, 2008). Существуют также многочисленные исследования, подтверждающие связь между отсутствием активности *GSTM1* и риском развития рака мочевого пузыря (Bell *et al.*, 1993; Баранов и др., 1999; Habdous *et al.*, 2004), аденокарциномой желудка и прямой кишки (Zhong *et al.*, 1993; Economopoulos *et al.*, 2010). Р. Стрендж

(Strange *et al.*, 1991) в своей работе показал, что риск заболеваемости раком кишечника и желудка почти в 3 раза больше у людей, имеющих генотип *GSTM1 0/0*. Делеция в этом гене также ассоциирована с повышенным риском развития астмы и других респираторных заболеваний (Tamer *et al.*, 2004). И тем не менее мутантный аллель *GSTM1 0* довольно широко распространен в человеческой популяции. Число людей, гомозиготных по этому аллелю, составляет 40–60 % среди европеоидов, 27–35 % – среди негроидов, 32–53 % – среди монголоидов (Geisler, Olshan, 2001; Dieckvoss *et al.*, 2002). По данным разных авторов, «нулевой» аллель *GSTM1 0* в гомозиготном состоянии присутствует у 40–46 % населения России (Баранов и др., 1999; Вахитова и др., 2001).

Класс theta (T) GSTs включает ферменты *GSTT1* и *GSTT2* (Webb *et al.*, 1996). Было подтверждено, что гены *GSTT1* и *GSTT2*, как и ген *GSTM1*, играют важную роль в процессах канцерогенеза у человека (Setiawan *et al.*, 2000; Demir *et al.*, 2005). С помощью метода гибридизации *in situ* было установлено, что ген *GSTT1* располагается в области 22q11.2 (Webb *et al.*, 1996), занимает около 8 т.п.н. и состоит из 5 экзонов и 4 интронов (Timofeeva *et al.*, 2009). Выявлено, что 15–30 % европеоидов, 22–29 % негроидов и 38–58 % монголоидов являются гомозиготными по делетированному аллелю *GSTT1 0* (Tew *et al.*, 2001; Geisler, Olshan, 2001; Dieckvoss *et al.*, 2002). В популяции русского населения европейской части России частота этого генотипа в среднем составляет 18 % (Хрунин и др., 2008).

С середины XX в. онкологические заболевания демонстрируют повсеместный рост в популяциях человека (Аксель и др., 2001; Муранова, 2010), в том числе и у коренных этносов Сибири (Осипова и др., 1999). Проблема этнических различий в чувствительности к онкозаболеваниям по-прежнему остается актуальной. Объектом нашего исследования явились коренные малочисленные народы Северной Сибири (КМНС) – селькупы и лесные ненцы Ямало-Ненецкого автономного округа и нганасаны полуострова Таймыр, все они по языку относятся к самодийской ветви уральской языковой семьи. По антропологическим и генетическим данным в их генофондах фиксируют-

ся европеоидная и монголоидная компоненты (Дебец, 1947; Sukernik *et al.*, 1978; Карафет и др., 1994; Осипова, 1994; Дербенева и др., 2002; Karafet *et al.*, 2002; Аксянова и др., 2003; Гольцова и др., 2005). Наличие европеоидной компоненты объясняется тем, что этническое ядро современных северо-самодийских народностей сформировалось в результате синтеза древнего аборигенного субстрата Заполярья и самодоязычных групп, имевших контакт с европеоидами на разных этапах своей истории (Васильев, 1979).

**Селькупы.** Селькупский этнос в настоящее время представлен северными селькупами, живущими на территории Ямало-Ненецкого автономного округа (ЯНАО) и Туруханского района Красноярского края, и южными селькупами, расселенными в основном на территории Томской области. Согласно переписи 2002 г., на территории ЯНАО проживают 1797 человек (<http://www.perepis2002.ru/index.html?id=44>). В XVII в. часть селькупов из Томско-Нарымского Приобья переселились на Север, на реку Таз, позднее – на реку Турухан, образовав группу северных селькупов, дисперсно расселенную по 7 локальностям: Фарково, Советская Речка, Красноселькуп, Толька Красноселькупская, Толька Пуровская, Ратта, Кики-Акки. Популяционно-генетические исследования северных селькупов проведены в 1988–2007 гг. по всему ареалу расселения (Осипова и др., 2007).

**Лесные ненцы** численностью около 2 тыс. человек проживают в основном на территории Пуровского района ЯНАО. Популяция лесных ненцев является частью большого ненецкого этноса, самого крупного из самодийских этносов, который включает в себя также европейских и сибирских тундровых ненцев. В составе лесных ненцев различают четыре рода – Айваседо, Пяк, Вэлло, Иуси. У лесных ненцев наблюдается высокая частота выявляемости родственных браков, поэтому коэффициент инбридинга по родословным (0,012) у них значительно выше, чем у нганасан, селькупов и тундровых ненцев (Абанина, Сукерник, 1980; Абанина, 1982; Посух и др., 1996; Гольцова, Осипова, 2006).

**Нганасаны** проживают на территории Таймырского (Долгано-Ненецкого) муниципального района Красноярского края и являются самым северным народом Евразии и самым

древним народом Таймыра. Нганасаны сложились на основе древнего палеоазиатского населения Таймыра, неолитических охотников на дикого северного оленя, смешавшегося с самодийскими и тунгусскими племенами. По данным Всероссийской переписи населения 2002 г., на территории Таймыра проживает 766 нганасан в поселках Усть-Авам и Волочанка (авамская группа) и в поселке Новая (вадеевская группа). В настоящее время нганасанский этнос подвержен мощным процессам ассимиляции с пришлым населением, поэтому популяционная выборка нганасан была сформирована с учетом генеалогических данных, собранных сотрудниками ИКЭМ СО АМН СССР и ИЦиГ СО РАН в 1974–2000 гг. (Т.В. Гольцова, Л.П. Осипова).

Коренные этносы Сибири не только представляют собой уникальную модель для изучения генетических процессов, происходящих в популяциях человека, но и ценны сами по себе как этносы, освоившие самые суровые для проживания регионы Северной Сибири. Начиная с 1960-х гг. на Севере происходило бурное развитие промышленности, что привело к изменению традиционного уклада жизни коренных этносов, к проникновению новых химических веществ, лекарств и других «загрязнителей» в среду их обитания. Устойчивость коренных этносов к этим инновациям во многом зависит от состояния их генофондов, способности метаболизировать чужеродные вещества окружающей среды, воздействующие на организм.

Поскольку ферменты биотрансформации ксенобиотиков имеют огромное значение для защиты организмов от действия чужеродных веществ, целью данного исследования является изучение полиморфизма генов *CYP2D6* (аллели \*3 и \*4), *GSTM1*, *GSTT1* (нулевые генотипы) в популяциях селькупов, лесных ненцев, нганасан и русских Сибири в этническом контексте и в связи с риском возникновения онкозаболеваний.

## Материалы и методы

Материал для исследования собирался во время экспедиций 1988–2009 гг. в Ямало-Ненецкий автономный округ и на п-ов Таймыр Красноярского края под руководством к.б.н. Л.П. Осиповой. Забор крови производился по международным правилам с использованием



«Информированного согласия» от добровольцев, практически здоровых на момент исследования. Выборки были сформированы из пула этнических представителей селькупов ( $N = 330$ ), лесных ненцев ( $N = 303$ ), нганасан ( $N = 186$ ), русских Сибири ( $N = 346$ ). В эти выборки не вошли метисы разных уровней от браков с русским и другими пришлыми этносами. В качестве сравнения также использовались литературные данные для монголоидов Китая (Setiawan *et al.*, 2000; Qin *et al.*, 2008).

Образцы ДНК были выделены из лейкоцитарных фракций венозной крови стандартным методом фенол-хлороформной экстракции с использованием протеиназы К. Выявление делеций в генах *GSTM1* и *GSTT1* проводилось методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-time PCR) с интеркалирующим флюоресцентным красителем SYBR GreenI и анализом кривых плавления (в модификации к.б.н. М.Л. Филипенко). Праймеры для ПЦР были выбраны внутри области делеций в генах *GSTM1* и *GSTT1* таким образом, чтобы обеспечивалось отсутствие синтеза соответствующего продукта ПЦР при анализе образцов ДНК с *GSTM1* 0/0 или *GSTT1* 0/0 соответственно. Для того чтобы отличить наличие гомозиготной делеции в генах *GSTT1* и *GSTM1* от отсутствия ДНК матрицы или ингибирования реакции ПЦР, в амплификационную смесь вводили праймеры для амплификации короткого легкоплавкого А/Т-богатого фрагмента ДНК (LTM – low temperature melting). Праймеры были синтезированы в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, их структуры представлены в табл. 1.

Амплификация осуществлялась с применением методики hot-старт, при этом праймеры и dNTPs с помощью парафина отделялись от ДНК и Taq-полимеразы. Состав ПЦР-смеси имел следующий состав: буфер (65 mM Tris-HCl (pH 8,9); 0,05 % Tween 20; 16 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 3,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 0,8× SYBR Green, 0,2 mM dNTPs, 0,3 мкМ праймеры, 0,5 ед. термостабильной Taq-полимеразы. Реакционный объем составлял 25 мкл, каждая реакционная смесь была покрыта равным объемом минерального масла. Размеры амплифицируемых фрагментов: *GSTM1* – 229 пар оснований, *GSTT1* – 287 пар оснований, LTM – 127 пар оснований. Амплификация про-

водилась с помощью амплификатора iCycler iQ5 (Bio-Rad, США).

Условия ПЦР: начальная денатурация 3 мин при 95 °С; далее 38 циклов по три шага: денатурация 5 с при 95 °С, отжиг праймеров 5 с при 64 °С, элонгация 12 с при 72 °С. Регистрация флюоресцентного сигнала – 10 с при 78 °С, затем 10 с при 84 °С для *GSTM1* или 91 °С для *GSTT1*. Кривые плавления регистрировали в течение 61 цикла с повышением температуры на 0,5 °С в каждом цикле от начальной температуры 65 °С, регистрация флюоресцентного сигнала производилась на каждом цикле.

Полученные результаты интерпретировали исходя из анализа графиков накопления флюоресценции, специфичность оценивалась с помощью кривой плавления. Накопление флюоресцентного сигнала прямо пропорционально накоплению фрагментов ДНК, так как использовался интеркалирующий краситель SYBR Green I – вещество, флюоресценция которого значительно увеличивается при связывании с двуцепочечной молекулой ДНК. При регистрации кривых плавления происходила денатурация двуцепочечных продуктов ПЦР и, соответственно, снижался уровень флюоресцентного сигнала, температура плавления составляла 78 °С для LTM, 85 °С – *GSTM1* и 91 °С – *GSTT1*.

Генотипирование однонуклеотидных замен в гене *CYP2D6* проводилось в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплементарных полиморфным участкам ДНК. Каждый образец амплифицировался с использованием пары праймеров

**Таблица 1**  
Структуры праймеров  
для локусов *GSTM1*, *GSTT1* и LTM

| Название локуса | Последовательности праймеров                              |
|-----------------|---|
| <i>GSTM1</i>    | 5'GGTCAAGGACATCATAGACGAGAA3'<br>5'CTCAGGAGAACTGAAGCCAAA3' |
| <i>GSTT1</i>    | 5'GCTAGTTGCTGAAGTCCTGCTTA3'<br>5'CTTGCCCTTCAGAATGACCT3'   |
| LTM             | 5'TGGGTGCTAGAGGTATAATCG3'<br>5'TTAGAGGAAGCTGGGTAAGAG3'    |

и двух зондов, несущих «гаситель» на 3'-конце и разные флуоресцентные красители (FAM либо R6G) на 5'-конце. Структуры праймеров и зондов приведены в табл. 2.

Общий объем реакционной смеси составлял 25 мкл, смесь содержала ДНК с концентрацией 15 нг/мкл, 300 нМ каждого праймера; по 100–200 нМ TaqMan-зондов, конъюгированных с FAM или R6G; 200 мкМ dNTPs, амплификационный буфер (650 мМ Tris-HCl, 240 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 % Tween 20, 35 мМ MgCl<sub>2</sub>), термостабильную Taq-полимеразу – 0,5 ед. акт./реакцию. ПЦР проводилась в следующих условиях: начальная денатурация 1 мин 30 с при 96 °С; затем 45 циклов, включающих денатурацию при 96 °С 8 с, отжиг праймеров и последующую элонгацию при 60 °С в течение 40 с (каждый шаг сопровождался регистрацией флуоресцентного сигнала в диапазонах, соответствующих интервалам флуоресценции флуорофоров FAM и R6G. Работа проводилась с использованием амплификатора iCycler iQ 4 (Bio-Rad, USA). Полученные данные обрабатывались с помощью программы «Bio-Rad iQ5». Популяционные частоты аллельных вариантов вычисляли на основе наблюдаемых частот генотипов. Оценку соответствия распределения

частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга проводили с использованием критерия  $\chi^2$  (Пирсона), применяя on-line тест-программу (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.p1>) (при  $p > 0,05$  равновесие выполняется).

Оценку достоверности различий по частотам аллелей и генотипов между исследованными выборками проводили по критерию  $\chi^2$  с помощью статистической программы Statistica 1993 (при  $p < 0,05$  результаты считались достоверно значимыми).

### Результаты

Частоты генотипов полиморфных вариантов *CYP2D6\*3* и *CYP2D6\*4* гена *CYP2D6* представлены в табл. 3 и 4. Во всех обследованных популяциях наблюдается соответствие распределения частот *CYP2D6\*3* и *CYP2D6\*4* генотипов равновесию Харди–Вайнберга. Следует отметить, что мутантный гомозиготный вариант *CYP2D6\*3 del/del* не был встречен ни в одной из исследованных выборок. Вариант *CYP2D6\*4 A/A* выявлен только среди нганасан и русских Сибири.

Частоты аллеля *CYP2D6\*3 (2549del)* невысоки во всех исследованных популяциях, однако у

Таблица 2

Структуры праймеров и зондов, используемых для генотипирования в режиме реального времени методом конкурирующих TaqMan-зондов

| Аллель          | Последовательность праймеров | Последовательность зондов          |
|-----------------|------------------------------|------------------------------------|
| <i>CYP2D6*3</i> | 5'TGGCAATGTCCTACGCTTC3'      | 5'FAM - TGAGCACAGGATGACCT – BHQ3'  |
|                 | 5'CTCTCACCTTCTCCATCTCTGC3'   | 5'R6G – TGAGCACGGATGACCT – BHQ3'   |
| <i>CYP2D6*4</i> | 5'TTGCTCACGGCTTTGTCCAGG3'    | 5'R6G – CCCCCAGGACGCCCCCT – BHQ3'  |
|                 | 5'GGCAAGAAGTCGCTGGACCAG3'    | 5'FAM – CCCCCAAGACGCCCCCTT – BHQ3' |

Таблица 3

Распределение генотипов полиморфного варианта *CYP2D6\*3* и соответствие равновесию Харди–Вайнберга в исследованных популяциях

| Популяции            | Частоты генотипов, % |              |                | Соответствие равновесию Харди–Вайнберга |
|----------------------|----------------------|--------------|----------------|---|
|                      | <i>A/A</i>           | <i>A/del</i> | <i>del/del</i> |   |
| Селькупы (330)*      | 99,10 (327)          | 0,90 (3)     | 0,00           | $p = 0,93$                              |
| Лесные ненцы (303)   | 100,00 (303)         | 0,00 (0)     | 0,00           | $p = 1,00$                              |
| Нганасаны (186)      | 99,46 (185)          | 0,54 (1)     | 0,00           | $p = 0,97$                              |
| Русские Сибири (346) | 96,53 (334)          | 3,47 (12)    | 0,00           | $p = 0,74$                              |

\* В скобках даны размер выборки и количество лиц с конкретным генотипом.

Таблица 4

Распределение генотипов полиморфного варианта *CYP2D6\*4*  
и соответствие равновесию Харди–Вайнберга в исследованных популяциях

| Популяции            | Частоты генотипов, % |            |            | Соответствие равновесию Харди–Вайнберга |
|----------------------|----------------------|------------|------------|---|
|                      | <i>G/G</i>           | <i>G/A</i> | <i>A/A</i> |   |
| Селькупы (322)*      | 91,93 (296)          | 8,07 (26)  | 0,00 (0)   | $p = 0,45$                              |
| Лесные ненцы (299)   | 93,31 (279)          | 6,69 (20)  | 0,00 (0)   | $p = 0,55$                              |
| Нганасаны (184)      | 85,87 (158)          | 13,59 (25) | 0,54 (1)   | $p = 0,99$                              |
| Русские Сибири (317) | 69,10 (219)          | 27,40 (87) | 3,5 (11)   | $p = 0,52$                              |

\* В скобках даны размер выборки и количество лиц с конкретным генотипом.

русских эта частота достоверно выше ( $p < 0,05$ ), чем у коренных народов (табл. 5).

Частоты аллеля *CYP2D6\*4* (*A1846*) сходны у селькупов и лесных ненцев ( $p = 0,64$ ), однако у нганасан его частота выше в 2 раза, а у русских Сибири выше примерно в 4 раза. По частотам данного аллеля все самодийцы отличаются до-

стоверно от популяций русских и монголоидов Китая ( $p < 0,005$ ) (табл. 6).

Частоты нулевых генотипов *GSTM1* 0/0 и *GSTT1* 0/0, представленные в табл. 7, гораздо сильнее варьируют в исследованных популяциях по сравнению с аллелями локуса *CYP2D6*.

Таблица 5

Частоты аллеля *CYP2D6\*3* (*2549del*) и достоверность различий между популяциями

| Популяции                  | Общее число аллелей | Частота <i>CYP2D6*3</i> ( <i>2549del</i> ), % | Селькупы        | Лесные ненцы     | Нганасаны       | Русские          | Китайцы    |
|----------------------------|---------------------|---|-----------------|------------------|-----------------|------------------|------------|
| Селькупы                   | 660                 | 0,45  |                 | $p = 0,28$       | $p = 0,95$      | $p = 0,02$       | $p = 0,19$ |
| Лесные ненцы               | 606                 | 0,00  | $\chi^2 = 1,16$ |                  | $p = 0,81$      | $p = 0,00$       | $p^*$      |
| Нганасаны                  | 372                 | 0,27  | $\chi^2 = 0,00$ | $\chi^2 = 0,06$  |                 | $p = 0,04$       | $p = 0,70$ |
| Русские Сибири             | 692                 | 1,73  | $\chi^2 = 5,34$ | $\chi^2 = 10,34$ | $\chi^2 = 4,06$ |                  | $p = 0,00$ |
| Китайцы (Qin et al., 2008) | 800                 | 0,00  | $\chi^2 = 1,75$ | $\chi^2^*$       | $\chi^2 = 0,15$ | $\chi^2 = 11,68$ |            |

Примечание. Выделены статистически значимые величины парных различий (то же для табл. 6, 8, 9).  $p^*$  – вычислить значение  $\chi^2$  не представляется возможным, так как в выборках лесных ненцев и китайцев частоты мутантного аллеля равны нулю.

Таблица 6

Частоты аллеля *CYP2D6\*4* (*A1846*) и достоверность различий между популяциями

| Популяции                  | Общее число аллелей | Частота <i>CYP2D6*4</i> ( <i>A1846</i> ), % | Селькупы         | Лесные ненцы     | Нганасаны        | Русские Сибири    | Китайцы    |
|----------------------------|---------------------|---|------------------|------------------|------------------|-------------------|------------|
| Селькупы                   | 644                 | 4,04  |                  | $p = 0,64$       | $p = 0,04$       | $p = 0,00$        | $p = 0,00$ |
| Лесные ненцы               | 598                 | 3,34  | $\chi^2 = 0,22$  |                  | $p = 0,01$       | $p = 0,00$        | $p = 0,00$ |
| Нганасаны                  | 368                 | 7,34  | $\chi^2 = 3,98$  | $\chi^2 = 6,27$  |                  | $p = 0,00$        | $p = 0,00$ |
| Русские Сибири             | 634                 | 17,20                                       | $\chi^2 = 46,22$ | $\chi^2 = 50,08$ | $\chi^2 = 14,31$ |                   | $p = 0,00$ |
| Китайцы (Qin et al., 2008) | 800                 | 0,14  | $\chi^2 = 26,52$ | $\chi^2 = 21,08$ | $\chi^2 = 49,21$ | $\chi^2 = 121,06$ |            |



Таблица 7

Частоты генотипов  
*GSTM1* 0/0 и *GSTT1* 0/0  
в исследованных популяциях

| Популяции            | Частота<br><i>GSTM1</i> 0/0,<br>% | Частота<br><i>GSTT1</i> 0/0,<br>% |
|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Селькупы (330)*      | 20,00                             | 14,85                             |
| Лесные ненцы (303)   | 35,31                             | 9,90                              |
| Нганасаны (186)      | 9,14                              | 12,37                             |
| Русские Сибири (341) | 48,09                             | 38,71                             |

\* В скобках дан размер выборки.

В табл. 8, 9 представлены достоверности различий в частотах *GSTM1* 0/0 и *GSTT1* 0/0 генотипов между популяциями.

По частотам *GSTM1* 0/0 самодийские популяции достоверно отличаются как друг от друга, так и от монголоидов Китая и от русских Сибири. По частотам генотипа *GSTT1* 0/0 самодийские популяции схожи между собой, но достоверно отличаются как от монголоидов Китая, так и от русских Сибири.

Мы сочли целесообразным провести меж-популяционное сравнение суммарной встречае-

мости «нулевых» генотипов глутатион-S-трансфераз M1 и T1 включая «двойные» сочетания *GSTM1* 0/0 / *GSTT1* 0/0 (табл. 10).

По суммарной представленности всех вариантов сочетания «нулевых» генотипов наибольшее значение имеют русские Сибири (почти 64 %), а наименьшая суммарная частота наблюдается у нганасан Таймыра – около 16 %.

### Обсуждение результатов

Крайне низкие частоты встречаемости аллеля *CYP2D6*\*3 среди селькупов и нганасан и полное его отсутствие у лесных ненцев сравнимы с частотами, наблюдаемыми в монголоидных популяциях Евразии (Ryu *et al.*, 1998; Qin *et al.*, 2008). У русских Сибири так же, как и в других европеоидных популяциях Эстонии и Германии (Marandi *et al.*, 1997; Sachse *et al.*, 1997), частота этого аллеля тоже невысока (около 2 %), хотя имеет достоверные отличия от таковых у коренных этносов Сибири. Можно предположить, что существуют селективные механизмы, препятствующие накоплению этого варианта в популяциях, либо же этот аллель имеет сравнительно недавнее эволюционное происхождение,

Таблица 8

Достоверность различий в частотах *GSTM1* 0/0 генотипа между популяциями

| Популяции                                | Селькупы         | Лесные ненцы     | Нганасаны        | Русские Сибири  | Китайцы    |
|--|------------------|------------------|------------------|-----------------|------------|
| Селькупы                                 |                  | $p = 0,00$       | $p = 0,01$       | $p = 0,00$      | $p = 0,00$ |
| Лесные ненцы                             | $\chi^2 = 10,08$ |                  | $p = 0,00$       | $p = 0,04$      | $p = 0,01$ |
| Нганасаны                                | $\chi^2 = 7,05$  | $\chi^2 = 25,34$ |                  | $p = 0,00$      | $p = 0,00$ |
| Русские Сибири                           | $\chi^2 = 28,35$ | $\chi^2 = 4,16$  | $\chi^2 = 42,94$ |                 | $p = 0,68$ |
| Китайцы (Setiawan <i>et al.</i> , 2000)* | $\chi^2 = 35,48$ | $\chi^2 = 6,63$  | $\chi^2 = 48,59$ | $\chi^2 = 0,17$ |            |

\* Частота генотипа *GSTM1* 0/0 в китайской выборке (429 человек) составляет 51,00 %.

Таблица 9

Достоверность различий в частотах *GSTT1* 0/0 генотипа между популяциями

| Популяции                                | Селькупы         | Лесные ненцы     | Нганасаны        | Русские Сибири  | Китайцы    |
|--|------------------|------------------|------------------|-----------------|------------|
| Селькупы                                 |                  | $p = 0,12$       | $p = 0,58$       | $p = 0,00$      | $p = 0,00$ |
| Лесные ненцы                             | $\chi^2 = 2,38$  |                  | $p = 0,54$       | $p = 0,00$      | $p = 0,00$ |
| Нганасаны                                | $\chi^2 = 0,30$  | $\chi^2 = 0,38$  |                  | $p = 0,00$      | $p = 0,00$ |
| Русские Сибири                           | $\chi^2 = 27,33$ | $\chi^2 = 42,29$ | $\chi^2 = 22,63$ |                 | $p = 0,23$ |
| Китайцы (Setiawan <i>et al.</i> , 2000)* | $\chi^2 = 42,90$ | $\chi^2 = 59,46$ | $\chi^2 = 32,77$ | $\chi^2 = 1,46$ |            |

\* Частота генотипа *GSTT1* 0/0 в китайской выборке (429 человек) составляет 46,00 %.

Таблица 10

Частоты сочетания «нулевых» генотипов *GSTM1* 0/0 и *GSTT1* 0/0  
в исследованных популяциях

| Популяции          | Частоты генотипов, %              |                                   |                                     |
|--------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
|                    | <i>GSTM1</i> 0/0 / <i>GSTT1</i> + | <i>GSTM1</i> + / <i>GSTT1</i> 0/0 | <i>GSTM1</i> 0/0 / <i>GSTT1</i> 0/0 |
| Селькупы (330)     | 17,27 (57)                        | 12,12 (40)                        | 2,73 (9) *                          |
| Лесные ненцы (303) | 32,34 (98)                        | 6,93 (21)                         | 2,97 (9)                            |
| Нганасаны (186)    | 6,45 (12)                         | 6,45 (12)                         | 2,69 (5)                            |
| Русские (341)      | 25,22 (86)                        | 15,84 (54)                        | 22,87 (78)                          |

\* Частоты сочетания генотипов *GSTM1* 0/0 / *GSTT1* 0/0 в выборках коренных народов достоверно отличаются от таковой для русских ( $p < 0,05$ ). В скобках приведено количество лиц с конкретным сочетанием генотипов.

предположительно, в европеоидной ветви. Частоты аллеля *CYP2D6*\*4 в популяциях коренных этносов имеют промежуточные значения между таковыми для монголоидов Китая и русских Сибири. Аналогичный вывод был сделан при исследовании выборки (102 чел.) тундровых ненцев (Duzhak *et al.*, 2000). Частота *CYP2D6*\*4 в исследованной нами выборке русских Сибири согласуется с данными, полученными для выборки русских ( $N = 290$ ), проживающих в европейской части России (Воронежская область) (18,2 %;  $p = 0,73$ ) и в Эстонии (14,4 %;  $p = 0,35$ ), а также для европейской выборки Германии (20,7 %;  $p = 0,15$ ) (Sachse *et al.*, 1997; Marandi *et al.*, 1997; Gaikovitch *et al.*, 2003). Таким образом, частоты мутантных вариантов гена *CYP2D6*, первой фазы биотрансформации ксенобиотиков, достоверно ниже в выборках коренных этносов, чем в выборке русских Сибири и в других европеоидных популяциях. У коренных этносов преобладают лица с нормальной активностью соответствующих ферментов *CYP2D6*.

Что касается глутатион-S-трансфераз, то частоты «нулевых» генотипов *GSTM1* 0/0 и *GSTT1* 0/0 гораздо сильнее варьируют в исследованных популяциях по сравнению с аллелями локуса *CYP2D6*. Частота «нулевых» генотипов у русских Сибири оказалась ожидаемо высокой – 48 % для *GSTM1* 0/0 и около 39 % для *GSTT1* 0/0. Частота *GSTM1* 0/0 для русских Сибири сравнима с таковыми для русских европейской части России (40 % по данным В.С. Баранова с соавт. (1999)), русских Волго-Уральского региона России (46,2 %;  $p = 0,96$ ) (Вахитова и др., 2001) и европеоидов Германии (54,1 %;  $p = 0,51$ ) (Kempkes *et al.*, 1996). Однако частота другого

генотипа, *GSTT1* 0/0, у русских Сибири в 2 раза выше, чем у русских европейской части России (Хрунин и др., 2008) и у европеоидов Германии ( $p < 0,05$ ) (Kempkes *et al.*, 1996).

Что касается изученных самодийских популяций, то по частотам генотипа *GSTT1* 0/0 они достоверно не отличаются между собой, и встречаемость *GSTT1* 0/0 в этих популяциях существенно ниже, чем у русских Сибири и монголоидов Китая ( $p = 0,00$ ).

Наименьшее количество носителей «нулевого» генотипа *GSTM1* 0/0 наблюдается среди нганасан (9,14 %). У лесных ненцев отмечен феномен необычно высокой частоты *GSTM1* 0/0 (около 35 %). По данным литературы, в родственной лесным ненцам по языку популяции тундровых ненцев Самбурга в выборке из 102 практически здоровых человек была зафиксирована примерно такая же частота *GSTM1* 0/0 – 39,8 % ( $p = 0,71$ ) (Duzhak *et al.*, 2000). Однако среди тундровых ненцев, больных раком или имеющих хромосомные аномалии ( $N = 28$ ), частота «нулевого» генотипа *GSTM1* 0/0 оказалась гораздо выше и составила почти 63 % (Duzhak *et al.*, 2001). Таким образом, впервые была показана связь между наличием мутантного «нулевого» генотипа *GSTM1* 0/0 и риском развития онкологических заболеваний у самодийских этносов. Необходимы дальнейшие исследования в этом направлении с вовлечением широкого спектра генетических маркеров и увеличением объема выборок больных лиц.

Столь разная представленность генотипа *GSTM1* 0/0 в самодийских популяциях, достоверно отличающаяся от его частоты среди европеоидов и монголоидов, вероятно, может

говорить о расхождении в становлении, развитии каждого из коренных этносов, и, возможно, это связано с тем, что условия среды и факторы микроэволюции по-разному действовали на коренные северные популяции. Их малая численность могла способствовать дрейфу генов и последующему отбору в пользу наиболее «приспособленных» генотипов в условиях жесткой среды обитания.

Распределение частот генотипов *GSTM1* 0/0 и *GSTT1* 0/0 исследовано и в других коренных популяциях Сибири (Ахматьянова и др., 2008; Хрунин и др., 2008). Однако для некоторых этнических групп (бурятов, калмыков, ханты) не указаны размеры популяционных выборок (Попова и др., 2002), что явилось препятствием для адекватных сравнений. Мы провели сравнение популяций телеутов, шорцев и якутов с популяциями самодийцев. Оказалось, что частоты *GSTM1* 0/0 у селькупов и лесных ненцев достоверно выше, чем у телеутов и шорцев ( $p < 0,05$ ), но сходны у нганасан и телеутов ( $p = 0,77$ ). В то же время частота *GSTM1* 0/0 у якутов достоверно выше, чем у селькупов и нганасан, и сходна с частотой у лесных ненцев ( $p = 0,57$ ). Частота другого генотипа, *GSTT1* 0/0, также ниже в самодийских популяциях по сравнению с якутами и телеутами, но эти различия достоверны только для популяции лесных ненцев. С шорцами имеют сходство лесные ненцы ( $p = 0,67$ ).

Проведенное попарное сравнение выявило существенную вариабельность в колебаниях частот «нулевых» генотипов глутатион-S-трансфераз M1 и T1 между коренными популяциями Сибири. Необычным представляется двукратное преобладание частоты *GSTT1* 0/0 над частотой *GSTM1* 0/0 у телеутов, поскольку, по литературным данным, обычно эти частоты схожи, либо преобладает *GSTM1* 0/0.

В табл. 10 приведено распределение различных сочетаний генотипов *GSTM1* 0/0 и *GSTT1* 0/0 в исследованных популяциях. Видно, что общая сумма частот «нулевых» *GSTs*-вариантов минимальна у нганасан (15,6 %). У селькупов это значение почти в 2 раза выше, а наибольшую величину среди коренных этносов имеют лесные ненцы – около 42 %. Максимальная суммарная частота «нулевых» вариантов наблюдается у русских Сибири, почти 64 %. Оказалось, что по сравнению с русской сибирской популяцией

в популяциях коренных северных этносов с наименьшей частотой присутствуют носители одновременно двух «нулевых» вариантов генов глутатион-S-трансфераз. Возможно, одновременное наличие двух «нулевых» генотипов более неблагоприятно для фенотипа, чем сочетание двух положительных (*GSTM1* + / *GSTT1* +) или одного нулевого варианта (*GSTM1* + / *GSTT1* 0/0 или *GSTM1* 0/0 / *GSTT1* +). Не исключено, что сочетание двух мутантных генотипов одновременно ограничивалось отбором и повлияло на устойчивость коренных этносов к жестким природным условиям Севера.

В целом исследуемые популяции коренных самодийских этносов Северной Сибири имеют достоверно сниженное содержание «нулевых» вариантов генов *GSTM1* и *GSTT1*, маркеров риска развития онкологических заболеваний, по сравнению с русскими Сибири и монголоидами Китая, что, вероятно, может обеспечивать данные этносы меньшим риском развития онкопатологий на популяционном уровне. Но стоит учитывать тот факт, что коренные этносы проживают в зоне экстремальных природных условий с высоким уровнем антропогенной и техногенной нагрузки на окружающую среду, что может негативно сказываться на здоровье населения и его чувствительности к онкологическим заболеваниям, так как в процессе канцерогенеза задействованы многие механизмы. Кроме того, в настоящее время в популяциях коренных этносов увеличивается степень метисации, что способствует привнесению «новых» генных вариантов в их генофонды и может изменять степень риска развития подобных заболеваний.

Наше исследование позволило впервые выявить распределение полиморфных вариантов генов системы биотрансформации ксенобиотиков в коренных самодийских популяциях селькупов, лесных ненцев и нганасан, а также у русских Сибири. В целом по всем 4 изученным полиморфным вариантам можно прогнозировать пониженный риск онкологических заболеваний у коренных самодийских этносов по сравнению с русскими Сибири. Исключение составляет популяция лесных ненцев, в которой зарегистрирована повышенная частота генотипов *GSTM1* 0/0, что может быть обусловлено своеобразием брачной структуры и повышенным коэффициентом инбридинга.

Полученные результаты могут также иметь значение при прогнозировании вероятности осложнений и негативного ответа на используемые лекарственные препараты, которые метаболизируются ферментами GSTM1, GSTT1 и CYP2D6.

Финансовая поддержка данного исследования осуществлялась Интеграционным проектом № 5.5 (2006–2008 гг.), Гос. контрактом № 01-15/36 и экспедиционными грантами СО РАН № 1/8 за 2008 г. и № 1/2 за 2009 г. (для О.Л.П.); Интеграционными проектами СО РАН № 17 (2009–2011 гг.) и № 84 (2009–2011 гг.) (для Ф.М.Л.).

Авторы выражают глубокую благодарность представителям коренных этносов, принявшим участие в данном исследовании. А также Е.А. Зубкову и М.Н. Бочкареву за выделение образцов ДНК; Н.А. Бурлаковой, Т.В. Чуркиной, Н.А. Молетотовой, Т.М. Карафет и С.Г. Вепреву за помощь в проведении экспедиционных исследований.

### Литература

- Абанина Т.А., Сукерник Р.И. Популяционная структура лесных ненцев. Сообщение II. Результаты генеалогического изучения // Генетика. 1980. Т. 16. № 1. С. 156–164.
- Абанина Т.А. Популяционная структура лесных ненцев: демографические характеристики, структура браков, миграция, анализ смещения // Генетика. 1982. Т. 18. № 11. С. 1884–1893.
- Аксель Е.М., Давыдов М.И., Ушакова Т.И. и др. Злокачественные новообразования желудочно-кишечного тракта: основные статистические показатели и тенденции. 2001. Доступно: <http://www.consilium-medicum.com/article/8413>
- Аксянова Г.А., Богашев А.Н., Богордаева А.А. и др. Этнография и антропология Ямала / Ред. А.Н. Богашев. Новосибирск: Наука, 2003. 390 с.
- Ахматьянова В.Р., Остапцева А.В., Шабалдин А.В. и др. Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз M1 и T1 (*GSTM1* и *GSTT1*) у коренного и пришлого населения Кемеровской области // Генетика. 2008. Т. 44. № 4. С. 539–542.
- Баранов В.С., Асеев М.В., Баранова Е.В. «Гены предрасположенности» и генетический паспорт. 1999. Доступно: <http://nature.web.ru/db/msg.html?mid=1178666&uri=page1.html>
- Васильев В.И. Происхождение северо-самодийских народностей. М.: Наука, 1979. 242 с.
- Вахитова Ю.В., Султанаева З.М., Викторова Т.В. и др. Анализ полиморфизма гена глутатион-S-трансферазы в популяциях Волго-Уральского региона // Генетика. 2001. Т. 37. № 2. С. 268–270.
- Всероссийская перепись населения РФ 2002. Том 13. Коренные малочисленные народы Российской Федерации. Доступно: <http://www.perepis2002.ru/index.html?id=44>
- Гольцова Т.В., Осипова Л.П. Генетико-демографическая структура популяций коренных народов Сибири в связи с проблемами микроэволюции // Информ. вестник ВОГиС. 2006. Т. 10. № 1. С. 126–154.
- Гольцова Т.В., Осипова Л.П., Жаданов С.И., Виллемс Р. Влияние брачной миграции на генетическую структуру популяции нганасан Таймыра: генеалогический анализ по маркерам митохондриальной ДНК // Генетика. 2005. № 5. С. 1–11.
- Дебев Г.Ф. Селькупы (антропологический очерк) // Тр. Ин-та этнографии. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1947. С. 103–145.
- Дербенева О.А., Стариковская Е.Б., Володько Н.В. и др. Изменчивость митохондриальной ДНК у кетов и нганасан в связи с первоначальным заселением Северной Евразии // Генетика. 2002. Т. 38. № 11. С. 1–6.
- Карафет Т.М., Посух О.Л., Осипова Л.П. Популяционно-генетические исследования коренных жителей Сибирского Севера // Сиб. экол. журнал. 1994. № 2. С. 113–127.
- Кулинский В.И. Обезвреживание ксенобиотиков // Сорос. образоват. журнал. 1999. № 1. С. 8–12.
- Ляхович В.В., Вавилин В.А., Гришанова А.Ю. и др. Фармакогенетика и современная медицина // Вестн. Рос. акад. мед. наук. 2004. № 10. С. 40–45.
- Ляхович В.В., Вавилин В.А., Гуткина Н.И. и др. Гены и ферменты системы метаболизма ксенобиотиков в онкопатологии // Вопр. мед. химии. 1997. Т. 43. Вып. 5. С. 330–337.
- Муранова О.Ю. Эпидемиология рака молочной железы в Приморском крае. Пути профилактики и ранней диагностики: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2010.
- Осипова Л.П. Генетические маркеры иммуноглобулинов (система Gm) для оценки процессов миграции и метисации в популяциях человека в Северной Сибири // Сиб. экол. журнал. 1994. Т. 1. № 2. С. 129–140.
- Осипова Л.П., Посух О.Л., Пономарева А.В. и др. Окружающая среда и ее влияние на генофонд человека: опыт комплексных исследований // Информ. вестник ВОГиС. 1999. № 8. С. 11–16.
- Осипова Л.П., Сенькова Н.А., Карафет Т.М. и др. Генетическая структура популяции северных селькупов по маркерам групп крови // Генетическая демография и биомедицина: результаты



- исследований коренного населения Приуральского и Красноселькупского районов ЯНАО // Науч. вестн. Ямало-Ненецкого автономного округа. 2007. Вып. 8. № 52. С. 61–75.
- Попова С.Н., Сломинский П.А., Галушкин С.Н. и др. Полиморфизм глутатион-S-трансфераз M1 и T1 в ряде популяций России // Генетика. 2002. Т. 38. № 2. С. 281–284.
- Посух О.Л., Осипова Л.П., Крюков Ю.А., Ивакин Е.А. Генетико-демографический анализ популяций коренных жителей Самбургской тундры // Генетика. 1996. Т. 32. № 6. С. 822–829.
- Райс Р.Х., Гуляева Л.Ф. Биологические эффекты токсических соединений. Новосибирск: НГУ, 2003. 208 с.
- Саприн А.Н. Ферменты метаболизма и детоксикации ксенобиотиков // Усп. биол. химии. 1991. Т. 32. С. 146–172.
- Фрейдин М.Б., Брагина Е.Ю., Огородова Л.М., Пузырев В.П. Генетика атопии: современное состояние // Информ. вестник ВОГиС. 2006. Т. 10. № 3. С. 492–503.
- Хрунин А.В., Хохрин Д.В., Лимборская С.А. Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз в популяциях русского населения европейской части России // Генетика. 2008. Т. 44. С. 1429–1434.
- Abraham B.K., Adithan C. Genetic polymorphism of *CYP2D6* // Indian J. Pharmacol. 2001. V. 33. P. 147–169.
- Alexandrie A.-K., Ingelman-Sundberg M., Seidegard J. *et al.* Genetic susceptibility to lung cancer with special emphasis on *CYP1A1* and *GSTM1*: a study on host factors in relation to age at onset, gender and histological cancer types // Carcinogenesis. 1994. V. 15. P. 1785–1790.
- Au W.W., Oh H.Y., Grady J. *et al.* Usefulness of genetic susceptibility and biomarkers for evaluation of environmental health risk // Env. Mol. Mutagen. 2001. V. 37. P. 215–225.
- Bartsch H., Nair U., Risch A. *et al.* Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevent. 2000. V. 9. P. 3–28.
- Bell D.A., Taylor J.A., Paulson D.F. *et al.* Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (*GSTM1*) that increases susceptibility to bladder cancer // J. Natl. Cancer Inst. 1993. V. 85. N 14. P. 1159–1164.
- Bertilsson L., Dahl M.-L., Dalen P., Al-Shurbaji A. Molecular genetics of *CYP2D6*: Clinical relevance with focus on psychotropic drugs // Br. J. Clin. Pharmacol. 2002. V. 53. N 2. P. 111–122.
- Christiansen L., Brasch-Andersen C., Bathum L. *et al.* A longitudinal study of the effect of *GSTT1* and *GSTM1* gene copy number on survival // Mech. Ageing Dev. 2006. V. 127. P. 597–599.
- Dieckvoss B.-O., Stanulla M., Schrappe M. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes in pediatric non-Hodgkin's lymphoma // Haematologica. 2002. V. 87. P. 709–713.
- Demir A., Altin S., Demir I. *et al.* The frequency of *GSTT1* null genotype in Turkish population and lung cancer risk // Orig. Commun. 2005. V. 11. N 2. P. 89–93.
- Duzhak T., Mitrofanov D., Ostashevskii V. *et al.* Genetic polymorphisms of *CYP2D6*, *CYP1A1*, *GSTM1* and *p53* genes in a unique Siberian population of Tundra Nentsi // Pharmacogenetics. 2000. V. 10. N 6. P. 531–537.
- Duzhak T.G., Osipova L.P., Posukh O.L. *et al.* Genetic polymorphisms of *CYP1A1*, *GSTM1* and *p53* genes in a unique Siberian population of Tundra Nentsi and its pharmacogenetic importance // Int. J. Circumpolar Health. 2001. V. 60. N 2. P. 228–234.
- Economopoulos K.P., Sergentanis T.N. *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *GSTA1* and colorectal cancer risk: a comprehensive meta-analysis // Eur. J. Cancer. 2010. V. 46. N 9. P. 1617–1631.
- Eichelbaum M., Baur M.P., Dengler H.J. *et al.* Chromosomal assignment of human cytochrome P-450 (debrisoquine / sparteine type) to chromosome 22 // Br. J. Clin. Pharmacol. 1987. V. 23. N 4. P. 455–458.
- Ford J.G., Ly Y., O'Sullivan M.M. *et al.* Glutathione S-transferase M1 polymorphism and lung cancer risk in African-Americans // Carcinogenesis. 2000. V. 21. N 11. P. 1971–1975.
- Frova C. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives // Biomol. Engineering. 2006. V. 23. P. 149–169.
- Gaikovitch E.A., Cascorbi I., Mrozikiewicz P.M. *et al.* Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP1A1*, *NAT2* and of P-glycoprotein in a Russian population // Eur. J. Clin. Pharmacol. 2003. V. 59. P. 303–312.
- Gajeckaa M., Rydzanicza M., Jaskula-Sztula R. *et al.* *CYP1A1*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *NAT2*, *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms or their combinations are associated with the increased risk of the laryngeal squamous cell carcinoma // Mutat. Res. Fundamental and Mol. Mechanisms of Mutagenesis. 2005. V. 574. Issue 1/2. P. 112–123.
- Gawronska-Szklarz B., Wojcicki M., Kuprianowicz A. *et al.* *CYP2D6* and *GSTM1* genotypes in a Polish population // Eur. J. Clin. Pharmacol. 1999. V. 55. N 5. P. 389–392.
- Geisler S.A., Olshan A.F. *GSTM1*, *GSTT1*, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: A Mini-HuGE Review // Am. J. Epidemiol. 2001. V. 154. N 2. P. 95–105.
- Gonzalez F.J., Vilbois F., Hardwick J.P. *et al.* Human debrisoquine 4-hydroxylase (P450 IID1): cDNA and

- deduced amino acid sequence and assignment of the *CYP2D* locus to chromosome 22 // *Genomics*. 1988. V. 2. N 2. P. 174–179.
- Gresner P., Gromadzinskaa J., Wasowicza W. Polymorphism of selected enzymes involved in detoxification and biotransformation in relation to lung cancer // *Lung Cancer*. 2007. V. 57. Issue 1. N 1. P. 1–25.
- Haddous M., Siest G., Herbeth B. *et al.* Glutathione S-transferases genetic polymorphisms and human diseases: overview of epidemiological studies // *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 2004. V. 62. N 1. P. 15–24.
- Joseph T., Kusumakumary P., Chacko P. *et al.* Genetic polymorphism of *CYP1A1*, *CYP2D6*, *GSTM1* and *GSTT1* and susceptibility to acute lymphoblastic leukaemia in Indian children // *Pediatr. Blood Cancer*. 2004. V. 43. N 5. P. 560–567.
- Karafet T.M., Osipova L.P., Gubina M.A. *et al.* High levels of Y chromosome differentiation among Native Siberian populations and the genetic signature of a boreal hunter-gatherer way of life // *Hum. Biol.* 2002. V. 16. P. 702–722.
- Keen J.H., Jakoby W.V. Glutathione transferases catalysis of nucleophilic reactions of glutathione // *J. Biol. Chem.* 1978. V. 253. N 16. Issue 25. P. 5654–5657.
- Kempkes M., Golka K., Reich S. *et al.* Glutathione S-transferase *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes as potential risk factors for urothelial cancer of the bladder // *Arch. Toxicol.* 1996. V. 71. Issue 1/2. P. 123–126.
- Legrand-Andreoletti M., Stucker I., Marez D. *et al.* Cytochrome P450 *CYP2D6* gene polymorphism and lung cancer susceptibility in Caucasians // *Pharmacogenetics*. 1998. V. 8. N 1. P. 7–14.
- London S.J., Daly A.K., Leathart J.B. *et al.* Genetic polymorphism of *CYP2D6* and lung cancer risk in African-Americans and Caucasians in Los Angeles County // *Carcinogenesis*. 1997. V. 18. N 6. P. 1203–1214.
- Marandi T., Dahl M.-L., Rago L. *et al.* Debrisoquine and S-mephenytoin hydroxylation polymorphisms in a Russian population living in Estonia // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1997. V. 53. P. 257–260.
- McLellan R.A., Oscarson M., Alexandrie A.-K. *et al.* Characterization of a human glutathione S-Transferase  $\mu$  cluster containing a duplicated *GSTM1* Gene that causes ultrarapid enzyme activity // *Mol. Pharmacol.* 1997. V. 52. N 6. P. 958–965.
- Qin S., Shen L., Zhang A. *et al.* Systematic polymorphism analysis of the *CYP2D6* gene in four different geographical Han populations in mainland China // *Genomics*. 2008. V. 92. P. 152–158.
- Rowland P., Blaney F.E., Smyth M.G. *et al.* Crystal structure of human cytochrome P450 2D6 // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. N 11. P. 7614–7622.
- Ryu S.W., Kim Y.J., Kim E. Mutation analysis of *CYP2D6* locus in the Korean population: identification of rare poor metabolizer alleles at the nucleotide level // *Mol. Cells*. 1998. V. 8. N 6. P. 758–763.
- Sachse C., Brockmoller J., Bauer S., Roots I. Cytochrome P450 2D6 in a Caucasian population: Allele frequencies and phenotypic consequences // *Am. J. Hum. Genet.* 1997. V. 60. P. 284–295.
- Seidegard J., Pero R.W., Markowitz M.M. *et al.* Isoenzyme(s) of glutathione transferase (class Mu) as a marker for the susceptibility to lung cancer: a follow up study // *Carcinogenesis (London)*. 1990. V. 11. P. 33–36.
- Seidegard J., Vorachek W.R., Pero R.V., Pearson W.R. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilben oxide are due to a gene detection // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. P. 7293–7297.
- Setiawan V.W., Zhang Z.F., Yu G.P. *et al.* *GSTT1* and *GSTM1* null genotypes and the risk of gastric cancer: a case-control study in a Chinese population // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2000. V. 9. N 1. P. 73–80.
- Shaw G.L., Falk R.T., Frame J.N. *et al.* Genetic polymorphism of *CYP2D6* and lung cancer risk // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1998. V. 7. N 3. P. 215–219.
- Shi X., Zhou S., Wang Z., Zhou I. *CYP1A1* and *GSTM1* polymorphisms and lung cancer risk in Chinese populations: a meta-analysis // *Lung Cancer*. 2008. V. 59. N 2. P. 155–163.
- Silveira V., Canalle R., Scridili C.A. *et al.* Role of the *CYP2D6*, *EPHX1*, *MPO*, and *NQO1* genes in the susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in Brazilian children // *Environ. Mol. Mutagen.* 2010. V. 51. N 1. P. 48–56.
- Strange R.C., Matharoo B., Faulder G.C. *et al.* The human glutathione S-transferases: a case-control study of the incidence of the *GSTT1* 0 phenotype in patients with adenocarcinoma // *Carcinogenesis*. 1991. V. 12. P. 25–28.
- Sukernik R.I., Karaphet T.M., Osipova L.P. Distribution of blood groups, serum markers and red cell enzymes in two human populations from Northern Siberia // *Hum. Hered.* 1978. V. 28. N 5. P. 321–327.
- Tamer L., Calikoglu M., Ates N.A. *et al.* Glutathione-S-transferase gene polymorphisms (*GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*) as increased risk factors for asthma // *Respirology*. 2004. V. 9. P. 493–498.
- Tew M.B., Reveille J.D., Arnett F.C. *et al.* Glutathione S-transferase genotypes in systemic sclerosis and their association with clinical manifestations in early disease // *Genes and Immunity*. 2001. V. 2. P. 236–238.
- Timofeeva M., Jager B., Rosenberg A. *et al.* A multiplex real-time PCR method for detection of *GSTM1* and *GSTT1* copy number // *Clin. Biochem.* 2009. V. 42. P. 500–509.
- Webb G., Vaska V., Coggan M., Board P. Chromosomal localization of the gene for the human theta class

- glutathione transferase (*GSTT1*) // Genomics. 1996. V. 33. N 1. P. 121–123.
- Xu S., Wang Y., Roe B. *et al.* Characterisation of the human class Mu glutathion S-transferase gene cluster and the *GSTM1* deletion // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. N 6. P. 3517–3527.
- Yadav S.S., Ruwali M., Pant M.C. *et al.* Interaction of drug metabolizing cytochrome P450 2D6 poor metabolizers with cytochrome P450 2C9 and 2C19 genotypes modify the susceptibility to head and neck cancer and treatment response // Mutat. Res. Fundamental. and Mol. Mechanisms of Mutagenesis. 2010. V. 684. Issue 1/2. P. 49–55.
- Zanger U.M., Raimundo S., Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry // Naunin-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 2004. V. 369. P. 23–37.
- Zhong S., Wyllie A.H., Barnes D. *et al.* Relationship between the *GSTM1* genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer // Carcinogenesis. 1993. V. 14. P. 1821–1824.
- Zhou S.F. Polymorphism of human Cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I // Clin. Pharmacogenet. 2009. V. 48. N 11. P. 689–723.

## POLYMORPHISM OF GENES FOR XENOBIOTIC BIOTRANSFORMATION, *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6*, CANDIDATE MARKERS OF CANCER RISK, IN INDIGENOUS PEOPLES AND RUSSIANS IN NORTHERN SIBERIA

R.P. Korchagina<sup>1</sup>, L.P. Osipova<sup>1</sup>, N.A. Vavilova<sup>1</sup>, N.A. Ermolenko<sup>2</sup>,  
E.N. Voronina<sup>2</sup>, M.L. Filipenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: kruosana@mail.ru, ludos@bionet.nsc.ru, senk\_off@mail.ru;

<sup>2</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: kostrykina@gmail.com, voronina\_l@mail.ru, max@niboch.nsc.ru

### Summary

The *CYP2D6*, *GSTM1*, and *GSTT1* genes, controlling biotransformation of xenobiotics, are involved in tumor formation due to the presence of mutant variants able to slow down and arrest their expression. The rate of cancer disease morbidity in human populations, including indigenous people of Siberia, has been increasing since the middle of the 20th century. The problem of ethnical differences in tumor susceptibility remains relevant. The first study of polymorphisms of the *CYP2D6* (alleles *CYP2D6\*3* and *CYP2D6\*4*), *GSTM1*, and *GSTT1* (*GSTM1* 0/0 and *GSTT1* 0/0 genotypes) in practically healthy Samoyedic people (Selkups, Forest Nenets and Nganasans) and Russian residents of Siberia is reported. The results are compared with reported data on Mongoloid peoples of China. The study reveals a significant variability of *CYP2D6\*4* and *GSTM1* 0/0 frequencies in Northern populations. In contrast, the frequencies of *CYP2D6\*3* and *GSTT1* 0/0 variants do not differ significantly in the indigenous populations of Selkups, Forest Nenets, and Nganasans. The indigenous populations occupy an intermediate position between Siberian Russians and Chinese Mongoloids with respect to *CYP2D6\*4* allele frequencies. However, the frequencies of «null» genotypes *GSTM1* 0/0 and *GSTT1* 0/0 in indigenous people are significantly lower than in Siberian Russians or the Chinese group ( $p < 0, 05$ ). In general, the risk of tumors in indigenous Samoyedic peoples is expected to be lower than in Siberian Russians. An exception is the population of Forest Nenets, where an elevated frequency of the *GSTM1* 0/0 genotype has been detected. It may be determined by the peculiarity of their marriage structure and the elevated inbreeding coefficient. The results can be used in prediction of complication probability and response to pharmaceuticals metabolized by the *CYP2D6*, *GSTM1*, and *GSTT1* enzymes.

**Key words:** indigenous peoples of Northern Siberia, genes for xenobiotic biotransformation, real-time PCR, *CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4*, *GSTT1* 0/0, *GSTM1* 0/0.

## ПРЕДСКАЗАНИЕ АЛЛЕРГЕННОСТИ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНФОРМАЦИИ О КОНФОРМАЦИОННЫХ ПЕПТИДАХ

А.О. Брагин, П.С. Деменков, В.А. Иванисенко

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

В настоящее время аллергия является одной из наиболее часто встречаемых проблем со здоровьем в развитых странах. Предсказание аллергенности белков по их аминокислотным последовательностям обладает ограниченной точностью в связи с пространственной организацией поверхностных районов белка, несущих антигенные эпитопы. Предложен новый метод предсказания белков-аллергенов на основе анализа конформационных пептидов, моделирующих поверхность белка.

**Ключевые слова:** аллергены, конформационные пептиды, пространственная структура белка, предсказание аллергенности белков.

### Введение

Аллергия встречается более чем у 20 % населения развитых индустриальных стран (Casolaro *et al.*, 1996). Предсказание потенциальных аллергенов по аминокислотным последовательностям и пространственным структурам белков является важной задачей биоинформатики. Одним из первых *in silico*-методов предсказания аллергенов был предложен всемирной организацией здравоохранения (WHO) и продовольственной и сельскохозяйственной организацией (FAO) (FAO/WHO, 2003). Согласно этому методу, белок считается аллергеном, если его последовательность из 80 аминокислотных остатков имеет гомологию выше 35 % с одним из известных аллергенов, или участок анализируемого белка протяженностью как минимум 6 аминокислотных остатков идентичен участку аминокислотной последовательности известного аллергена.

Кроме метода, предложенного FAO/WHO, существует еще ряд методов анализа аллергенности белков с использованием информации по аминокислотной последовательности. Например, A. Zorzet разработал подход предсказания аллергенности с использованием алгоритма выравнивания анализируемой последователь-

ности с последовательностями аллергенов при помощи FASTA3 и последующей классификации при помощи метода k-ближайших соседей (kNN) (Zorzet *et al.*, 2002). Дальнейшее улучшение метода было достигнуто в работе D. Soeria-Atmadja, были предложены новые методы классификации, основанные на байесовском подходе (Bayesian linear Gaussian classifier, Bayesian quadratic Gaussian classifier) (Soeria-Atmadja *et al.*, 2004).

В дополнение к методу FAO/WHO было предложено использовать поиск мотивов в анализируемом белке, характерных для белков-аллергенов (Stadler M., Stadler B., 2003). Позже W. Kong с коллегами показали, что поиск множественных мотивов в анализируемом белке увеличивает точность предсказания аллергенности (Kong *et al.*, 2007).

Для предсказания аллергенности была создана база паттернов, характерных для белков-аллергенов, полученных с использованием методов вейвлетовых преобразований и скрытых марковских моделей (Li *et al.*, 2004). В дополнение к предсказанию аллергенности, основанному на распознавании мотивов, этими же авторами было предложено использовать поиск сходства последовательностей по наборам белков-аллергенов с помощью BLAST.



В работе (Saha, Raghava, 2006a) использовались метод опорных векторов и поиск эпитопов IgE. Н. Muh с коллегами (Muh *et al.*, 2009) создали компьютерную программу AllerHunter, которая для предсказания аллергенности использует выравнивание анализируемой последовательности с известными последовательностями белков-аллергенов совместно с методом опорных векторов.

Как известно, медиаторы воспаления выделяются, когда IgE, расположенные на поверхности тучных клеток или базофилов, контактируют с аллергеном (Sutton *et al.*, 1993). Участки поверхности антигена (эпитопы), с которыми взаимодействует IgE, могут быть как линейные, так и конформационные (Schramm *et al.*, 2001; Takagi *et al.*, 2005). Линейные эпитопы представляют собой непрерывный участок в аминокислотной последовательности, в то время как конформационные эпитопы формируются аминокислотными остатками, распределенными в разных местах последовательности. При этом конформационные эпитопы, так же как и линейные, образуют компактные области на поверхности белка, с которыми могут взаимодействовать антитела.

Большинство описанных выше методов явно или неявно используют информацию о линейных антигенных эпитопах. Например, такие эпитопы могут входить в состав мотивов или консервативных участков аминокислотных последовательностей белков, используемых при предсказании аллергенности. Однако конформационные эпитопы учесть при анализе первичной структуры значительно сложнее в силу того, что они могут быть распределены вдоль протяженных участков последовательности. Для их анализа требуется использование данных о пространственной структуре белков.

В настоящее время предложено несколько методов предсказания конформационных эпитопов при наличии известной пространственной структуры антигена (Kulkarni-Kale *et al.*, 2005; Ponomarenko *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2009). Необходимость наличия пространственной структуры белков является серьезным ограничением для широкого использования этих методов. Для многих белков пространственная структура не известна и не может быть предсказана по гомологии, в част-

ности для мембранных белков. Однако задача предсказания конформационных эпитопов по данным только первичной структуры белка остается пока нерешенной.

Один из возможных путей решения проблемы учета информации о конформационных эпитопах в методах предсказания аллергенности белков только по их первичной структуре может состоять в выявлении линейных участков в последовательности, способных имитировать конформационные эпитопы различных белков.

Такого рода мимикрия конформационных эпитопов линейными пептидами была показана при использовании фагового дисплея (Smith, 1985). Было обнаружено, что многие моноклональные антитела, связывающиеся с конформационными эпитопами антигена, также обладают способностью связываться с искусственными линейными пептидами. Оказалось, что аминокислотный состав таких линейных пептидов и соответствующих им конформационных эпитопов в значительной степени совпадал. Кроме того, последовательности аминокислот линейных пептидов представляли собой последовательные цепочки сближенных в третичной структуре белка аминокислот конформационных эпитопов. Такие цепочки аминокислот, сближенных в третичной структуре, но удаленных друг от друга в первичной структуре белка, можно назвать конформационными пептидами по аналогии с конформационными эпитопами. Ранее нами был разработан подход к предсказанию конформационных эпитопов в белках на основе поиска сходства между конформационными пептидами и пептидами, полученными методом фагового дисплея, обладающими способностью специфично связываться с моноклональными антителами. Данный подход был применен нами для идентификации конформационных эпитопов в белках ряда вирусов (Локтев и др., 2002; Туманова и др., 2002).

В настоящей работе нам было интересно выяснить, может ли информация о сходстве между аминокислотными последовательностями анализируемого набора белков и конформационными пептидами, представленными на поверхности различных белков-аллергенов, увеличить точность предсказания аллергенности белков этого анализируемого набора.

Полученные результаты показали различимое увеличение точности предсказания аллергенности по сравнению с методом, использующим только сходство фрагментов последовательностей между известными белками-аллергенами и анализируемыми белками.

Можно предположить, что наличие совпадений между конформационными пептидами у разных аллергенов может свидетельствовать о том, что данные конформационные пептиды являются частью потенциальных конформационных эпитопов, существенных для проявления аллергенных свойств белков. Предложенный подход может быть использован для увеличения точности методов предсказания аллергенности белков, а также создания новых методов предсказания потенциальных конформационных эпитопов.

#### **Метод предсказания аллергенности белков**

Для предсказания аллергенности белков использовался подход, основанный на расчете меры сходства между анализируемым белком и известными белками-аллергенами (обучающая выборка). Сходство между белками рассчитывалось двумя способами. В первом случае сравнение производилось только на основе линейных фрагментов последовательностей белков, во втором случае для проверки гипотезы о том, что информация о конформационных пептидах, представленных на поверхности известных белков-аллергенов, может увеличить точность предсказания аллергенности; дополнительно к линейным фрагментам рассматривались конформационные пептиды.

**Расчет линейных и конформационных пептидов.** Линейные пептиды рассчитывались путем сдвига подвижной рамки длиной 8 аминокислотных остатков вдоль последовательности белка. Такая длина часто используется в методах предсказания аллергенности (Saha, Raghava, 2006b; Silvanovich *et al.*, 2006; Herman *et al.*, 2009).

Конформационные пептиды рассчитывались в пространственных структурах белков-аллергенов по следующим правилам:

1) два аминокислотных остатка считались связанными в конформационном пептиде, если

расстояние между их C- $\alpha$ -атомами в пространственной структуре белка было не более 5 Å;

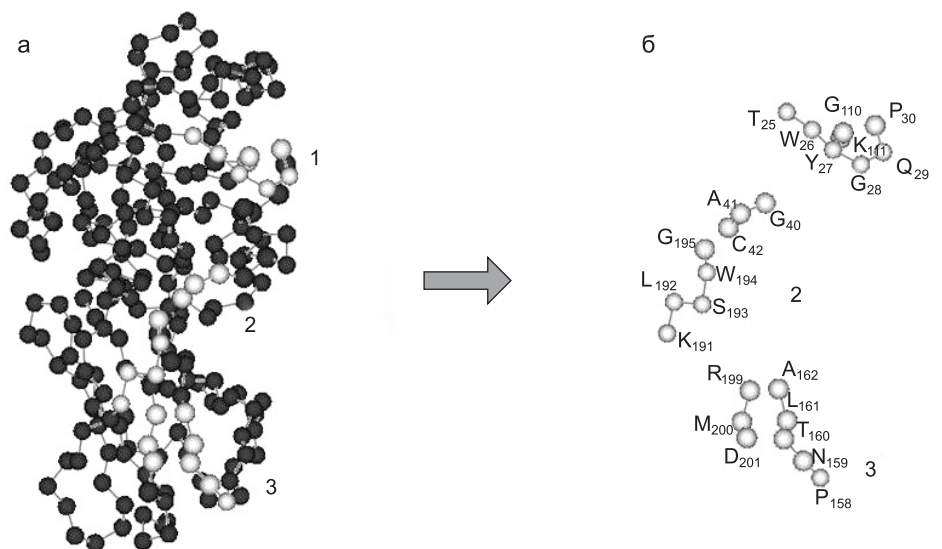
2) требовалось, чтобы аминокислотные остатки, формирующие конформационный пептид, располагались на поверхности белка. Для этого рассматривались только те конформационные пептиды, для которых усредненная доступность для растворителя была не менее 50 % от максимальной доступности аминокислот для растворителя;

3) длина конформационных пептидов так же, как и в случае с линейными пептидами, задавалась равной 8 аминокислотным остаткам.

Пример конформационных пептидов, рассчитанных для белка-аллергена Zea m 1, изображен на рис. 1.

**Расчет сходства между анализируемым белком и белком-аллергеном.** Для расчета сходства между анализируемыми белками и белками-аллергенами было создано два набора пептидов: LP, линейные пептиды и LCP, линейные и конформационные пептиды. Известные белки-аллергены были взяты из базы данных аллергенов SDAP (Ivanciuc *et al.*, 2003). Среди представленных в базе данных последовательностей белков-аллергенов с помощью программы PISCES (Wang, Dunbrack, 2003) были отобраны 586 белков, между которыми уровень сходства не превышал 90 %. Наборы LP и LCP строились на основе анализа первичных и пространственных структур данных белков соответственно. Набор LCP был расширением LP путем включения конформационных пептидов, рассчитанных по пространственным структурам белков. В базе данных PDB было обнаружено 16 экспериментально расшифрованных пространственных структур для разных белков-аллергенов. Пространственные структуры других белков извлекались из репозитория предсказанных пространственных структур (Kiefer *et al.*, 2009). Всего было собрано 345 пространственных структур белков-аллергенов.

Пептиды включались в соответствующие наборы при условии, если они встречались не менее чем в двух белках-аллергенах. Сравнение пептидов проводилось с учетом их сходства по физико-химическим свойствам аминокислот. Для этого их последовательности представлялись в вырожденном алфавите согласно



**Рис. 1.** Пространственная структура белка-аллергена *Zea m 1* (PDB ID 2HCZ) (а) с примерами найденных конформационных пептидов (б).

Темными кружками изображены аминокислоты, линии между ними обозначают пептидные связи. Светлыми кружками отмечены аминокислоты, входящие в состав конформационных пептидов 1, 2 и 3.

группировке аминокислот по близости физико-химических свойств (табл. 1).

Аминокислоты, принадлежащие к одной группе, заменялись в последовательностях пептидов на соответствующий идентификатор группы. Два пептида считались одинаковыми, если их последовательности полностью совпадали с учетом вырожденности алфавита.

Таким образом, в набор LP было помещено более 44 тыс. последовательностей линейных пептидов, а набор LCP содержал более 99 тыс. линейных и конформационных пептидов.

Далее для каждой аминокислотной последовательности из LP и LCP рассчитывалась ха-

рактеристика специфичности встречи пептидов в белках-аллергенах ( $SA$ ).  $SA$  рассчитывался как отношение частот встречаемости пептида в белках-аллергенах к частоте встречаемости пептида в белках неаллергенах

$$SA = \ln \left( \frac{Va}{Vh} \right), \quad (1)$$

где  $Va$  – частота встречаемости пептида в белках-аллергенах;  $Vh$  – частота встречаемости пептидов в белках неаллергенах.

В качестве набора белков неаллергенов нами были взяты белки человека. Известно, что белки человека редко являются аллергенами, так в базе данных UniProt приведено только 5 таких белков (Arweiler *et al.*, 2004). Для расчета показателя  $SA$  из SWISS-Prot случайным образом были выбраны около 3,5 тыс. белков человека. Сравнение пептидов из белков-аллергенов с последовательностями белков человека также проводилось с использованием вырожденного алфавита. Отрицательные значения  $SA$  приравнивались к нулю.

Предсказание аллергенности белка строилось на расчете значения решающей функции ( $DF$ )

$$DF = \frac{\sum_{i=1}^N SA_i}{L}, \quad (2)$$

**Таблица 1**

Группировка аминокислот по близости физико-химических свойств

| Группы аминокислот      | Аминокислоты        |
|-------------------------|---------------------|
| Гидрофобные             | V, M, I, L, F, Y, W |
| Положительно заряженные | R, K, H             |
| Отрицательно заряженные | E, D                |
| Полярные                | S, T, N, Q          |
| Малые аминокислоты      | A, G                |
| Цистеин                 | C                   |
| Пролин                  | P                   |

где  $SA_i$  – значения  $SA$  у пептидов из LP или LCP, совпадающих с пептидами анализируемого белка;  $L$  – длина анализируемого белка.

Для расчета значения решающей функции последовательность анализируемого белка разбивали на линейные пептиды длиной 8 аминокислотных остатков путем сдвига подвижной рамки. Полученные таким образом пептиды сравнивались с пептидами из LP или LCP. Сравнение с LP проводилось в случае предсказания аллергенности анализируемого белка только по аминокислотной последовательности. Набор LCP использовался для предсказания с учетом конформационных пептидов. Полученные при сравнении пептидов значения  $SA_i$  суммировались и нормировались на длину последовательности анализируемого белка. Все сравнения пептидов и в этом случае проводились с использованием вырожденного алфавита. Белок считался аллергеном, если значение его решающей функции  $DF$  было выше заданного порога. Значение порога для  $DF$  задавалось в зависимости от требований к ошибкам перепредсказания и недопредсказания.

**Оценка точности метода.** Для оценки точности метода предсказания был использован тестовый набор белков-аллергенов и неаллергенов из работы Н. Muh с соавт. (2009). Из тестового набора была удалена одна последовательность длиной короче 8 аминокислотных остатков. Таким образом, тестовая выборка состояла из 140 аллергенов и 497 неаллергенов. Кроме того, было проведено сравнение

белков обучающей выборки с белками тестовой выборки. При оценке точности из обучающей выборки был удален 41 белок, встречающийся в тестовом наборе. Таким образом, после их удаления обучающая выборка аллергенов составила 545 белков.

Для оценки точности метода использовались ошибки недопредсказания и перепредсказания.

$$E1 = \frac{FN}{(TP + FN)}, \quad (3)$$

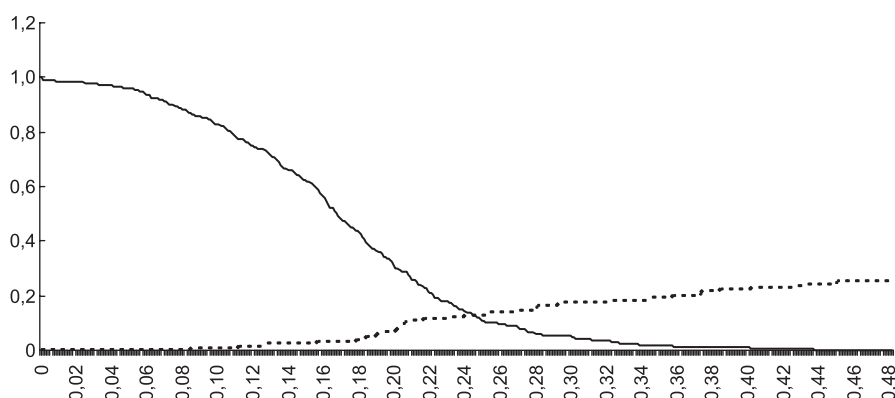
$$E2 = \frac{FP}{(TN + FP)}, \quad (4)$$

где  $TP$  – аллергены, предсказанные как аллергены;  $FN$  – аллергены, предсказанные как неаллергены;  $TN$  – неаллергены, предсказанные как неаллергены;  $FP$  – неаллергены, предсказанные как аллергены;  $E1$  – ошибка недопредсказания;  $E2$  – ошибка перепредсказания.

## Результаты и обсуждение

Зависимость ошибок недопредсказания и перепредсказания метода LCP, использующего конформационные пептиды, от значения порога для решающей функции  $DF$  изображена на рис. 2. Из рис. 2 можно видеть, что при пороге функции  $DF$ , равном 0,244, достигаются минимальные значения ошибок пере- и недопредсказания, соответствующие пересечению кривых, равные 0,128.

Нами также был построен аналогичный график для метода LP, основанного на анализе



**Рис. 2.** График зависимости ошибок недопредсказания (пунктирная линия) и перепредсказания (непрерывная линия) от значения порога для решающей функции  $DF$  метода LCP.

По оси ординат отложены значения ошибок, по оси абсцисс – значение порога для  $DF$ .

только линейных пептидов (график не показан). Пересечение кривых для ошибок пере- и недопредсказания наблюдалось при пороге, равном 0,191, и соответствовало ошибкам, равным 0,15. Таким образом, метод, использующий конформационные пептиды, показал более высокую точность, чем метод, основанный только на линейных пептидах, что указывает на эффективность использования информации о трехмерной структуре белков в методах предсказания аллергенности.

Для сравнения разработанного нами метода с существующими методами предсказания аллергенности белков была зафиксирована ошибка перепредсказания, равная 0,068 (табл. 2). Такое значение ошибки перепредсказания приводится авторами хорошо известной программы AllerHunter (Muh *et al.*, 2009).

При заданном значении ошибки перепредсказания ошибка недопредсказания метода LCP была ниже примерно на 2 % по сравнению с методом AllerHunter (табл. 2). Точность метода линейных пептидов LP оказалась наиболее низкой среди рассматриваемых методов.

Таким образом, предложенный нами подход, рассматривающий конформационные пептиды, позволяет улучшить точность методов предсказания аллергенности белков, основанных на анализе только аминокислотных последовательностей. Можно ожидать, что использование данных о конформационных пептидах может быть применено для улучшения точности других существ-

ующих методов предсказания аллергенности, поскольку такого рода информация ранее не использовалась для решения этой задачи. Важно заметить, что для расчета конформационных пептидов требуется наличие пространственной структуры только белков известных аллергенов, а не анализируемых белков. Это позволяет применять разработанный метод для предсказания аллергенности при массовом анализе белков, в том числе и целых протеомов.

## Благодарности

Работа частично была поддержана грантами EU-FP7 PATHOSYS project № 260429, Министерством науки и образования РФ 14.740.11.0001, междисциплинарными интеграционными проектами СО РАН № 119 и 26, программой РАН № 19, Министерством образования и науки Российской Федерации, ГК 07.514.11.4003.

## Литература

- Локтев А.В., Кувшинов В.Н., Меламед Н.В. и др. Локализация антигенной детерминанты белка Е вируса клещевого энцефалита, узнаваемой антигем-агглютинирующими моноклональными антителами, с помощью пептидной фаговой библиотеки // *Вопр. вирусологии*. 2002. Т. 47. № 2. С. 31–34.
- Туманова О.Ю., Кувшинов В.Н., Ильичев А.А. и др. Локализация конформационного эпитопа гликопротеина gp120 ВИЧ-1, узнаваемого вируснейтрализующими моноклональными антителами 2G12 // *Молекуляр. биология*. 2002. Т. 36. № 4. С. 657–663.
- Apweiler R., Bairoch A., Wu C.H. *et al.* UniProt: the Universal Protein knowledgebase // *Nucl. Acids Res.* 2004. 32 (Database issue). D115–119.
- Casolaro V., Georas S.N., Song Z., Ono S.J. Biology and genetics of atopic disease // *Curr. Opin. Immunol.* 1996. V. 8. N 6. P. 796–803.
- FAO/WHO Codex Principles and Guidelines on Foods Derived from Biotechnology. 2003.
- Herman R.A., Song P., Thirumalaiswamysekhar A. Value of eight-amino-acid matches in predicting the allergenicity status of proteins: an empirical bioinformatic investigation // *Clin. Mol. Allergy*. 2009. V. 7. P. 9.
- Ivancic O., Schein C.H., Braun W. SDAP: database and computational tools for allergenic proteins // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. N 1. P. 359–362.

**Таблица 2**

Значения ошибок недо- и перепредсказания у различных методов поиска аллергенных белков

| Название метода                    | Значение ошибки недопредсказания, E1 | Значение ошибки перепредсказания, E2 |
|------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Метод конформационных пептидов LCP | 0,143                                | 0,068                                |
| AllerHunter*                       | 0,163                                | 0,068                                |
| Метод линейных пептидов LP         | 0,171                                | 0,068                                |

\* Метод AllerHunter (Muh *et al.*, 2009).



- Kiefer F., Arnold K., Künzli M. *et al.* The SWISS-MODEL Repository and associated resources // *Nucl. Acids Res.* 2009. 37 (Database issue). D387–392.
- Kong W., Tan T.S., Tham L., Choo K.W. Improved prediction of allergenicity by combination of multiple sequence motifs // *In Silico Biol.* 2007. V. 7. N 1. P. 77–86.
- Kulkarni-Kale U., Bhosle S., Kolaskar A.S. CEP: a conformational epitope prediction server // *Nucl. Acids Res.* 2005. 33 (Web Server issue). W168–171.
- Li K.B., Issac P., Krishnan A. Predicting allergenic proteins using wavelet transform // *Bioinformatics.* 2004. V. 20. N 16. P. 2572–2578.
- Liang S., Zheng D., Zhang C., Zacharias M. Prediction of antigenic epitopes on protein surfaces by consensus scoring // *BMC Bioinformatics.* 2009. V. 10. P. 302.
- Muh H.C., Tong J.C., Tammi M.T. AllerHunter: a SVM-pairwise system for assessment of allergenicity and allergic cross-reactivity in proteins // *PLoS One.* 2009. V. 4. N 6. e5861.
- Ponomarenko J., Bui H.H., Li W. *et al.* ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes // *BMC Bioinformatics.* 2008. V. 9. P. 514.
- Saha S., Raghava G.P. AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes // *Nucl. Acids Res.* 2006a. 34 (Web Server issue). W202–209.
- Saha S., Raghava G.P. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network // *Proteins.* 2006b. V. 65. N 1. P. 40–48.
- Schramm G., Bufe A., Petersen A. *et al.* Discontinuous IgE-binding epitopes contain multiple continuous epitope regions: results of an epitope mapping on recombinant Hol l 5, a major allergen from velvet grass pollen // *Clin. Exp. Allergy.* 2001. V. 31. N 2. P. 331–341.
- Silvanovich A., Nemeth M.A., Song P. *et al.* The value of short amino acid sequence matches for prediction of protein allergenicity // *Toxicol. Sci.* 2006. V. 90. N 1. P. 252–258.
- Smith G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface // *Science.* 1985. V. 228. N 4705. P. 1315–1317.
- Soeria-Atmadja D., Zorzet A., Gustafsson M.G., Hammerling U. Statistical evaluation of local alignment features predicting allergenicity using supervised classification algorithms // *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2004. V. 133. N 2. P. 101–112.
- Stadler M.B., Stadler B.M. Allergenicity prediction by protein sequence // *FASEB J.* 2003. V. 17. N 9. P. 1141–1143.
- Sun J., Wu D., Xu T. *et al.* SEPPA: a computational server for spatial epitope prediction of protein antigens // *Nucl. Acids Res.* 2009. 37 (Web Server issue). W612–6.
- Sutton B.J., Gould H.J. The human IgE network // *Nature.* 1993. V. 366. N 6454. P. 421–428.
- Takagi K., Teshima R., Sawada J. Determination of human linear IgE epitopes of Japanese cedar allergen Cry j 1 // *Biol. Pharm. Bull.* 2005. V. 28. N 8. P. 1496–1499.
- Wang G., Dunbrack R.L. Jr. PISCES: a protein sequence culling server // *Bioinformatics.* 2003. V. 19. N 12. P. 1589–1591.
- Zorzet A., Gustafsson M., Hammerling U. Prediction of food protein allergenicity: a bioinformatic learning systems approach // *In Silico Biol.* 2002. V. 2. N 4. P. 525–534.

## PROTEIN ALLERGENICITY PREDICTION ON THE BASE OF DISCONTINUOUS PEPTIDES

A.O. Bragin, P.S. Demenkov, V.A. Ivanisenko

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

### Summary

Nowadays, allergy is one of the most common health problems for developed countries. The accuracy of prediction of protein allergenicity from their amino acid sequences is limited due to the spatial organization of protein patches containing allergenic epitopes. A new method of prediction of allergenic proteins by representation of their surfaces with a set of discontinuous peptides was proposed. It has been shown that the use of information on conformational peptides of a protein improves the accuracy of the method for allergenicity prediction.

**Key words:** allergen, discontinuous peptide, protein 3D structure, protein allergenicity prediction.

# ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНА ЦИТОХРОМА *b* МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В ИСКУССТВЕННО СОЗДАННОЙ И ДОНОРНОЙ ПОПУЛЯЦИЯХ КЕТЫ (*ONCORHYNCHUS KETA* WALBAUM) РЕК КУЛЬКУТЫ И ЯМА (СЕВЕРНОЕ ПОБЕРЕЖЬЕ ОХОТСКОГО МОРЯ)

Л.Т. Бачевская, В.В. Переверзева

Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, Магадан, Россия,  
e-mail: gekki54@mail.ru

Определена нуклеотидная последовательность фрагмента гена *cytb* мтДНК у кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum) из рек северного побережья Охотского моря Яма (донор) и Кулькуты (искусственно созданная популяция). Отмечен полиморфизм изученного молекулярного маркера. Показаны особенности генетической структуры кеты из исследованных локальностей. Значения нуклеотидного и гаплотипического разнообразия искусственно созданной популяции оказались более высокими по сравнению с показателями, характеризующими популяцию-донор. Вероятно, это связано с особенностями формирования генетической структуры кулькутинской популяции и определяется эффектом основателя. Кроме того, причиной отмеченного факта может быть стрейнинг, который повлиял на количественный и качественный составы гаплотипов искусственно созданной популяции кеты. По-видимому, гаплотипы, привнесенные в результате межпопуляционного обмена, успешно поддерживаются за счет искусственного воспроизводства, что привело к некоторому изменению генетического облика кулькутинской локальности относительно донорной популяции.

**Ключевые слова:** кета (*Oncorhynchus keta*), молекулярные маркеры, ген цитохрома *b*, мтДНК, популяционная генетика.

## Введение

Материковое побережье Охотского моря является одним из основных районов воспроизводства тихоокеанских лососей, среди которых важное место занимает ценный промысловый вид – кета *Oncorhynchus keta* (Walbaum). Пополнение запасов этого вида в указанном регионе происходит с помощью естественного нереста и искусственного воспроизводства. Кроме этого, наряду с традиционной биотехникой искусственного разведения тихоокеанских лососей проводятся работы по созданию популяций, ранее не обитавших в тех или иных водоемах. Подобные популяции отличаются от акклиматизированных в первую очередь тем, что при заходе в реку в период нерестовой миграции они полностью изымаются из биотопа,

и размножение происходит только в условиях рыбоводного завода. Такой эксперимент имеет успех в Магаданской области. Для формирования популяции искусственного происхождения использовали половые продукты поздней нерестовой кеты р. Яма (материковое побережье Охотского моря) (1992–1995 гг.). Оплодотворенную икру инкубировали в заводских условиях. Полученную молодь перевозили в р. Кулькуты (ранее не заселенную этим видом) и содержали в выростных садках. Это способствовало формированию хоминга и обеспечивало ее возврат в указанный водоем. Заходящие на нерест в р. Кулькуты производители полностью вылавливались, а полученные от них половые продукты использовали в рыбоводных целях. В результате этого была сформирована «промыслово-маточная» кулькутинская популяция, ежегодные

подходы которой составляют от 600 до 7000 шт. (Сафроненков и др., 2005). При такой биотехнике популяция, созданная искусственным способом, не нарушает исторически сложившегося биотопа водоема, что весьма важно. Кроме того, эксплуатация искусственно созданных популяций дает возможность избежать проблем, возникающих в смешанных нерестовых стадах, состоящих из рыб естественного и искусственного происхождения. Тем не менее для них характерны негативные изменения, которые чаще всего связаны со снижением их генетического разнообразия (Омельченко и др., 2002). В процессе исследования структуры кулькутинской кеты использовали методы популяционной генетики, направленные на изучение аллозимной изменчивости и полиморфизма тотальной ДНК (метод RAPD). Отмечена тенденция к снижению ее генетического разнообразия, которая зафиксирована на фоне возрастающей численности сформированного стада (Бачевская и др., 2006; Бачевская, Лапинский, 2010). Для расширения информации о генетической структуре и процессах, протекающих в популяции кеты р. Кулькуты, использован наиболее современный метод определения нуклеотидных последовательностей генома, дающий исчерпывающую информацию о его строении. Был исследован фрагмент гена *cytb* мтДНК. Полиморфизм гена *cytb* мтДНК представляет интерес при различных внутри- и межпопуляционных исследованиях (Радченко и др., 1997; Шпигальская и др., 2009; Бачевская, Переверзева, 2010). На основе анализа полученных данных проведена оценка генетического разнообразия и степени дивергенции искусственно созданной кулькутинской и донорной ямской популяций кеты.

### Материалы и методы

В основу работы положены материалы, собранные в 2008 г. Исследовано 70 особей кулькутинской и 87 – ямской кеты. Выделение и очистка ДНК проводились по модифицированному методу Флеминга и Кука (Fleming, Cook, 2002). Участок гена *cytb* митохондриального генома амплифицировался с использованием праймеров Lk14735 (5'- AAAAACCACCGT TGT TAT TCAACTA-3') и H15149ad (5'- GCICCTCARAATGAYATTTGTCCT-3').

Полимеразная цепная реакция проводилась по методике, описанной Расселлом (Russell *et al.*, 2000). Определение нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов мтДНК осуществляли по стандартной методике с применением наборов для циклического секвенирования ДНК Big Dye Terminator (Applied Biosystems, V. 3.1) и генетического анализатора ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США). Все нуклеотидные последовательности депонированы в GenBank. Их номера представлены в табл. 1. Статистическая обработка полученных данных (в том числе расчет нуклеотидного разнообразия –  $\pi$ ) проводилась с использованием пакета программ MEGA-4 (Tamura *et al.*, 2007). Оценивали генетическое (гаплотипическое) разнообразие  $H$  (Nei, 1973). Статистическую достоверность различий частоты встречаемости выявленных гаплотипов рассчитывали с помощью  $t$ -критерия Стьюдента (Животовский, 1991). В процессе работ применяли программу ARLEQUIN 3.0. (Excoffier *et al.*, 2005). Оценка соответствия характера нуклеотидных замен гипотезе нейтральности в обследованных популяциях для использованного маркера проводилась с помощью теста D. Тадзимы (Tajima, 1989). Медианную сеть, связывающую наблюдаемые гаплотипы, строили с помощью Network 4.5.1.0 (Bandelt *et al.*, 1999).

**Таблица 1**

Частота распределения гаплотипов фрагмента гена *cytb* мтДНК в популяциях кеты рек Кулькуты и Яма (материковое побережье Охотского моря)

| Гаплотипы | № GenBank | Локальность        |        |
|-----------|-----------|--------------------|--------|
|           |           | р. Кулькиуты       | р. Яма |
|           |           | Частота гаплотипов |        |
| B1        | FJ887836  | 0,6143             | 0,7356 |
| B3        | FJ887843  | 0,1286             | 0,0690 |
| B5        | FJ887839  | 0,0143             | 0,0000 |
| B7        | FJ887847  | 0,1571             | 0,1379 |
| B8        | FJ887846  | 0,0571             | 0,0230 |
| B10       | GQ131428  | 0,0143             | 0,0115 |
| B11       | GQ131426  | 0,0000             | 0,0115 |
| B17       | GU251076  | 0,0143             | 0,0000 |
| B22       | JF791691  | 0,0000             | 0,0115 |



### Результаты и обсуждение

Определена нуклеотидная последовательность фрагмента гена *cytb* мтДНК у кеты из рек Яма и Кулькуты. Изученный фрагмент содержит 395 пар нуклеотидов (п.н.) и соответствует положению 15396–15790 п.н. полного генома мтДНК кеты (GenBank, EF105341); 15396 п.н. соответствует 19 п.н. гена *cytb* кеты (Chang *et al.*, 2007). Позиции варьируемых нуклеотидов приведены на рис. 1 в сравнении с нуклеотидной последовательностью гаплотипа B1 (GenBank FJ887836). При анализе нуклеотидных последовательностей обнаружены замены только в третьем положении кодона гена *cytb* (рис. 1).

|     |           |
|-----|-----------|
|     | 2233333   |
|     | 87702389  |
|     | 40364640  |
| B1  | TATGTA GA |
| B3  | ...C...   |
| B5  | .G.....   |
| B7  | ...A....  |
| B8  | ...A.G..  |
| B10 | C.....    |
| B11 | .....A.   |
| B17 | ..C.....  |
| B22 | .....G    |

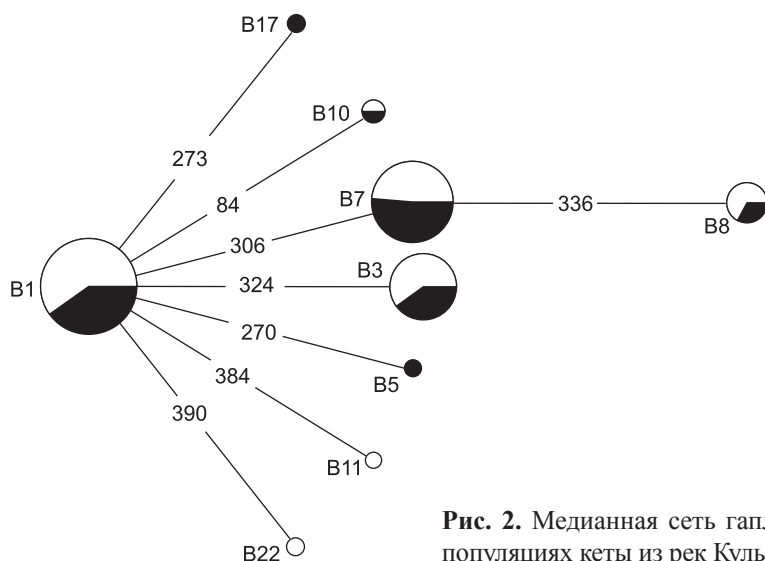
**Рис. 1.** Гаплотипы фрагмента гена *cytb* мтДНК популяций кеты из рек Яма и Кулькуты.

Такое проявление вполне закономерно. Известно, что третий нуклеотид большинства кодонов в транскрибируемых участках гена наиболее вариативен из-за вырожденности кода (Zardoya, Meyer, 1996).

В исследованных популяциях кеты отмечен полиморфизм гена *cytb* мтДНК. Обнаружено 9 гаплотипов, при этом из 9 вариантов лишь 5 были общими для обеих популяций (табл. 1). Отмечено характерное для морских видов рыб распределение гаплотипов, т. е. небольшое их число имели высокую частоту, другие варианты встречались редко или были уникальными (Avise, 1994). В данном случае всего два гаплотипа представлены в выборках с относительно высокой частотой. У кеты р. Яма выявлены гаплотипы B11 и B22, отсутствующие в кулькутинской выборке (табл. 1). Вероятно, этот факт связан с малочисленностью кулькутинской выборки

(70 шт.), в число которой не вошли носители указанных гаплотипов. Нельзя исключить также, что подобное проявление могло быть вызвано особенностями формирования кулькутинской популяции. Выше отмечено, что для ее создания использовались поздние (по срокам миграции) производители, т. е. в процессе формирования была задействована лишь часть генофонда ямской популяции-донора, которая имеет высокий уровень генетической гетерогенности, проявляющейся на протяжении всего срока нерестовой миграции (Макоедов, Бачевская, 1992). В то же время в искусственно созданной популяции кеты р. Кулькуты были выявлены уникальные варианты гаплотипов B5, B17, не обнаруженные в выборке производителей донорной популяции р. Яма. Ранее было показано, что вариант B5 встречался в выборке кеты из р. Ола, которая так же, как и р. Кулькуты, впадает в Ольский лиман. В свою очередь гаплотип B17 ранее был зарегистрирован в популяции кеты р. Армань (Тауйская губа Охотского моря) (Бачевская, Переверзева, 2010). Известно, что кета из различных водоемов генетически отличается друг от друга вследствие высокого «хоминга» – инстинкта дома, позволяющего производителям кеты возвращаться на нерест в родной водоем. Тем не менее некоторое количество особей кеты все же заходит в соседние водоемы. Отклонение от строгого хоминга, т. е. возврат для размножения не к местам рождения, а в другие водоемы, называется «стреингом» (англ. strey – сбиться с пути, заблудиться). Стреинг не нарушает хоминг, а является важнейшим эволюционным приобретением видов, которое позволяет им осваивать новые места обитания (Алтухов и др., 1997). Вполне вероятно, что появление в кулькутинской выборке вариантов B5 и B17 определяется стреингом, который характерен для тихоокеанских лососей. У кеты он составляет 3,6–8 % (Медников и др., 1988; Варнавская, 2006). Величина стреинга, рассчитанная нами для кулькутинской кеты, сопоставима с приведенными выше значениями и составляет 2,8 %.

По принципу минимального числа нуклеотидных замен в исследованном фрагменте гена цитохрома *b* мтДНК построена медианная сеть, отображающая характер взаимоотношений выявленных вариантов в генофондах популяций кеты рек Яма и Кулькуты (рис. 2).



**Рис. 2.** Медианная сеть гаплотипов фрагмента гена *cytb* мтДНК в популяциях кеты из рек Кулькиты (черный цвет) и Яма (белый цвет).

Обнаруженные гаплотипы в выборках искусственно созданной и донорной популяций в основном происходят от варианта B1. Гаплотип B7 встречается с относительно высокой частотой в обеих популяциях (табл. 1). Последующая мутация в варианте B7 дала начало гаплотипу B8, который отличается от наиболее распространенного гаплотипа B1 двумя транзициями в третьей позиции кодона. Его можно отнести к числу относительно «частых» вариантов исследуемого фрагмента гена *cytb* мтДНК. Он отмечен в обеих популяциях, причем в кулькутинской выборке встречается в два раза чаще, чем в ямской – донорной. Кроме того, обращает на себя внимание увеличение (в два раза) частоты носителей гаплотипа B3 у кулькутинских производителей. Достоверность различий определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента (Животовский, 1991). Значения частот данного гаплотипа в выборках кеты из обеих популяций статистически достоверно различаются ( $t = 3,89$ ;  $p < 0,001$ ). Наблюдаемое увеличение значений частот гаплотипа B3 в искусственно созданной

популяции, по-видимому, может быть связано с особенностями формирования ее генетической структуры и, вероятнее всего, определяется эффектом основателя. Нельзя исключить также, что наблюдаемое распределение частот имеет стохастический характер. Так как численность донорной популяции кеты значительно выше, чем искусственно созданной, то и стохастические процессы в кулькутинской популяции могут быть более ярко выражены.

Как и ожидалось, рассчитанная величина межпопуляционной изменчивости ( $F_{sc}$ ) исследованной кеты ничтожно мала – 0,02 %, а на долю внутривидовой генетической изменчивости ( $F_{ct}$ ) приходится 99,98 %. Несколько неожиданными оказались данные, характеризующие уровень генетического разнообразия исследованных популяций. Так как при формировании кулькутинского стада использовалась лишь часть генофонда кеты р. Яма, то можно было предполагать возможность снижения генетического разнообразия в искусственно созданном кулькутинском стаде. Тем не менее

**Таблица 2**

Нуклеотидное и гаплотипическое разнообразие исследованных популяций кеты

| Локальность | Количество | $\pi$   | $P_i$   | H       | S | D        |
|-------------|------------|---------|---------|---------|---|----------|
| Яма         | 87         | 0,00131 | 0,51751 | 0,43923 | 6 | -1,30015 |
| Кулькиты    | 70         | 0,00194 | 0,76398 | 0,58587 | 6 | -0,92271 |

Примечание.  $\pi$  – нуклеотидное разнообразие; H – гаплотипическое разнообразие; S – число вариабельных сайтов;  $P_i$  – среднее число парных различий между гаплотипами; D – коэффициент теста Tajima.

значения нуклеотидного ( $\pi$ ) и гаплотипического ( $H$ ) разнообразия в этой популяции кеты более высокие по сравнению с выявленными показателями у кеты р. Яма (табл. 2). Кроме того, в популяции кулькутинской кеты среднее число парных различий между гаплотипами исследованного фрагмента мтДНК несколько больше, чем в популяции-доноре. По-видимому, даже незначительный межпопуляционный обмен (2,8 %) повлиял на количественный и качественный составы гаплотипов кулькутинской кеты. Вероятно, в результате стрейнга привнесенные в нее гаплотипы успешно поддерживаются за счет искусственного воспроизводства, что привело к некоторому изменению генетического облика кулькутинской популяции относительно донорной. В то же время проведенный тест Таджимы (Tajima, 1989) показал отсутствие отклонения от нейтрального равновесия в исследованных популяциях. Это свидетельствует о том, что для формирования кулькутинской популяции кеты было использовано достаточное количество особей (сопоставимое с эффективной численностью), и она не испытывала эффекта «горлышка бутылки». Подобное предположение вполне согласуется с результатами анализа ранее опубликованных данных (Сафроненков, 2006), которые показывают, что за десятилетний период эксперимента по формированию кулькутинской популяции было использовано значительное количество оплодотворенной икры (не менее 16 млн шт.). Опираясь на данные по средней плодовитости североохотоморской кеты (2630 шт.) (Черешнев и др., 2002) и учитывая среднее значение процента возврата кулькутинских производителей (0,77 %) (Сафроненков, 2006), не сложно подсчитать количество рыб, использованных с рыбоводной целью. В среднем ежегодно брали для закладки на инкубацию икру от 608 особей, что вполне достаточно для поддержания генетического разнообразия популяций кеты (Алтухов и др., 1997). Тем не менее подобные популяции требуют постоянного наблюдения и мониторинга их генетического разнообразия. Для более детального исследования необходимо расширение спектра информативных генетических маркеров.

Исследования частично финансировались грантом ДВО РАН (ГрА 09-III-06-219, 2009-2011).

## Литература

- Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т. Популяционная генетика лососевых рыб. М.: Наука, 1997. 288 с.
- Бачевская Л.Т., Лапинский А.Г. Генетические процессы в искусственно созданной популяции кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum) р. Кулькуты (северное побережье Охотского моря) // Вопросы рыболовства. 2010. Т. 11. № 2(42). С. 241–250.
- Бачевская Л.Т., Лапинский А.Г., Соловечук Л.Л. Биохимический и RAPD – полиморфизмы у донорной и интродуцированной популяций кеты из рек Яма и Кулькуты (северное побережье Охотского моря) // Вестник Северо-Восточного научного центра ДВО РАН. 2006. № 1 (5). С. 61–66.
- Бачевская Л.Т., Переверзева В.В. Внутривидовой полиморфизм фрагмента гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum) из рек восточной Камчатки и северного побережья Охотского моря // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 3. С. 537–545.
- Варнаевская Н.В. Генетическая дифференциация популяций тихоокеанских лососей. КамчатНИРО, 2006. 488 с.
- Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 269 с.
- Макоедов А.Н., Бачевская Л.Т. Генетические и фенетические особенности кеты разного времени нерестового хода // Биология моря. 1992. № 3/4. С. 62–68.
- Медников Б.М., Волобуев В.В., Горшков В.А. и др. Структура нерестовой кеты *Oncorhynchus keta* бассейна реки Тауй (по данным молекулярной гибридизации) // Вопросы ихтиологии. 1988. Т. 28. Вып. 5. С. 724–730.
- Омельченко В.Т., Салменкова Е.А., Рогатных А.Ю. Опыт оценки генетической изменчивости индустриальной популяции кеты, созданной в Магаданской области // Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей: Матер. науч. конф. П.-Камчатский, 2002. С. 291–294.
- Радченко О.А., Малярчук Б.А., Соловечук Л.Л. Сравнительный рестрикционный анализ сегмента гена цитохрома *b* у кижуча, кеты и горбуши // Генетика. 1997. Т. 33. № 4. С. 471–474.
- Сафроненков Б.П., Хованская Л.Л., Волобуев В.В. Состояние лососеводства в Северном Охотоморье и пути его развития на ближайшую перспективу // Рыбное хозяйство. 2005. № 1. С. 43–47.
- Сафроненков Б.П. Современное состояние и перспективы искусственного разведения тихоокеанских лососей в Магаданской области // Современные проблемы лососевых рыбоводных заводов

- Дальнего Востока. Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей: Матер. науч. конф. П.-Камчатский, 2006. С. 127–138.
- Черешнев И.А., Волобуев В.В., Шестаков А.В., Фролов С.В. Лососевидные рыбы Северо-Востока России. Владивосток: Дальнаука, 2002. 490 с.
- Шпигальская Н.Ю., Брыков В.А., Кухлевский А.Д. Полиморфизм мтДНК горбуши Камчатки и острова Сахалин // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана: Сб. науч. тр. Камчат. НИИ рыб. хоз. и океанографии. П.-Камчатский: КамчатНИРО, 2009. Вып. 13. С. 74–87.
- Avise J.C. Molecular Markers // Natural History and Evolution. N.Y.; London: Chapman and Hall, 1994. 511 p.
- Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. P. 37–48.
- Chang H.-W., Tan K.-Y., Chou Y.C. EF105341 // GenBank. 2007.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis // Evol. Bioinformatics Online. 2005. V. 1. P. 47–50.
- Fleming M.A., Cook J.A. Phylogeography of endemic ermine (*Mustela erminea*) in southeast Alaska // Mol. Ecol. 2002. N 11. P. 795–807.
- Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. N 12. P. 3321–3323.
- Russell V.J., Hold G.L., Pryde S.E. *et al.* Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between Salmon species // J. Agric. Food Chem. 2000. N 48. P. 2184–2188.
- 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.
- Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism // Gen. Soc. Am. 1989. P. 585–595.
- Zardoya R., Meyer A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates // Mol. Biol. Evol. 1996. V. 13. N 7. P. 933–942.

## VARIABILITY OF MITOCHONDRIAL DNA CYTOCHROME *b* GENE IN ARTIFICIAL AND DONOR POPULATIONS OF CHUM SALMON (*ONCORHYNCHUS KETA* WALBAUM) FROM THE RIVERS KULKUTA AND YAMA (THE NORTHERN COAST OF THE SEA OF OKHOTSK)

L.T. Bachevskaya, V.V. Pereverzeva

Institute of Biological Problems of the North, FEB RAS, Magadan, Russia,  
e-mail: gekki54@mail.ru

### Summary

Nucleotide sequence of mt DNA cyt *b* gene fragment was determined at chum salmon from the rivers Yama (donor) and Kulkuta (artificial population). Polymorphism of the studied molecular marker was noted. Peculiarities of genetic structure of chum salmon from the studied localities were shown. Values of nucleotide and haplotype diversity of artificial population appeared to be higher comparing to those, of donor population. This probably is connected with formation peculiarities of genetic structure of the Kulkuta population and determined by effect of founder. This fact can be caused by straying (interpopulation exchange) that influenced the quantitative and qualitative haplotype composition of the artificial Kulkuta population of chum salmon. Haplotypes, added as a result of interpopulation exchange, probably, are successfully supported due to artificial reproduction that led to some change of genetic aspect of the Kulkuta locality, comparing to the donor population.

**Key words:** chum salmon (*Oncorhynchus keta*), molecular marker, cytochrome *b* gene, mtDNA, population genetics.

## ОСНОВНЫЕ ИТОГИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА СЕВЕРООХОТОМОРСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ ГОРБУШИ (*ONCORHYNCHUS GORBUSCHA*)

С.П. Пустовойт

Учреждение Российской академии наук Институт биологических проблем Севера ДВО РАН,  
Магадан, Россия, e-mail: pustov@ibpn.ru

Рассмотрены многолетние данные о распределении частот генов в популяциях горбуши Тауйской губы за период с 1997 по 2010 гг. в связи с произошедшей на рубеже веков сменой доминантности поколений. Генетическая структура популяций горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* стабильна в сохранении характерных частот генов вне зависимости от численности популяций.

**Ключевые слова:** горбуша, *Oncorhynchus gorbuscha*, генетический мониторинг, флуктуирующая численность популяций.

Горбуша (*Oncorhynchus gorbuscha*) – единственный вид моноциклического рода тихоокеанских лососей (*Oncorhynchus*, *Salmoniformes*), нерестующий на втором году жизни. Благодаря этой особенности в одной реке размножаются особи четных и нечетных генераций, между которыми существует жесткая репродуктивная изоляция. Численность четных и нечетных поколений в одной реке может различаться в десятки раз, обычно одно поколение многочисленное (доминантное), другое малочисленное. По неизвестным пока причинам иногда происходят смены доминантных поколений. Например, в крупнейшей по численности популяции горбуши, размножающейся в реках Тауйской губы, р. Ола с начала 1960-х годов до 1983 г. доминировало поколение нечетных лет. С 1984 по 1998 гг. более многочисленными стало поколение четных лет, а на рубеже прошедшего и нынешнего веков опять доминантным стало нечетное поколение (Марченко и др., 2004). При этом численность нечетных поколений горбуши, нерестующей в Гижигинской губе, осталась более высокой, чем четных поколений (Голованов, Марченко, 2001). Немаловажно отметить исключительно высокую хозяйственную значимость данного вида, поскольку в многочисленные годы горбуша определяет

успешность лососевой путины на всем Дальнем Востоке России (Черешнев и др., 2002).

За 30 лет генетического мониторинга были проанализированы не только основные параметры популяционно-генетической структуры горбуши, размножающейся в реках Тауйской губы (Макоедов и др., 1993; Пустовойт, 1999, 2010б; Гордеева и др., 2003; Голованов и др., 2009). Кроме того, оценены межполовые различия генетических параметров (Агапова и др., 2007; Пустовойт, 2008). Показано, что генетические параметры темпоральных группировок популяции горбуши имеют заметные особенности у рыб разного пола. Размах и вектор таких различий зависят от аллозимного локуса, что не позволяет охарактеризовать однозначно такую связь фразой: генетическая изменчивость (дифференциация) самцов всегда больше/меньше, чем у самок. В чем генетическая структура самок и самцов сходна, так это в их более низкой гетерозиготности в четном поколении по сравнению с нечетным. Генетические различия горбуши четных и нечетных лет оказались значимы и для межпопуляционных различий: статистически значимая гетерогенность выборок из рек Тауйской губы обнаружена только при анализе четных поколений (Голованов и др., 2009). Отмеченные более заметные меж-



популяционные отличия выборок четных лет обусловили их более высокую дифференциацию ( $G_{ST} = 1,39 \pm 0,41$ ), чем в выборках нечетных лет ( $G_{ST} = 0,740 \pm 0,09$ ). Для средней (по 5 локусам) гетерозиготности закономерность противоположная – нечетные поколения более гетерозиготны, что уже отмечено ранее. Средняя величина межпопуляционной генетической дифференциации горбуши Тауйской губы невысока, как и в иных участках ареала. Во время выполнения генетического мониторинга нами проанализирована связь генетических признаков как с морфологическими параметрами, так и с величиной флуктуирующей асимметрии по числу лучей в парных плавниках (Пустовойт, 2006, 2010а).

Благодаря выполнению вышеперечисленных работ только североохотоморские популяции из рек Тауйской губы охвачены столь длительным временем проведения генетического мониторинга. В других частях ареала основной задачей было оценить уровень межпопуляционных различий по данным, собранным за несколько лет (Beacham *et al.*, 1985; Картавец, 1991; Варнавская, 1992, 2005; Алтухов и др., 1997; Брыков и др., 1999а, б; Пустовойт, 2000; Noll *et al.*, 2001; Churikov, Gharrett, 2002; Hawkins *et al.*, 2002; Ефремов, 2002; Салменкова и др., 2006; Шпигальская и др., 2009).

Цель данной работы – рассмотреть распределение частот генов в популяциях горбуши Тауйской губы за период с 1997 по 2010 гг. в связи с произошедшей на рубеже веков смены доминантности поколений.

### Материал и методика

Материал собирали в устьевых участках рек Тауй, Яна и Ола. В табл. 1 указаны даты выборок (и их объем), собранные в период с 2005 по 2010 гг. Сбор материала по возможности охватывал весь период нерестового хода горбуши (конец июня–весь июль в доминантные по численности годы и первая половина июля в малочисленные годы).

Методом электрофореза в блоках 5 %-го полиакриламидного геля (Засыпкин, 1987) исследована генетическая изменчивость следующих локусов (с указанием аллелей): глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (*G3PDH*\*100, \*110), ма-

латдегидрогеназа (*sMDH-B1*, 2\*100, \*110, \*90), 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (*PGDH*\*100, \*95, \*90, \*105), формальдегиддегидрогеназа (*FDHG*\*100, \*105, \*95), фосфоглюкомутаза (*PGM-2*\*100, \*110). Обозначения аллозимных локусов и аллелей даны в соответствии с номенклатурой генов, кодирующих белки у рыб (Shaklee *et al.*, 1990). В табл. 1 не указаны частоты одного (самого редкого) аллеля, например, для двухаллельных локусов указана частота одного (основного).

Для гистохимического выявления активности ферментов в блоках геля использовали сводки Aebersold с соавт. (1987), Manchenko с соавт. (1994). Статистическую обработку проводили по современным руководствам (Nei, Kumar, 2000; Картавец, 2009).

### Результаты и обсуждение

Частоты аллелей полиморфных локусов в выборках горбуши рек Тауй, Яна и Ола приведены в табл. 1. Рассмотрим распределение частот генов в выборках за 13 лет: с 1997 по 2010 гг. Для анализа использованы данные, опубликованные в наших предыдущих работах (Макоедов и др., 1993; Голованов и др., 2009).

На рис. 1–5 показаны частоты аллелей полиморфных генов в популяции р. Ола, которая является наиболее многочисленной среди прочих исследованных, и по ней накоплены наиболее репрезентативные данные. В популяции р. Ола так же, как и в популяциях рек Тауй и Яна, отмечены следующие отличия частот генов между поколениями четных и нечетных лет. Частота основного аллеля локусов глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (рис. 1) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (рис. 2) заметно ниже в выборках поколений четных лет ( $0,935 \pm 0,0046$  и  $0,963 \pm 0,0035$ ) по сравнению с таковыми в нечетные годы ( $0,961 \pm 0,0030$  и  $0,980 \pm 0,0022$ ). Характер распределения частот локусов малатдегидрогеназы (рис. 3) и формальдегиддегидрогеназы (рис. 4) прямо противоположный – в выборках четного года частота основного аллеля в подавляющем большинстве случаев выше ( $0,986 \pm 0,0022$  и  $0,992 \pm 0,0017$ ), чем в выборках нечетного ( $0,970 \pm 0,0027$  и  $0,943 \pm 0,0036$ ). Еще более рельефные отличия у локуса фосфоглюкомутазы – он полиморфен только в

Таблица 1

Частоты аллелей полиморфных локусов и статистические ошибки (s) основного аллеля (\*100)  
в выборках горбуши рек Тауйской губы, полученные в период с 2005 по 2010 гг.

| Дата        | n   | G3PDH* |       | sMDH-BI,2* |       |       | PGDH* |       |       |       | FDHG* |       | PGM-2* |       |  |
|-------------|-----|--------|-------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--|
|             |     | *100   | s     | *100       | *110  | s     | *100  | *95   | *90   | s     | *100  | s     | *100   | s     |  |
| р. Таушй    |     |        |       |            |       |       |       |       |       |       |       |       |        |       |  |
| 15.07.10    | 100 | 0,925  | 0,019 | 0,995      | 0,002 | 0,006 | 0,925 | 0,070 | 0,005 | 0,019 | 1     | 0     | 1      | 0     |  |
| 27.07.10    | 47  | 0,894  | 0,032 | 0,989      | 0,005 | 0,007 | 0,915 | 0,064 | 0,021 | 0,029 | 1     | 0     | 1      | 0     |  |
| р. Яна      |     |        |       |            |       |       |       |       |       |       |       |       |        |       |  |
| 06.07.05    | 100 | 0,960  | 0,014 | 0,962      | 0,015 | 0,009 | 0,955 | 0,025 | 0,020 | 0,015 | 0,940 | 0,017 | 0,925  | 0,026 |  |
| 22.07.05    | 100 | 0,965  | 0,013 | 0,970      | 0,012 | 0,008 | 0,935 | 0,050 | 0,015 | 0,017 | 0,935 | 0,017 | 0,965  | 0,013 |  |
| 07.08.05    | 100 | 0,945  | 0,016 | 0,948      | 0,030 | 0,011 | 0,940 | 0,035 | 0,020 | 0,017 | 0,950 | 0,015 | 0,920  | 0,019 |  |
| 04.07.06    | 50  | 0,920  | 0,027 | 0,995      | 0,005 | 0,005 | 0,950 | 0,030 | 0,020 | 0,022 | 1     | 0     | 1      | 0     |  |
| 26.07.06    | 50  | 0,900  | 0,030 | 0,995      | 0,005 | 0,005 | 0,920 | 0,040 | 0,040 | 0,027 | 1     | 0     | 1      | 0     |  |
| 15.07.09    | 49  | 0,969  | 0,017 | 0,979      | 0,015 | 0,011 | 0,939 | 0,041 | 0,020 | 0,024 | 0,959 | 0,020 | 0,939  | 0,024 |  |
| 11+17.07.10 | 89  | 0,916  | 0,021 | 0,994      | 0,003 | 0,004 | 0,910 | 0,067 | 0,023 | 0,021 | 1     | 0     | 1      | 0     |  |
| 24+27.07.10 | 99  | 0,909  | 0,020 | 0,987      | 0,005 | 0,006 | 0,939 | 0,051 | 0,010 | 0,017 | 0,995 | 0,005 | 1      | 0     |  |
| р. Ола      |     |        |       |            |       |       |       |       |       |       |       |       |        |       |  |
| 06.07.05    | 100 | 0,965  | 0,013 | 0,955      | 0,025 | 0,010 | 1     | 0     | 0     | 0     | 0,950 | 0,015 | 0,930  | 0,018 |  |
| 11.07.05    | 100 | 0,965  | 0,013 | 0,967      | 0,028 | 0,009 | 0,980 | 0     | 0,020 | 0,010 | 0,905 | 0,021 | 0,970  | 0,012 |  |
| 16.07.05    | 100 | 0,950  | 0,015 | 0,975      | 0,015 | 0,008 | 0,970 | 0,020 | 0,010 | 0,012 | 0,935 | 0,017 | 0,955  | 0,015 |  |
| 21.07.05    | 100 | 0,965  | 0,013 | 0,978      | 0,022 | 0,007 | 0,980 | 0,005 | 0,015 | 0,010 | 0,960 | 0,014 | 0,925  | 0,019 |  |
| 17.07.06    | 100 | 0,925  | 0,019 | 0,967      | 0,020 | 0,009 | 0,985 | 0,015 | 0     | 0,009 | 1     | 0     | 1      | 0     |  |
| 28.07.06*   | 64  | 0,953  | 0,019 | 0,988      | 0,004 | 0,007 | 0,945 | 0,016 | 0,039 | 0,029 | 0,992 | 0,008 | 1      | 0     |  |
| 07.07.07    | 100 | 0,975  | 0,011 | 0,968      | 0,015 | 0,009 | 0,985 | 0,005 | 0,010 | 0,009 | 0,980 | 0,010 | 0,920  | 0,019 |  |
| 12.07.07    | 100 | 0,965  | 0,013 | 0,958      | 0,025 | 0,010 | 0,985 | 0,010 | 0,005 | 0,009 | 0,945 | 0,016 | 0,900  | 0,021 |  |
| 18.07.07    | 100 | 0,960  | 0,014 | 0,973      | 0,015 | 0,008 | 0,975 | 0,005 | 0,015 | 0,011 | 0,965 | 0,013 | 0,925  | 0,019 |  |
| 24.07.07    | 100 | 0,960  | 0,014 | 0,970      | 0,005 | 0,008 | 0,955 | 0,040 | 0,005 | 0,015 | 0,955 | 0,015 | 0,895  | 0,022 |  |
| 03.07.08    | 99  | 0,934  | 0,018 | 0,992      | 0,002 | 0,004 | 0,934 | 0,035 | 0,025 | 0,017 | 0,934 | 0,018 | 1      | 0     |  |

Окончание таблицы 1

| Дата     | n   | G3PDH* |       |  | sMDH-BI,2* |       |       |  | PGDH* |       |       |  | FDHG* |       |  | PGM-2* |       |
|----------|-----|--------|-------|--|------------|-------|-------|--|-------|-------|-------|--|-------|-------|--|--------|-------|
|          |     | *100   | s     |  | *100       | *110  | s     |  | *95   | *90   | s     |  | *100  | s     |  | *100   | s     |
| 10.07.08 | 31  | 0,935  | 0,031 |  | 0,992      | 0     | 0,008 |  | 0,081 | 0,032 | 0,040 |  | 1     | 0     |  | 1      | 0     |
| 30.06.09 | 50  | 0,940  | 0,024 |  | 0,955      | 0,030 | 0,015 |  | 0,050 | 0,040 | 0,029 |  | 0,930 | 0,025 |  | 0,960  | 0,020 |
| 29.06.10 | 100 | 0,905  | 0,021 |  | 0,987      | 0,013 | 0,006 |  | 0,045 | 0,025 | 0,018 |  | 0,990 | 0,007 |  | 1      | 0     |
| 06.07.10 | 100 | 0,945  | 0,016 |  | 0,980      | 0,015 | 0,007 |  | 0,040 | 0,010 | 0,015 |  | 0,985 | 0,009 |  | 1      | 0     |

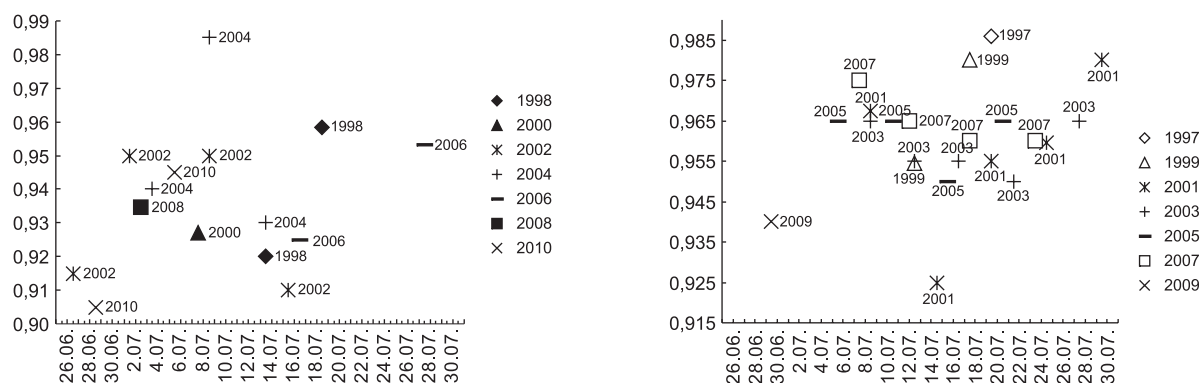
Таблица 2

Средние за год аллельные частоты (p) и значения теста на гетерогенность ( $\chi^2$ ) в выборках (1997–2010 гг.) горбуши рек Тауйской губы

| Локальность, год | к  | n    | G3PDH* |          | sMDH-BI,2* |          | PGDH* |          | FDHG* |          | PGM-2* |          |
|------------------|----|------|--------|----------|------------|----------|-------|----------|-------|----------|--------|----------|
|                  |    |      | p      | $\chi^2$ | p          | $\chi^2$ | p     | $\chi^2$ | p     | $\chi^2$ | p      | $\chi^2$ |
| Тауй, 2000       | 3  | 191  | 0,929  | 2,25     | 0,989      | 1,53     | 0,956 | 0,60     | 0,995 | 5,63     | 1      | –        |
| Тауй, 2002       | 3  | 262  | 0,933  | 1,38     | 0,989      | 153      | 0,903 | 3,75     | 1     | –        | 1      | –        |
| Тауй, 2010       | 2  | 147  | 0,915  | 0,27     | 0,993      | 0,56     | 0,922 | 0,06     | 1     | –        | 1      | –        |
| Яна, 2004        | 1  | 99   | 0,904  | –        | 0,997      | –        | 0,980 | –        | 0,975 | –        | 1      | –        |
| Яна, 2006        | 2  | 100  | 0,910  | 0,12     | 0,995      | 0        | 0,935 | 0,37     | 1     | 0        | 1      | 0        |
| Яна, 2010        | 2  | 188  | 0,912  | 0,73     | 0,991      | 0,81     | 0,926 | 0,73     | 0,997 | –        | 1      | 0        |
| Яна, четн.       | 5  | 487  | 0,909  | 0,59     | 0,994      | 4,28     | 0,942 | 3,86     | 0,994 | –        | 1      | 0        |
| Ола, 1998        | 2  | 192  | 0,939  | 1,22     | 0,986      | 0,19     | 0,982 | 0,96     | 1     | 0        | 1      | –        |
| Ола, 2000        | 1  | 96   | 0,927  | –        | 0,979      | –        | 0,974 | –        | 0,995 | –        | 1      | –        |
| Ола, 2002        | 4  | 400  | 0,931  | 1,63     | 0,988      | 0,71     | 0,965 | 0,44     | 1     | 0        | 1      | –        |
| Ола, 2004        | 3  | 250  | 0,956  | 3,41     | 0,992      | 1,06     | 0,978 | 2,28     | 0,994 | 2,26     | 1      | –        |
| Ола, 2006        | 2  | 164  | 0,936  | 0,34     | 0,976      | 0,94     | 0,969 | 2,16     | 0,997 | 6,71*    | 1      | –        |
| Ола, 2008        | 2  | 130  | 0,935  | 0,05     | 0,992      | 0,65     | 0,923 | 0,55     | 0,950 | 1,97     | 1      | –        |
| Ола, 2010        | 2  | 200  | 0,925  | 1,15     | 0,984      | 1,40     | 0,940 | 0,35     | 0,987 | 0,10     | 1      | –        |
| Ола, четные      | 16 | 1432 | 0,935  | 64,58*   | 0,986      | 10,49    | 0,963 | 24,79    | 0,992 | 38,28*   | 1      | –        |
| Тауй, 1997       | 2  | 200  | 0,968  | 0,36     | 0,973      | 0,42     | 0,995 | 1,0      | 0,928 | 0,02     | –      | –        |

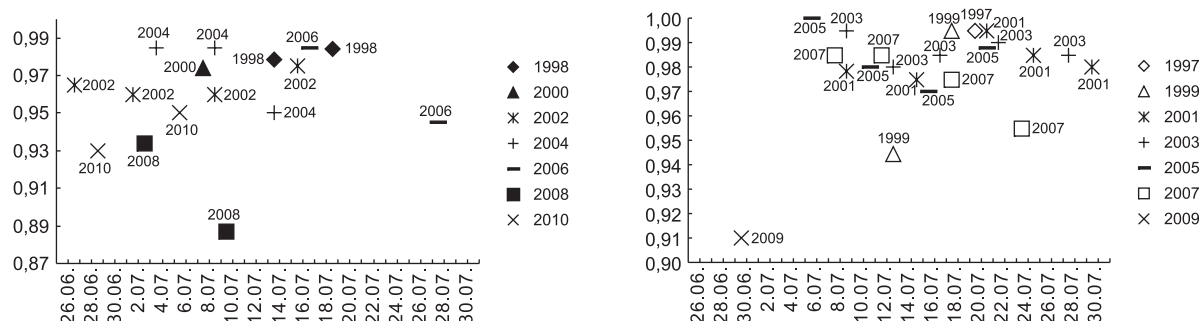
Окончание таблицы 2

| Локальность,<br>год | к  | n    | G3PDDH* |          | sMDH-B1,2* |          | PGDH* |          | FDHG* |          | PGM-2* |          |
|---------------------|----|------|---------|----------|------------|----------|-------|----------|-------|----------|--------|----------|
|                     |    |      | p       | $\chi^2$ | p          | $\chi^2$ | p     | $\chi^2$ | p     | $\chi^2$ | p      | $\chi^2$ |
| Тауй, 1999          | 4  | 399  | 0,941   | 0,52     | 0,963      | 1,76     | 0,979 | 0,02     | 0,935 | 1,59     | 0,936  | 4,14     |
| Тауй, 2003          | 1  | 97   | 0,959   | –        | 0,959      | –        | 0,995 | –        | 0,964 | –        | 0,933  | –        |
| Тауй, нечет.        | 7  | 696  | 0,951   | 1,62     | 0,965      | 3,53     | 0,986 | 6,17     | 0,937 | 5,07     | 0,936  | 4,03     |
| Яна, 1997           | 1  | 100  | 0,970   | –        | 0,963      | –        | 0,980 | –        | 0,010 | –        | –      | –        |
| Яна, 2003           | 1  | 96   | 0,932   | –        | 0,961      | –        | 0,995 | –        | 0,984 | –        | 0,932  | –        |
| Яна, 2005           | 3  | 300  | 0,957   | 0,06     | 0,960      | 0,68     | 0,943 | 0,75     | 0,942 | 0,13     | 0,937  | 1,74     |
| Яна, 2007           | 1  | 100  | 0,970   | –        | 0,970      | –        | 0,935 | –        | 0,930 | –        | 0,915  | –        |
| Яна, 2009           | 1  | 49   | 0,969   | –        | 0,980      | –        | 0,939 | –        | 0,959 | –        | 0,939  | –        |
| Яна, нечет.         | 7  | 645  | 0,958   | 4,29     | 0,964      | 0,03     | 0,955 | 8,88     | 0,943 | 6,74     | 0,932  | 2,74     |
| Ола, 1997           | 1  | 100  | 0,985   | –        | 0,980      | –        | 0,995 | –        | 0,925 | –        | 0,940  | –        |
| Ола, 1999           | 2  | 199  | 0,967   | 1,79     | 0,964      | 0,05     | 0,970 | 3,46     | 0,942 | 0,49     | 0,960  | 0,12     |
| Ола, 2001           | 5  | 441  | 0,955   | 4,17     | 0,976      | 1,77     | 0,983 | 0,92     | 0,936 | 6,50     | 0,938  | 1,87     |
| Ола, 2003           | 5  | 500  | 0,958   | 0,45     | 0,969      | 0,82     | 0,987 | 1,01     | 0,946 | 2,68     | 0,939  | 5,27     |
| Ола, 2005           | 4  | 400  | 0,961   | 1,49     | 0,969      | 0,27     | 0,983 | 1,76     | 0,938 | 2,94     | 0,945  | 2,60     |
| Ола, 2007           | 4  | 400  | 0,965   | 0,44     | 0,967      | 0,20     | 0,975 | 2,46     | 0,961 | 1,80     | 0,910  | 0,79     |
| Ола, 2009           | 1  | 50   | 0,940   | –        | 0,955      | –        | 0,910 | –        | 0,930 | –        | 0,960  | –        |
| Ола, нечет.         | 22 | 2090 | 0,961   | 9,81     | 0,970      | 7,40     | 0,980 | 30,82    | 0,944 | 21,20    | 0,937  | 14,76    |

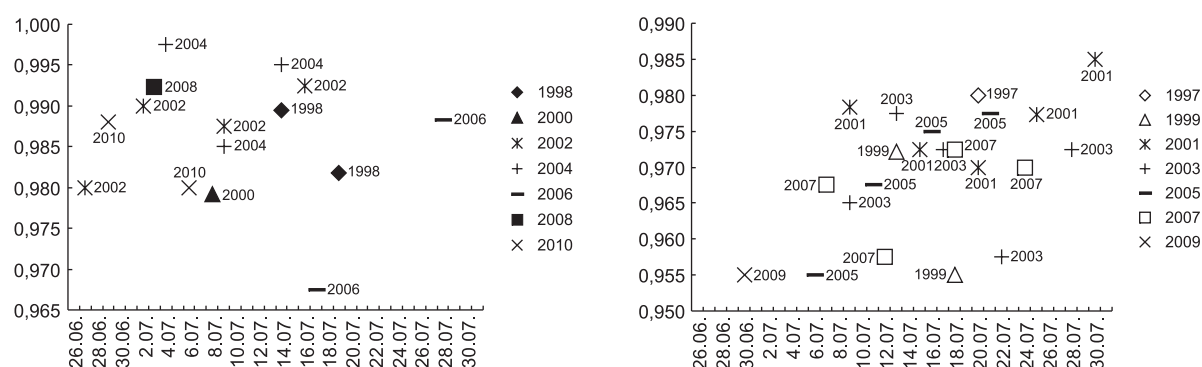


**Рис. 1.** Частоты основного аллеля локуса глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (*G3PDH\*100*) в выборках четного (слева) и нечетного (справа) поколений горбуши р. Ола.

Здесь и далее по оси абсцисс указаны даты с 26 июня по конец июля.



**Рис. 2.** Частоты основного аллеля локуса 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (*PGDH\*100*) в выборках четного (слева) и нечетного (справа) поколений горбуши р. Ола.



**Рис. 3.** Частоты основного аллеля локуса малатдегидрогеназы (*sMDH-B1,2\*100*) в выборках четного (слева) и нечетного (справа) поколений горбуши р. Ола.

выборках нечетных поколений (рис. 5). Аналогичные особенности генетической изменчивости четных и нечетных поколений горбуши известны и для других азиатских популяций (Макоедов и др., 1993; Алтухов и др., 1997).

В рассматриваемом ряду генераций четных лет выделяются своими аномальными частотами следующие выборки: по частотам локуса *G3PDH\** первая выборка за 2010 г. и вторая выборка за 2004 г., по частотам *sMDH-B1,2\** первая и третья выборка за 2004 г., первая выборка за 2006 г., по частоте *PGDH\** и *FDHG\** выборка за 2008 г. (см. рис. 1–5). Статистически значимая гетерогенность отмечена только по частоте гена

тами следующие выборки: по частотам локуса *G3PDH\** первая выборка за 2010 г. и вторая выборка за 2004 г., по частотам *sMDH-B1,2\** первая и третья выборка за 2004 г., первая выборка за 2006 г., по частоте *PGDH\** и *FDHG\** выборка за 2008 г. (см. рис. 1–5). Статистически значимая гетерогенность отмечена только по частоте гена



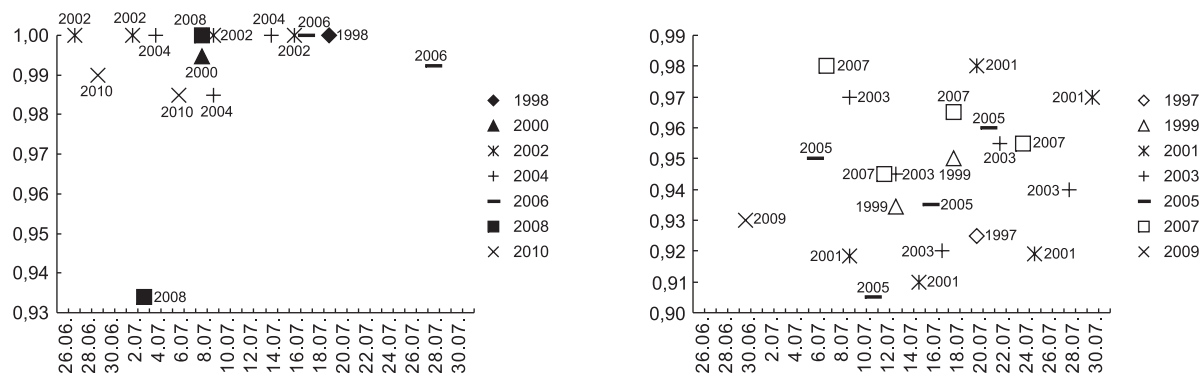


Рис. 4. Частоты основного аллеля локуса формальдегиддегидрогеназы (*FDHG\*100*) в выборках четного (слева) и нечетного (справа) поколений горбуши р. Ола.

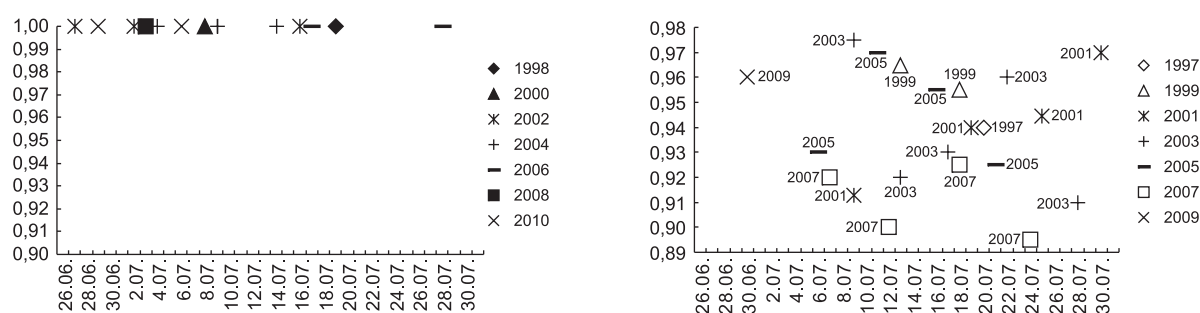


Рис. 5. Частоты основного аллеля локуса фосфоглюкомутазы (*PGM-2\*100*) в выборках четного (слева) и нечетного (справа) поколений горбуши р. Ола.

*FDHG\** по данным за 2006 г. и за все выборки четных лет, по частотам гена *PGDH\** также выявлено несходство частот генов во всех выборках четных лет (табл. 2). В выборках нечетных лет нехарактерные частоты обнаружены в 2001 г. у локусов *G3PDH\**, *sMDH-B1,2\** и *FDHG\** в 2009 г. – у *G3PDH\** *PGDH\**, в 2007 г. у локуса *PGM-2\**. Отметим, что все они статистически незначимо отличаются от данных для прочих выборок нечетных лет (табл. 2). Ранее нами проанализированы более многочисленные данные, собранные в период с 1993 по 2004 гг. из тех же популяций (Голованов и др., 2009). Статистически значимая гетерогенность обнаружена также только в выборках (25 шт.) четных лет по частотам локусов 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (*PGDH\**) и формальдегиддегидрогеназа (*FDHG\**). Генетическая гетерогенность 25 выборок нечетных лет отсутствует. Данный факт связан с более высоким уровнем генетической дифференциации выборок четных ( $G_{ST} = 1,39\%$ ) поколений

по сравнению с нечетными ( $G_{ST} = 0,74\%$ ). Следовательно, величина генетической дифференциации выборок поколений четных и нечетных лет неодинакова, что является еще одним генетическим признаком, отличающим указанные генерации горбуши.

С чем связаны отмеченные колебания частот генов? Прежде всего, это могут быть внутрипопуляционные причины, обусловленные наличием половых, темпоральных и иных группировок. Некоторые генетические особенности внутрипопуляционных группировок описаны нами ранее (Пустовойт, 2006, 2008). Однако отмеченные в данной работе частоты выходят за рамки, характерные для внутрипопуляционных группировок. Видимо, их можно объяснить миграцией в р. Олу производителей из других популяций. Источник таких миграций неясен, так как отсутствуют современные сведения о генетической структуре популяций из других участков ареала. Следует отметить, что в последующие после аномальных по час-

тотам локусов годы выборки имеют сходные с многолетними частотами частоты генов. Предполагаемые мигранты не меняют существенно генетическую структуру популяции горбуши р. Ола, поскольку в следующие годы частоты генов соответствуют обычным.

Отметим, что немногие аномальные выборки обнаружены на рубеже веков, когда кардинально менялась численность четных и нечетных поколений. Если уж практически исчезновение четного поколения за один 2000 г. и рост в десятки раз численности нечетного в 2001 г. мало изменило уровень генетической изменчивости подавляющего большинства выборок из исследованных рек, то заход какой-то части производителей из иных популяций в другие годы тем более не мог существенно преобразить установившиеся ранее значения частот генов. Генетическая структура горбуши р. Ола, как и, видимо, рек Тауй и Яна, стабильна в сохранении характерных частот генов вне зависимости от численности популяций.

Ранее подробное рассмотрение межгодовой динамики частот генов у горбуши Сахалино-Курильского региона привело к формированию гипотезы о наличии у горбуши флуктуирующих стад (Глубоковский и др., 1989; Животовский и др., 1989; Zhivotovsky *et al.*, 1994). Согласно этой гипотезе границы, количество и численность локальных стад, приуроченных к нерестовым рекам, испытывают периодические изменения. Главной причиной таких изменений является миграция особей из одних регионов размножения в другие. Поскольку предполагаемая миграция происходит в разных частях ареала несинхронно (и пока по неизвестным причинам), то в одних частях ареала популяционная структура стабильна, тогда как в других может существенно меняться. За прошедшие годы нам известна только одна ситуация существенной перестройки популяционно-генетической структуры, произошедшей в середине 1980-х гг. в популяциях Западной Камчатки (Макоедов и др., 1993). В популяциях рек Тауйской губы не отмечены подобные колебания аллельных частот аллозимных локусов.

Если говорить о численности популяций, то в природе, видимо, нет нефлуктуирующих по этому параметру популяций рыб (Иванков, 1993). Колебания численности горбуши так же, как и

прочих рыб, происходят вследствие закономерных колебаний факторов окружающей среды. Для объяснения причин смены доминантности в численности поколений у североохотоморской горбуши существует следующая точка зрения. По мнению ихтиологов МагаданНИРО, падение численности четных поколений (1998 и 2000 гг.) горбуши р. Ола обусловлено неблагоприятными условиями нагула молоди в прибрежье в 1999 и 2001 гг. (Марченко и др., 2004). Наоборот, высокая выживаемость нечетных поколений начиная с 1999 г. связана с хорошими условиями нагула в 2000 и 2002 гг. Как видно, ключевым фактором рассматривается влияние гидрологических условий прибрежных участков Охотского моря. Указанное объяснение в целом соответствует модели локального стада, отрицающей существенное влияние миграции на численность популяции. По уже упоминавшейся модели флуктуирующих стад изменение численности может быть связано с перераспределением производителей по регионам нереста. Причина таких перераспределений, видимо, связана с изменениями морских течений в более отдаленных от берегов местах Охотского моря.

Для окончательного выяснения особенностей популяционной организации горбуши необходимы дополнительные исследования с использованием новых методов генетического анализа. Вместе с тем можно подчеркнуть высокую стабильность популяционно-генетических параметров североохотоморской горбуши даже в условиях огромных изменений численности ее популяций.

## Литература

- Агапова Г.А., Голованов И.С., Марченко С.Л., Пустовойт С.П. Биологическое разнообразие самок и самцов североохотоморской горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* // Изв. ТИНРО. 2007. Т. 149. С. 205–218.
- Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т. Популяционная генетика лососевых рыб. М.: Наука, 1997. 288 с.
- Брыков В.А., Полякова Н.Е., Скурихина Л.А. и др. Популяционно-генетическая структура горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) по результатам рестриктазного анализа митохондриальной ДНК: динамика изменчивости в поколениях // Генетика. 1999а. Т. 35. № 5. С. 657–665.

- Брыков В.А., Полякова Н.Е., Скурихина Л.А. и др. Популяционно-генетическая структура горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) по результатам рестриктазного анализа митохондриальной ДНК: временная гетерогенность в период нерестового хода // Генетика. 1999б. Т. 35. № 5. С. 666–673.
- Варнавская Н.В. Изменчивость частот 19 полиморфных генов в популяциях нечетного поколения тихоокеанского лосося – горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha* Walbaum) Камчатки и Северной Америки // Генетика. 1992. Т. 28. № 9. С. 127–140.
- Варнавская Н.В. Геногеография по аллозимным локусам у тихоокеанских лососей // Популяционная биология, генетика и систематика гидробионтов. Петропавловск-Камчатский: КамчатНИРО, 2005. Т. 1. С. 28–62.
- Глубоковский М.К., Животовский Л.А., Викторовский Р.М. и др. Популяционная организация горбуши // Генетика. 1989. Т. 25. № 7. С. 1275–285.
- Голованов И.С., Марченко С.Л. Современное состояние запасов, биология, динамика численности и проблемы промысла горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* материкового побережья Охотского моря // Сб. науч. тр. Магаданского НИИ рыб. хоз-ва и океанографии. Магадан: МагаданНИРО, 2001. Вып. 1. С. 134–143.
- Голованов И.С., Марченко С.Л., Пустовойт С.П. Генетический мониторинг североохотоморских популяций горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* // Цитология и генетика. 2009. Т. 43. № 6. С. 18–27.
- Гордеева Н.В., Салменкова Е.А., Алтухов Ю.П. и др. Генетические изменения у горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) в ходе акклиматизации в бассейне Белого моря // Генетика. 2003. Т. 39. № 3. С. 402–412.
- Ефремов В.В. Аллозимная изменчивость горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* Сахалина // Вопросы ихтиологии. 2002. Т. 42. № 3. С. 409–417.
- Животовский Л.А., Глубоковский М.К., Викторовский Р.М. и др. Генетическая дифференциация горбуши // Генетика. 1989. Т. 25. № 7. С. 1261–1274.
- Засыпкин М.Ю. Генетическая структура популяций настоящих тюленей подсемейства Phocinae Охотского моря // Генетика. 1987. Т. 23. № 2. С. 336–343.
- Иванков В.Н. Популяционная организация у тихоокеанских лососей с коротким пресноводным периодом жизни // Вопросы ихтиологии. 1993. Т. 33. № 1. С. 78–83.
- Картавец Ю.Ф. Изменчивость частот аллелей в пространстве и во времени в популяциях горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* // Вопросы ихтиологии. 1991. Т. 31. № 3. С. 487–495.
- Картавец Ю.Ф. Молекулярная эволюция и популяционная генетика: Уч. пособие. Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2009. 280 с.
- Макоедов А.Н., Пустовойт С.П., Ермоленко Л.Н. и др. Популяционно-генетическое исследование горбуши, размножающейся в реках Северо-Востока России // Генетика. 1993. Т. 29. № 8. С. 1366–1374.
- Марченко С.Л., Голованов И.С., Хованский И.Е. Эффективность воспроизводства горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) р. Ола (северное побережье Охотского моря) // Сб. науч. тр. Магаданского НИИ рыб. хоз-ва и океанографии. Магадан: МагаданНИРО, 2004. Вып. 2. С. 227–236.
- Пустовойт С.П. Анализ морфологических различий гомо- и гетерозиготных самок и самцов горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) популяции р. Ола (северное побережье Охотского моря) // Цитология и генетика. 2006. Т. 40. № 5. С. 3–9.
- Пустовойт С.П. Генетическое разнообразие популяций североохотоморской горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* // Вопросы ихтиологии. 1999. Т. 39. № 4. С. 521–526.
- Пустовойт С.П. Генетическое разнообразие самок и самок горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha*) // Изв. ТИНРО. 2008. Т. 155. С. 120–130.
- Пустовойт С.П. Генетическое разнообразие популяций кеты (*Oncorhynchus keta*), горбуши (*O. gorbuscha*) и нерки (*O. nerka*), размножающейся в реках Западной Камчатки // Усп. соврем. биологии. 2000. Т. 120. № 3. С. 273–278.
- Пустовойт С.П. Анализ взаимосвязи гетерозиготности и величины флуктуирующей асимметрии горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha*) // Информ. вестник ВОГиС. 2010а. Т. 14. № 3. С. 530–536.
- Пустовойт С.П. Генетическая дифференциация в азиатских и американских популяциях видов рода тихоокеанские лососи (*Oncorhynchus*, *Salmoniformes*) // Изв. ТИНРО. 2010б. Т. 162. С. 113–138.
- Салменкова Е.А., Гордеева Н.В., Омельченко В.Т. и др. Генетическая дифференциация горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* Walbaum в азиатской части ареала // Генетика. 2006. Т. 42. № 10. С. 1371–1387.
- Черешнев И.А., Волобуев В.В., Шестаков А.В., Фролов С.В. Лососевидные рыбы Северо-Востока России. Владивосток: Дальнаука, 2002. 496 с.
- Шпигальская Н.Ю., Брыков В.А., Кухлевский А.Д. Полиморфизм мтДНК горбуши Камчатки и острова Сахалин // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана. 2009. Вып. 13. С. 74–87.
- Aebersold P.B., Winans G.A., Teel D.J. *et al.* Manual for starch gel electrophoresis: a method for the detec-

- tion of genetic variation // NOAA Technical Report NMFS. 61. 1987. 19 p.
- Beacham T.D., Withler R.E., Gould A.P. Biochemical genetic stock identification of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) in southern British Columbia and Puget Sound // Can. J. Fish. Aquatic Sci. 1985. V. 42. P. 1474–1483.
- Churikov D., Gharrett A.J. Comparative phylogeography of the two pink salmon broodlines: an analysis based on a mitochondrial DNA genealogy // Mol. Ecol. 2002. V. 11. P. 1077–1101.
- Hawkins S.L., Varnavskaya N.V., Matzak E.A. *et al.* Population structure of odd-broodline Asian pink salmon and its contrast to the even-broodline structure // J. Fish Biol. 2002. V. 60. P. 370–388.
- Manchenko G.P. Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels: A handbook // CRC Press. Inc., Boca Raton, FL. 1994. 440 p.
- Nei M., Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford Univ. Press, 2000. 333 p.
- Noll C., Varnavskaya N.V., Matzak E.A. *et al.* Analysis of contemporary genetic structure of even-broodyear populations of Asian and western Alaskan pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha* // Fish. Bull. 2001. V. 99. P. 123–138.
- Shaklee J.B., Allendorf F.W., Morizot D.C., Whitt G.S. Gene nomenclature for protein-coding loci in fish // Trans. Amer. Fish. Soc. 1990. V. 119. № 1. P. 2–15.
- Zhivotovsky L.A., Gharret A.J., McGregor A.J. *et al.* Gene differentiation in pacific salmon (*Oncorhynchus* sp.): facts and models with reference to pink salmon (*O. gorbuscha*) // Can. J. of Fish. Aquatic Sci. 1994. V. 21. Suppl. 1. P. 223–232.

## PRINCIPAL RESULTS OF GENETIC MONITORING OF PINK SALMON (*ONCORHYNCHUS GORBUSCHA*) POPULATIONS FROM THE NORTHERN COAST OF THE SEA OF OKHOTSK

**S.P. Pustovoit**

Institute of Biological Problems of the North, Far East Branch, Russian Academy of Science,  
Magadan, Russia, e-mail: [pustov@ibpn.ru](mailto:pustov@ibpn.ru)

### Summary

Long-term data about the distribution of the frequencies of genes in pink salmon populations from Taui Bay in 1997–2010 are considered in connection with the change of dominant generations that occurred at the turn of the 21st century. The genetic structure of pink salmon populations is stable with regard to the preservation of characteristic frequencies of genes regardless of population size.

**Key words:** pink salmon, genetic monitoring, fluctuating population size.

## ЭВОЛЮЦИОННАЯ ЭКОЛОГИЯ ПЛОДОВИТОСТИ ЖИВОТНЫХ: АДАПТИВНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПОТОМКОВ ПРЕДОПРЕДЕЛЯЮТСЯ УСЛОВИЯМИ ИХ ПРЕНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ (НА ПРИМЕРЕ ВОДЯНОЙ ПОЛЕВКИ, *ARVICOLA TERRESTRIS* L.)

Г.Г. Назарова, В.И. Евсиков

Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия,  
e-mail: galinanazarova@mail.ru

В результате многолетнего мониторинга природной популяции водяной полевки и разведения животных в виварии выяснена роль характеристик материнской среды (прирост массы тела матери в период беременности, календарные сроки рождения, число детенышей в помете) в становлении и реализации репродуктивного потенциала особей смежных поколений. В регуляции репродуктивных процессов значительную роль играет депонирование резервов жира и других веществ в организме матери в период беременности. Реализация собственного репродуктивного потенциала самок, скорость роста, половое созревание и участие в размножении потомков зависят от способности организма самок оптимально использовать энергетические ресурсы тела как в период беременности, так и на следующем этапе репродуктивного цикла – лактации.

**Ключевые слова:** беременность, смертность, половое созревание, материнский эффект, репродуктивный потенциал, упитанность, *Arvicola terrestris*.

У млекопитающих отношения организма с внешней средой устанавливаются уже в пренатальный период. Эндогенные сигналы материнской среды (гормональные, метаболические) несут достаточно полную информацию о характере внешнего окружения: состоянии кормовой базы, численности популяции, а в целом – пригодности локального местообитания для жизни и размножения особей следующего поколения. При этом внешние сигналы предсказуемых изменений биотической и абиотической среды, воспринимаемые материнским организмом (например длительность светового периода), способны генерировать фенотипические вариации в раннем онтогенезе, влиять на траекторию развития (Ebling, Foster, 1989; Ключков и др., 2010; Fusco, Minelli, 2010). Зависимость фенотипического проявления как структурных, так и функциональных особенностей организма животных от условий раннего развития обнаружена у животных разных таксономических групп, но у млекопитающих относительная

роль материнских эффектов наиболее значима (Bernardo, 1996; Rossiter, 1996; Reinhold, 2002). Это связано с чрезвычайно высокой энергетической стоимостью репродукции для самок (Gittleman, Thompson, 1988) и продолжительной и тесной зависимостью потомства от «материнской среды» в период внутриутробного развития и молочного вскармливания.

Организм матери и развивающиеся эмбрионы представляют собой единую систему, состоящую из двух взаимодействующих подсистем, между которыми возможен конфликт в отношении распределения ресурсов (Trivers, 1974). Эмбрионы получают питание только через организм матери, но при этом они сами активно участвуют в формировании потока нутриентов, входящего в материнский организм, и его распределении на собственные нужды. От согласованности процессов жизнеобеспечения данных подсистем зависят как судьба размножающейся самки, так и выживание вида в целом (Евсиков и др., 1973, 1991). Решение



противоречивых задач – поддержание соматической целостности и жизни материнского организма, испытывающего в период репродукции энергетические нагрузки, сопоставимые с выполнением тяжелой работы (Kirkwood, 1983; Weiner, 1987, 1989), и быстрый рост потомства – обеспечиваются механизмами гомеостаза и гомеореза. Гомеостатическое регулирование, осуществляемое на основе обратных связей с условиями среды, в короткие промежутки времени адаптирует организм к ее пертурбациям (Шилов, 1977). Напротив, физиологические механизмы гомеореза функционируют без обратных связей, на длительных промежутках времени. Они обеспечивают относительное постоянство динамических процессов, таких, как беременность, лактация, рост, и важны в управлении развитием (Уоддингтон, 1970; Bauman, Curgie, 1980).

Водяная полевка – удобный модельный объект для изучения механизмов реализации репродуктивного потенциала популяций, поскольку занимает протяженный ареал, обитает в широком градиенте факторов физической среды, а численность ее локальных популяций подвержена многолетним периодическим колебаниям. В данной работе обобщены результаты изучения связи обеспеченности материнского организма резервами тела, аккумулированными в период беременности, с реализацией воспроизводительного потенциала в изменчивых во времени условиях среды обитания. Следует особо подчеркнуть, что на протяжении всего периода наблюдений (начиная с 1980 г.) мы неукоснительно следовали принципу возможно более адекватного соответствия генетико-этологического и физиологического статуса зверьков, разводимых в неволе, таковому в природе (Назарова, Евсиков, 2008).

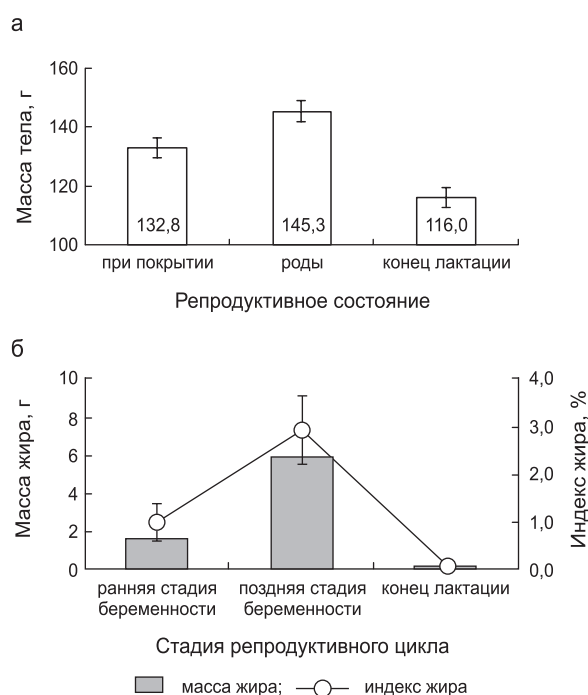
### Аккумуляция и мобилизация резервов тела в репродуктивном цикле

В обширных исследованиях на млекопитающих изучены различные аспекты зависимости процессов воспроизводства от количества и качества кормовых ресурсов. Вопрос о роли резервов организма самки в своевременном и должном обеспечении необходимыми для нормального развития потомства нутриентами

поставлен в небольшом числе работ (Пианка, 1981; Jönsson, 1997; Boyd, 2000; Glazier, 2000) и остается малоизученным, особенно у незимоспящих грызунов. Вместе с тем известно, что физическое состояние самки зависит от доступности пищевых ресурсов, их качества, эффективности функционирования систем, ответственных за ассимиляцию энергии, ее распределение между конкурирующими жизненными функциями и, несомненно, имеет важное значение для «воспроизведения приспособленных форм в потомстве, в том числе и за счет ресурсов и жизни отдельных особей» (Шмальгаузен, 1983).

У самок водяной полевки, разводимых в виварии, изучена динамика массы тела и жировых депо в период беременности и лактации. Выяснено, что при родах масса тела самок в среднем на 9,5 % выше, чем при покрытии ( $t = 2,60$ ;  $p < 0,05$ ), а при отъеме детенышей, через 3 недели, – на 20,2 % ниже, чем при родах ( $t = 5,98$ ;  $p < 0,001$ ) и на 12,6 % ниже, чем при покрытии ( $t = 3,48$ ;  $p < 0,001$ ) (рис. 1, а).

Масса жировых депо, локализованных в области матки, яичников и почек, достоверно различается на ранней (1–10-й день), поздней (11–20-й день) стадиях беременности и в конце



**Рис. 1.** Изменение массы тела самок (а) и жировых депо (б) на разных фазах репродуктивного цикла.

лактации (медианный тест:  $\chi^2 = 11,2$ ;  $df = 2$ ;  $p < 0,01$ ). Достоверно изменяется и индекс жира – отношение массы жировых депо к массе тела самок на момент забоя (медианный тест:  $\chi^2 = 11,2$ ;  $df = 2$ ;  $p < 0,01$ ) (рис. 1, б). На поздней стадии беременности относительная масса жира больше, чем на ранней стадии (критерий Манна–Уитни;  $Z = 2,39$ ,  $p < 0,05$ ). В конце лактации индекс жира меньше, чем на поздних (критерий Манна–Уитни;  $Z = 3,70$ ,  $p < 0,01$ ) или ранних стадиях беременности (критерий Манна–Уитни;  $Z = 2,84$ ,  $p < 0,01$ ).

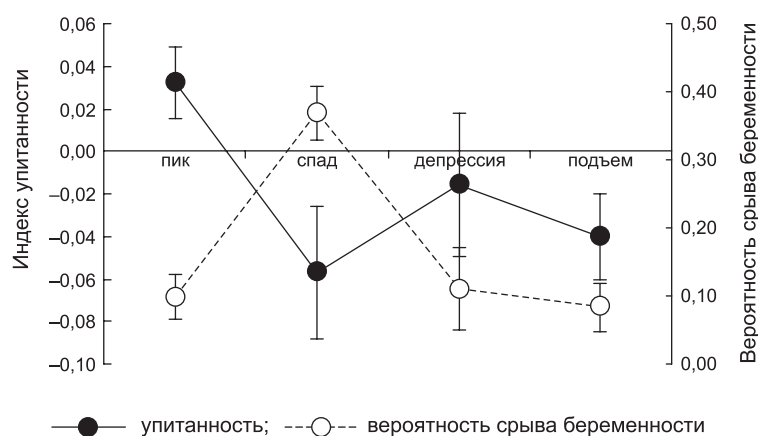
Таким образом, у водяных полевок, как и у некоторых других представителей грызунов (Randolph *et al.*, 1977), вспомогательным источником энергии при возникновении ее дефицита в ходе размножения становятся жировые резервы тела самки, аккумулированные в период беременности.

### Физическое состояние матери в период беременности и смертность потомства

В природной популяции водяных полевок выявлены скоррелированные изменения показателей плодовитости и физического состояния беременных самок. Физическое состояние оценивали по отклонению массы тела самки (исключая массу матки с эмбрионами) от теоретически ожидаемой, вычисленной из уравнения регрессии массы тела на длину. Выяснено, что данный индекс положительно коррелирует с массой жировых депо брюшной полости ( $r = 0,63$ ,  $p < 0,01$ ). Это послужило основанием для ис-

пользования его в качестве информативной прижизненной оценки величины жировых запасов тела.

Анализ многолетних полевых популяционных данных показал, что беременные самки находятся в лучшем физическом состоянии на пике численности (Евсиков и др., 2008). В период спада показатели их упитанности достоверно снижаются. Причиной может быть обострение кормового дефицита, связанного с сокращением оптимальных для размножения территорий, повышение стрессированности животных (Евсиков и др., 1999а; Овчинникова, 2000; Музыка и др., 2010). С ухудшением физического состояния беременных самок в фазу спада снижается число желтых тел и живых эмбрионов, увеличивается доля особей с резорбцией всего помета (рис. 2). Результаты множественного регрессионного анализа выявили положительную связь между упитанностью беременных самок, числом желтых тел, живых эмбрионов и отрицательную – с величиной эмбриональных потерь, что согласуется с экспериментальными данными других авторов, показавшими, что низкая упитанность самок повышает риск невынашивания беременности (Chrousos *et al.*, 1998; Schulz, Widmaier, 2004) и сопровождается увеличением смертности потомства в период молочного вскармливания. Согласно нашим данным, у самок, в пометах которых смертность детенышей составляет 100 %, прибавка массы тела за период беременности ниже, чем у успешно выкармливающих (Назарова, Евсиков, 2000).



**Рис. 2.** Изменение упитанности беременных самок и вероятность срыва беременности на разных фазах популяционного цикла (Евсиков и др., 2008).

Очевидно, в условиях стресса, дефицита кормовых ресурсов самоподдержание и сохранение жизни матери имеет приоритет перед сохранением жизни потомства.

**Изменчивость самок  
по способности аккумулировать  
резервы тела в период беременности,  
половое созревание и рост потомства**

В регуляции скорости полового созревания, наиболее пластичной характеристики воспроизводительной функции, определяющей репродуктивный потенциал популяции, первостепенную роль играют фотопериодические, визуальные, ольфакторные, социальные, метаболические сигналы, несущие информацию о количестве и доступности трофических ресурсов во внешней среде, качестве корма (Беляев, 1976; Bronson, Rissman, 1986; Zambrano *et al.*, 2005). Сложная архитектура взаимодействий этих сигналов во времени в конечном итоге обеспечивает настройку начала и окончания сезона размножения, основных звеньев воспроизводительной функции животных и, следовательно, гибкую регуляцию воспроизводства популяции в соответствии с локальными экологическими условиями. Наиболее ярко это демонстрируют сезонно размножающиеся грызуны, у которых особи из весенних когорт быстро растут, созревают и вступают в размножение в год своего рождения, а особи осенних – только на следующий год (Schwarz *et al.*, 1964; Gliwicz, 1996; Olenev, 2002).

Ведущую роль в изменении скорости индивидуального роста и полового развития особей разных когорт играют фотопериодические сигналы (Gliwicz, 1996). Однако наличие внутри- и межпопуляционной изменчивости доли особей весенних когорт, достигающих половой зрелости и вступающих в размножение (Boonstra, 1989; Евсиков и др., 1999б), свидетельствует о том, что для регуляции роста и полового созревания важна и другая биологически значимая информация, к которой развивающийся организм наиболее восприимчив в критические периоды онтогенеза.

Хорошее соответствие между фенотипом и средой достигается при условии, что сигналы, служащие триггерами изменения развития,

являются надежными предикторами будущего селективного окружения. Физиологические механизмы, опосредующие связь между состоянием внешней среды и пластичностью репродуктивного потенциала популяций, изучены недостаточно. В экспериментальных исследованиях показано, что для инициации полового созревания (Hamilton, Bronson, 1985), наступления и сохранения беременности (Woodside *et al.*, 1981) необходим определенный запас жира в организме. Снижение жировых резервов тела ниже порогового уровня блокирует размножение (Frisch, 1984; Glen, 1990). В 1990-х гг. установлено, что жировая ткань – не только энергетическое депо, но и эндокринный орган. Лептин – гормон жировой ткани – играет центральную роль в регуляции метаболизма, роста и репродуктивной функции (Gueorguiev *et al.*, 2001) и может выступать в качестве посредника в передаче сигналов внешней среды. Мы предположили, что сигнальное значение для потомства может иметь динамика накопления резервов тела матери в период его внутриутробного развития. Скорость изменения дает более детальную информацию о взаимодействии организма матери и эмбрионов с внешним окружением, чем статические показатели, поскольку учитывается наличие пороговых значений индуктивных сигналов, при достижении которых изменяется развитие. Данный аспект никем ранее не изучался.

У водяных полевок, разводимых в виварии, оценено влияние массы тела матери при покрытии, степени повышения упитанности в период беременности, календарного месяца рождения, порядкового номера родов, величины помета и соотношения полов при рождении на вероятность полового созревания потомков в первые два месяца жизни (Назарова, Евсиков, 2007). В качестве прижизненной оценки жировых резервов, аккумулированных в период беременности, использовали индексы физического состояния, представляющие собой разность между наблюдаемым приростом массы тела самки в период беременности и теоретически ожидаемым, вычисленным из уравнения регрессии, аппроксимирующего зависимость между массой тела после родов и при покрытии (Назарова, Евсиков, 2007, 2008).

Результаты множественного регрессионного анализа показали, что половое созревание доче-

рей зависит от месяца рождения и физических кондиций матери в период беременности (табл. 1). Доля созревающих самок выше среди родившихся в марте (0,42), чем в апреле (0,17) или мае (0,11). Самки, родившиеся позже июня, остаются неполовозрелыми в год своего рождения.

С повышением величины аккумулированных в период беременности резервов тела половое созревание особей, родившихся весной, ускоряется (табл. 1). У матерей, дочери которых достигают половой зрелости, величина резервов тела, накопленных в период беременности, судя по индексу физического состояния, достоверно выше, чем у матерей, дочери которых остались неполовозрелыми ( $0,062 \pm 0,016$  и  $-0,009 \pm 0,006$  соответственно,  $p < 0,001$ ).

Самки, созревающие в год своего рождения, отличаются от несозревающих более высокой скоростью роста (рис. 3), что согласуется с данными, полученными на других грызунах (Schwarz *et al.*, 1964). Согласно нашим результатам, отмеченные преимущества в росте созревающих в год своего рождения самок связаны с лучшим физическим состоянием матери в период беременности. Множественный регрессионный анализ показал, что масса тела дочерей в возрасте до 10 недель положительно связана с массой тела матери и степенью повышения ее упитанности в период беременности. Отрицательное влияние величины помета на массу дочерей в раннем возрасте нивелируется после достижения животными 5-недельного возраста.

Таким образом, скорость полового созревания напрямую зависит от условий материнской среды в период внутриутробного развития, прежде всего ресурсного обеспечения организма матери. Этот вывод согласуется с результатами экспериментальных исследований, выполненных на водяной полевке. Показано, что 16-часовое голодание матери на 3-й а затем на 5-й день беременности приводит к снижению продукции эстрадиола у дочерей и нарушению возрастной динамики концентрации кортикостерона, прогестерона и эстрадиола (Yakovleva *et al.*, 1997). Аналогичные результаты получены на крысах. Голодание матери в последнюю неделю беременности вызывает снижение массы тела и массы матки у дочерей при рождении, нарушает развитие яичников (Léonhard *et al.*, 2003).

Таблица 1

Влияние факторов материнского организма на вероятность полового созревания дочерей

| Факторы  | Параметры уравнения регрессии | $p$   |
|--|-------------------------------|-------|
| Константа  | $-2,02 \pm 1,95$              | 0,30  |
| Месяц рождения                                     | $-0,93 \pm 0,28$              | 0,001 |
| Порядковый номер родов                             | $-0,74 \pm 0,43$              | 0,08  |
| Масса матери при покрытии                          | $0,006 \pm 0,008$             | 0,48  |
| Индекс физического состояния во время беременности | $8,19 \pm 2,96$               | 0,006 |
| Число детей в помете                               | $-0,008 \pm 0,23$             | 0,97  |
| Соотношение полов при рождении                     | $0,006 \pm 0,01$              | 0,57  |

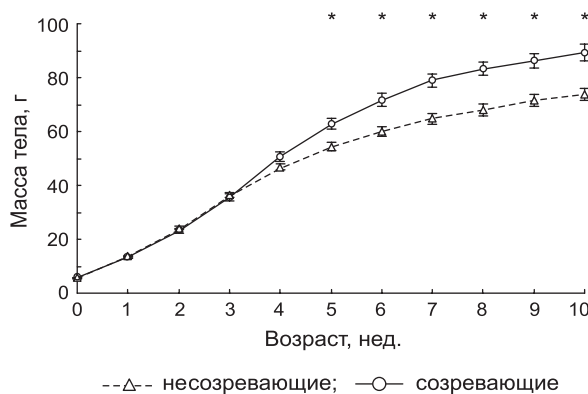


Рис. 3. Рост самок двух групп: созревающих и несозревающих в год своего рождения (Назарова, Евсиков, 2007).

\*  $p < 0,01$ .

Выполненные исследования отчасти раскрывают природу закономерных межгодовых вариаций вовлеченности молодых самок в репродуктивный процесс, связанных с циклом численности популяции. У водяной полевки доля половозрелых сеголеток повышается на подъеме численности и снижается на спаде (Евсиков и др., 1999б). Такая динамика может быть обусловлена однонаправленными межгодовыми изменениями параметров абиотической среды (Музыка и др., 2010) и показателей физического состояния самок родительского поколения (Евсиков и др., 2008). Показано, что воздействие на животных стрессующих



факторов различной природы, нарушающих энергетический баланс и гормональный статус животных, имеет закономерную динамику (Евсиков и др., 1991). Интегрированное влияние внешних и внутривидовых факторов сказывается на физическом статусе, а затем и на репродуктивной способности особей, поэтому физическое состояние имеет первостепенное значение для реализации репродуктивного потенциала на фоне демографической динамики популяций, количественных и качественных изменений кормовой базы. Хотя в фазу подъема средние морфометрические показатели упитанности беременных самок не достигают максимальных значений (это отмечается в фазу пика), величина прироста упитанности за период беременности в фазу подъема достоверно выше, чем в другие фазы популяционного цикла (Назарова, 2008). И именно в фазу подъема численности значительно повышается интенсивность размножения молодых самок, увеличивается масса семенников и семенных пузырьков у самцов-сеголеток (Евсиков и др., 1991), что может быть связано с пренатальным материнским влиянием на скорость полового развития потомства.

### Заключение

Результаты изучения влияния характеристик внешней и материнской среды (календарные сроки рождения, величина помета, соотношение полов при рождении, физическое состояние матери во время беременности) на постнатальное развитие потомства показали, что пластичность скорости роста и полового развития связана, прежде всего, с лабильностью физического состояния матери в период беременности, способностью накапливать жировые резервы тела, необходимые для нужд лактации. Физическое состояние служит надежным индикатором доступности и качества трофических ресурсов во внешней среде, способности организма самки справляться с энергетическими нагрузками, связанными с размножением. Эндогенные сигналы величины резервов тела играют центральную роль в поддержании гомеостаза в системах «мать–потомки» и «организм–популяция–среда», устойчивого сохранения популяций во времени.

### Благодарности

Работа выполнена при поддержке РФФИ: гранты № 09-04-01712-а; № 11-04-00277-а.

### Литература

- Беляев Д.К. Теоретические основы и практические аспекты использования фотопериодизма в разведении пушных зверей // Световой фактор в повышении продуктивности пушных зверей. М., 1976. С. 7–30.
- Евсиков В.И., Мошкин М.П., Герлинская Л.А., Назарова Г.Г. Реализация репродуктивного потенциала и стресс в цикле численности водяных полевок // Экология популяций. М., 1991. С. 213–228.
- Евсиков В.И., Мошкин М.П., Герлинская Л.А. Популяционная экология водяной полевки (*Arvicola terrestris* L.) в Западной Сибири. Сообщение III. Стресс и воспроизводство в популяционном цикле // Сиб. экол. журнал. 1999а. № 1. С. 79–88.
- Евсиков В.И., Назарова Г.Г., Музыка В.Ю. Физическое состояние и репродуктивные характеристики самок водяной полевки (*Arvicola terrestris* L.) // Экология. 2008. № 6. С. 436–440.
- Евсиков В.И., Назарова Г.Г., Рогов В.Г. Популяционная экология водяной полевки (*Arvicola terrestris* L.) в Западной Сибири. Сообщение I. Репродуктивная способность самок, полиморфных по окраске шерстного покрова, на разных фазах динамики численности популяции // Сиб. экол. журнал. 1999б. № 1. С. 59–68.
- Евсиков В.И., Осетрова Т.Д., Кондрина Л.П., Беляев Д.К. Генетика плодовитости животных. Сообщение V. Вес мышей линий BALB, C57 BL и их реципрокных гибридов и его связь с плодовитостью // Генетика. 1973. Т. 9. № 8. С. 70–84.
- Клочков Д.В., Гулевич Р.Г., Трапезов О.В. Фотопериодический сигнал как ключевой фактор во взаимоотношении организм–среда // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 4. № 4. С. 729–746.
- Музыка В.Ю., Назарова Г.Г., Потапов М.А. и др. Влияние гидрологических условий на внутривидовую конкуренцию, структуру поселений и воспроизводство у водяной полевки *Arvicola terrestris* // Сиб. экол. журнал. 2010. № 5. С. 827–833.
- Назарова Г.Г. Материнское влияние на приспособленность потомков и численность популяции: Автореф. д-ра наук. Новосибирск, 2008. 39 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. Наступление половозре-



- лости 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.
- Овчинникова Л.Е. Роль трофических факторов в регуляции численности водяной полевки (*Arvicola terrestris* L.): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск: ИСиЭЖ СО РАН, 2000. 20 с.
- Пианка Э. Эволюционная экология. М.: Мир, 1981. 400 с.
- Уоддингтон К.Х. Основные биологические концепции // На пути к теоретической биологии. I. Прологомены. М.: Мир, 1970. С. 11–38.
- Шилов И.А. Об общих принципах экологических адаптаций // Биологические науки. Науч. докл. высш. школы. 1977. № 10. С. 55–62.
- Шмальгаузен И.И. Пути и закономерности эволюционного процесса. Избр. тр. М.: Наука, 1983. 360 с.
- Bauman D.E., Currie W.B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis // J. Dairy Sci. 1980. V. 63. P. 1514–1529.
- Bernardo J. Maternal effects in animal ecology // Am. Zool. 1996. V. 36. P. 83–105.
- Boonstra R. Life history variation in maturation in fluctuating meadow vole populations (*Microtus pennsylvanicus*) // Oikos. 1989. V. 54. P. 265–274.
- Boyd I.L. State-dependent fertility in pinnipeds: contrasting capital and income breeders // Funct. Ecol. 2000. V. 14. P. 623–630.
- Bronson F.H., Rissman E.F. The biology of puberty // Biol. Rev. 1986. V. 61. P. 157–195.
- Chrousos G.P., Torpy D.J., Gold P.W. Interactions between the hypothalamic-pituitary axis and the female reproductive system: clinical implications // Ann. Intern. Med. 1998. V. 129. P. 229–240.
- Ebling E.J.P., Foster D.L. Pineal melatonin rhythms and the timing of puberty in mammals // Experientia. 1989. V. 45. P. 946–954.
- Frisch R.E. Body fat, puberty and fertility // Biol. Rev. 1984. V. 59. P. 161–188.
- Fusco G., Minelli A. Phenotypic plasticity in development and evolution: facts and concepts // Phil. Trans. R. Soc. B. 2010. V. 365. P. 547–556.
- Gittleman J.Z., Thompson S.D. Energy allocation in mammalian reproduction // Amer. Zool. 1988. V. 28. P. 863–875.
- Glazier D.S. Is fatter fitter? Body storage and reproduction in ten populations of the freshwater amphipod *Gammarus minus* // Oecologia. 2000. V. 122. P. 335–345.
- Glen P. Food, sex, time and effort in small mammals: energy allocation strategies for survival and reproduction // Behavior. 1990. V. 114. P. 191–205.
- Gliwicz J. Life history of voles: growth and maturation in seasonal cohorts of the root vole // Misc. Zool. 1996. V. 19. N 1. P. 1–12.
- Gueorguiev M., Gyth M.I., Korbonits M. Leptin and puberty: a review // Pituitary. 2001. V. 4. P. 79–86.
- Hamilton G.D., Bronson F.H. Food restriction and reproductive development in wild house mice // Biol. Reprod. 1985. V. 32. P. 773–778.
- Jönsson I.K. Capital and income breeding as alternative tactics of resource use in reproduction: metabolic fuels hypothesis // Oikos. 1997. V. 78. P. 57–66.
- Kirkwood J.K. A limit to metabolisable energy in mammals and birds // Comp. Biochem. Physiol. 1983. V. 75A. P. 1–3.
- Léonhard M., Lesage J., Croix D. *et al.* Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty // Biol. Reprod. 2003. V. 68. P. 390–400.
- Olenev G.V. Alternative types of ontogeny in cyclomorphic rodents and their role in population dynamics: an ecological analysis // Russ. J. Ecol. 2002. T. 33. № 5. С. 321–330.
- Randolph P.A., Randolph J.C., Mattingly K., Foster M.M. Energy costs of reproduction in the cotton rat (*Sigmodon hispidus*) // Ecology. 1977. V. 58. P. 31–45.
- Reinhold K. Maternal effects and the evolution of behavioral and morphological characters: A literature review indicates the importance of extended maternal care // J. Heredity. 2002. V. 93. P. 400–405.
- Rossiter M.C. Incidence and consequences of inherited environmental effects // Annu. Rev. Ecol. Syst. 1996. V. 27. P. 451–476.
- Schulz L.C., Widmaier E.P. The effect of leptin on mouse trophoblast cell invasion // Biol. Reprod. 2004. V. 71. P. 1963–1967.
- Schwarz S.S., Pokrovski A.V., Istchen V.C. *et al.* Biological peculiarities of seasonal generations of rodents, with special reference to the problem of senescence in mammals // Acta Theriologica. 1964. V. 8. N 1. P. 1–43.
- Trivers R.L. Parent-offspring conflict // Am. Zool. 1974. V. 14. P. 249–264.
- Weiner J. Limits to energy budget and tactics in energy investments during reproduction in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus* Pallas 1770) // Symp. Zool. Soc. Lond. 1987. V. 57. P. 167–187.
- Weiner J. Metabolic constraints to mammalian energy budgets // Acta Theriol. 1989. V. 34. N 1. P. 3–35.
- Woodside B., Wilson R., Chee P., Leon M. Resource partitioning during reproduction in the Norway rat // Science. 1981. V. 2. P. 76–77.

- Yakovleva T.V., Bazhan N.M., Makarova E.N. Effects of food deprivation in early pregnancy on the development of ovaries and adrenals in female progeny of the water vole (*Arvicola terrestris*) // Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 1997. V. 116. P. 103–109.
- Zambrano E., Rodriguez-Gonzalez G.L., Guzman C. *et al.* A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development // J. Physiol. 2005. V. 563.P. 275–284.

**EVOLUTIONARY ECOLOGY OF ANIMAL FERTILITY:  
THE FITNESS OF THE PROGENY IS DETERMINED  
BY THEIR PRENATAL DEVELOPMENT (BY THE EXAMPLE  
OF THE EUROPEAN WATER VOLE, *ARVICOLA TERRESTRIS* L.)**

**G.G. Nazarova, V.I. Evsikov**

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

**Summary**

The contribution of maternal environment (gestational weight gain, month of birth, and litter size) to the formation and realization of the reproductive potential of adjacent European water vole generations has been studied for years in a natural population and in captivity. Accumulation of body reserves during pregnancy plays an essential role in the regulation of reproductive processes. Realization of the reproductive potential of females, growth rate, and the sexual maturation of the offspring depend on the ability of the mothers to utilize the reserves properly both during pregnancy and at the next stage of the reproduction cycle, lactation.

**Key words:** pregnancy, mortality, sexual maturity, maternal effect, reproductive potential, nutritional state, *Arvicola terrestris*.

## ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПАРАЛЛЕЛИЗМ В АБЕРРАЦИЯХ ОКРАСКИ ВОЛОСЯНОГО ПОКРОВА У СЕВЕРНЫХ МОРСКИХ КОТИКОВ (*CALLORHINUS URSINUS*), АМЕРИКАНСКИХ НОРОК (*MUSTELA VISON*) И СОБОЛЕЙ (*MARTES ZIBELLINA*)

С.В. Фомин<sup>1</sup>, Н.С. Фомина<sup>2</sup>, О.В. Трапезов<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Вятская государственная сельскохозяйственная академия, Киров, Россия;

<sup>2</sup> Федеральное государственное учреждение Государственный природный биосферный заповедник «Командорский» им. С.В. Маракова, с. Никольское, Алеутский район, Камчатский край, Россия, e-mail: natsfomina@mail.ru;

<sup>3</sup> Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, e-mail: trapezov@bionet.nsc.ru

Исследовалась частота встречаемости окрасочных aberrаций в популяции северных морских котиков Командорских островов. Зафиксировано присутствие с частотой порядка величин  $10^{-4}$  таких окрасочных aberrаций, как альбинизм, акромеланизм, неспецифические пегости, золотистая окраска, окраска хорькового типа. Установлена фенотипическая схожесть с подобными окрасочными aberrациями у соболей и мутациями окраски у американской норки клеточного разведения. Обсуждается эволюционно-генетический смысл поддержания aberrативного окрасочного полиморфизма в природных популяциях.

**Ключевые слова:** северный морской котик, *Callorhinus ursinus*, американская норка, *Mustela vison*, соболь, *Martes zibellina*, полиморфизм, изоморфизм, aberrации окраски, фенотипический параллелизм.

И тут случилось чудо. Из-за ближайшего скалистого выступа выплыл белый калан. Не поверив глазам, я трепетно ждал, чтобы он приблизился хоть еще немного. Когда до зверя осталось метров двадцать, сомнения исчезли. Передо мной действительно плыл белый калан, «тойон» – каланий князь.

С.В. Мараков, 1988

В пределах вида постоянно возникает огромное число разных мутаций, затрагивающих фенотипические признаки организма, и в популяции могут одновременно присутствовать многие мутантные гены, представляющие собой фонд вариаций (генофонд – на языке генетики). Начиная с классической работы С.С. Четверикова (1926) было показано, что значительное большинство возникающих в природных популяциях генных мутаций рецессивны (доминантные мутации возникают весьма редко), находятся они там, как правило, в гетерозиготном состоянии и не выявляются в признаках организма, так как присутствуют

под покровом стандартного фенотипа. Они могут проявиться лишь в редких случаях, если встретятся и оставят потомство две особи, гетерозиготные по одному и тому же рецессивному мутантному аллелю, тогда у части их потомков этот аллель придет в гомозиготное состояние. Причем необходимо, чтобы у таких рецессивных гомозигот не было никаких дефектов, мешающих нормальной работе организма.

Подобных, резко уклоняющихся по окраске от нормы, особей в популяциях диких животных принято называть aberrантами (лат. *aberratio* – уклонение) (рис. 1). В природе aberrанты встречаются редко, потому и малочисленны они в



**Рис. 1.** Котик-альбинос. Фото С.В. Маракова. 15 июля 1955 г.

музейных коллекциях. В то же время как для генетико-популяционных исследований, так и для частной генетики пушных зверей изучение окрасочных aberrаций давно представляет большой интерес (Dunn, 1921; Haldane, 1927; Николаев, 1931; Кузнецов, 1941; Ромашов, Ильина, 1942, 1943).

Начало учета окрасочных aberrаций у северных морских котиков Командорского архипелага следует отнести к 1954 г., когда С.В. Мараков сделал первый черно-белый снимок котика с белой неспецифической пегостью на голове на «Юго-Восточном лежбище» морских зверей о. Медный (Мараков, 1974).

В настоящем исследовании были поставлены задачи: 1) по наличию окрасочных aberrаций составить представление о присутствии генов, затрагивающих окраску волосяного покрова в командорской популяции северных морских котиков; 2) сравнить aberrации окраски у северных морских котиков с похожими окрасками у представителей других таксонов – американской норки и соболя; 3) рассмотреть возможные генетические механизмы поддержания популяционного гомеостаза среди морских котиков Командорского архипелага.

## Материалы и методы

### Северный морской котик

Отряд: Pinnipedia (Ластоногие). Семейство: Otariidae Gill, 1866 (Ушастые тюлени). Род: *Callorhinus* Gray, 1859 (Северные морские котики). Вид: *Callorhinus ursinus* Linnaeus, 1758

(Северный морской котик). Хромосомный набор  $2n = 36$ .

Половой диморфизм резко выражен: длина тела самца до 2,1 м, масса до 300 кг, самки соответственно – до 1,5 м и 65 кг. Телосложение самцов массивное, самок – изящное. Ласты очень длинные, без волосяного покрова.

Рождение потомства у северных морских котиков обычно с середины июня до начала августа (рис. 2). Новорожденные щенки достигают массы тела около 5 кг и длины тела 55–65 см. Лактация продолжается 3–4 месяца. Смертность среди молодняка в первый год жизни очень высокая – до 50 % (рис. 3, е). К концу лактационного периода у детенышей начинается линька со сменой ювенильного черного волосяного покрова на серый (Ильина, 1940, 1949, 1951; Бычков, 1971; Нестеров и др., 1997; Кузин, 1999; Владимиров, 1998; Результаты исследований..., 1998–2010).

Общая окраска взрослых самцов северного морского котика варьирует от серебристо-серой до черно-бурой. Можно встретить почти седых и черных как смоль особей. Спинная часть тела отличается от брюшной, она варьирует от темно-серой до коричневой; брюшная – красновато-коричневая. У взрослых самок спина серовато-коричневая или серая, грудь имеет палевые, темно-серые и светло-серые тона. мех детенышей имеет черную или черно-бурую блестящую ость и редкий светлый пух. Молодые самцы и самки серебристо-серые, более светлые на брюшной стороне (Мараков, 1974).



**Рис. 2.** Северный морской котик (самец, самка, детеныш). Фото С.В. Фомина.



Волосистой покров у морских котиков состоит из длинных грубых остевых, переходных и нежных пуховых волос. Волосы растут пучками, состоящими из одного острого, 2–3 промежуточных и 10–30 пуховых волос. В пуховых волосах нет сердцевинного слоя и по форме они отличаются от остевых. Соотношение остевых и пуховых волос 1 : 30. На одном квадратном сантиметре шкуры котика насчитывается до 50 тыс. волосков (табл. 1).

Работа по изучению присутствия окрасочных aberrаций среди молодняка северного морского котика проводилась в природном биосферном заповеднике «Командорский» на лежбищах «Северное» и «Северо-Западное» о-ва Беринга и на лежбищах «Юго-Восточное» и «Уриль» о-ва Медный. Частота появления окрасочных aberrаций регистрировалась в 1998, 2002, 2004, 2006, 2008, 2009, 2010 гг. в период плановых учетов численности животных в августе месяце (рис. 3, а–е; 4).

#### Американская норка клеточного разведения

Американская норка принадлежит к отряду хищных (Carnivora), семейству куньих (Mustelidae), роду ласки и хорьки (*Mustela*). По общепринятым правилам таксономической номенклатуры видовое название американской норки записывается как *Mustela vison* Schreber, 1777 (Есть еще одно гораздо реже используемое название американской норки другого автора –

*Mustela vison* Brisson.). Кариотип американской норки представлен 15 парами хромосом ( $2n = 30$ ) (Волобуев, Терновский, 1974; Терновский, 1977).

В природе на своей исторической родине ареал *Mustela vison* занимает огромное пространство Северной Америки от Аляски до Ньюфаундленда. Несмотря на то что американская норка в пределах своего исторического ареала обитания представляет один вид, систематики выделяют в ней различные географические расы, сформированные отличающимися между собой локальными популяциями. Так, основанная в 1670 г. Пушно-меховая компания Гудзона за залива (Hudson Bay Fur Company) выделяла в ареале норки 16 территорий, на которых звери различались по размеру тела и особенностям мехового покрова (Ness *et al.*, 1988).

J.C.D. Schreber, представляя в 1777 г. первую таксономическую сводку по американской норке, выделил в ареале ее обитания 11 географических рас (Möller, 1930). Позже, в 1950 г., специалист по частной генетике норки из Института генетики Висконсинского университета (г. Мэдисон, США) R. Shackelford, ссылаясь на книгу Н.Е. Antony о северо-американских млекопитающих, так же, как и Schreber, выделял 11 подвидов норки (Schackelford, 1950).

E.R. Bowness (1980) в своей книге о первых канадских норководов указывает, что в доместикацию норки были вовлечены только пять географических рас: *M. vison vison* с восточного побережья Канады (Квебек, Восточный Лабрадор и Новая Шотландия); *M. vison lowii* с северо-восточного побережья США; *M. vison lacustris* – центральные территории южнее границы с США; *M. vison energumenos* – Британская Колумбия; *M. vison ingens* и *M. vison melampeplus* – известные как Юконская и Аляскинская.

В формирование генофонда современной американской норки клеточного разведения наибольший вклад внесли три подвида: *M. vison vison* (Восточный Квебек), отличающаяся небольшим размером тела, с красивым шелковистым коротковолосым мехом; *M. vison ingens* (Аляска, бассейн реки Юкон) – крупная крепкого телосложения норка с грубым мехом и хорошей плодовитостью и *M. vison melampeplus* (полуостров Кенай). При этом самое большое количество зверей для разведения в условиях

**Таблица 1**  
Характеристики волосяного покрова  
у северного морского котика  
в сравнении с некоторыми другими  
видами пушных зверей

| Мех                   | Носкость<br>по шкале<br>Паркера | Густота<br>волос,<br>тыс. шт./см <sup>2</sup> |
|-----------------------|---------------------------------|---|
| Калан (выдра морская) | 120                             | 154,1   |
| Выдра речная          | 100                             | 58,6  |
| Морской котик         | 85                              | 50,0  |
| Соболь                | 80                              | 12,86   |
| Американская норка    | 70                              | 33,72   |
| Горностай             | 25                              | 17,55   |



неволи было изъято из юконской популяции (Ness *et al.*, 1988).

Из всех видов кунных американская норка благодаря существованию меховой индустрии стала главной составляющей бизнеса в международной меховой торговле, именно она получила наибольшее распространение как объект клеточного пушного звероводства. Стараниями звероводов американская норка перешагнула границы своего исторического ареала и стала видом-космополитом, распространилась в короткие исторические сроки с территории Северной Америки в умеренные зоны Южной Америки (Аргентина), в Европу и Азию – Россию, Монголию, Китай, Японию и даже в Африку (ЮАР) (Joergensen, 1984). С точки зрения эволюции для американской норки сложилась уникальная ситуация – она, попав в условия промышленной domestikации, стала самым процветающим видом среди всего видового разнообразия пушных зверей на Земле. Носители редких, порой сублетальных, аллелей, составляющих генетический груз в природных популяциях норок, в новой среде, созданной человеком, получили самое широкое распространение, более того, из них сформированы породы этих животных (Ness, 1958, 1963–1965). Конечно, за такое эволюционное процветание высока и «плата» – до 70 % мирового поголовья норок (50,5 млн голов) ежегодно забивается на производство меховой продукции.

В ходе промышленной domestikации и широкого обмена между зверофермами племенными животными на сегодня сформировался тип окраски американской норки клеточного разведения, получивший название – *стандартная*<sup>1</sup> (генетический символ +/+), в котором уже невозможно найти признаки какой-либо исходной географической расы. Это привело к появлению синонимического названия для американской норки клеточного разведения – *Neovison vison* – наравне с *Mustela vison* Schreber, 1777.

<sup>1</sup> Значение слова *стандарт* происходит от английского *standard* – норма, образец. То есть, если тот или иной продукт сделан по стандарту, значит, изготовлен в соответствии с какой-то нормой, или, другими словами, по образцу. 14 октября 1946 г. в Лондоне открылась конференция национальных организаций по стандартизации. 25 стран включая СССР были представлены 65 делегатами. Результатом их работы стало принятие решения о создании Международной организации по стандартизации – ISO (International Organization for Standardization).

В результате промышленного разведения путем селекции создано три типа стандартных норок, различающихся интенсивностью пигментации волосяного покрова: *коричневые*, *темно-коричневые* и *черные* (Ильина, Кузнецов, 1965, 1983; Ness *et al.*, 1988; Колдаева, 2004).

Более чем за вековой срок разведения в условиях неволи (75 генераций) у американской норки в ходе естественного мутационного процесса, а также вследствие ограничения свободы скрещивания и инбридинга, сопровождавшихся «огомозигочиванием» рецессивных мутаций, привнесенных из природных популяций, находившихся под покровом стандартного фенотипа, уже зарегистрировано 35 аллелей, затрагивающих окраску меха. Из них 22 – рецессивных и 13 – доминантных и полудоминантных. К мутациям у американских норок до сих пор апеллируют как к «чуду», ведь на их основе сегодня получено уже свыше 150 комбинативных окрасочных форм, которые по окраске меха делятся на 6 основных типов: коричневые, голубые, бежевые, белые, черные и пятнистые. Окраска их может быть обусловлена комбинацией только одних рецессивных генов, одних доминантных генов или взаимодействием рецессивных с доминантными (Schackelford, 1941, 1986; Castle, Moor, 1946; Беляев, Ростовцева, 1948; Schackelford, Moore, 1954; Ильина, Кузнецов, 1965, 1983; Беляев, Евсиков, 1970; Smith, 1981; Цветков и др., 1981, 1988; Ness *et al.*, 1988; Тихомиров и др., 1994а, б; Tikhomirov *et al.*, 1996; Trapezov, 1997а, б; Колдаева, 2004).

Для фенотипического сравнения сходства окрасочных aberrаций у северного морского котика с таковыми у норок использовались животные из генетической коллекции мутаций окраски американской норки на экспериментальной звероферме Института цитологии и генетики СО РАН (Трапезов, Трапезова, 2009а).

### Соболь клеточного разведения

















Соболь отнесен систематиками к самому многочисленному виду в отряде хищных млекопитающих (Carnivora). Так же, как и американская норка, соболь принадлежит к семейству кунных (Mustelidae), к роду куниц (*Martes*) и к подроду собственно куниц (*Martes*). Интенсив-



**Рис. 3.** Исследование частоты встречаемости окрасочных aberrаций среди молодняка северного морского котика в возрасте 35–40 дней.  
 Фото В.В. Фомина, С.В. Фомина, Н.С. Фоминой.

а – дикий тип окраски (стандарт, норма); б – золотистый; в – альбинизм; г – хорьковый тип окраски; д – пегость; е – гибель черно-белой формы.



| Стандарт<br>(дикий тип)  | Неспецифическая<br>пегость   | Золотистая<br>окраска  | Акромеланизм  | Альбинизм   | Хорьковый тип  |
|--|--|--|---|---|--|
|   |   |   |   |  |   |
|   |   |   |   |  |   |
|  |  |  | По данным А.Л. Пономарева акромеланизм у соборлей тобольского и енисейского краёв (географические расы) встречается с частотой 1 : 500 (Пономарев, 1938). |   |  |

**Рис. 4.** Фенотипический параллелизм в aberrациях окраски волосяного покрова у северных морских котиков (верхний ряд), американских норок (средний ряд) и соборлей (нижний ряд). Фото aberrантных окрасок соборлей выполнены Е.М. Колдаевой и Е.Г. Сергеевым.

ность пигментации волосяного покрова соболей изменчива: наиболее светлые уральские и камчатские соболя<sup>2</sup>, темных особей больше среди баргузинских и якутских соболей. Следует заметить, что темные окрасочные формы соболей в природных условиях вообще встречаются редко, даже среди знаменитых баргузинских соболей, добываемых охотничьим промыслом, около половины особей имеют средний или светлый тон окраски (Сабанеев, 1875; Бакеев и др., 2003).

Высокая ценность соболиного меха привела к его неконтролируемому и хищническому промыслу, вызвавшему глубокую депрессию численности соболя как вида. К 1930-м годам ареал соболя распался на отдельные островные очаги, сохранившиеся в основном в южной части Восточной Сибири (Алтае-Саянское нагорье и Прибайкалье). В ряде регионов Западной Сибири он исчез полностью (Монахов, Бакеев, 1981; Монахов и др., 1982). Одной из мер по сохранению соболя как вида явилось создание специализированных соболеводческих хозяйств (Портнова, 1966).

Современный генофонд соболей клеточного разведения комплектовался в 1929–1932 гг. из амурских, енисейских, баргузинских и алтайских географических рас (кряжей). Изъятые из природы животные не обладали нужной для селекции окраской, так как отловить в тайге избирательно соболей желательной темной окраски было технически невозможно. Поэтому в исходном для клеточного разведения поколении 1932 г. только 4 % зверей имели нужную для дальнейшего подбора пар темную окраску меха (Ильина, 1935; Павлов, Балиева, 1941; Портнова, 1941, 1966; Старков, 1947; Куличков, Портнова, 1967; Кудина, 1969; Павлюченко и др., 1979; Ильина Кузнецов, 1983; Колдаева, 2004).

Н.А. Пономаревым одновременно с животоловом соболей проводился учет окрасочных aberrаций, встречавшихся в природных условиях. Он выделил следующие фенотипы: акроме-ланисты, хромисты, пегие, белые (имеющие на крестце, горле и лапах светлый кремовый налет,

а также коричневато-оранжевые тона на брюшке и на спине по позвоночнику) (Пономарев, 1938). Более поздние исследователи добавляют к этому перечню соболей дымчатой окраски, с подпалами и т. д. (Терновская, Терновский, 1971; Монахов, Чеглаков, 1973; Чеглаков, 1977, 1980, 1986). О концентрации в популяции соболей aberrантных окрасочных форм Бакеев с соавт. напишут: «...в среднем на 25–30 тыс. соболей «стандартной» окраски встречаются звери мутантной формы с необычной окраской – кремовой, оранжевой, светло-охристой, серо-голубой, пегой, белой и других тонов» (Бакеев и др., 2003. С. 123).

За прошедшие 25 генераций промышленной domestikации соболей на специализированных зверофермах зафиксировано появление *de novo* зверей с неспецифическими пегостями в виде обширной белой пятнистости или пегостями на лапах, кончике хвоста, мордочке и туловище. Размер и цвет пятен сильно варьируют. Окраска пятен может быть не только белой, но и желтой различной интенсивности. У пятнистых соболей глаза часто бывают синими или голубыми, а носовое зеркало частично или полностью депигментировано. По характеру наследования этого окрасочного новшества было высказано предположение о наличии у соболей двух мутаций, определяющих проявление белой пятнистости. Гомозиготные особи гибнут на пренатальной или постнатальной стадии развития. Отмечался лишь единичный случай рождения белого соболя, дожившего до 45-дневного возраста (Кудина, 1969; Ильина, Кузнецов, 1983; Снытко, Уткин, 1984; Колдаева, 2004).

С 1970-х гг. во ВНИИ охоты и звероводства им. Б.М. Житкова предпринимались непродолжительные эксперименты по выяснению наследования aberrантных окрасок у соболей (Монахов, Чеглаков, 1973; Чеглаков, 1980, 1986).

Начиная с 1981 г. в зверосовхозе «Пушкинский» у соболей стали регистрировать появление *de novo* оригинальных окрасочных aberrаций, сходных с хорошо описанными мутантными окрасками у норок: *паломино*, *пастель*, *лаванда*, *серебристо-голубые* (Кузнецов и др., 2007; Кузнецов, Сергеев, 2009а–в, 2010). Окрасочные новшества, возникшие на соболиной ферме данного хозяйства, были использованы для фенотипического сравнения с окрасочными aberr-

<sup>2</sup> Как произносится и пишется во множественном числе слово *соболя*: *соболи* или *соболя*? Ответ следует искать в параллельной этимологии слов: *учитель*, *тополь*, *табеля*. Пишется и произносится: *учителя*, *тополя*, *табеля*. По аналогии с ними следует – *соболя* (Трапезов, Трапезова, 2001).

рациями, зарегистрированными в командорской популяции северного морского котика (рис. 3).

### Результаты

На всех лежбищах островов Командорского архипелага ежегодно насчитывается около 240 тыс. северных морских котиков. Из них на долю молодняка, родившегося и выжившего к моменту учета, в среднем приходится 56 тыс. голов. С учетом погибших обций ежегодный приплод молодняка в командорской популяции котиков насчитывает в среднем 58,5 тыс. голов (Результаты исследований..., 1998–2010). Основную массу учтенного поголовья котиков составляют стандартно окрашенные животные. Аберрантные окрасочные формы представлены единичными особями (как правило, молодняком-сеголетками). Частота их присутствия в среднем составляет порядок величин  $10^{-4}$  (табл. 2).

Из всех аберраций окраски волосяного покрова в командорской популяции северного морского котика наиболее распространен *альбинизм*. Если все складывается благополучно, у альбиносов появляется шанс дожить до половозрелого состояния и дать потомство. Так, начиная с 2002 г. на Северном лежбище о. Беринга в течение нескольких лет подряд учитывалась взрослая самка-альбинос. В 2006 г. на участке «Кишечное» Северного лежбища эта самка кормила нормально окрашенного черного щенка, что предполагает рецессивность окраски матери-альбиноса и гетерозиготность по этой же окраске ее детеныша. Специалистам, изучающим материнское поведение морского котика, хорошо известно, что самка кормит только своего детеныша, находя его среди тысяч других (возможно, при помощи слуха и обоняния) (Мараков, 1972, 1974; Крученкова, 2009). В данном случае можно предположить, что этот черноокрашенный щенок дикого типа был именно ее детеныш. Но нужно иметь в виду, что литературные данные по материнскому поведению аберрантных по окраске северных морских котиков отсутствуют, и не исключено, что мутации, затрагивающие окраску волосяного покрова, могут приводить к нарушению материнского поведения, и аберрантная по окраске самка способна выкармливать любого щенка,

в том числе и чужого нормально окрашенного. Поэтому окончательный ответ о генотипе матери и детеныша может быть возможен только при постановке полного генетического анализа.

*Золотистые* животные имеют золотисто-окрашенными все категории волос. Глаза, как правило, светло-голубые. Кожа лап розовая.

Для *пегих* котиков характерно наличие депигментированных или слабо пигментированных участков тела большего или меньшего протяжения. Пегости чаще локализуются на голове, в редких случаях носят неспецифический характер – охватывают туловище. Проявление пегостей часто коррелирует со светло-голубой окраской глаз. Нередко пегости бывают не белыми, а кремового оттенка.

У *котиков-акромеланистов* пигментированы лишь выступающие части тела: уши, лапы, кончик морды, глаза.

Для аберрантов *хорькового типа* характерно ослабление окраски подпуши на фоне коричневой окраски кроющего волоса. Глаза светло-голубые. Кожа лап розовая.

Сейчас невозможно что-либо сказать о фенотипике вышеперечисленных окрасочных аберраций в командорской популяции северного морского котика, поскольку организация проведения гибридологических экспериментов с ними на данный момент исключена по причинам крайней сложности в техническом исполнении. Можно лишь подразумевать, что эти аберрации окраски наследуются моногенно, давая при скрещивании менделевское расщепление.

### Обсуждение

Homologue ... The same organ in different animals under every variety of form and function.

R. Owen, 1843

Абсолютное большинство особей северного морского котика Командорского архипелага представлено животными стандартного типа окраски. Стандартный фенотип, дикий тип или норму (+/+) можно определить как совокупность жизненных циклов особей данного вида или их стадий, возникающих как наследственно устойчивый или адаптивный ответ на воздействия внешней среды. Каждая особенность, каждый



Таблица 2

Частота встречаемости окрасочных aberrаций  
в командорской популяции северного морского котика  
на лежбищах «Северное», «Северо-Западное» и «Урилье» в августе месяце  
(взрослые и молодняк в возрасте 35–40 дней) в период 1998–2010 гг.

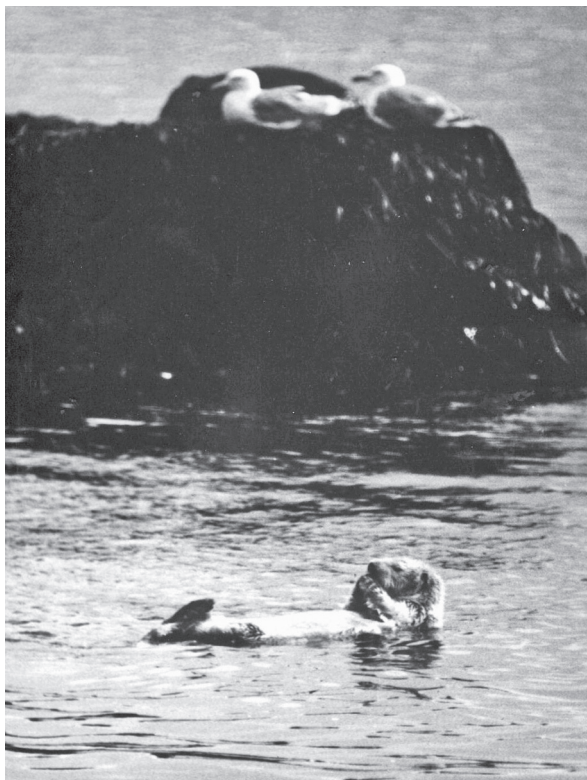
| Фенотип окрасочных aberrаций | Количество окрасочных aberrаций среди общего количества учтенного молодняка вместе с павшими животными на лежбище в год исследования |                                       |                                      |   |                                      |                                       |   |
|------------------------------|--|---------------------------------------|--------------------------------------|---|--------------------------------------|---------------------------------------|---|
|                              | 1998   | 2002                                  | 2004                                 | 2006                                      | 2008                                 | 2009                                  | 2010  |
|                              | 26738 (Северное),<br>9532 (Сев.-Зап.)  | 28745 (Северное)<br>9014 (Сев.-Зап.)  | 23074 (Северное)<br>7803 (Сев.-Зап.) | 24598 (Северное)<br>10346 (Сев.-Зап.)     | 23220 (Северное)<br>8288 (Сев.-Зап.) | 21402 (Северное)<br>10181 (Сев.-Зап.) | 26130 (Северное)<br>9406 (Сев.-Зап.)<br>7300 (Урилье) |
| Черно-белые                  | 0  | 0                                     | 0                                    | Северное<br>1 авг.<br>1 щенок<br>(павший) | 0                                    | 0                                     | 0   |
| Пегость + голубые глаза      | 0  | 0                                     | 0                                    | 0   | 0                                    | Северное<br>3 авг.<br>1 щенок         | 0   |
| Пегость                      | 0  | 0                                     | 0                                    | 0   | Северное<br>2 авг.<br>1 щенок        | 0                                     | 0   |
| Неспецифическая пегость      | 0  | 0                                     | 0                                    | 0   | 0                                    | 0                                     | о. Медный,<br>Урилье<br>6 авг.<br>1 щенок             |
| Золотистая окраска           | Северное<br>2 авг.<br>1 щенок  | 0                                     | 0                                    | 0   | 0                                    | 0                                     | Северное,<br>5 авг.<br>1 щенок                        |
| Акромеланизм                 | 0  | 0                                     | 0                                    | 0   | Северное<br>август<br>Взрослая самка | 0                                     | 0   |
| Альбинизм                    | Северное<br>2 авг.<br>Взрослая самка   | Северное<br>15 авг.<br>Взрослая самка | Северное<br>2 авг.<br>Взрослая самка | Северное<br>август<br>1 щенок             | 0                                    | 0                                     | 0   |
| Хорьковый тип                | 0  | 0                                     | Северо-Западное<br>3 авг.<br>1 щенок | 0   | Северо-Западное<br>2 авг.<br>1 щенок | 0                                     | 0   |

признак в этой среде подвергаются испытанию, и каждый уже отобранный признак коррелированно становится фактором других признаков. Стандартные формы выживают, нестандартные за редким исключением не доживают до половозрелого состояния или не оставляют потомства, хотя, быть может, гибнущие – крупнее, красивее своих собратьев – тех, кто принял участие

в воспроизведении следующего поколения. В итоге образуется стандартная согласованность форм и расцветок, размеров и функций. Такой отбор в пользу нормы, гибель всех отклонений от нее И.И. Шмальгаузен назвал стабилизирующим отбором (Шмальгаузен, 1982).

В то же время наблюдаемые окрасочные aberrации у северного морского котика не пред-

ставляют собой уникальное явление, свойственное только данному виду. Аберративная изменчивость в окраске представляет собой всеобщий процесс. Так, материалы, накопленные в фондах Дарвиновского музея, показывают, что есть черный волк, черная рысь и черный заяц, и наоборот – белые ворон, баклан, павлин, еж (Котс, 1937; Костина и др., 1982). Такое явление, как альбинизм, встречается у всех живых организмов без исключения. Этим животным приписывались даже мистические свойства. Например, героем известного американского романа Г. Мелвилла «Моби Дик» является кит-альбинос. Величественные морские картины, захватывающий сюжет, описания человеческих характеров в сочетании с универсальными философскими обобщениями делают эту книгу подлинным шедевром мировой литературы. И видимо, совсем не случайно и совершенно независимо в алеутском эпосе присутствует поверье: белый калан – это «каланий тойон», он появляется один раз в сто лет, и большая удача тому, кто его встретит (рис. 5).



**Рис. 5.** Калан-альбинос в бухте Запалата о-ва Медный. Фото С.В. Маракова 6 июля 1962 г.

Изучение окраски волосяного покрова у различных животных имеет в генетике достаточно длительную историю (Sturm, 2006), но все еще не получает окончательного объяснения удивительное явление, которое называют *фенотипическим параллелизмом в изменчивости*, который наблюдается достаточно давно (Duval-Jouve, 1865; Cope, 1896; де Фриз, 1912; Osborn, 1917; Заварзин, 1925; Оленов, 1965; Захаров, 1982; Медников, 1981, 1983, 1989а, б; Раутиан, 1987).

Как следует интерпретировать фенотипическое сходство в аберрациях окраски у представителей трех совершенно разных таксонов: северных морских котиков, американских норок и соболей? На первый взгляд это зримое сходство побуждает апеллировать к закону гомологических рядов в наследственной изменчивости (Vavilov, 1922). Исходя из прогностических возможностей в отношении параллельной изменчивости у разных таксонов этот закон был воспринят как «таблица Менделеева в биологии» (Hammer, Schubert, 1994; Popov, 2002; Zakharov, 2005; Bogdanov *et al.*, 2007; Юрченко, Захаров, 2007; Шумный, 2007; Трапезов, 2007; Sommer, 2008; Суслов, Колчанов, 2009). Но несмотря на эвристически сильную сторону закона, он не объясняет причину и эволюционно-генетический смысл фенотипического сходства окрасочных аберраций у этих трех видов. Напомним параграф «Конвергенции признаков» в дарвиновском «Происхождении ...»: «Невероятно, чтобы потомки двух организмов, первоначально заметно между собой различавшихся, могли сблизиться в такой степени, которая привела бы к почти полной идентичности всей их организации». И далее, в пятой главе, разбирая законы вариации, Дарвин продолжает: «Различные виды представляют аналогичные вариации, вследствие чего разновидность какого-либо вида нередко приобретает признак, свойственный родственному виду...» (Дарвин, 1991. С. 114, 136, 137). Раздумывая над фактами подобного рода, Дарвин проводил параллели между сходством в форме черепа у породы южноамериканского скота ньята, бульдога и мопсообразных пород собак (Darwin, 1845). И все же со времен Ч. Дарвина хотя концепция гомологии и составляет центральную часть эволюционной и сравнительной биологии, ее

точное определение, несмотря на множество ее интерпретаций, крайне противоречиво (de Beer, 1971; Abouheif, 1997; Wagner, 2007; Sommer, 2008). Более того, наличие фенотипического параллелизма, казалось бы, противоречит дарвиновскому положению о неопределенной изменчивости, что и послужило в свое время основой для формирования номогенетического толкования эволюции. Достаточно вспомнить хорошо известное выражение автора эволюции на основе закономерностей Л.С. Берга о том, что «своими наблюдениями и опытами Вавилов проводит идею номогенеза более успешно, чем это делаю я в настоящей работе» (Берг, 1977. С. 224). Точку зрения Л.С. Берга как антитезу дарвиновской эволюции активно поддерживал биолог широкого профиля, математик и философ А.А. Любищев. Наиболее полно свое одобрение номогенеза он изложил в выпускаемых с конца 1960-х гг. под редакцией Н.Н. Воронцова сборниках «Проблемы эволюции». В статье «О постулатах современного селектогенеза» Любищев писал: «Живи Дарвин до настоящего времени и сохрани полную свежесть мысли и работоспособности, он был бы в лагере антидарвинистов» (Любищев, 1973. С. 45).

В обсуждении сложности природы параллелизма в изменчивости организмов двумя выдающимися генетиками Н.И. Вавиловым и Ю.А. Филипченко выделились два подхода: стремление первого к самым широким обобщениям и склонность второго к углубленному анализу вопроса и собиранию научных фактов (Захаров, 1982). В своей статье «О параллелизме в живой природе», посвященной анализу закона гомологических рядов в наследственной изменчивости Вавилова, Филипченко писал: «...можно ли признать все явления, описанные до сих пор под именем параллелизма в различных группах, за явления одного порядка, и нет ли тут на самом деле некоторого смешения различных вещей?» (Филипченко, 1924. С. 248). В четвертом издании своей книги «Изменчивость и методы ее изучения» Ю.А. Филипченко предлагает параллелизм, имеющий внешнее сходство и зависящий в то же время от совершенно различных причин, разделить на три категории:

1) генотипический параллелизм, основанный на наличии у близких видов одинаковых генов и сходных биотипов;

2) экотипический параллелизм, основанный на появлении в виде ответа организма на внешние воздействия сходных экотипов, что может зависеть у близких видов от одинаковых, у далеких – от совершенно различных генотипических структур;

3) морфологический параллелизм, основанный на одинаковых возможностях развития наружных и внутренних макроскопических и микроскопических структур и наблюдающийся в более крупных систематических группах, к особенностям которых понятие о генах и генотипической структуре вообще не приложимо (Филипченко, 1929. С. 202).

Далее он продолжает: «Поскольку Вавилов включил в закон гомологических рядов случаи генотипического параллелизма (число которых в настоящее время увеличилось во много раз), он действительно чрезвычайно удачно формулировал то, что является весьма характерным для явлений групповой (*наследственной* (Захаров, 1982)) изменчивости. Однако в примерах, приводимых Вавиловым, фигурируют и явления (например, мимикрия), которые относятся не к генотипическому параллелизму, а к экотипическому, также характерному для групповой изменчивости» (Филипченко, 1929. С. 203).

Н.И. Вавилов в окончательной редакции своего труда полностью принимает замечания Филипченко о необходимости различения фенотипической и генотипической изменчивости, введя соответствующий раздел (§ 4). Там он пишет: «Генетические исследования заставляют нас быть более осторожными и по внешнему виду не судить о неперменном сходстве генотипического порядка. Фенотипическое исследование есть первое приближение, за которым должно идти генетическое исследование» (Вавилов, 1935. С. 36, 37). То есть гомологичные признаки не обязательно имеют один и тот же генетический базис. Хотя этот недостаток не распространяется на гомологию генов, которые передаются вертикально, т. е. непрерывно в ряду поколений (Юрченко, Захаров, 2007).

Н.И. Вавилов, ссылаясь на опыты А.Н. Луткова, получившего безлигульные рентгеномутанты ячменя, указывал, что гомология, истинная на уровне фенотипа, на уровне генотипа может оказаться ложной: «Одинаковые изменения фенотипического порядка могут

быть вызваны и разными генами» (Вавилов, 1967. С. 48). Особенно четко точка зрения Н.И. Вавилова выражена в его письме к Г.С. Зайцеву, опубликованном в 1977 г. в журнале «Природа»: «...признаки морфологические, равно как физиологические, могут и при внешней однородности быть разнородны генетически... Признак есть условная ступень в анализе формы» (Вавилов, 1977. С. 105).

Здесь позиция Н.И. Вавилова очерчена совершенно недвусмысленно: о какой-либо регулярной параллельности изменений правомочно говорить, подразумевая генетическое единство дивергирующих форм. Эту оценку Вавилова необходимо вспомнить именно сейчас, когда современные приверженцы номогенетических толкований эволюции склонны рассматривать новейшие, действительно впечатляющие, достижения молекулярной эволюции как долгожданное «прямое» доказательство правоты номогенеза, вновь апеллируя к закону Вавилова (Родин, 1989). Но сложность механизмов, лежащих в основе параллелизмов изменчивости, продолжает приводить к неоднозначности в филогенетических построениях. Одним из наглядных примеров такой сложности могут быть современные работы по поискам и картированию главных генов количественных признаков, в которых достаточно часто обнаруживается, что одинаковое проявление одного и того же признака может быть обусловлено полиморфизмом разного набора главных («критических») для этого признака генов (Sinha *et al.*, 2006). Несмотря на развитие методов молекулярной генетики, до сих пор не удалось количественно описать параллельные замены на молекулярном уровне (Wolf *et al.*, 2002; Snel *et al.*, 2005). В итоге почти вековая история открытия закона Вавилова и огромное количество подтверждающих его наблюдений все еще оставляют этот закон на уровне описания феномена, механизмы которого неизвестны (Рогозин и др., 2008). Видимо, не зря один из главных «архитекторов» синтетической теории эволюции Э. Майр расценивал «закон гомологических рядов в наследственной изменчивости» всего лишь как указание на *признак*, который можно использовать в таксономических изысканиях, а не на *упорядоченность* и *ограничения изменчивости* (Mayr, 1942; Майр, 1947).

В 1940 г. английский генетик и эколог Э. Форд ввел понятие *полиморфизм популяций* как существование в популяции одновременно двух или более генотипически различающихся форм, причем частота наиболее редкой формы все же достаточно велика, чтобы ее поддержание можно было объяснить мутационным давлением (Ford, 1964).

Данные по природным популяциям показали, что гетерозиготные особи имеют повышенную жизнеспособность, а в некоторых случаях и повышенную плодовитость по сравнению с гомозиготами. Внутри популяций гетерозиготные формы отличаются повышенными скоростью роста, выживаемостью и морфологической стабильностью. Наблюдение о том, что сверхдоминирование (однолокусный гетерозис) дает столь существенное увеличение относительной приспособленности гетерозигот по сравнению с гомозиготами, сформировало представление об отборе на гетерозиготность, о том, что существует постоянный отбор в пользу гетерозигот (L'Heritier, Teissier, 1933; Мазинг, 1938, 1939; Дубинин, 1940; Dobzhansky, 1970). Как отметил С.С. Четвериков (1926), гетерозиготность по разным аллелям «пропитывает вид во всех направлениях» и в результате случайных комбинаций постепенно «заражает» большинство индивидов вида. Вследствие такого селективного преимущества класса гетерозигот над гомозиготами в популяции устанавливается гетерозиготный полиморфизм, который постоянно поддерживается давлением естественного отбора (Беляев и др., 1968; Беляев, Евсиков, 1968; Евсиков, 1987).

Отсюда появление абберантных окрасочных вариантов в популяции морских котиков можно объяснить огомозиготиванием присутствующих в ней в гетерозиготном состоянии мутаций, затрагивающих окраску волосяного покрова.

Полиморфизм имеет место в любой системе объектов. С точки зрения общей теории систем полиморфизм, или множественность форм, дополняется своей противоположностью — *изоморфизмом* (сходством, соответствием, симметрией, непротиворечивостью или равномерностью) (Вернадский, 1892; Алтухов, Рычков, 1972). Это понятие вошло в другие области знания и стало определяться как сходство высокой степени. Примером изоморфизма может служить внешнее сходство морозных



узором на оконном стекле со многими видами растений. Обобщенное учение об изоморфизме сформировало представление о биоизоморфизме, впоследствии развитом Л.С. Бергом (1977) в его номогенетической теории эволюции на основе закономерностей. Изоморфизм возникает на основе параллелизма и конвергенции, когда высокая степень внешнего сходства организмов зачастую определяется не генетической тождественностью, а тождественностью каналов отбора. Так, втянутые в схожие каналы отбора приобретают внешнее сходство сельдевая акула и дельфин, речной бобр и морская выдра-калан.

Возможно ли истолковывать феномен параллелизма-изоморфизма в абберациях окраски у представителей трех разных таксонов (котиков, норок и соболей клеточного разведения) без анализа их адаптивной ценности? Вряд ли, ведь любое проявление такого характера изменчивости (кстати, как и любой другой изменчивости) проходит оценку на адаптивность естественным отбором (Медников, 1981, 1983, 1989а, б).

Как показали модельные эксперименты Д.К. Беляева в 1970-х гг., резкие изменения среды, провоцируя состояние стресса, мобилизуют в популяциях животных скрытую генетическую изменчивость, что, в свою очередь, облегчает поиск и отбор наиболее адаптивных к экстремальным условиям жизни вариантов животных (Беляев, 1979; Belyev, Borodin, 1982). Так, в экспериментах, проведенных на американской норке, было показано, что гетерозиготность по локусам окраски дает селективное преимущество их носителям по сравнению с гомозиготными формами по тем же локусам окраски в условиях экстремального дефицита в кормовой обеспеченности (Трапезов, 1978; Трапезов, Беляев, 1978; Трапезов, Маркель, 1989; Трапезов, Прасолова, 1990, 1997; Трапезов и др., 1999; Trapezov, 2004; Трапезов, Трапезова, 2009б). Применимы ли параллели с гетерозиготностью по мутациям окраски у американских норок к северным морским котикам?

Внешнее сходство в абберациях окраски у северных морских котиков, американских норок и соболей не дает оснований (без молекулярно-генетического анализа) судить о сходстве генотипического порядка, его можно отнести к разряду изоморфизма. Но в то же время исходя

из поразительного сходства в фенотипической изменчивости по абберациям окраски у рассматриваемых трех видов, достаточно далеких по происхождению, можно подразумевать наличие у них специфической генной компоненты, попадающей под давление сходного канала отбора.

В чем идентичность условий существования северного морского котика в сравнении с норками и соболями, попавшими в условия клеточного заточения? В том, что все три вида, в своей истории внезапно по эволюционным меркам оказавшись на расстоянии вытянутой руки человека, подверглись беспрецедентному давлению антропогенного стресса. По существу они оказались втянутыми в один и тот же канал отбора, а конкретно – на способность не только выживать, но и давать потомство в условиях стрессирующей антропогенной среды (рис. 6). То есть речь идет о сходной наследственно детерминируемой, канализируемой изменчивости фенотипов – изменчивости в определенном канале отбора, когда в ряду поколений в одном и том же направлении реорганизуются гормональные регуляционные механизмы, нейрохимические механизмы головного мозга, возникают одни и те же морфологические и физиологические изменения.

Можно говорить, что у разных видов наряду со свойственной им спецификой имеется общий признак – «гены стрессоустойчивости», замаркированные сходными абберантными окрасками. Для стабилизирующего отбора подобного рода окрасочные абберации в гомозиготном состоянии, вызывая системные отклонения от нормы, снижают приспособленность несущих их особей и элиминируются из популяции, поскольку отбор действует не на конкретный аллель или признак, а на целый организм, т. е. на всю особь. В то же время гетерозиготность по этим же абберациям окраски дает их носителям селективное преимущество для выживания, а самое главное – повышает шанс оставить потомство.

Результат неконтролируемого хищнического промысла стал для котиков в свое время катастрофой – миллионное поголовье этого вида ластоногих по всему ареалу к началу минувшего века сократилось до нескольких тысяч. В 1911 г. страны, вовлеченные в коммерческий промысел на северных морских котиков, договорились прекратить его вообще. И численность их тут





**Рис. 6.** Забой северных морских котиков напротив поселка Глинка на о. Медный.  
Фото Николая Никитича Лукина-Федотова, 1895 г.

же стала возрастать – уже в 1950-х гг. в строго ограниченных пределах появилась возможность возобновить промысел драгоценного меха. К примеру, на островах Прибылова восстановление численности популяции котиков шло со скоростью 8 % ежегодно, и через два десятилетия популяция стабилизировалась на численности около полумиллиона взрослых самок и на этом уровне сохраняется и сейчас. История восстановления этой популяции морских котиков и обзор ее динамики были в свое время представлены в статье Т. Smith и D. Polacheck (1981).

Командорская популяция котиков также стабилизировалась, и научно обоснованное промысловое изъятие, в основном самцов препродуктивного возраста, можно доводить до 3 тыс. голов в год. Котики способны отдавать эту популяционную дань меховой промышленности.

За повышенную приспособленность гетерозигот (сверхдоминирование) популяция «платит» выщеплением менее жизнеспособных гомозигот – так называемый «сегрегационный» генетический груз, в равновесном состоянии описываемый формулой Харди–Вайнберга. В норме плата за такую генетическую адаптацию оказывается «приемлемой», поскольку соотношение гомо- и гетерозигот авторегулируется и поддерживается на устойчивом уровне. Этот

уровень является оптимальным, поскольку как убыль гетерозиготности, так и ее чрезмерное нарастание (приводящее к нарастанию аутбридинга и к последующему снижению жизнеспособности гибридных комбинаций) одинаково неблагоприятны для нормального функционирования популяции (Алтухов, 1989).

Отсюда можно сделать предположение о том, что в командорской популяции котиков для сохранения популяционного гомеостаза естественный отбор поддерживает численность особей, гетерозиготных по тем или иным локусам, в нужном оптимуме. Для иллюстрации: оптимальный уровень в выборках из популяций беспозвоночных, в том числе таких, как сухопутные улитки, дрозофила, сверчки и мечехвосты, имеет гетерозиготность порядка 15 %, в выборках позвоночных включая рыб, ящериц, грызунов, людей в среднем составляет 6 % (Selander, Kaufman, 1973).

Генофонд других ластоногих – северных морских слонов (*Mirounga angustirostris*) – в сравнении с северными морскими котиками утратил значительную часть своей гетерозиготности, как полагают, вследствие еще более драматического истребления этих животных. Прохождение северными морскими слонами «бутылочного горлышка» привело их к однотипной гомозиготности, что вызывает определенное опасение, что у них истощен не-

обходимый резерв генетической изменчивости, который помог бы им в будущем выдержать возможные резкие флуктуации среды (Bonnell, Selander, 1974).

Можно ли считать такой признак, как проявление окрасочных aberrаций, для командорской популяции северного морского котика адаптивным, не нейтральным? Можно, если допустить, что гетерозиготность по локусам aberrантной окраски дает их носителям большие адаптационные возможности к самым разнообразным агрессивным факторам среды. Такой отбор на гетерозиготность по локусам окраски неизбежно время от времени сопровождается огомозигчиванием отдельных скрытых под покровом стандартного фенотипа мутаций в виде появления с той или иной частотой aberrантных по окраске особей: альбиносов, золотистых и др.

В то же время ничто не ограничивает дальнейшее накопление в командорской популяции котиков генетической изменчивости в виде возникающих *de novo* в ходе естественного мутационного процесса доминантных, полудоминантных и рецессивных мутаций окраски. Возникающие доминантные летальные мутации, как правило, тут же элиминируются, потому что вызывают гибель несущего их организма. Рецессивные летальные мутации сохраняются в гетерозиготах под прикрытием их нормальных вариантов и передаются следующим поколениям. Так в популяциях накапливается генетический груз.

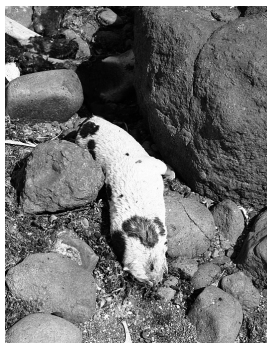
Но здесь нужно иметь в виду, что частота спонтанного мутирования разных генов у различных организмов не одинакова. В 1919 г. в первых опытах Г. Мёллера на дрозофилиной модели было подсчитано, что частота мутационных событий обычно колеблется в пределах  $1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-7}$  на ген за одно поколение (Muller, 1928). Оптимум частоты мутирования был так отработан естественным отбором, что при излишних скоростях мутационных событий ход эволюции не ускорился бы, а резко замедлился и, вероятно, вообще свелся бы к хаотическим флуктуациям – «топтанию на месте» (Demerec, 1926, 1937; Дубинин, 1931, 1940, 1966; Дубинин, Ромашов, 1932; Timofeef-Ressovsky, 1932; Дубинин и др., 1936; Sturtevant, 1937; Шапиро, 1938; Берг, 1943; Шапиро, Игнатъев, 1945; Берг, Тимофеев-Ресовский, 1961; Голубовский,

Викторова, 1968; Медников, 1971; Соколова, Голубовский, 1979; Захаров, 1995; Гершензон, 1997; Захаров и др., 2001, 2008; Иванников и др., 2008).

В итоге в стабильных условиях существования популяции мутационный процесс ведет к накоплению того «резерва наследственной изменчивости», который под покровом стандартного фенотипа обеспечит в будущем возможность генетической адаптации популяции к тем или иным изменениям среды. Смысл мутационной изменчивости в том и состоит, что посредством ее расширяется поле возможностей вида как системы. И особенность этого поля возможностей такова, что оно внутренне противоречиво: если какой-то определенный генотип особенно хорошо приспособлен к условиям данной среды, то почему же все особи популяции не обладают генотипом, который бы обеспечивал такую максимальную адаптацию? Почему популяция удерживает в себе одновременно и вредные летальные мутации, и полезные фенотипы? Почему существует такое противоречие?

Летальные и сублетальные мутации, вызывающие гибель определенной доли потомства животных, необходимы популяции на случай бескормицы, когда у самок возрастает вероятность погибнуть от истощения в период вскармливания щенков молоком. Через гибель определенных генотипов создается оптимальная для данной популяции и данных условий средняя плодовитость (Евсиков, 1987). Этот «безжалостный» механизм обеспечивает защиту вида как системы от катастрофических последствий при некоторых относительно кратковременных изменениях внешней среды (Беляев, 1972). Поэтому естественный отбор поддерживает и сохраняет системы с таким, казалось бы, противоречием, обеспечивая сохранение их устойчивости. Один из творцов немецкой классической философии Г.В. Гегель комментировал такое явление так: ... противоречие не следует считать просто какой-то ненормальностью, встречающейся лишь кое-где, ... нечто жизненно, только если оно содержит в себе противоречие» (Гегель, 1971. С. 59).

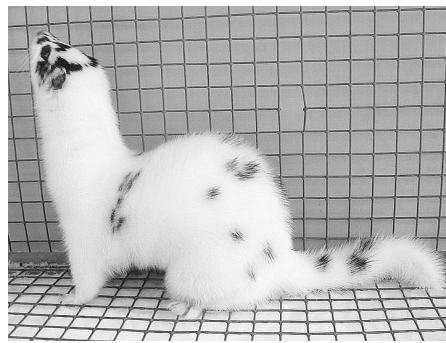
Как оценить в этой популяционной динамике появление уникального и необычного по окраске черно-белого щенка северного морского ко-



Черно-белая абберация окраски волосяного покрова у щенка северного морского котика. Обнаружен погибшим на лежбище «Северное» острова Беринга 1 авг. 2006 г. Примерный возраст 35–40 дней. Фото С.В. Фомина.



Полудоминантная мутация *Грузинская белая* ( $W^G/+$ ) у серебристо-черной лисы. Обнаружена в 1943 г. в зверосовхозе «Бакурианский» в Грузии, получив также названия – *Бакурианская*, *Снежная*. Детальным изучением наследования этой окраски занимались с 1971 г. на экспериментальной звероферме Института цитологии и генетики СО РАН. В гомозиготном состоянии ( $W^G/W^G$ ) является эмбриональной леталью, которая наносит свой смертельный удар еще на доимплантационной стадии развития (Георгидзе, 1948; Беляев и др., 1973; Belyaev *et al.*, 1975; Ильина, Кузнецов, 1983). Фото Е.М. Колдаевой.



Полудоминантная мутация *Карельская темно-коричневая* ( $S^K/+$ ) у американской норки. Обнаружена в 1971 г. в карельском зверосовхозе «Куйтежский» в стаде пастелевых норок, получив название – *Куйтежская пестрая* ( $S^K/+ b/b$ ). Гомозиготы ( $S^K/S^K$ ) дают летальный эффект в неонатальный период. Смерть наступает в возрасте 19–34 дня вследствие функционального поражения паренхиматозных органов, в первую очередь селезенки и печени (Цветков и др., 1981, 1988; Ильина, Кузнецов, 1983; Матыско, Дивеева, 1984). Фото из коллекции генотипов американской норки Института цитологии и генетики СО РАН.

**Рис. 7.** Фенотипический параллелизм между черно-белой абберацией окраски у северного морского котика и полудоминантными мутациями окраски у серебристо-черной лисы и американской норки.

тика, погибшего предположительно в возрасте 35–40 дней в конце июля 2006 г. на лежбище «Северное» о. Беринга (рис. 7). Возможно ли в данном случае искать фенотипический параллелизм с внешне сходными и хорошо описанными полудоминантными мутациями у серебристо-черных лисиц и американских норок, дающими в гомозиготе летальный эффект на разных стадиях онтогенеза? Можно ли допустить, что данная абберация окраски у северного морского котика несет сублетальный эффект? Ответы на эти вопросы даст дальнейшее углубленное изучение феногенетики окрасочных аббераций в популяции северных морских котиков Командорского архипелага.

### Заключение

В чем состоит эволюционно-генетический смысл фенотипического параллелизма в абберациях окраски у представителей трех филогенетически удаленных друг от друга таксонов – северных морских котиков, американских норок и соболей? С точки зрения общей теории систем само существование качественно различных объектов в системе приводит их к

той или иной полиморфизации. И такая полиморфизация сопровождается, как ни парадоксально, ... изоморфизацией. И, наверное, было бы методологической ошибкой преувеличивать или преуменьшать значение одного из них, например полиморфизма, за счет принижения или превознесения другого – изоморфизма. Речь идет о всеобщем и фундаментальном явлении в живой природе. В то же время это явление имеет огромное прикладное значение в животноводческой и природоохранной практике, поскольку предоставляет возможность целенаправленно искать и находить нужные признаки и варианты у различных видов в многообразии форм как диких, так и домашних животных.

Исследование разнообразия окрасочных аббераций в популяции северного морского котика со временем может снова поставить вопрос об организации контролируемого разведения абберантных окрасочных форм этих ценных животных в той или иной части акватории Командорского архипелага (их доместики). План организации такой работы обсуждался еще в послевоенном 1946-м году во время специальной экспедиции, организованной Министерством внешней торговли СССР по изу-





с серыми котиками взятыми на корабль

**Рис. 8.** Остров Онекотан. 1946 г. Изучение возможности промышленной domestikации северного морского котика.

Справа – старейшина отечественного звероводства Е.Д. Ильина (1909–1987). Фото из книги: «Елена Дмитриевна Ильина. Путевые заметки и лирические отступления научного работника». М., 2009. 250 с.

чению возможностей развития клеточного и вольного звероводства как на Командорах, так и на островах Курильской гряды<sup>3</sup> (рис. 8).

В реальности возможного будущего развития проекта domestikации оригинальных окрасочных форм северного морского котика убеждает проводившийся в прошлом уникальный опыт по содержанию в неволе морской выдры-калана на острове Медный, вблизи села Преображенское (Малькович, 1937, 1938, 1955, 1958; Ильина, 1950; Рязанов, 1989; Trapezov, 1998; Трапезов и др., 2002).

### Благодарности

Выражаем признательность за предоставленные материалы нашим коллегам: В.В. Фомину (Северо-Восточное территориальное управле-

ние Федерального агентства по рыболовству), Е.Г. Мамаеву, О.А. Белонович (Камчатский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии); Е.М. Колдаевой (Отдел племенных ресурсов Департамента животноводства и племенного дела МСХ РФ) за ценные замечания и пожелания при обсуждении статьи, а также за предоставленные фотоматериалы по абберантным окраскам у соболей и мутантной окрасочной формы лисы *Грузинская белая* ( $W^{G/+}$ ); Е.Г. Сергееву (Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства РАСХН им. В.А. Афанасьева) за обсуждение материалов статьи и любезно представленные фотоматериалы по абберантным формам у соболей.

### Литература

<sup>3</sup> 2 сентября 1945 г. Япония подписала Акт о безоговорочной капитуляции и 5 сентября 1945 г. все острова Курильской гряды, возвращенные по итогам второй мировой войны под юрисдикцию СССР, были заняты советскими войсками. Уже на следующий год с открытием дальневосточной навигации Е.Д. Ильина на военном тральщике в составе комиссии участвует в оценке состояния лежбищ морских зверей с целью выявления возможностей организации на островах вольных звероводческих хозяйств. В рабочем отчете Е.Д. Ильиной имеется запись: «16/VI-1946 г. Звероводство на Курилах в настоящее время будет сталкиваться с интересами воинских частей. Тем не менее, необходимо выделить 2–3 острова, на которых возможно выпустить зверей, объявив их запретной зоной» (Ильин и др., 2009. С. 221).

- Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: Наука, 1989. 328 с.
- Алтухов Ю.П., Рычков Ю.Г. Генетический мономорфизм видов и его возможное биологическое значение // Журн. общ. биологии. 1972. Т. 33. № 3. С. 281–300.
- Бакеев Н.Н., Монахов Г.И., Синицин А.А. Соболи. 2-е изд., перераб. и доп. Киров: Изд-во «Вятка», 2003. 336 с.
- Беляев Д.К. Проблемы domestikации животных и растений. М.: Наука, 1972. С. 39.

- Беляев Д.К. Дестабилизирующий отбор как фактор изменчивости при domestикации // Природа. 1979. № 2. С. 36–45.
- 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. Генетический синтез норок новых окрасок и перспективы их племенного использования // Генетика. 1970. Т. 6. № 1. С. 54–63.
- Беляев Д.К., Евсиков В.И., Шумный В.К. Генетико-селекционные аспекты моногибридного гетерозиса // Генетика. 1968. Т. 4. № 12. С. 47–62.
- Беляев Д.К., Ростовцева Е.Я. Мутации окраски у норок // Каракулеводство и звероводство. 1948. № 3. С. 63–68.
- Беляев Д.К., Трут Л.Н., Рувинский А.О. Генетически детерминированная летальность у лисиц и возможности ее преодоления // Генетика. 1973. Т. 9. № 9. С. 71–79.
- Берг Л.С. Труды по теории эволюции. 1922–1930. Л., 1977. 387 с.
- Берг Р.Л. Происходит ли элиминация особей, гетерозиготных по летальным мутациям, в популяциях // Изв. АН СССР. 1943. № 4. С. 243–248.
- Берг Р.Л., Тимофеев-Ресовский Н.В. О путях эволюции генотипа // Проблемы кибернетики. М., 1961. Вып. 5. С. 183–197.
- Бычков В.А. Возрастная изменчивость длины и веса тела морских котиков острова Тюленьего // Экология. 1971. № 1. С. 154–172.
- Вавилов Н.И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. М.; Л.: Сельхозгиз, 1935. 56 с.
- Вавилов Н.И. Научные основы селекции пшеницы. Избр. пр.: в 2 т. Л.: Наука, 1967. Т. 2. С. 7–259.
- Вавилов Н.И. Письма Г.С. Зайцеву // Природа. 1977. № 4. С. 102–115.
- Вернадский В.И. О полиморфизме как общем свойстве материи // Уч. зап. Моск. ун-та, отд-ние естественн-исторических наук. 1892. Вып. 9. С. 1–18.
- Владимиров В.А. Структура популяций и поведение северных морских котиков // Ред. В.Е. Соколов, А.А. Аристов, Т.Ю. Лисицына. Северный морской котик: систематика, морфология, экология, поведение. М.: ИПЭЭ РАН, 1998. С. 555–722.
- Волобуев В.Г., Терновский Д.В. Сравнение кариотипов европейской (*Lutreola lutreola*) и американской (*Lutreola vison*) норок // Зоол. журнал. 1974. Т. 53. Вып. 10. С. 1579–1580.
- Гегель Г.В.Ф. Наука логики: в 3 т. Т. 2. М., 1971. С. 66.
- Георгиев В.К. Белая лиса // Каракулеводство и звероводство. 1948. № 2. С. 57–59.
- Гершензон С.М. «Вспышки» мутаций некоторых генов в природных популяциях *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1997. Т. 33. № 4. С. 421–430.
- Голубовский М.Д., Викторова Г.В. Концентрация и аллелизм летальных мутаций в соседних природных популяциях *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1968. Т. 4. № 8. С. 48–57.
- Дарвин Ч. Происхождение видов путем естественного отбора или сохранение благоприятствуемых пород в борьбе за жизнь. Пер. с шестого издания (Лондон, 1872) / Отв. ред. А.Л. Тахтаджян. СПб: Наука. С.-Петербургское отд-ние, 1991. 539 с.
- де Фриз Г. Мутации и периоды мутаций при происхождении видов. СПб, 1912. Изд. М.И. Семенов.
- Дубинин Н.П. Генетико-автоматические процессы и их роль в процессе органической эволюции // Журн. общ. биологии. 1931. Т. VII. Вып. 5/6. С. 463–479.
- Дубинин Н.П. Дарвинизм и генетика популяций // Усп. соврем. биологии. 1940. Т. 13. № 2. С. 276–305.
- Дубинин Н.П. Эволюция популяций и радиация. М.: Атомиздат, 1966. С. 478–479.
- Дубинин Н.П., Гептнер М.А., Демидова З.А., Дьякова Л.И. Генетическая структура и динамика природных популяций *Drosophila melanogaster* // Биол. журнал. 1936. Т. 5. С. 939–976.
- Дубинин Н.П., Ромашов Д.Д. Генетическое строение вида и его эволюция // Биол. журнал. 1932. Т. 1. № 5/6. С. 52–95.
- Евсиков В.И. Генетико-эволюционные аспекты проблемы гомеостаза плодовитости млекопитающих (на примере норки) // Генетика. 1987. Т. XXIII. № 6. С. 988–1002.
- Заварзин А.А. Параллелизм структур как основной принцип морфологии // Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie. 1925. Bd. 124.
- Захаров И.А. Генетики и эволюционисты – Ю.А. Филипченко и Н.И. Вавилов // Природа. 1982. № 6. С. 81–86.
- Захаров И.К. Мутации и мутационный процесс в природных популяциях *Drosophila melanogaster*: Дис ... д-ра биол. наук. Новосибирск: Ин-т цитологии и генетики СО РАН, 1995. 48 с.
- Захаров И.К., Ваулин О.В., Илинский Ю.Ю. и др. Источники генетической изменчивости в природных популяциях *Drosophila melanogaster* // Информ. вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 1/2. С. 112–126.
- Захаров И.К., Юрченко Н.Н., Иванников А.В. и др. Вспышки мутаций и транспозоны в природных популяциях *Drosophila melanogaster* // Информ. вестник ВОГиС. 2001. № 16. С. 10–12.
- Иванников А.В., Синянский Я.Я., Юрченко Н.Н. и др. Летальные мутации в популяциях *Drosophila me-*



- lanogaster* Северной Евразии // Информ. вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 3. С. 392–398.
- Ильин О.Г., Ильина О.Д., Докучаева С.О. Елена Дмитриевна Ильина. Путевые заметки и лирические отступления научного работника. М., 2009. 250 с.
- Ильина Е.Д. Основы генетики и селекции пушных зверей. Главпушнина НКВТ, 1935.
- Ильина Е.Д. Котики на Командорских островах. М.: Россельхозиздат, 1940.
- Ильина Е.Д. Остров Тюлений и его промысловые богатства. М.: Россельхозиздат, 1949.
- Ильина Е.Д. Островное звероводство. М.: Междунар. книга, 1950. 302 с.
- Ильина Е.Д. Морские котики. М.: Россельхозиздат, 1951.
- Ильина Е.Д., Кузнецов Г.А. Генетические основы разведения цветных норок. М.: Россельхозиздат, 1965. 94 с.
- Ильина Е.Д., Кузнецов Г.А. Основы генетики и селекции пушных зверей. М.: Колос, 1983. 279 с.
- Колдаева Е.М. Генетика и селекция (книга первая). М.: ФГУП Изд-во «Известия», 2004. 296 с.
- Костина И.Л., Раутиан А.С., Раутиан Г.С. Сравнительная и эволюционная морфология окраски оперения птиц по материалам фондов Государственного Дарвиновского музея. М., 1982.
- Котс А.Ф. О гомологических рядах в окраске оперения Tetraonidae и Phasianidae // Памяти акад. М.А. Мензбира. М.; Л., 1937. С. 211–234.
- Крученкова Е.П. Материнское поведение млекопитающих. М.: МГУ, 2009. 207 с.
- Кудина Н.И. Материалы научной конференции МВА по вопросам ветеринарии, зоотехнии, товароведения. М., 1969.
- Кузин А.Е. Северный морской котик. М., 1999. 396 с.
- Кузнецов Б.А. Аберративная изменчивость окраски пушных зверей // Тр. Моск. зоотехн. ин-та. 1941. Т. 1. С. 134–141.
- Кузнецов Г.А., Сергеев Е.Г. Наследование нестандартной окраски у клеточных соболей // Кролиководство и звероводство. 2009а. № 3. С. 13–17.
- Кузнецов Г.А., Сергеев Е.Г. Перспективы создания цветных форм соболей (*Martes zibellina* Linnaeus, 1758) // Информ. вестник ВОГиС. 2009б. Т. 13. № 3. С. 605–611.
- Кузнецов Г.А., Сергеев Е.Г. Генетика окраски волосяного покрова пастелевых соболей // Матер. всерос. конф. посв. 100-летию Е.Д. Ильиной. М., 2009в. С. 27–31.
- Кузнецов Г.А., Сергеев Е.Г. Особенности окраски потомков первого поколения от скрещивания стандартных и пастелевых соболей // Матер. междунар. науч.-практ. конф., посв. 80-летию Вятской гос. с-х. академии. Киров, 2010. С. 149–150.
- Кузнецов Г.А., Сергеев Е.Г., Ручкина З.С. Белый соболь // Междунар. конф. 75 лет. НИИПЗК. Пробл. восстановления и дальнейшего развития клеточного пушного звероводства. Родники, НИИПЗК, 2007. С. 92–97.
- Куличков Б.А., Портнова Н.Т. Русский соболь. М.: Колос, 1967.
- Любищев А.А. О постулатах современного селектогенеза // Проблемы эволюции / Ред. Н.Н. Воронцов. Новосибирск: Наука, 1973. Т. III. С. 31–57.
- Мазинг Р.А. Повышенная жизнеспособность гетерозиготных по летали мух *Drosophila melanogaster* // Докл. АН СССР. 1938. Т. 20. № 2/3. С. 173–176.
- Мазинг Р.А. Различная жизнеспособность мух *Drosophila melanogaster*, гетерозиготных по леталиям, возникшим в природе // Докл. АН СССР. 1939. Т. 25. № 1. С. 65–68.
- Малькович Т.А. Морской бобр в неволе // Природа. 1937. № 3. С. 81–87.
- Малькович Т.А. Акклиматизация морских выдр (*Enhydra marina* Lech.) на Мурмане // Природа. 1938. № 7/8.
- Малькович Т.А. Опыт приручения калана: Дис..., 1955.
- Малькович Т.А. Опыт содержания каланов в неволе // Изв. Сиб. отд-ния АН СССР. 1958. № 6. С. 126–136.
- Мараков С.В. Природа и животный мир Командор. М.: Наука, 1972. 184 с.
- Мараков С.В. Северный морской котик. М.: Наука, 1974. 72 с.
- Мараков С.В. Земля в океане // Смена. 1988. № 24. Декабрь. С. 14.
- Матыско Е.К., Дивеева Г.М. Влияние гена карельской окраски на жизнеспособность гомозигот и компаундов // Достижения науки в звероводстве и промышленном кролиководстве. М., 1984. Т. 31. С. 181–185.
- Майр Э. Систематика и происхождение видов. М.: Иностран. лит-ра, 1947. 504 с.
- Медников Б.М. Онтогенез и теория информации // Природа. 1971. № 7. С. 15–23.
- Медников Б.М. Современное состояние и развитие закона гомологических рядов в наследственной изменчивости // Проблемы новейшей истории эволюционного учения. Л., 1981. С. 127–135.
- Медников Б.М. Гомологическая изменчивость и ее эволюционное значение // Развитие эволюционной теории в СССР. Л.: Наука, 1983. С. 129–138.
- Медников Б.М. Еще раз о законе гомологических рядов в наследственной изменчивости // Природа. 1989а. № 7. С. 27–35.
- Медников Б.М. Современное состояние проблемы вида и видообразования // Вавиловское наследие в современной биологии. М.: Наука, 1989б. 368 с.

- Монахов Г.И., Бакеев Н.Н. Соболь. М.: Лесн. пром-ность, 1981. 240 с.
- Монахов Г.И., Крючков В.С., Монахов В.Г., Шурыгин Б.В. Результаты интродукции восточносибирских соболей в Енисейской Сибири и бассейне р. Васюган // Промысловая териология. М.: Наука, 1982. С. 136–148.
- Монахов Г.И., Чеглаков В.Н. К вопросу о разведении цветных соболей // Сб. НТИ ВНИИОЗ. 1973. Вып. 40/41. С. 109–112.
- Нестеров Г.А., Болтнев А.И., Стус А.И. и др. Результаты мониторинга популяций морских котиков в России в 1997–2000 гг. Командорские острова. Состояние командорской популяции морских котиков в 1997 г. КамчатНИРО. 140 с.
- Николаев А. Белые лисицы // Союзпушнина. 1931. № 7. С. 26–27.
- Оленов Ю.М. Явления фенотипического параллелизма в природных популяциях *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1965. Т. 1. № 2. С. 87–94.
- Павлов М.К., Балиева И.В. Племенное дело в соболеводстве // Кролиководство и звероводство. 1941. № 6. С. 15–19.
- Павлюченко В.М., Уткин Л.Г., Григорьев М.Ю. и др. Клеточное разведение соболей. М.: Колос, 1979. 184 с.
- Пономарев А.Л. Об изменчивости и наследовании окраски и расцветки у соболей // Зоол. журнал. 1938. Т. 17. Вып. 3. С. 482–503.
- Портнова Н.Т. Опыт работы соболиной фермы Пушкинского звероводческого совхоза // Кролиководство и звероводство. 1941. № 6. С. 7–9.
- Портнова Н.Т. Наш опыт разведения соболей // Кролиководство и звероводство. 1966. № 4. С. 15–16.
- Раутиан Г.С. Гомологические ряды в окраске птиц // Природа. 1987. № 10. С. 66–74.
- Результаты исследований морских млекопитающих Дальнего Востока. Годовые отчеты Командорской инспекции рыбоохраны, 1998–2010.
- Рогозин И.Б., Глазко В.И., Кунин Е.В. Молекулярная основа рядов гомологической изменчивости Н.И. Вавилова // Информ. вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 3. С. 362–371.
- Родин С.Н. Закон гомологических рядов Н.И. Вавилова в свете некоторых данных теории молекулярной эволюции // Вавиловское наследие в современной биологии. М.: Наука, 1989. С. 38–71.
- Ромашов Д.Д., Ильина Е.Д. Анализ популяций лисец по формуле Гарди // Докл. АН СССР. 1942. Т. 37. № 5/6. С. 220–224.
- Ромашов Д.Д., Ильина Е.Д. Об аберративной изменчивости в популяциях пушных зверей // Журн. общ. биологии. 1943. Т. 4. № 5. С. 286–312.
- Рязанов Д.А. Разработка рационов кормления каланов при содержании их в неволе // Отчет о научно-исследовательской работе. Петропавловск-Камчатский, 1989.
- Сабанеев Л.П. Соболь и соболиный промысел. М.: Тип. В. Готье, 1875.
- Снытко Э.Г., Уткин Л.Г. Белая пятнистость клеточных соболей // Тр. НИИПЗК. 1984. Т. 31. С. 128–135.
- Соколова К.Б., Голубовский М.Д. Жизнеспособность гетерозигот по летальным аллелям локуса «гигантские личинки» у *Drosophila melanogaster* при разных температурах // Генетика. 1979. Т. 15. № 3. С. 454–463.
- Старков И.Д. Биология и разведение соболей и куниц. М., 1947.
- Суворов Е.К. Командорские острова и пушной промысел на них. СПб, 1912.
- Суслов В.В., Колчанов Н.А. Дарвиновская эволюция и регуляторные генетические системы // Информ. вестник ВОГиС. 2009. Т. 13. № 2. С. 410–439.
- Терновская Ю.Г., Терновский Д.В. Перспективы разведения цветных соболей // Матер. к Всесоюз. науч.-произв. совещанию по соболю. Киров, 1971. С. 164–165.
- Терновский Д.В. Биология куницеобразных. Новосибирск: Наука, 1977. 280 с.
- Тихомиров И.Б., Прасолова Л.А., Всеволодов Э.Б. и др. Феногенетический анализ пигментации новой окрасочной мутации американской норки (*Mustela vison* Schr.) и комбинации ее с некоторыми известными // Генетика. 1994а. Т. 30. № 2. С. 255–260.
- Тихомиров И.Б., Прасолова Л.А., Трапезов О.В. и др. Норка талица // Кролиководство и звероводство. 1994б. № 3. С. 10.
- Трапезов О.В. Влияние недокорма на рост и развитие норок разных генотипов // Тр. Науч.-исслед. ин-та пушного звероводства и кролиководства. 1978. Т. 18. С. 137–148.
- 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.
- Трапезов О.В., Беляев Д.К. О роли гетерозиготности норок в экстремальных условиях кормовой обеспеченности // Закономерности онтогенетической эволюции животных. Изд-во Тюмен. ун-та, 1978. С. 34–36.
- Трапезов О.В., Маркель А.Л. Влияние мутаций окраски на функцию надпочечников при хроническом кормовом стрессе у американской норки // Генетика. 1989. Т. 25. № 3. С. 508–512.
- Трапезов О.В., Маркель А.Л., Луценко Н.Д., Шульга В.А. Влияние кормового стресса на показатели размножения норок // Кролиководство и звероводство. 1999. № 4. С. 13–14.

- Трапезов О.В., Прасолова Л.А. Морфоструктура меха у норок разных генотипов под влиянием дифференцированного голодового стресса // С.-х. биология. 1990. № 6. С. 135–139.
- Трапезов О.В., Прасолова Л.А. Качество опушения у зверей в экстремальных кормовых условиях // Кролиководство и звероводство. 1997. № 4. С. 11–12.
- Трапезов О.В., Трапезова Л.И. О терминологии в звероводстве // Кролиководство и звероводство. 2001. № 2. С. 5–6.
- Трапезов О.В., Трапезова Л.И. Воспроизводящаяся коллекция генотипов американской норки (*Mustela vison* Schreber, 1777) на экспериментальной звероферме Института цитологии и генетики СО РАН // Информ. вестник ВОГиС. 2009а. Т. 13. № 3. С. 554–570.
- Трапезов О.В., Трапезова Л.И. Последствия влияния кормового стресса матерей на поведение потомства у норок разных генотипов // Матер. 4-го Междунар. симп. «Современные проблемы и методы экологической физиологии и патологии млекопитающих, введенных в зоокультуру». Петрозаводск, 23–25 сентября 2009. 2009б. С. 251–256.
- Трапезов О.В., Трапезова Л.И., Парамонов Г.П., Данилин Н.Ф. О возможности разведения калана // Кролиководство и звероводство. 2002. № 4. С. 14–16. № 5. С. 10–11.
- Филипченко Ю.А. О параллелизме в живой природе // Усп. эксперим. биологии. 1924. Т. 3. Вып. 3/4. С. 248.
- Филипченко Ю.А. Изменчивость и методы ее изучения. М.; Л., 1929. С. 202.
- Цветков Ю.В., Евсиков В.И., Осетрова Т.Д., Матиско Е.К. Генетика окраски пятнистых норок зверосовхоза «Куйтежский» // Биология и патология пушных зверей: Тез. докл. к III Всерос. науч. конф. Петрозаводск, 1981. Ч. 2. С. 167–168.
- Цветков Ю.В., Попов Ф.А., Цветкова В.А. и др. Куйтежская пятнистая // Кролиководство и звероводство. 1988. № 1. С. 7–8.
- Чеглаков В.Н. Соболь абберрантной окраски // Биология и патология клеточных пушных зверей. Киров, 1977. С. 115.
- Чеглаков В.Н. Первые итоги работы с цветным соболем во ВНИИОЗ // Биология, разведение и содержание клеточных соболей. М., 1980. С. 115–117.
- Чеглаков В.Н. Доместикация цветных соболей // Первое Всесоюзное совещание по проблемам зоокультуры: Тез. докл. М., 1986. Ч. 1. С. 248–250.
- Четвериков С.С. О некоторых моментах эволюционного процесса с точки зрения современной генетики // Журн. эксперим. биологии. (А). 1926. Т. 2. Вып. 1. С. 3–54; Вып. 4. С. 237–240. То же: Бюл. МОИП (биол.). 1965. Т. 70. № 4. С. 34–75; В кн.: Классики советской генетики, 1920–1940. Л.: Наука. 1968. С. 133–170; Сокращ. англ. пер. Ф.Г. Добржанского: Cold Spring Harbor Symp., 1959. V. 24. P. 167–195. Франц. пер.: S.S. Tchetverikoff. Les Lois de l'Heredite. Mont-Pelerin, 1970.
- Шапиро Н.И. Мутационный процесс как адаптивный признак вида // Зоол. журнал. 1938. Т. 17. С. 592–601.
- Шапиро Н.И., Игнатьев М.В. Эволюция мутабельности // Усп. соврем. биологии. 1945. Т. 20. № 3. С. 325–344.
- Шмальгаузен И.И. Организм как целое в индивидуальном и историческом развитии. Избр. тр. М.: Наука, 1982. 383 с.
- Шумный В.К. Два гениальных обобщения Николая Ивановича Вавилова (к 120-летию со дня рождения) // Генетика. 2007. Т. 43. № 11. С. 1447–1584.
- Юрченко Н.Н., Захаров И.К. Концепция биологической гомологии: исторический обзор и современные взгляды // Информ. вестник ВОГиС. 2007. Т. 11. № 3/4. С. 537–546.
- Abouheif E. Developmental genetics of homology: a hierarchical approach // Trends. Ecol. Evol. 1997. V. 12. P. 405–408.
- Belyaev D.K., Borodin P.M. The influence of stress on variation and its role in evolution // Biol. Zbl. 1982. V. 100. P. 705–714.
- Belyaev D.K., Trut L.N., Ruvinsky A.O. Genetics of the *W* locus in foxes and expression of its lethal effects // J. Hered. 1975. V. 66. P. 331–338.
- Bogdanov Y.F., Grishaeva T.M., Dadashev S.Y. Similarity of the domain structure of proteins as a basis for the conservation of meiosis // Int. Rev. Cytol. 2007. V. 257. P. 83–142.
- Bonnel M.L., Selander R.K. Elephant seals: genetic variation and near extinction // Science. 1974. V. 184. P. 908–909.
- Bowness E.R. History of early mink people in Canada. Canada Mink Breed. Assoc. 1980. 252 p.
- Castle W.E., Moor L. Mutation in mink under domestication // J. Hered. 1946. V. 37. P. 137–145.
- Cope E. The Primary Factors of Organic Evolution. Chicago, 1896. P. 475–484.
- Darwin Ch. Journal of Researches into the Natural History and Geology of the Countries Visited During the Voyage of H.M.S. Beagle Round the World: Under the Command of Capt. Fitz Roy. L.: John Murray, 1845.
- de Beer G.R. Homology: an unsolved problem. Oxford Biology Reader. L.: Oxford University Press, 1971. N 11.
- Demerec M. Miniature-alpha – a second frequently mutation character in *Drosophila virilis* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1926. V. 12. P. 687–690.

- Demerec M. Frequency of spontaneous mutations in certain stocks of *Drosophila melanogaster* // Genetics. 1937. V. 22. P. 469–478.
- Dobzhansky Th. Genetics of the evolutionary process. N.Y.: Columb. Univ. Press, 1970. 505 p.
- Dunn L.C. Unit Character Variation in Rodents // J. Mammal. 1921. V. 2. N 2. P. 125–140.
- Duval-Jouve M.J. Variations paralleles des types congeneres // Bull. de la Societe Botanique de France. 1865. V. 12. P. 196–211.
- Ford E. Ecological genetics. London: Methuen, 1964, 2nd ed., 1965. London: Chapman and Hall; 3rd ed., 1971; 4th ed., 1975. 410 p.
- Joergensen G. Mink Production. 1984. Publisher: Scientifur 48 H. Roskildevej, DK 3400 Hilleroed. Denmark. P. 11–12.
- Haldane J.B.S. The Comparative Genetics of Colour in Rodents and Carnivora // Biol. Rev. 1927. V. 11. P. 199.
- Hammer K., Schubert I. Are Vavilov's law of homologous series and syntenry related? // Genet. Res. Crop Evol. 1994. V. 41. P. 123–124.
- L'Heritier Ph., Teissier G. Eliminations des formes mutantes dans les populations de Drosophiles. Cas des Drosophiles «ebony» // C. R. Soc. Biol. 1933. V. 124. P. 882–885.
- Mayr E. Systematics and the Origin of Species. N.Y., Columbia Univ. Press, 1942. 120 p.
- Møller K.F. Minkboken. Strange and Co., Oslo, 1930. 78 p.
- Muller H. J. The problem of genic modification // Ztschr. induct. Abstammungs- und Vererbungslehre. 1928. Suppl. Bd. 1. S. 234–260. (Рус. пер. в кн.: Мёллер Г. Избранные работы по генетике. М.: Сельхозгиз, 1937. С. 178–205).
- Ness N. Heggedalfactoren i relasjon til black cross-factoren // Nord. Vet. Med. 1958. V. 10. P. 509–521.
- Ness N. An investigation of the relation of the Heggedal factor to the Black Cross factor // Acta. Agric. Scand. 1963. V. 13. P. 131–138.
- Ness N. The homozygous lethal effect of the heggedal factor (shadow factor) // Acta. Agric. Scand. 1964. V. 13. P. 208–228.
- Ness N. Abnormalities of the female genital organs in mink heterozygous for the Heggedal factor (shadow factor) // Acta. Agric. Scand. 1965. V. 15. P. 65–99.
- Ness N., Einarsson E., Lohi O. *et al.* Beautiful Fur Animals and Their Colour Genetics. 1988. Glostrup, Denmark: Published by Scientifur. 271 p.
- Osborn H.F. The Origin and Evolution of Life. N.Y.: Charles Scribner's Sons, 1917. P. xxi+322.
- Owen R. Lectures on comparative anatomy and physiology of the invertebrate animals. Delivered at the Royal College of Surgeons in 1843. L.: Brown, Green and Longman.
- Popov I.Y. Periodical systems in biology // Die Entstehung Biologischer Disziplinen / Ed. U. Hossfeld, T. Junker. Berlin: VWB, 2002. P. 55–69.
- Schackelford R.M. Genetics of the ranch mink. Pilsbury Publishers Inc. N.Y., 1950. 91 p.
- Schackelford R.M. American mink. Evolution of domesticated animals. Longman. 1986. P. 229–234.
- Schackelford R.M., Moore W.L. Genetic basis of some white phenotypes in the ranch mink // J. Hered. 1954. V. 45. P. 173–176.
- Selander R.R., Kaufman D.W. Genic variability and strategies of adaptation in animals // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. P. 1875–1877.
- Sinha H., Nicholson B.P., Steinmetz L.M., McCusker J.H. Complex genetic interactions in a quantitative trait locus // PloS Genetics. 2006. V. 2. N 2. P. 140–147.
- Smith B.W. Nature's jewels. A history of mink farming in the United States // Nat. Board of Fur Farm Org. 1981. 100 p.
- Smith T., Polacheck D. Reexamination of the life table for northern fur seals and implications about population regulatory mechanisms // Dynamics of Large Mammal Populations / Eds C.W. Fowler, T. Smith. N.Y.: John Wiley and Sons, 1981. P. 99–120.
- Sommer R.J. Homology and the hierarchy of biological systems // BioEssays. 2008. V. 30. Issue 7. P. 653–658.
- Snel B., Huynen M.A., Dutilh B.E. Genome trees and the nature of genome evolution // Annu. Rev. Microbiol. 2005. V. 59. P. 191–209.
- Sturm R.A. A golden age of human pigmentation genetics // Trends Genet. 2006. V. 20. P. 464–468.
- Sturtevant A.H. Essays on evolution. 1. On the effects of selection on mutation rate // Quart. Rev. Biol. 1937. V. 12. P. 461–467.
- Timofeef-Ressovsky N.W. Verschiedenheit der normalen Allele der white-Serie aus zwei geographisch getrennten Populationen von *Drosophila melanogaster* // Biol. Zbl. 1932. Bd. 52. S. 468–492.
- Tikhomirov I.B., Tikhomirova V.V., Trapezov O.V. A new dominant mutant in mink (*Mustela vison* Schreber, 1777) // Proc. of the VIth Intern. Sci. Congr. in Fur Animal Production. Applied Sci. Rep. August 21–23, 1996, Warsaw, Poland, 1996. V. 27. P. 191–194.
- Trapezov O.V. Black Crystal: A novel coat color mutant in the American Mink // J. Hered. 1997a. V. 88. P. 164–166.
- Trapezov O.V. A rise of new colour phases in American mink (*Mustela vison* Schreber) in the course of selection for domestic behaviour // Scientifur. 1997b. V. 21. N 1. P. 41–47.
- Trapezov O.V. Behavioral aspects of the river otter (*Lutra lutra*) and the sea otter (*Enhydra lutris*)



- breeding in captivity // VIIth Intern. Otter Colloquium. March 14–19, 1998. Trebon, Czech Republic. P. 7.
- Trapezov O.V. Effect of coat colour mutation in mink on the adrenal cortex function at pelting time in Siberian climate // VIIIth Intern. Sci. Congr. in Fur Animal Production. Scientifur. V. 28. N 3. I: Welfare and Ethics. P. 42–43. 15–18 September 2004, De Ruvenberg, Hertogenbosch, The Netherlands.
- Vavilov N.I. The law of homologous series in variation // J. Genet. 1922. V. 12. N 1. P. 47–89.
- Wagner G. The developmental genetics of homology // Nat. Rev. Genet. 2007. V. 8. P. 473–479.
- Wolf Y.I., Rogozin I.B., Grishin N.V., Koonin E.V. Genome trees and the tree of life // Trends Genet. 2002. V. 18. N 9. P. 472–479.
- Zakharov I.A. Nikolai I. Vavilov (1887–1943) // J. Biosci. 2005. V. 30. N 3. P. 299–301.

## PHENOTYPIC PARALLELISM OF COLOR ABERRATIONS IN THE NORTHERN FUR SEAL (*CALLORHINUS URSINUS*), AMERICAN MINK (*MUSTELA VISON*), AND SABLE (*MARTES ZIBELLINA*)

S.V. Fomin<sup>1</sup>, N.S. Fomina<sup>2</sup>, O.V. Trapezov<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Vyatka Agricultural Academy, Kirov, Russia;

<sup>2</sup> State Natural Biosphere Reserve «Kommandorsky»,  
Commander Islands, Nikol'skoe, Russia, e-mail: natsfomina@mail.ru;

<sup>3</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: trapezov@bionet.nsc.ru

### Summary

The frequency of color aberrations in the seal population of Commander Islands has been studied. Albino, acromelanism, nonspecific piebaldness, golden, and ferret-type color phases have been recorded at frequencies about  $10^{-4}$ . They are phenotypically similar to the same phases in sables and color mutations in farm-bred American minks. The evolutionary significance of color aberrations in natural populations is discussed.

**Key words:** Northern fur seal, *Callorhinus ursinus*, American mink, *Mustela vison*, sable, *Martes zibellina*, polymorphism, color aberrations, phenotypic parallelism, isomorphism, population regulatory mechanisms.



## УРОВЕНЬ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ У КОШЕК (*FELIS CATUS* L.) В ЗАПАДНОЕВРОПЕЙСКИХ, СЕВЕРОАМЕРИКАНСКИХ И ВОСТОЧНОЕВРОПЕЙСКИХ ПОПУЛЯЦИЯХ

Г.Г. Гончаренко, С.А. Зятыков

УО Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины, Гомель, Республика Беларусь,  
e-mail: ggoncharenko@gsu.by

В ходе анализа генетической структуры популяций домашних кошек *Felis catus* европейского континента, США и Канады было установлено, что проанализированные популяции разделяются на два кластера (группы): западноевропейско-североамериканский и восточноевропейский. Установлены близкородственный характер и единство происхождения популяционных генофондов кошек белорусско-российских городов. Выявлено действие эффекта основателя на формирование послевоенной популяции кошек Санкт-Петербурга.

**Ключевые слова:** *Felis catus*, гены окраса меха, генетическая структура, степень генетической дифференциации, коэффициент генетической дистанции ( $D_N$ ).

### Введение

Известно, что все цветовые вариации, кроме серого полосатого (дикий тип), в окрасе меха у кошек *Felis catus* обусловлены мутациями в генах, контролирующих процесс пигментогенеза и миграции меланоцитов в волосные фолликулы (Searle, 1968; Robinson, 1977; Бородин, 1995; Гончаренко, Зятыков, 2007). Частоты встречаемости мутантных и нормальных аллелей генов окраса характерны для каждой популяции и отражают их генетические структуры.

В настоящее время аллельные частоты по генам окраса меха домашних кошек описаны практически для всех развитых стран (Searle, 1949; Dreux, 1967; Clark, 1975; Todd, Lloyd, 1979; Lloyd, 1982; Ruiz Garcia, 1990; Ruiz Garcia *et al.*, 2005; Shostell *et al.*, 2005). Имеются работы, посвященные анализу генетической структуры кошек в отдельных городах восточноевропейских государств (Россия, Беларусь) (Borodin *et al.*, 1978; Гончаренко и др., 1985; Голубева, Жигачев, 2007). Однако практически неисследованной остается зона контакта между популяциями *F. catus* восточноевропейских

государств с популяциями Западной Европы и Северной Америки.

Целью настоящей работы было установить генетическую структуру и оценить уровень дифференциации популяций *F. catus* на территории ряда белорусских, российских, а также западноевропейских и североамериканских городов.

### Материалы и методы

Материал для популяционно-генетического анализа был собран в шести белорусских (Минск, Гомель, Могилев, Орша, Речица, Бобруйск), трех российских (Смоленск, Москва, Новосибирск) и одном казахстанском (Алматы) городах. Для сравнительного анализа генетической структуры и степени генетической дифференциации были также использованы данные по двум крупным российским городам (Borodin *et al.*, 1978) и 14 городам различных стран Западной Европы, а также США и Канады (Searle, 1949; Todd, 1964, 1966; Dreux, 1967, 1975; Clark, 1975; Todd N.B., Todd L.M., 1976; Blumenberg, McDonald, 1978; Blumenberg *et al.*, 1979; Todd, Lloyd, 1979; Lloyd, 1982; Shostell *et al.*, 2005).

Для установления генотипов применялся метод визуального типирования структуры и окраски шерстного покрова домашних кошек. Для каждой кошки был составлен индивидуальный генетический портрет. В ряде случаев для уточнения генотипов применялся метод семейного (генеалогического) анализа.

В каждой популяции домашних кошек были исследованы частоты мутантных аллелей сцепленного с полом локуса *Orange* – доминантный аллель *O*, а также 6 аутосомных локусов (*Agouti* – рецессивный аллель *a*, *Dilute* – рецессивный аллель *d*, *Long hair* – рецессивный аллель *l*, *Piebald spotting* – доминантный аллель *S*, *White* – доминантный аллель *W*, *Tabby* – рецессивный аллель *t<sup>b</sup>*). Все мутантные аллели, за исключением аллеля *l*, влияют на окраску шерстного покрова и характер его распределения. Аллель *l* в гомозиготном состоянии определяет длинную шерсть. Фенотипическое проявление аллелей, их взаимодействие и методы подсчета аллельных частот подробно описаны ранее (Robinson, Silson, 1969; Robinson, Manchenko, 1981; Гончаренко и др., 1985).

Для установления сходства и различий между исследуемыми популяциями использовался коэффициент генетической дистанции Неи ( $D_N$ ) (Nei, 1972):

$$D_N = -\ln I_N, I_N = \frac{\sum_{j=1}^L \sum_{i=1}^R x_{ij} y_{ij}}{\sqrt{(\sum_{j=1}^L \sum_{i=1}^R x_{ij}^2)(\sum_{j=1}^L \sum_{i=1}^R y_{ij}^2)}},$$

где  $x_{ij}$  и  $y_{ij}$  – частоты  $i$ -го аллеля  $j$ -го локуса сравниваемых популяций.

Если  $D_N$  равно 0, то популяции идентичны. Чем больше значение  $D_N$ , тем менее родственны сравниваемые популяции. Считается, что коэффициент дистанции Неи самый точный и поэтому используется многими исследователями.

Для наглядного изображения общей картины генетических взаимоотношений между всеми исследованными популяциями на основании полученных коэффициентов генетической дистанции Неи была построена дендрограмма методом невзвешенного парно-группового кластерного анализа (UPGMA) (Sneath, Sokal, 1973). Надежность характера ветвления дендрограммы оценивалась при помощи бутстреп-теста Фелзенштейна (Felsenstein, 1985). Все расчеты

проводились с использованием компьютерных программ «Ген» (версия для PC) и DISPAN (Гончаренко и др., 1988; Ota, 1993).

## Результаты и обсуждение

Для оценки генетической структуры были рассчитаны частоты встречаемости нормальных и мутантных аллелей окраса и структуры шерсти в каждой из 12 исследованных популяций Беларуси и России. Аллельные частоты по 6 аутосомным и 1 сцепленному с полом генам в популяциях *F. catus* приведены в табл. 1. Здесь следует отметить высокие частоты для мутантных аллелей *a* и *l*, значения которых во всех популяциях Беларуси и России варьировали от 40 до 60 %, а в некоторых превышали 70 %. Мутантные аллели *S*, *d* и *O* характеризовались средним значением частот встречаемости, поскольку в большинстве исследованных популяций имели величины от 15 до 40 %. Мутантные аллели локусов *White* и *Tabby* встречались с низкой частотой.

Сравнительный анализ генетической структуры показал, что почти все исследованные нами популяции России и Беларуси имеют сходные значения по аллельным частотам 5 локусов (*Agouti*, *Dilute*, *Long hair*, *Piebald spotting*, *White*) (табл. 1).

Крайне интересная ситуация сложилась по мраморному аллелю *t<sup>b</sup>* локуса *Tabby*. В городах Западной Европы, а также США и Канады его частота обычно превышает 40 %, а в Глазго, Дублине, Лондоне, Ньюкасле и Париже – 75 % (Searle, 1949; Todd, 1964, 1966; Dreux, 1967, 1975; Clark, 1975; Todd N.B., Todd L.M., 1976; Blumenberg, McDonald, 1978; Blumenberg *et al.*, 1979; Todd, Lloyd, 1979; Lloyd, 1982; Shostell *et al.*, 2005). В исследованных городах Беларуси и России выявлена в целом низкая частота встречаемости аллеля *t<sup>b</sup>*, а в нескольких популяциях он полностью отсутствовал (табл. 1). Исключением является популяция Санкт-Петербурга, где частота аллеля *t<sup>b</sup>* составляет 44 %. Считается, что столь высокой частоты в Санкт-Петербурге этот аллель достиг после Великой Отечественной войны. За время блокады с 1941 по 1943 гг. популяция *F. catus* в Санкт-Петербурге (Ленинграде) практически полностью исчезла. В апреле 1943 г. после частичного прорыва

Таблица 1

Аллельные частоты по 7 генам окраса и структуры меха  
в популяциях *F. catus* 26 городов Европейского континента, США и Канады

| Популяция       | N    | Частоты аллелей |          |          |          |          |          |                      | Источник                        |
|-----------------|------|-----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------------------|---------------------------------|
|                 |      | <i>a</i>        | <i>d</i> | <i>l</i> | <i>O</i> | <i>S</i> | <i>W</i> | <i>t<sup>b</sup></i> |                                 |
| Минск           | 102  | 0,795           | 0,316    | 0,533    | 0,205    | 0,219    | 0,010    | 0                    | Наши данные                     |
| Гомель          | 686  | 0,688           | 0,378    | 0,471    | 0,183    | 0,327    | 0,015    | 0,125                | Наши данные                     |
| Могилев         | 108  | 0,745           | 0,341    | 0,373    | 0,181    | 0,218    | 0,023    | 0,139                | Наши данные                     |
| Орша            | 87   | 0,822           | 0,378    | 0,577    | 0,220    | 0,319    | 0,017    | 0                    | Наши данные                     |
| Речица          | 86   | 0,742           | 0,376    | 0,431    | 0,135    | 0,386    | 0,006    | 0                    | Наши данные                     |
| Бобруйск        | 105  | 0,630           | 0,310    | 0,430    | 0,110    | 0,150    | 0,020    | 0                    | Наши данные                     |
| Смоленск        | 94   | 0,775           | 0,314    | 0,413    | 0,267    | 0,251    | 0,016    | 0,147                | Наши данные                     |
| Москва          | 102  | 0,588           | 0,439    | 0,519    | 0,183    | 0,253    | 0        | 0                    | Наши данные                     |
| Новосибирск     | 226  | 0,619           | 0,374    | 0,446    | 0,203    | 0,329    | 0,009    | 0,083                | Наши данные                     |
| Алматы          | 171  | 0,541           | 0,360    | 0,562    | 0,162    | 0,214    | 0,003    | 0,155                | Наши данные                     |
| Санкт-Петербург | 115  | 0,570           | 0,420    | 0,640    | 0,250    | 0,310    | 0,010    | 0,440                | Borodin <i>et al.</i> , 1978    |
| Самара          | 64   | 0,460           | 0,130    | 0,560    | 0,230    | 0,410    | 0        | 0                    | Borodin <i>et al.</i> , 1978    |
| Лондон          | 700  | 0,762           | 0,142    | 0,330    | 0,105    | 0,313    | 0,004    | 0,814                | Searle, 1949                    |
| Ньюкасл         | 617  | 0,800           | 0,300    | 0,360    | 0,160    | 0,340    | 0,010    | 0,770                | Shostell <i>et al.</i> , 2005   |
| Дублин          | 360  | 0,824           | 0,290    | 0,329    | 0,115    | 0,306    | 0,020    | 0,744                | Todd, Lloyd, 1979               |
| Глазго          | 918  | 0,800           | 0,260    | 0,300    | 0,200    | 0,200    | 0        | 0,800                | Clark, 1975                     |
| Париж           | 1833 | 0,710           | 0,330    | 0,240    | 0,060    | 0,240    | 0,011    | 0,780                | Dreux, 1967                     |
| Марсель         | 550  | 0,720           | 0,340    | 0,270    | 0,080    | 0,290    | 0,000    | 0,680                | Dreux, 1975                     |
| Амстердам       | 636  | 0,740           | 0,250    | 0,150    | 0,130    | 0,320    | 0,010    | 0,570                | Lloyd, 1982                     |
| Портленд        | 264  | 0,785           | 0,478    | 0,435    | 0,291    | 0,437    | 0,029    | 0,537                | Blumenberg <i>et al.</i> , 1979 |
| Кливленд        | 171  | 0,743           | 0,413    | 0,254    | 0,233    | 0,351    | 0,021    | 0,385                | Blumenberg, McDonald, 1978      |
| Бостон          | 792  | 0,642           | 0,426    | 0,302    | 0,193    | 0,436    | 0,022    | 0,443                | Todd, 1964                      |
| Нью-Йорк        | 236  | 0,752           | 0,443    | 0,130    | 0,146    | 0,470    | 0,013    | 0,473                | Todd, 1966                      |
| Галифакс        | 159  | 0,788           | 0,450    | 0,476    | 0,323    | 0,379    | 0,032    | 0,427                | Todd N.B., Todd L.M., 1976      |
| Сент Луис       | 866  | 0,787           | 0,427    | 0,481    | 0,299    | 0,384    | 0,016    | 0,507                | Shostell <i>et al.</i> , 2005   |
| Мемфис          | 300  | 0,801           | 0,439    | 0,318    | 0,214    | 0,379    | 0,012    | 0,546                | Shostell <i>et al.</i> , 2005   |

Примечание. N – количество особей, проанализированных в каждой популяции.

блокады среди первых грузов, прибывших в Ленинград, были кошки, в основном дымчатого окраса, которые по постановлению Ленсовета были специально завезены в город для борьбы с крысами. По-видимому, среди этих кошек были особи, несущие аллель *t<sup>b</sup>*, который сохранился с высокой частотой в современной популяции Санкт-Петербурга. Иными словами, столь высокая частота данного аллеля в Санкт-Петербурге обязана действию эффекта основателя. Поскольку Санкт-Петербург является портовым

городом, нельзя исключить и возможность попадания на его территорию кошек с аллелем *t<sup>b</sup>* с американских и английских судов, побывавших в ленинградском порту.

Что касается сцепленного с полом гена *Orange*, то в популяциях 12 восточноевропейских городов включая основанную русскими переселенцами Алма-Ату, частота мутантного аллеля *O* колеблется от 11 до 30 % (табл. 1). Следует отметить, что такие же высокие по данному аллелю частоты характерны для стран

Западной и Северной Европы (Todd *et al.*, 1975), а также Греции (Todd, Kunz, 1977) и существенно отличаются от популяций, входящих в состав так называемого коридора пониженной частоты аллеля *O*, расположенного по линии Тегеран–Будапешт, сформированного под влиянием азиатских кошек (Borodin *et al.*, 1978; Гончаренко и др., 1985, 2010).

Для более точной количественной оценки генетической дифференциации между 26 исследованными популяциями домашних кошек включая данные по 14 городам Западной Европы, а также США и Канады был использован коэффициент генетической дистанции Неи (Nei, 1972), который учитывает различия по всем исследованным локусам, а не только по сильно различающимся. Найденные значения коэффициентов генетической дистанции ( $D_N$ ) представлены в виде диагональной матрицы в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что наиболее сходные генетические структуры оказались у 10 белорусско-российских популяций и 7 популяций Западной Европы, поскольку значение  $D_N$  для восточноевропейских популяций (без Санкт-Петербурга) варьировало от 0,002 до 0,025, а для популяций Западной Европы – от 0,001 до 0,021. Наибольшие различия, как и следовало ожидать, выявлены между белорусско-российскими и западноевропейско-американскими популяциями, где  $D_N$  для всех сравниваемых пар превышало 0,050 и в ряде случаев – 0,100, а для пары Самара–Глазго даже достигло значения 0,198 (табл. 2).

При использовании значений коэффициентов генетической дистанции Неи ( $D_N$ ) посредством невзвешенного парно-группового метода кластерного анализа (UPGMA) нами была построена дендрограмма (рис. 1), позволяющая наглядно проиллюстрировать степень межпопуляционной дифференциации в исследованных популяциях домашних кошек. Необходимо отметить, что бутстреп-тест показал высокодоверительный характер ветвления в дендрограмме (> 90 %) практически для всех ветвей.

Из дендрограммы хорошо видно, что проанализированные популяции кошек Европейского и Североамериканского континентов распадаются на два четких кластера. Левый кластер включает в себя только популяции исторически связанных

стран Западной Европы, США и Канады. На территории Западной Европы кошки на протяжении многих веков подвергались массовому уничтожению инквизицией. Все это, по-видимому, обусловило своеобразие и обособленность генетической структуры этих популяций, которая восстанавливалась из редких сохранившихся групп и генотипов под воздействием эффекта основателя и дрейфа генов.

Необходимо подчеркнуть, что вопреки ожиданию, западноевропейская популяция кошек Амстердам вошла в субкластер североамериканских городов, а не в субкластер городов Западной Европы (рис. 1). В американском субкластере Амстердам объединился в одну ветвь с Нью-Йорком. Поскольку Нью-Йорк в начале XVII в. был основан голландскими колонистами и даже более полувека носил название «Новый Амстердам», предположение о том, что первоначальная популяция кошек этого города голландского происхождения продолжает сохранять свои черты в современной популяции кошек Нью-Йорка, кажется вполне уместным. Ранее подобное предположение было сделано в работе Ван Аардэ с соавт. (Van Aarde *et al.*, 1981). В то же время необходимо отметить, что в нашей работе популяции кошек Амстердам и Кливленд английского происхождения были ближе по значениям генетической дистанции Неи, чем Амстердам и Нью-Йорк (табл. 2). Но Кливленд по коэффициентам  $D_N$  в свою очередь ближе к другим североамериканским городам, чем Амстердам (табл. 2). В этом отношении кластерный анализ и дендрограмма дают более объективный характер генетической связи между популяциями, чем одна матрица генетических дистанций.

В наше исследование были включены только популяции городов востока США и Канады англо-французского и, как в случае с Нью-Йорком, англо-голландского происхождения. Интересно отметить, что популяции южных городов США, основанные испанцами, как было показано в работе Руиса-Гарсии с соавт. (Ruiz Garcia *et al.*, 1990), имеют другую генетическую структуру, существенно отличающуюся от англо-французских и англо-голландских.

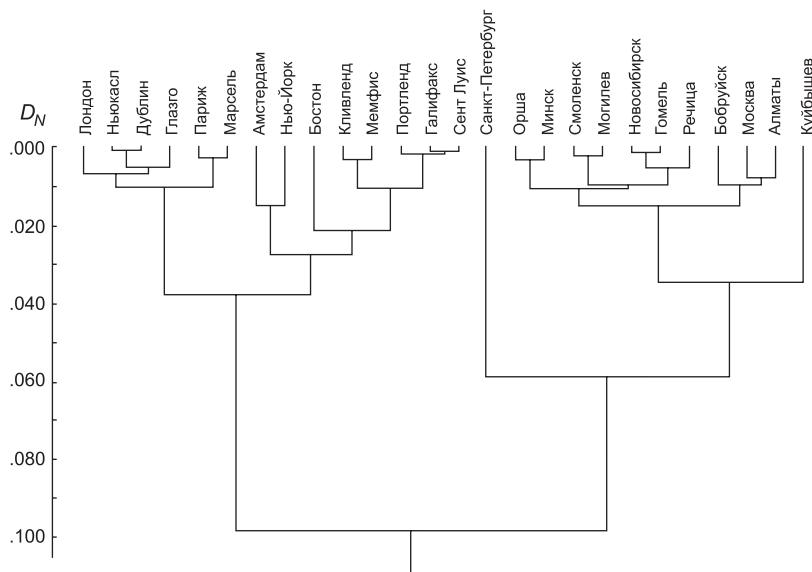
Что касается правого кластера дендрограммы, то его составляют, в основном, популяции белорусско-российских (восточноевропейских)

Таблица 2

Значения коэффициентов генетической дистанции Неи в 26 популяциях *F. satius* Европы и Северной Америки

| Популяция       | Минск | Гомель | Могилев | Орша | Речица | Бобруйск | Смоленск | Москва | Санкт-Петербург | Новосибирск | Алматы | Самара | Лондон | Ньюкасл | Дублин | Глазго | Париж | Марсель | Амстердам | Порتلэнд | Кливленд | Бостон | Нью-Йорк | Галифакс | Сент-Луис |
|-----------------|-------|--------|---------|------|--------|----------|----------|--------|-----------------|-------------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|-------|---------|-----------|----------|----------|--------|----------|----------|-----------|
| Гомель          | .009  | xxx    |         |      |        |          |          |        |                 |             |        |        |        |         |        |        |       |         |           |          |          |        |          |          |           |
| Могилев         | .010  | .005   | xxx     |      |        |          |          |        |                 |             |        |        |        |         |        |        |       |         |           |          |          |        |          |          |           |
| Орша            | .003  | .009   | .016    | xxx  |        |          |          |        |                 |             |        |        |        |         |        |        |       |         |           |          |          |        |          |          |           |
| Речица          | .010  | .005   | .011    | .008 | xxx    |          |          |        |                 |             |        |        |        |         |        |        |       |         |           |          |          |        |          |          |           |
| Бобруйск        | .010  | .011   | .009    | .021 | .015   | xxx      |          |        |                 |             |        |        |        |         |        |        |       |         |           |          |          |        |          |          |           |
| Смоленск        | .008  | .006   | .002    | .013 | .013   | .015     | xxx      |        |                 |             |        |        |        |         |        |        |       |         |           |          |          |        |          |          |           |
| Москва          | .012  | .008   | .016    | .014 | .011   | .008     | .019     | xxx    |                 |             |        |        |        |         |        |        |       |         |           |          |          |        |          |          |           |
| Санкт-Петербург | .058  | .033   | .046    | .056 | .062   | .061     | .043     | .047   | xxx             |             |        |        |        |         |        |        |       |         |           |          |          |        |          |          |           |
| Новосибирск     | .012  | .008   | .008    | .013 | .006   | .009     | .009     | .005   | .039            | xxx         |        |        |        |         |        |        |       |         |           |          |          |        |          |          |           |
| Алматы          | .019  | .010   | .017    | .025 | .023   | .011     | .020     | .007   | .024            | .009        | xxx    |        |        |         |        |        |       |         |           |          |          |        |          |          |           |
| Самара          | .038  | .030   | .046    | .042 | .034   | .032     | .043     | .029   | .066            | .066        | .026   | xxx    |        |         |        |        |       |         |           |          |          |        |          |          |           |
| Лондон          | .162  | .123   | .110    | .174 | .159   | .159     | .111     | .183   | .080            | .140        | .131   | .183   | xxx    |         |        |        |       |         |           |          |          |        |          |          |           |
| Ньюкасл         | .140  | .101   | .092    | .145 | .135   | .145     | .092     | .156   | .059            | .118        | .114   | .178   | .006   | xxx     |        |        |       |         |           |          |          |        |          |          |           |
| Дублин          | .132  | .097   | .085    | .139 | .128   | .134     | .086     | .151   | .064            | .114        | .111   | .176   | .006   | .001    | xxx    |        |       |         |           |          |          |        |          |          |           |
| Глазго          | .151  | .117   | .098    | .164 | .156   | .150     | .098     | .171   | .074            | .133        | .125   | .198   | .008   | .005    | .005   | xxx    |       |         |           |          |          |        |          |          |           |
| Париж           | .156  | .112   | .096    | .169 | .147   | .141     | .104     | .161   | .075            | .126        | .118   | .194   | .011   | .009    | .006   | .008   | xxx   |         |           |          |          |        |          |          |           |
| Марсель         | .120  | .081   | .069    | .129 | .109   | .110     | .076     | .125   | .056            | .093        | .090   | .154   | .013   | .007    | .005   | .010   | .003  | xxx     |           |          |          |        |          |          |           |
| Амстердам       | .105  | .071   | .055    | .117 | .091   | .094     | .060     | .116   | .074            | .079        | .089   | .132   | .021   | .019    | .015   | .020   | .015  | .008    | xxx       |          |          |        |          |          |           |
| Порتلэнд        | .081  | .049   | .053    | .074 | .071   | .098     | .048     | .086   | .029            | .061        | .069   | .121   | .052   | .025    | .029   | .042   | .045  | .029    | .038      | xxx      |          |        |          |          |           |
| Кливленд        | .106  | .067   | .059    | .109 | .093   | .105     | .060     | .110   | .050            | .077        | .085   | .144   | .027   | .012    | .012   | .018   | .015  | .008    | .010      | .013     | xxx      |        |          |          |           |
| Бостон          | .090  | .047   | .052    | .083 | .063   | .085     | .057     | .070   | .043            | .051        | .064   | .123   | .089   | .057    | .057   | .075   | .057  | .039    | .045      | .019     | .022     | xxx    |          |          |           |
| Нью-Йорк        | .101  | .060   | .054    | .101 | .070   | .095     | .059     | .100   | .077            | .066        | .091   | .134   | .057   | .039    | .036   | .053   | .038  | .024    | .015      | .027     | .013     | .017   | xxx      |          |           |
| Галифакс        | .084  | .055   | .057    | .079 | .082   | .102     | .050     | .092   | .025            | .067        | .070   | .126   | .047   | .022    | .026   | .034   | .043  | .030    | .041      | .002     | .014     | .028   | .038     | xxx      |           |
| Сент-Луис       | .065  | .039   | .043    | .060 | .063   | .082     | .037     | .073   | .020            | .051        | .055   | .104   | .050   | .026    | .029   | .040   | .048  | .031    | .039      | .002     | .016     | .026   | .035     | .001     | xxx       |
| Мемфис          | .083  | .050   | .046    | .082 | .070   | .089     | .045     | .089   | .041            | .061        | .072   | .128   | .036   | .016    | .016   | .027   | .025  | .013    | .016      | .006     | .003     | .017   | .012     | .009     | .008      |





**Рис. 1.** Дендрограмма, построенная методом UPGMA, показывающая степень генетической дифференциации в 26 популяциях *F. catus* Европы и Северной Америки.

городов (рис. 1). Популяции домашних кошек *F. catus*, входящих в состав этого кластера, начали формироваться в Поднепровье в X–XII вв. под влиянием торговых контактов с варягами и греками. Центральное ядро правого кластера составляют тесно сцепленные популяции городов Орша, Бобруйск, Смоленск, Могилев, Гомель, Речица, расположенных в бассейне Днепра. Характер взаимоотношений в правом кластере свидетельствует в пользу того, что дальнейшее расселение кошек на территории Беларуси и России происходило из Поднепровья, поскольку остальные популяции Минска, Москвы, Самары, Новосибирска, Алматы на дендрограмме или входят в ядро кластера, или близко к нему примыкают. Все это однозначно говорит о близкородственном характере популяционных генофондов кошек белорусско-российских городов и свидетельствует о единстве их происхождения.

Несколько обособленное на дендрограмме положение Санкт-Петербурга в восточноевропейском кластере (рис. 1), как уже отмечалось, скорее всего, связано с действием эффекта основателя, поскольку вновь возникшая после ВОВ популяция сформировалась из небольшого числа особей, завезенных в город после частичного прорыва блокады, среди которых

могли быть кошки, несущие аллель  $t^b$ . Нельзя исключить и возможность попадания в город кошек с аллелем  $t^b$  с американских и английских судов, побывавших в ленинградском порту.

Работа проводилась в рамках темы ГБ 06-15 «Структура и функционирование зооценозов наземных и водных экосистем Белорусского Полесья» (ГГУ им. Ф. Скорины) и ГБЦМ 11-32 «Разработка молекулярно-генетических технологий для диагностики возбудителей описторхоза в окончательных и промежуточных хозяевах», а также была поддержана грантами Президента Республики Беларусь для деятелей науки, образования и здравоохранения (№ 310рп 2002), (№ 147рп 2007) и грантом стипендиального фонда Президента РБ по поддержке талантливой молодежи (№ 32рп 2009).

### Литература

- Бородин П.М. Кошки и гены. М.: Зоосалон, 1995. 144 с.
- Голубева Н.А., Жигачев А.И. Новые данные о частотах генов окраса и длины шерсти у кошек. 1. Популяция кошек г. Армавир // Генетика. 2007. Т. 43. № 8. С. 1079–1083.
- Гончаренко Г.Г., Зятьков С.А. Генетика. Анализ наследственных закономерностей на генах меха

- кошек *Felis catus*. Гомель: ГГУ им. Ф. Скорины, 2007. 108 с.
- Гончаренко Г.Г., Зятьков С.А., Лысенко А.Н. Генетическая структура и уровень дифференциации в популяциях *Felis catus* Европейского континента // Докл. АН. 2010. Т. 431. № 6. С. 827–830.
- Гончаренко Г.Г., Кучмин В.М., Савицкий Б.П. Учебная программа для обработки эволюционно-генетических данных и их геносистематической интерпретации. Гомель: ГГУ, 1988. 32 с.
- Гончаренко Г.Г., Лопатин О.Е., Манченко Г.П. Мутантные гены окраски в популяциях домашних кошек Средней Азии и Европейской части СССР // Генетика. 1985. Т. 21. № 7. С. 1151–1158.
- Blumenberg B., Fish C., MacDonald B. Mutant allele frequencies in three domestic cat populations of New England // Carn. Genet. Newslett. 1979. V. 4. P. 1–12.
- Blumenberg B., McDonald B. A population genetics analysis of the domestic cats of Cleveland, Ohio, and the Midwestern United States // Carn. Genet. Newslett. 1978. V. 3. P. 227–240.
- Borodin P.M., Bochkarev M.N., Smirnova I.S., Manchenko G.P. Mutant allele frequencies in domestic cat populations of six soviet cities // J. Hered. 1978. V. 69. P. 169–174.
- Clark J.M. The effects of selection and human preference on coat colour gene frequencies in urbancats // J. Hered. 1975. V. 35. P. 195–210.
- Dreux P.H. Gene frequencies in the cat populations of Paris // J. Hered. 1967. V. 58. P. 92.
- Dreux P.H. Genetique de population des chats domestiques de Marseille (Bouche-du-Rhone, France) // Ann. Genet. Sel. Anim. 1975. V. 7. P. 23–33.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // Evolution. 1985. V. 39. P. 783–791.
- Lloyd A.T. Mutant allele frequencies in the domestic cat populations of the Netherlands // Genetica. 1982. V. 58. P. 223–228.
- Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Nat. 1972. V. 106. P. 283–292.
- Ota T. DISPAN: genetic distance and phylogenetic analysis. Institute of Molecular Evolutionary Genetics. The Pennsylvania State Univ., 1993.
- Robinson R. Genetics for Cat Breeders. London: Pergamon Press, 1977. 202 p.
- Robinson R., Manchenko G.P. Cat gene frequencies in cities of the USSR // Genetica. 1981. V. 55. P. 41.
- Robinson R., Silson M. Mutant gene frequencies in cats of southern England // Theor. Appl. Genet. 1969. V. 39. P. 326.
- Ruiz Garcia M. Mutant allele frequencies in domestic cat populations in Catalonia, Spain, and their genetic relationships with Spanish and English colonial cat populations // Genetica. 1990. V. 82. P. 209–214.
- Ruiz Garcia M., Alvarez D., Shostell J.M. Population genetic analysis of cat populations from Mexico, Colombia, Bolivia, and the Dominican Republic: identification of different gene pools in Latin America // J. Genet. 2005. V. 84. P. 147–171.
- Searle A.G. Gene frequencies in London's cats // J. Hered. 1949. V. 49. P. 214–220.
- Searle A.G. Comparative genetics of coat color in mammals. London: Logos press, 1968. 308 p.
- Shostell J.M., Staudinger J., Ruiz-Garcia M. Mutant allele frequencies in domestic cat populations in Arkansas and Tennessee // J. Heredity. 2005. V. 96(5). P. 557–565.
- Sneath P.H.A., Sokal R.R. Unweighted pair-group method average, UPGMA // Numerical Taxonomy. San Francisco: W.H. Freeman and Co, 1973. 573 p.
- Todd N.B. Gene frequencies of Boston's cats // Heredity. 1964. V. 19. P. 47–51.
- Todd N.B. Gene frequencies in the cat population of New York City // J. Hered. 1966. V. 57. P. 185–187.
- Todd N.B., Fagen R.M., Fagen K. Gene frequencies in Icelandic cats // Heredity. 1975. V. 35. P. 172–183.
- Todd N.B., Kunz T.H. Mutant allele frequencies in domestic cats populations of Greece // Biol. Gallo-Hellenica. 1977. V. 6. P. 289–310.
- Todd N.B., Todd L.M. Mutant allele frequencies among domestic cats in some eastern areas of Canada // J. Hered. 1976. V. 67. P. 368–372.
- Todd N.B., Lloyd A.T. Mutant allele frequencies in domestic cats of Dublin and vicinity // Carn. Genet. Newslett. 1979. V. 4. P. 24–30.
- Van Aarde R.J., Erasmus B.J., Blumenberg B. Frequencies of mutant alleles in the cat populations of Cape Town and Pretoria, South Africa // South African J. Sci. 1981. V. 77. P. 168–171.

**THE LEVEL OF GENETIC DIFFERENTIATION  
IN WEST EUROPEAN, NORTH AMERICAN, AND EAST EUROPEAN  
POPULATIONS OF DOMESTIC CATS (*FELIS CATUS* L.)**

**G.G. Goncharenko, S.A. Zyatkov**

Francisk Skorina Gomel State University, Gomel, Republic of Belarus,  
e-mail: ggoncharenko@gsu.by

**Summary**

Genetic analysis of domestic cats *Felis catus* of the European and North American continents revealed two clusters (groups) of populations: West European–North American and East European. The gene pools of cats from Belarusian and Russian cities are closely related, being of the same origin. The formation of the postwar St. Petersburg cat population was influenced by the founder effect.

**Key words:** *Felis catus*, coat color genes, genetic structure, genetic differentiation, genetic distance coefficient ( $D_N$ ).

## АНАЛИЗ ГЕТЕРОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ФЕРТИЛЬНЫХ И МУЖКОСТЕРИЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (*BETA VULGARIS*)

А.Г. Брагин<sup>1</sup>, М.К. Иванов<sup>1,2</sup>, Л.А. Федосеева<sup>1</sup>, Г.М. Дымшиц<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: abgicg@mail.ru;

<sup>2</sup> Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования  
Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Впервые для характеристики гетероплазматического состояния мтДНК растений применен метод высокочувствительного ПЦР в реальном времени с использованием гидролизуемых флюоресцентно меченных олигонуклеотидных зондов. Путем оценки копийности универсальных и *N*- и *Svulg*-специфичных маркеров в мтДНК сахарной свеклы *N*- и *Svulg*-типов на расширенной выборке растений различных линий и сортов с использованием оптимизированной ПЦР в реальном времени впервые показано, что гетероплазмия является естественным состоянием мтДНК *Beta vulgaris* как *N*-, так и *Svulg*-типов, и что количество доминирующего и минорного вариантов может отличаться более чем на 6 порядков.

**Ключевые слова:** *Beta vulgaris*, митохондриальная ДНК, гетероплазмия, ПЦР в реальном времени.

### Введение

Митохондриальная гетероплазмия (сосуществование в ткани или клетке альтернативных вариантов последовательности мтДНК или более чем одного митохондриального гаплотипа) широко распространена среди многоклеточных эукариот – от растений до человека (Kmiec *et al.*, 2006). Варианты последовательности мтДНК могут отличаться точечными заменами (SNP) или обширными структурными изменениями, затрагивающими в том числе и кодирующие последовательности. В зависимости от дозы мутантных вариантов в общем пуле мтДНК, которая может резко меняться в поколениях, последние могут способствовать фенотипическому проявлению связанных с ними признаков (часто представляющих собой патологии).

Такая ситуация типична для многих видов высших растений, в популяциях которых наряду с нормальным типом мтДНК наблюдается существование альтернативных типов, ассоциированных с признаком цитоплазматической муж-

ской стерильности (ЦМС), который заключается в формировании пыльников с абортивной пыльцой (Schnable, Wise, 1998; Kubo, Mikami, 2007). МтДНК ЦМС-типа обычно характеризуется множественными структурными перестройками, некоторые из них изменяют кодирующие части генов либо их локализацию и приводят к образованию химерных транскрибируемых рамок считывания (Sarria *et al.*, 1998; Arrieta-Montiel *et al.*, 2001).

У сахарной свеклы (*Beta vulgaris*) в формировании оуэновского типа ЦМС участвует *Svulg*-тип мтДНК. По сравнению с нормальным (*N*-) типом он характеризуется измененной структурой и экспрессией ряда генов, а также множественными различиями в некодирующих областях (Sato *et al.*, 2004). Структурное состояние митохондриального генома сахарной свеклы мало изучено, хотя имеются данные о том, что, как и в случае ряда других видов высших растений, он состоит из набора линейных и кольцевых субгеномных молекул различного размера с возможностью рекомбинации между



ними благодаря наличию многочисленных повторов (Bears, Lonsdale, 1988). Эти молекулы могут независимо реплицироваться и содержаться в общем пуле мтДНК в неравных стехиометрических соотношениях.

Ранее нами при помощи ПЦР были проанализированы мужскостерильные и фертильные растения сахарной свеклы с разным типом цитоплазмы. Было обнаружено наличие всех исследованных маркеров мтДНК *N*-типа в мужскостерильных растениях и некоторых *Svulg*-специфичных маркеров – в фертильных (Брагин и др., 2006), что свидетельствовало в пользу гетероплазматического характера организации мтДНК сахарной свеклы. Невозможность обнаружения ряда *Svulg*-специфичных маркеров в составе мтДНК фертильных растений в работах Брагина с соавт. (2006), Cheng с соавт. (2009) может объясняться как несовершенством использованных методов, не позволяющих обнаружить единичные копии аллогенных последовательностей в чужеродном окружении, так и принципиальным отсутствием части последовательностей мтДНК *Svulg*-типа в митохондриях фертильных растений и их возникновением *de novo* в процессе конверсии к ЦМС-фенотипу. Решение этого вопроса принципиально важно для понимания организации митохондриального генома *B. vulgaris*.

В настоящей работе использован усовершенствованный метод ПЦР в реальном времени, основанный на использовании гидролизующих флюоресцентно меченных олигонуклеотидных зондов и позволяющий детектировать единичные копии исследуемой последовательности в ПЦР-смеси. Это дало возможность провести анализ относительного содержания маркерных последовательностей как специфичных для *N*- и *Svulg*-типов мтДНК, так и общих для этих типов, и количественно охарактеризовать гетероплазмию мтДНК сахарной свеклы в линейных материалах, отличающихся по пыльцевому фенотипу.

## Материалы и методы

В работе анализировались растения, предоставленные Е.И. Малецкой, С.И. Малецким и Е.В. Левитесом (лаборатория популяционной генетики растений, ИГиГ СО РАН, г. Новосибирск), линий СОАН-31, СОАН-252 (фертильные линии О-типа – закрепители стерильности), СОАН-22 (фертильные растения, высокий процент конверсии к стерильному фенотипу), мсСОАН-22, мсСОАН-31, мсСОАН-252 (стерильные аналоги перечисленных фертильных линий), а также сортов Ганусовская односемянная 55, Белоцерковская односемянная 40, Янаш А3 (фертильные растения), мсКНВС2 и мсКWS1 (стерильные растения, апозиготически поддерживающиеся на *Svulg*-цитоплазме) (Мглинец и др., 1995; Аульченко и др., 1997; Вепрев и др., 1997).

мтДНК выделялась из корней и проростков как описано в статьях (Rogstad, 2003; Брагин и др., 2006) соответственно. ПЦР проводили с использованием 20 мкл реакционной смеси следующего состава: 67 mM Трис-НСl (pH 8,9), 1,6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 % Tween-20), dNTP 200 μM, 0,2 е.а. Taq-полимеразы, моноклональные антитела к Taq-полимеразе, специфические праймеры 0,5 μM, олигонуклеотидный зонд 0,25 μM, различные количества ДНК-матрицы. Реакцию проводили на амплификаторе с оптическим модулем iCycler iQ5 («Bio-Rad Laboratories», США) в трех повторах для каждого образца, с постановкой отрицательных контролей (без добавления мтДНК). Праймеры и зонды для ПЦР подбирали при помощи программы Oligo Analyzer в соответствии с известными последовательностями для *N*- и *Svulg*-вариантов мтДНК сахарной свеклы с использованием баз данных NCBI. В работе использовались три маркера, входящие в состав мтДНК как *N*-, так и *Svulg*-типов (в скобках приведены последовательности праймеров и флюоресцентно меченного зонда):

*orf-B* (5'-TGCCTGTCCCATGCGTTGTT-3',  
5'-AGGCATGACCAGAAGAATTGTGTGA-3',  
5'-R6G-ACCACCATTT(BHQ1)CTAGAGGCTTGACGGA-3'),  
*cox II* (5'-TGGACATCAATGGTATCGG-3',  
5'-TACCAGTAAGCCAGATGCT-3',  
5'-Cy5-AGTGC GCCT(BHQ1)CTTCACGAAGGTGATTT-3') и

*rps4* (5'-CTTAGAAAGAACAAGAAGTTTGGA-3',  
 5'-CGATAAGAATAAGGTCACGGAG-3',  
 5'-Cy5-CGACGCT(BHQ2)GAGCACAACAGAATGAAGAGGAA-3');  
 два маркера, уникальных для мтДНК *Svulg*-типа:  
*orf324* (5'-CATTTTGTTAATGATGGCTGCTTTGA-3',  
 5'-CCCTTTCCCCCTTCAGAG-3',  
 5'-FAM-CCTCT(BHQ1)GTCGCATCGAAGCCCAAGATCTC-3') и  
*S-RAPD* (5'-CAGAAGCTGAACCCGACACCAA-3',  
 5'-GAAGAAGGGAGTGAGGCATTAACGA-3',  
 5'-R6G-TGCTCAT(BHQ1)ATCCCAACTGGAGAGTCGT-3')  
 и один, уникальный для мтДНК *N*-типа:  
*orf246* (5'-CTCGGGGCTCCATGTAGTATTAGG-3',  
 5'-GGTGGATTATCAAGTCGAAAGGCG-3',  
 5'-FAM-TGGGCTTTCCCT(BHQ1)GCCTTGCTTACATCGTGCT-3').

Выбранные маркерные участки равномерно распределены по геному и соответствуют последовательностям с разной копийностью. Все олигонуклеотиды были синтезированы ЗАО «Синтол» (г. Москва).

### Результаты

Амплификация используемых в качестве нормировочных генов маркеров *coxII* и *rps4* была оптимизирована путем подбора концентраций праймеров и катионов магния в реакционной смеси, а также использованием «горячего старта», основанного на добавлении в реакционную смесь моноклональных антител, блокирующих активность Taq полимеразы (Rybalkin *et al.*, 1996). Оценка динамического диапазона показала, что в оптимизированных условиях стандартная кривая остается линейной ( $R^2 > 0,99$ ) в пределах от 100 до  $10^8$  копий на реакцию, чувствительность детекции при этом составила 50 копий маркерной последовательности на 1 г растительной ткани, что существенно превышает чувствительность методик, ранее использовавшихся для оценки гетероплазмии мтДНК сахарной свеклы (Брагин и др., 2006; Cheng *et al.*, 2009).

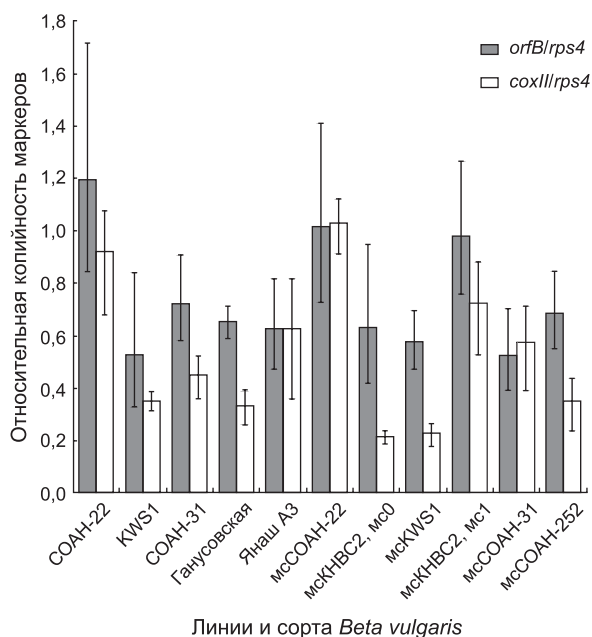
Сравнение копийности универсальных маркеров *rps4* и *coxII* с использованием выборки растений линий СОАН-22 и мсСОАН-22, включавшей по 5 растений каждой линии, показало, что соотношение *rps4/coxII* варьирует незначительно как в пределах линии, так и между линиями с вероятностью более 99 %, составляя  $1,03 \pm 0,25$  при межлинейном сравнении.

Соотношения маркеров *rps4/coxII* оказались близкими и при сравнении растений различных линий, что позволило использовать любой из них в качестве нормировочного гена.

Копийность маркеров мтДНК определялась с использованием мультиплексного количественного ПЦР в реальном времени, в реакционную смесь добавлялись праймеры и зонды, соответствующие нормировочному маркеру *rps4* (зонд был мечен флуорофором Cy5), и праймеры и зонды детектируемых последовательностей *orfB*, *orf324*, *orf246* или *S-RAPD* (зонды были мечены FAM или R6G).

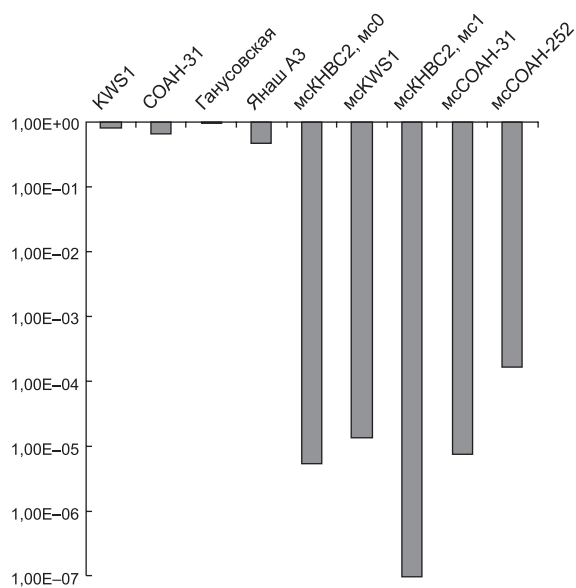
Оценка копийности универсального маркера *orfB* показала равное его присутствие как в цитоплазмах фертильных растений (соотношение от 0,52 для KWS1 до 1,20 для СОАН-22), так и в цитоплазмах растений ЦМС-линий (соотношение от 0,52 для мсСОАН-31 до 1,01 для мсСОАН-22) (рис. 1). Это вкупе с данными о повсеместном присутствии универсального маркера *coxII* свидетельствует в пользу того, что стехиометрия последовательностей в составе доминирующего генома изменяется в ограниченных пределах (не более одного порядка), и структура превалирующей формы генома стабильна даже в дифференцированных вегетативных тканях растения.

Анализ копийности *orf246* показал, что этот маркер количественно преобладает в линиях фертильных растений, обнаруживая незначительную межлинейную вариацию. Если принять количество нормированного на *rps4* маркера *orf246* в растениях сорта Ганусовская за 100 %, то количества этого маркера в мтДНК других фер-



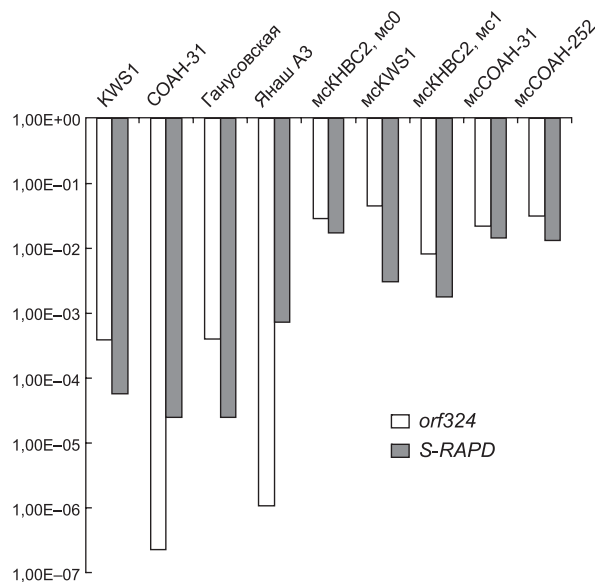
**Рис. 1.** Копийности универсальных маркеров *orfB* и *coxIII*, нормированные на копию универсального маркера *rps4*.

тильных растений составят 50, 69 и 88 % для сортов Янаш А3, COAH-31 и KWS1 соответственно, т. е. копииности отличались не более чем вдвое (рис. 2, табл.). Сходная картина наблюдалась и для мтДНК стерильных линий сахарной свеклы, в которых соотношение *rps4/orf246* составляло от 6000 (mSCOAH-252) до 183000 (mCKHBC2, mC0). В одном из исследованных образцов (mCKHBC2, mC1) указанная последовательность не была обнаружена, что, по всей вероятности, свидетельствует о том, что она была утрачена в мтДНК корня в ходе онтогенетического развития растения. Важно то, что использование усовершенствованного метода ПЦР в реальном времени позволило выявить *N*-специфичную последовательность во всех исследованных образцах с *Svulg*-цитоплазмой, кроме одного, что указывает на то, что мтДНК у *B. vulgaris* является гетероплазматичной. Крайне малая копиюность *N*-специфических последовательностей в *Svulg*-цитоплазме объясняется тем, что в качестве источника мтДНК использовались дифференцированные ткани растения. По-видимому, после прохождения стадий дифференцировки клетки могут терять минорный вариант мтДНК, в то время как клетки меристематических тканей сохраняют и передают «трансмиссивную форму» (Arrieta-Montiel *et al.*, 2001).



**Рис. 2.** Копиюность *N*-специфичного маркера *orf246*, нормированная на копию универсального маркера *rps4*.

Оценка копиюности *Svulg*-специфичных маркеров подтвердила полученные нами ранее данные о присутствии последовательностей, специфичных для плазмотипов стерильных линий в составе мтДНК растений фертильных линий (рис. 3 и табл.). Анализ копиюности



**Рис. 3.** Копиюности *Svulg*-специфичных маркеров *orf324* (белые столбики) и *S-RAPD* (серые столбики), нормированные на копию универсального маркера *rps4*.

Таблица

Соотношение копийностей маркеров в различных линиях сахарной свеклы

| Линии <i>B. vulgaris</i> | Отношение копийностей<br><i>orf246</i> и <i>rps4</i> | Отношение копийностей<br><i>orf324</i> и <i>rps4</i> | Отношение копийностей<br><i>S-RAPD</i> и <i>rps4</i> |
|--------------------------|--|--|--|
| СОАН-22                  | $3,78 \times 10^4$                                   | 1,07   | $1,10 \times 10^2$                                   |
| KWS1                     | $8,35 \times 10^1$                                   | $3,94 \times 10^4$                                   | $5,81 \times 10^5$                                   |
| СОАН-31                  | $6,60 \times 10^1$                                   | $2,30 \times 10^7$                                   | $2,46 \times 10^5$                                   |
| Ганусовская              | $9,53 \times 10^1$                                   | $3,99 \times 10^4$                                   | $2,51 \times 10^5$                                   |
| Янаш АЗ                  | $4,80 \times 10^1$                                   | $1,07 \times 10^6$                                   | $7,20 \times 10^4$                                   |
| цмсСОАН-22               | $3,79 \times 10^6$                                   | $9,81 \times 10^1$                                   | $2,59 \times 10^2$                                   |
| мсКНВС2, мс0             | $5,47 \times 10^6$                                   | $2,90 \times 10^2$                                   | $1,72 \times 10^2$                                   |
| мсKWS1                   | $1,38 \times 10^5$                                   | $4,51 \times 10^2$                                   | $3,02 \times 10^3$                                   |
| мсКНВС2, мс1             | $1,00 \times 10^7$                                   | $8,09 \times 10^3$                                   | $1,77 \times 10^3$                                   |
| мсСОАН-31                | $7,52 \times 10^6$                                   | $2,16 \times 10^2$                                   | $1,44 \times 10^2$                                   |
| мсСОАН-252               | $1,68 \times 10^4$                                   | $3,10 \times 10^2$                                   | $1,32 \times 10^2$                                   |

маркера *orf324* в расширенном спектре линий показал, что соотношение количества этой *Svulg*-специфичной последовательности к количеству универсального маркера *rps4* варьирует от 1 : 22 (линия мсKWS1) до 1 : 123 (образец линии мсКНВС2 с пыльцевым фенотипом мс1). Сходные данные получены и для другого ЦМС-специфичного маркера – *S-RAPD* с той оговоркой, что его количество оказалось ниже такового *orf324* для всех исследованных растений ЦМС-линий и составляло в соотношении с *rps4* от 1 : 69 (линия мсСОАН-31) до 1 : 564 (образец линии мсКНВС2 с пыльцевым фенотипом мс1). При этом между количествами обоих маркеров наблюдалось хорошее соответствие. Стоит отметить связь между пыльцевым фенотипом и копийностью *Svulg*-специфичных маркеров для двух исследованных растений линии мсКНВС2: в растении, характеризующемся пыльцевым фенотипом мс0, количество обеих маркерных последовательностей примерно на порядок превышает таковое в случае растения с мс1 фенотипом (частичная фертильность), при этом мс1 растение характеризуется минимальным количеством ЦМС-специфичных маркеров среди всех растений с оуэновским плазмотипом.

Анализ количества *Svulg*-специфичных маркеров в образцах растений с *N*-цитоплазмой показал повсеместное присутствие обеих последовательностей, при этом копийность маркеров была в среднем на 3 порядка меньше, чем в образцах

с *Svulg*-цитоплазмой для *orf324* и в среднем на 2 порядка меньше для *S-RAPD*. Это согласуется с высказанным ранее предположением о присутствии *Svulg*-специфичных последовательностей в цитоплазме фертильных растений в субстехиометрических количествах (Брагин и др., 2006). Все исследованные образцы можно разделить на две группы, опираясь на копийности *Svulg*-специфичных маркеров: в первую входят растения, в которых соотношение как *orf324/rps4*, так и *S-RAPD/rps4* будет больше 1 : 1000 – все растения этой группы принадлежат к ЦМС-линиям; во второй группе окажутся растения, для которых указанные соотношения будут меньше, чем 1 : 1000 (т. е. оба указанных маркера будут представлены в субстехиометрическом состоянии) – все растения этой группы фертильны.

### Обсуждение

Переход к более совершенному варианту ПЦР в реальном времени, основанному на использовании флуоресцентно меченных олигонуклеотидных зондов, нормировка специфических маркеров мтДНК на универсальные, оптимизация состава ПЦР-смеси и внедрение «горячего старта» в совокупности с анализом расширенной выборки растений позволили получить более полную картину организации мтДНК у *B. vulgaris*. Показано, что как *N*-, так и *Svulg*-специфичные маркеры повсеместно присутствуют



в цитоплазмах растений как с оуэновским плазмотипом, так и с плазмотипом, обеспечивающим образование фертильной пыльцы. Эти данные согласуются с фактами спонтанной конверсии к стерильности и спонтанной реверсии к фертильности (Аульченко и др., 1997; Вепрев и др., 1997), а также свидетельствуют в пользу независимого сосуществования митохондриальных геномов *N*- и *Svulg*-типов в пределах митохондрий растений одной линии, что подтверждается независимым накоплением точечных мутаций разными вариантами последовательности (Satoh *et al.*, 2004; Брагин и др., 2006).

Чрезвычайно важным является то, что стехиометрия *N* и *Svulg*-специфичных последовательностей находится в прямой зависимости от типа цитоплазмы для таких маркеров, как *N*-специфичный *orf246* и *Svulg*-специфичные *orf324* и *S-RAPD*, в то время как представленность универсальных маркеров *orfB*, *rps4* и *coxII* от типа цитоплазмы не зависит. Это подтверждает данные о преимущественном присутствии последовательностей, вошедших в состав мастер-хромосомы *N*-типа (Kubo *et al.*, 2000), в цитоплазме фертильных растений и преимущественном присутствии последовательностей, вошедших в состав мастер-хромосомы *Svulg*-типа (Satoh *et al.*, 2004), в цитоплазме растений с оуэновским типом ЦМС. Наличие связи между стехиометрией маркерных последовательностей и типом цитоплазмы позволяет использовать их для быстрого высокочувствительного типирования цитоплазмы сахарной свеклы, широко востребованного в селекционной практике (Cheng *et al.*, 2009). Полученные результаты дополняют и систематизируют информацию об организации митохондриального генома *B. vulgaris* и указывают на то, что гетероплазмия является естественным состоянием митохондриального генома растений этого вида.

### Литература

- Аульченко Ю.С., Вепрев С.Г., Аксенович Т.И. Изменение типа цитоплазмы у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) при инбридинге. II. Сегрегационный анализ родословной // Генетика. 1997. Т. 33. С. 808–815.
- Брагин А.Г., Иванов М.К., Дымшиц Г.М. Оценка стехиометрии маркерных последовательностей митохондриального генома сахарной свеклы (*Beta vulgaris*) методом ПЦР в реальном времени // Докл. АН. 2006. Т. 406. Вып. 2. С. 260–265.
- Вепрев С.Г., Дикалова А.Э., Мглинец А.В. и др. Изменение типа цитоплазмы у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) при инбридинге. I. Гибридологический анализ и тестирование типа митохондриальной ДНК // Генетика. 1997. Т. 33. С. 799–807.
- Мглинец А.В., Вепрев С.Г., Малецкий С.И. Принципы и методы создания цмс-аналогов инбредных линий сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). Каталог коллекции // Генетические коллекции растений. Новосибирск: Ин-т цитологии и генетики СО РАН, 1995. Вып. 3. С. 229–249.
- Arrieta-Montiel M., Lyznik A., Woloszynska M. *et al.* Tracing evolutionary and developmental implications of mitochondrial stoichiometric shifting in the common bean // Genetics. 2001. V. 158. P. 851–864.
- Brears T., Lonsdale D.M. The sugarbeet mt genome: a complex organization generated by homologous recombination // Mol. Gen. Genet. 1988. V. 214. P. 514–522.
- Cheng D., Kitazaki K., Xu D. *et al.* The distribution of normal and male-sterile cytoplasms in Chinese sugar-beet germplasm // Euphytica. 2009. V. 165. P. 345–351.
- Kmiec B., Woloszynska M., Janska H. Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals // Curr. Genet. 2006. V. 50. P. 149–159.
- Kubo T., Nishizawa S., Sugawara A. *et al.* The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA<sup>Cys</sup>(GCA) // Nucl. Acids Res. 2000. V. 28. P. 2571–2576.
- Kubo T., Mikami T. Organization and variation of angiosperm mitochondrial genome // Physiol. Plant. 2007. V. 129. P. 6–13.
- Rogstad S.H. Plant DNA Extraction Using Silica // Plant Mol. Biol. Reporter. 2003. 21. 463a–463g.
- Rybalkin I.N., Mukhamedova N.M., Vlasik T.N., Chenchik A.A. The new technology of hot start polymerase chain reaction // Bull. Exptl Biol. Med. 1996. V. 121(2). P. 0007–4888 (Print) 1573–8221 (Online).
- Sarria R., Lyznik A., Vallejos C.E., Mackenzie S.A. A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial peptide is post-translationally regulated // Plant Cell. 1998. № 10. P. 1217–1228.
- Satoh M., Kubo T., Nishizawa S. *et al.* The cytoplasmic male-sterile type and normal type mitochondrial genomes of sugar beet share the same complement of genes of known function but differ in the content of expressed ORFs // Mol. Gen. Genomics. 2004. V. 272. P. 247–256.
- Schnable P.S., Wise R.P. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration // Trends Plant Sci. 1998. V. 3(5). P. 175–180.

## ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL DNA HETEROPLASMY IN FERTILE AND OWEN CMS SUGAR BEET (*BETA VULGARIS*) PLANTS

A.G. Bragin<sup>1</sup>, M.K. Ivanov<sup>1,2</sup>, L.A. Fedoseeva<sup>1</sup>, G.M. Dymshits<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: abgicg@mail.ru;

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

### Summary

Real-time PCR with fluorescent hybridization probes was used for plant mitochondrial DNA (mtDNA) heteroplasmy state characterization for the first time. Analysis of *N*- and *Svulg*-specific sequence stoichiometry in sugar beet mtDNA indicates that heteroplasmy should be treated as native plant mtDNA behavior. Genome-specific sequence quantity determination shows that the copy number of minor genome sequences can be less than that of main genome sequences by more than six orders of magnitude.

**Key words:** *Beta vulgaris*, mitochondrial DNA, heteroplasmy, real-time PCR.

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ *ELYMUS FIBROSUS* (TRITICEAE: POACEAE) ПО ЗАПАСНЫМ БЕЛКАМ ЭНДОСПЕРМА

Д.Е. Герус, А.В. Агафонов

Учреждение Российской академии наук Центральный сибирский ботанический сад  
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: agalex@mail.ru

Проведено изучение проламин-глютелинового комплекса белков эндосперма у *Elymus fibrosus* (Poaceae) методом SDS-электрофореза. В целом *E. fibrosus* характеризуется исключительно низким уровнем изменчивости как по морфологическим, так и биохимическим признакам. Значение среднего процентного сходства по проламин-глютелиновым полипептидам между образцами *E. fibrosus* составило 49,3 %. Тем не менее на кладограмме исследованные образцы из азиатской части России и Финляндии были четко отделены друг от друга, что в общем согласуется с литературными данными по результатам аллозимного и RAPD-анализа. Но при этом два западносибирских образца были расположены ближе к финским, чем к другим азиатским.

**Ключевые слова:** *Elymus fibrosus*, изменчивость, белки эндосперма, электрофорез, частная генетика.

### Введение

Род *Elymus* L. является самым крупным в трибе Triticeae семейства Poaceae (Gramineae) и насчитывает в мире по разным оценкам 150–180 многолетних видов (Löve, 1984; Цвелев, 1991; Barkworth *et al.*, 2007). В России число видов по последним данным систематиков составляет 53 (Цвелев, Пробатова, 2010), из которых большая часть распространена в Сибири и на Дальнем Востоке. Это таксоны с преимущественным самоопылением, несущие гапломы StH, StY ( $2n = 4x = 28$ ) и StHY ( $2n = 6x = 42$ ) в соответствии с современной номенклатурой (Wang *et al.*, 1994). Обширные ареалы и часто наблюдаемое совместное произрастание двух и более видов обеспечивают протекание интрогрессивных процессов, что в свою очередь затрудняет понимание филогенетических отношений и построение адекватной таксономической системы рода (Агафонов, 2007a).

*E. fibrosus* (Schrenk) Tzvel. – аллотетраплоидный вид с геномной конституцией StStHH (Dewey, 1984). Ареал *E. fibrosus* охватывает европейскую часть России, включая Арктику,

а также многие регионы Западной и Восточной Сибири. В Западной Европе ареал продвинут до Скандинавии. Здесь необходимо отметить, что на основе природного материала в прошлом веке был создан ряд кормовых сортов и газонных смесей, и вид широко распространился по всей России включая урбанизированные территории. Основными морфологическими признаками, характеризующими данный вид, являются узкие, негустые, длинные колосья, колосковые чешуи (КЧ) почти в два раза короче нижних цветковых чешуй (НЦЧ), с внутренней стороны волосистые; нижние цветковые чешуи голые, безостые, каллус с длинными волосками (Пробатова, 1985; Пешкова, 1990). Проведенный нами анализ живых образцов *E. fibrosus* из разных точек ареала по таким морфологическим признакам, как опушенность стеблей и листовых пластинок, показал полное отсутствие изменчивости (Герус, Агафонов, 2003).

Ранее были исследованы уровни аллозимной, RAPD и микросателлитной изменчивости в некоторых популяциях из России и Финляндии. Генетическая изменчивость по микросателлитным локусам была выше (среднее число

аллелей на локус ( $A = 1,8$ ; процент полиморфных локусов ( $P = 53,3$ ; генное разнообразие ( $H_e = 0,252$ ), чем аллозимная ( $A = 1,06$ ;  $P = 5,8$ ;  $H_e = 0,008$ ) и RAPD ( $A = 1,19$ ;  $P = 20,3$ ;  $H_e = 0,090$ ) (Sun *et al.*, 1998; Diaz *et al.*, 2000). В исследованных популяциях из Финляндии генетическое разнообразие было больше, чем в изученных популяциях из России. В целом результаты, основанные на исследовании морфологической, аллозимной, микросателлитной и RAPD изменчивости, свидетельствуют о невысокой вариабельности *E. fibrosus* на протяжении обширного ареала. При этом молекулярно-генетическими методами были изучены только выборочные образцы из трех малочисленных популяций с территории России. Целью данного исследования ставились оценка уровня внутривидовой изменчивости *E. fibrosus* по запасным белкам эндосперма и сравнение полученных результатов с литературными данными по вариабельности молекулярно-генетических маркеров.

### Материалы и методы

**Растительный материал.** Анализировались образцы *E. fibrosus* из 31 популяции из различных географических точек России и Финляндии, а также семена сорта Регнерия Омская. Сортовые семена были получены из Западно-Сибирского селекцентра (г. Омск). Образцы финского происхождения из коллекции Шведского аграрного университета были любезно предоставлены Б. Саломоном (авторы сборов М. Густафссон, Р. вон Ботмер, Швеция). Данные о происхождении российского материала приведены в табл. 1. Под термином «образец» нами понимается следующее:

1. Семена, собранные с индивидуального растения в природных условиях (один образец – семена одного растения);
2. Семена из каждого пакета, полученного из вышеуказанных источников.

Биотипами мы называем конкретные растения, выращенные из семян образцов.

**SDS-электрофорез запасных белков эндосперма.** Процедуры по выделению запасных белков эндосперма и электрофорез в SDS-системе проводили по методике U.K. Laemmli (1970) с модификациями (Агафонов, Агафонова, 1989,

1992). Из каждой зерновки получали два типа белкового экстракта – без добавления 2-меркаптоэтанола (вариант –Me) и с добавлением (вариант +Me). В качестве стандарта в каждом опыте использовали зерновки образца *E. sibiricus* ALT-8401, у которого полипептидные компоненты электрофоретического спектра ранее были откалиброваны по стандартным маркерам молекулярных масс. Для более точной идентификации каждого компонента на электрофореграммах помимо значений молекулярных масс (кДа) строились шкалы относительной электрофоретической подвижности (ОЭП).

**Статистический анализ.** На основе электрофореграмм запасных белков эндосперма строили бинарную матрицу по присутствию (1) или отсутствию (0) компонента. Подсчет уровня попарно-группового сходства проводили в программе BiodiversityPro. Построение дендрограммы выполнено по методу «полной связи» (complete linkage) с использованием коэффициента Manhattan distance в программе Statistica 6.0. В методе «полной связи» расстояния объединения между кластерами определяются наибольшим расстоянием между любыми двумя объектами в различных кластерах. При использовании коэффициента Manhattan distance это расстояние является просто средним разностей по координатам. Стоит отметить, что для этой меры влияние отдельных больших разностей уменьшается. Манхэттенское расстояние вычисляется по формуле: расстояние  $(x, y) = \sum_i |x_i - y_i|$ .

### Результаты

Электрофорез запасных белков эндосперма образцов *E. fibrosus*, проведенный с использованием двух типов экстрактов (вариант +Me и –Me) в одном гелевом блоке, показал следующие результаты (рис. 1).

Общее число компонентов в варианте –Me, где проявляются мономерные белки – проламины, у разных образцов составляло 10–12, а в варианте +Me увеличивалось до 13–19 компонентов. В обоих случаях на спектрах присутствовали относительно консервативные компоненты в областях 32, 37 и 43 ед. ОЭП (отмечены двусторонними стрелками). Так как эти компоненты при обработке экстрактов 2-меркаптоэтанолом не изменили свою подвиж-



Таблица 1

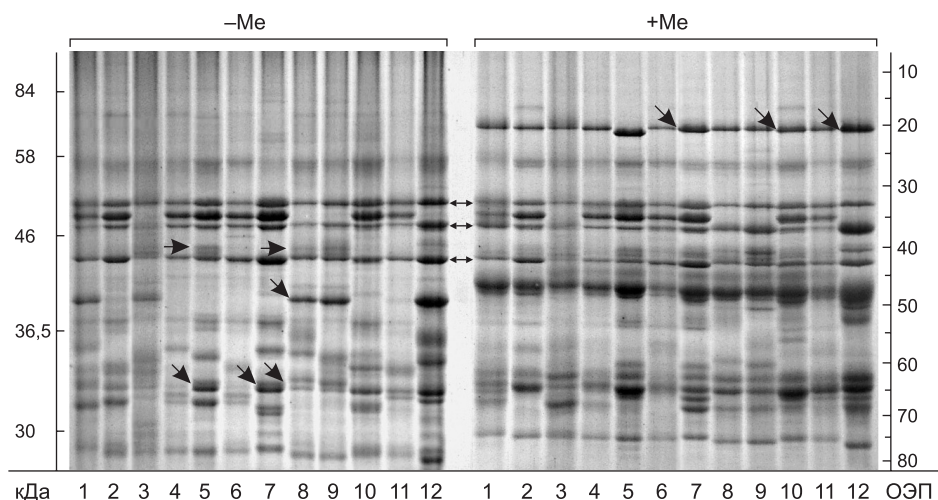
Идентификационные номера и место сбора российских образцов *E. fibrosus*

| Код образца | Место сбора   |
|-------------|---|
| MAR-0712    | окр. г. Магадан, Арманская трасса, берег р. Окса; N 59°39.733' E 150° 30.209'   |
| HAB-0110    | г. Хабаровск, урбанизированная городская территория   |
| VLA-8627    | окр. г. Владивосток, урбанизированная территория у автотрассы Владивосток–Артем; N 43°13' E 132°00'                                   |
| VLA-0708    | окр. г. Владивосток, песчаный берег ручья у автотрассы Владивосток–Артем; N 43°13.720' E 132°00.178'                                  |
| CHI-9609    | г. Чита, остепненный луг в районе аэропорта   |
| SAM-0520    | Республика Бурятия, Окинский р-н, автотрасса Самарта–Орлик, обочина грунтовой дороги; N 52°03.385' E 101°08.217'                      |
| IRC-8101    | Иркутская обл., Усть-Илимский р-н, окр. с. Невон  |
| SLU-9701    | Иркутская обл., окр. г. Слюдянка, зона отчуждения ж.-д. у оз. Байкал  |
| KRA-9909    | г. Красноярск, урбанизированная зона вблизи р. Енисей (А. Агафонов)   |
| SHA-9504    | Красноярский край, г. Шарыпово, урбанизированная территория; N 55°32.65' E 89°10.17'  |
| SHA 0502    | Красноярский край, г. Шарыпово, урбанизированная территория; N 55°32.44' E 89°09.22'  |
| TUM-0401    | Тюменская обл., Ханты-Мансийский АО, Октябрьский р-н, окр. с. Октябрьское, галечно-ово-илистый бер. притока р. Оби; N 66°00' E 62°45' |
| TUM-0402    | Тюменская обл., Ханты-Мансийский АО, Октябрьский р-н, окр. пос. Советский; N 66°00' E 62°45'  |
| TUV-0311    | Респ. Тува, г. Кызыл, каменисто-песчаный лев. бер. р. Енисей; N 51°43.212' E 94°25.098'   |
| ELC-9501    | г. Новосибирск, окр. пос. Н. Ельцовка, обочина лесной дороги  |
| ACD-8705    | г. Новосибирск, Академгородок, газонные посадки   |
| NSK-8917    | 184 км на юг по автотрассе Новосибирск–Барнаул, лесная поляна в 50 м от шоссе   |
| TRO-9003    | Алтайский край, Троицкий р-н, пос. Троицкое, бер. р. Большая Речка; N 52°58.75' E 84°41.16'   |
| BSK-9302    | г. Бийск, газонные посадки в районе автовокзала   |
| ABE-0445    | Респ. Алтай, Шебалинский р-н, окр. пос. Беш-Озек, луг вблизи 41 км автотрассы Черга–Усть-Кан; N 51°05.395' E 85°12.303'               |
| ABE-0645    |   |
| GAA-8915    | Респ. Алтай, Улаганский р-н, пос. Акташ, урбанизированная территория  |
| GAA-8916    |   |
| SAJ-9504    | Красноярский кр., Зап. Саян, автотрасса Абакан–Кызыл, граница разнотравного луга у оз. Ойское; N 52°50.216' E 93°14.923'              |
| UPA-9506    | Красноярский кр., Зап. Саян, автотрасса Абакан–Кызыл, пер. Уюкский, обочина лесной тропы  |
| OMS-8701#   | Омский СибНИИСХоз, Западно-Сибирский селекцентр   |

Примечание. (#) образец OMS-8701 был получен как *Roegneria fibrosa*, сорт Омская.

ность, то их можно рассматривать как инвариантные проламиновые полипептиды, лишённые внутренних S-S связей (Агафонов, Агафонова, 1992). У образца IRC-8101 эта группа белков представлена только двумя слабовыраженными проламинами на уровне 32 и 37 ед. ОЭП, что, видимо, может быть связано с длительным

хранением семян этого биотипа. У образцов KRA-9909, ELC-9501, TRO-9003 (–Me) в области 41 ед. ОЭП выявлялось по дополнительной субъединице (отмечены стрелками). Группа белков в области 45–80 ед. ОЭП была более полиморфной, представлена 5–8 компонентами. Сходство по полипептидам в этой группе



**Рис. 1.** SDS-электрофореграмма запасных белков эндосперма образцов *E. fibrosus*.

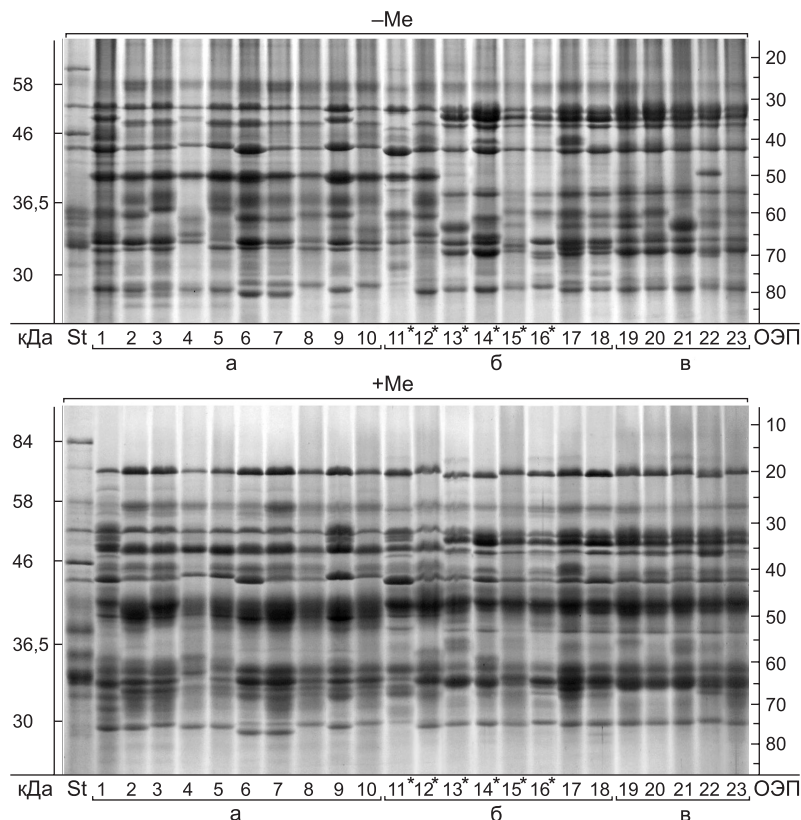
1 – VLA-8627; 2 – CHI-9609; 3 – IRC-8101; 4 – SLU-9701; 5 – KRA-9909; 6 – SAJ-9904; 7 – SHA-9504; 8 – ELC-9501; 9 – TRO-9003; 10 – BSK-9302; 11 – GAA-8915; 12 – H10339.

наблюдалось у образцов KRA-9909 и SHA-9504 в области 68 ед. ОЭП (отмечены стрелками). Также сходство показали образцы ELC-9501 и TRO-9003 по компонентам в областях 51 и 62–64 ед. ОЭП. После добавления в экстракты запасных белков эндосперма у всех образцов на электрофореграмме дополнительно выявлялась высокомолекулярная субъединица глютелина или агрегированного проламина, расположенная в области 19–20 ед. ОЭП (отмечена стрелкой). Кроме того, менялась подвижность проламиновых компонентов с массой ниже 36 кДа. Таким образом, вариант SDS-электрофореза запасных белков эндосперма с добавлением в экстракты 2-меркаптоэтанола (+Me) является более информативным из-за выявления дополнительных субъединиц глютелина и/или агрегированного проламина.

Для подтверждения ранее полученных данных об идентичности спектров сестринских зерновок видов рода *Elymus* был проведен электрофоретический анализ, в который были взяты пары зерновок с одного колоса у природных образцов видов *E. fibrosus*. За исключением трех образцов (SAJ-9904, KRA-9909, OMS-8701) сестринские зерновки всех образцов показали идентичность по запасным белкам эндосперма. Таким образом, полученные данные подтверждают представление о самоопылении как основной форме размножения видов рода *Elymus* и о

высоком уровне гомозиготности индивидуальных растений (Агафонов и др., 2008).

SDS-электрофорез запасных белков эндосперма образцов *E. fibrosus* из России и Финляндии (рис. 2) в варианте –Me позволил выявить компоненты на спектре, по которым группа азиатских образцов отличалась от финских. Исключение составили 7 западносибирских образцов (рис. 2 и 3, –Me) по наличию проламиновых компонентов 50 ед. ОЭП и 6 образцов по отсутствию инвариантных компонентов 34 ед. ОЭП. Они оказались более схожими с финской группой. Однако компонент 50 ед. ОЭП присутствовал и в одной зерновке сортовых семян. Все остальные группы полипептидов в большей или меньшей степени варьировали. В варианте +Me (рис. 2) у финских образцов высокомолекулярная субъединица глютелина в области 19–21 ед. ОЭП представлена только одним вариантом, тогда как у азиатских было выявлено по меньшей мере три аллеля (рис. 3). Так, первую группу составляли образцы KRA-9909, ABE-0445 и SHA-0502, у этих зерновок высокомолекулярная субъединица глютелина показала большую подвижность, чем у других. У образцов ELC-9501, ACD-8705 и NSK-8917 альтернативный компонент был наиболее медленным. Третью группу составляли все остальные образцы (треки № 1–6, 11–14, 16–18, 21–23). Компонент в области 34 ед. ОЭП присутствовал



**Рис. 2.** SDS-электрофореграмма запасных белков эндосперма у финских (а), дикорастущих азиатских (б) и сортовых (регнерия «Омская», в) образцов *E. fibrosus*.

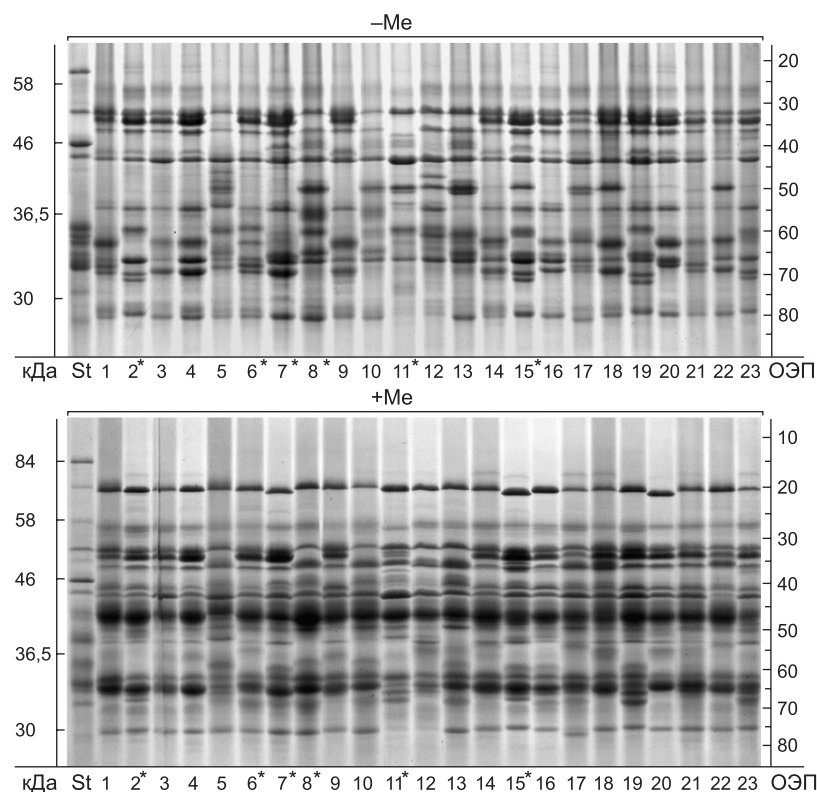
Звездочками отмечены также образцы, показанные на рис. 3. 1 – H10306b; 2 – H10307; 3 – H10311b; 4 – H10319; 5 – H10321; 6 – H10339; 7 – H10342a; 8 – H10344; 9 – H10347; 10 – H10349; 11 – TUM-0401; 12 – ELC-9501; 13 – ABE-0445; 14 – KRA-9909; 15 – SLU-9701; 16 – VLA-0708; 17 – HAB-0110; 18 – MAR-0712; 19–23 – OMS-8701.

почти у всех российских образцов, за исключением новосибирского ELC-9501. У финских образцов, наоборот, этот компонент отсутствовал или проявлялся в виде более слабых двойных полос (H10306b и H10347), схожих с таковыми у тюменского TUM-0401. Абсолютно постоянным для всех образцов из России был только полипептид 43 ед. ОЭП, который среди образцов из Финляндии был представлен 3 аллелями. Примечательно, что у самого географически отдаленного магаданского образца MAR-0712 был выявлен высокий уровень сходства как с дальневосточными (VLA-0708 и HAB-0110), так и с сибирскими образцами, что, вероятно всего, связано с его заносным происхождением. У всех российских образцов на спектрах присутствовали инвариантные компоненты неагрегированного проламина в областях 32, 37 и 43 ед. ОЭП, которые можно рассматривать как наиболее видоспецифичные (рис. 2 и 3, +Me).

Однако следует отметить, что абсолютно видоспецифичных полипептидов среди белков с функциями запасных у «хороших» видов, имеющих широкий ареал, нами ранее не обнаруживалось.

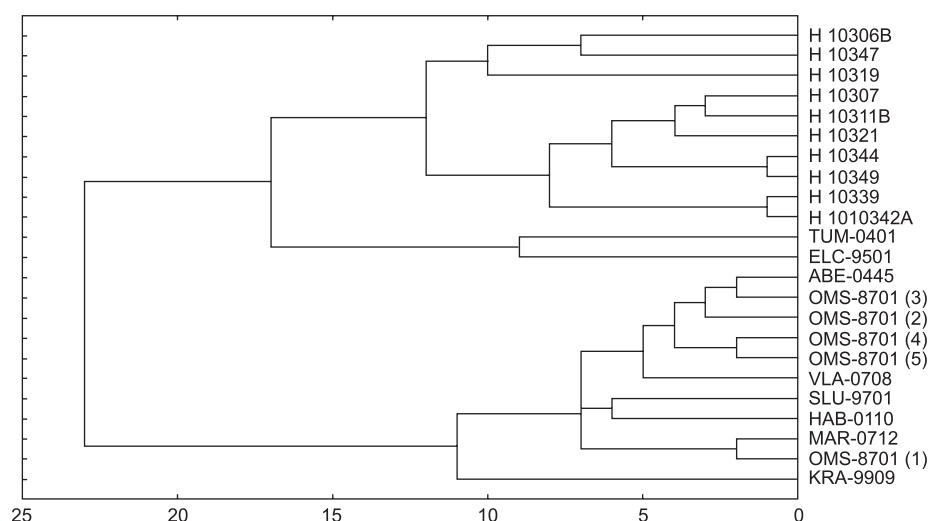
Анализ сортовых семян *E. fibrosus* (рис. 2, в) позволил выявить различия между зерновками только по нескольким компонентам, в том числе по высокомолекулярным субъединицам глютелина (агрегированного проламина) около 20 ед. ОЭП. При этом большинство природных азиатских образцов *E. fibrosus* по составу спектров очень схожи с семенами данного сорта.

На кладограмме (рис. 4), построенной на основе электрофореграммы –Me (рис. 2), финские и российские образцы образовали две клады. Однако два западносибирских образца, TUM-0401 и ELC-9501, распределились в кладу, образованную финскими образцами, из-за выше-названных особенностей сходства по запасным



**Рис. 3.** SDS-электрофореграмма запасных белков эндосперма у дальневосточных (1, 2) и сибирских образцов *E. fibrosus*.

1 – VLA-8627; 2 – VLA-0708; 3 – CHI-9609; 4 – SAM-0520; 5 – IRC-8101; 6 – SLU-9701; 7 – KRA-9909; 8 – ELC-9501; 9 – ACD-8705; 10 – NSK-8917; 11 – TUM-0401; 12 – TUM-0402; 13 – TRO-9003; 14 – BSK-9302; 15 – ABE-0445; 16 – ABE-0645; 17 – GAA-8915; 18 – GAA-8916; 19 – SHA-9504; 20 – SHA-0502; 21 – SAJ-9504; 22 – UPA-9506; 23 – TUV-0311.



**Рис. 4.** Дендрограмма, построенная на основе данных по проламинам (рис. 2, вариант –Me) финских и российских образцов по методу «Complete linkage» с использованием коэффициента «Manhattan distances». Шкала показывает уровень различий.



белкам эндосперма. На кладограмме, построенной по электрофореграмме в варианте +Me (в тексте рисунок не приводится), эти два образца также объединились в один кластер с финскими. В целом финские и российско-азиатские образцы вида достаточно четко различались, но граница между западными и восточными типами видовых спектров расположена ориентировочно на долготе Новосибирской области. Однако более подробный анализ российских образцов включая сортовые показал, что проламиновый полипептид 49 ед. ОЭП, характерный для всех финских образцов и двух западносибирских TUM-0401 и ELC-9501, обнаружен и у некоторых других российских (рис. 3; –Me). Кроме того, в популяции АВЕ отмечены оба варианта по наличию–отсутствию этого полипептида. Поэтому предполагать наличие особых типов спектра по географическому критерию без учета особенностей вида с европейской части России в настоящий момент преждевременно. Вероятнее всего, этот вид обладает достаточно высокой географической подвижностью и легкостью распространения генофонда, о чем косвенно свидетельствуют наиболее частые

местонахождения особей в пределах урбанизированных территорий (см. табл. 1).

### Обсуждение

На основе электрофоретического опыта (в тексте рисунок не приводится), где помимо образцов *E. fibrosus* были включены образцы *E. caninus* (Герус, Агафонов, 2006а), подсчитывали уровень процентного сходства по проламин-глутелиновым полипептидам (табл. 2). Сравнение методом попарно-группового сходства российских и одного финского образца дало следующие результаты. Наибольшее сходство (86,7 %) отмечено между новосибирскими образцами NSK-8917 и ELC-9501. Уровень сходства между финским образцом и российскими образцами колебался от 22,2 до 41,7 %. Наименьший уровень сходства (22,2 %) был отмечен между финским образцом H10339 и образцом BSK-9302 из Алтайского края. Средний процент сходства между образцами *E. fibrosus* составил 49,3 %.

Ранее было показано, что для сибирских популяций *E. caninus*, обычно отличавшихся го-

Таблица 2

Уровень сходства образцов *E. fibrosus* по проламин-глутелиновым компонентам, идентифицированным по величинам ОЭП (%)

| Образец  | CHI-9609 | IRC-8101 | SLU-9701 | SHA-9504 | UPA-9506 | NSK-8917 | ELC-9501    | OMS-8701 | TRO-9003 | BSK-9302 | GAA-8915 | H 10339     | ALP-9723* |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------------|----------|----------|----------|----------|-------------|-----------|
| VLA-8627 | 75,0     | 35,0     | 57,9     | 70,6     | 73,3     | 50,0     | 50,0        | 58,8     | 50,0     | 52,6     | 63,2     | 30,4        | 9,7       |
| CHI-9609 |          | 31,8     | 77,8     | 63,2     | 86,7     | 45,0     | 45,0        | 70,6     | 45,0     | 55,0     | 65,0     | 28,0        | 5,9       |
| IRC-8101 |          |          | 40,9     | 42,9     | 35,0     | 47,4     | 47,4        | 33,3     | 47,4     | 25,0     | 33,3     | 34,8        | 9,4       |
| SLU-9701 |          |          |          | 57,1     | 76,5     | 40,9     | 40,9        | 63,2     | 40,9     | 50,0     | 59,1     | <b>41,7</b> | 8,6       |
| SHA-9504 |          |          |          |          | 61,1     | 50,0     | 50,0        | 50,0     | 57,9     | 45,5     | 61,9     | 37,5        | 5,7       |
| UPA-9506 |          |          |          |          |          | 42,1     | 42,1        | 68,8     | 42,1     | 61,1     | 63,2     | 30,4        | 6,3       |
| NSK-8917 |          |          |          |          |          |          | <b>86,7</b> | 33,3     | 75,0     | 30,4     | 45,5     | 34,8        | 6,1       |
| ELC-9501 |          |          |          |          |          |          |             | 40,0     | 75,0     | 36,4     | 45,5     | 34,8        | 6,1       |
| OMS-8701 |          |          |          |          |          |          |             |          | 33,3     | 66,7     | 60,0     | 24,0        | 6,1       |
| TRO-9003 |          |          |          |          |          |          |             |          |          | 30,4     | 45,5     | 34,8        | 6,1       |
| BSK-9302 |          |          |          |          |          |          |             |          |          |          | 61,9     | <b>22,2</b> | 5,7       |
| GAA-8915 |          |          |          |          |          |          |             |          |          |          |          | 29,6        | 5,4       |
| H 10339  |          |          |          |          |          |          |             |          |          |          |          |             | 8,6       |

Примечание. Значком \* отмечен образец *E. caninus* (Алтайский край).

раздо большим числом особей, чем у *E. fibrosus*, характерен различный уровень изменчивости по запасным белкам: от значительной до полной идентичности спектров. Например, для 12 типов спектров в популяции ОА-95 (Хакасия) наименьший коэффициент сходства составил 28,6%, а наибольший – 71,4%. Среднее значение уровня сходства белковых спектров для различных популяций находилось в диапазоне 44–55%. Уровень сходства спектров между представителями различных популяций был ниже и в среднем составил 34% (Агафонов, Костина, 2003). Вероятнее всего, в настоящее время большинство образцов *E. fibrosus*, собранных на урбанизированных территориях азиатской части России, являются одичавшими потомками нескольких кормовых и газонных сортов, районированных в послевоенное время. В целом, изменчивость *E. fibrosus* по запасным белкам эндосперма в пределах азиатской части России можно охарактеризовать как относительно невысокую по сравнению с StH-геномными видами: *E. caninus* (Агафонов, Костина, 2003), *E. mutabilis*, *E. transbaicalensis* (Агафонов, 2004) и *E. sibiricus* (Агафонов, 2007б). Несколько инвариантных проламинов были выявлены у всех или большинства проанализированных образцов и могут быть охарактеризованы как наиболее видоспецифичные. Значительных различий в структуре спектров между финскими и российскими образцами не обнаружено.

Изученные образцы *E. fibrosus* из географически отдаленных мест характеризовались меньшей электрофоретической изменчивостью по полипептидным спектрам запасных белков эндосперма, чем образцы всех ранее исследованных видов *Elymus*. Наши данные согласуются с ранее полученными результатами о меньшей аллозимной, микросателлитной и RAPD изменчивости *E. fibrosus* по сравнению с другими видами рода *Elymus* (Sun *et al.*, 1998, 2001; Diaz *et al.*, 2000). Проведенное нами изучение морфологических характеристик растений разных образцов *E. fibrosus*, таких, как ширина листовых пластин, длина колосьев, число цветков в колоске, относительная длина колосковых чешуй, ширина мембран КЧ, показало исключительно низкий уровень вариабельности. В филогенетическом отношении это может означать, что *E. fibrosus* является относительно молодым

малодифференцированным таксоном, обладающим всеми признаками «хорошего» обособленного вида. Тем не менее некоторые биотипы *E. fibrosus* способны к межвидовой интрогрессии с наиболее морфологически близким видом *E. caninus* (Герус, Агафонов, 2006б).

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 04-04-48720 и № 08-04-00747-а.

## Литература

- Агафонов А.В. Внутривидовая структура и репродуктивные отношения между *Elymus mutabilis* и *E. transbaicalensis* (Poaceae) в Южной Сибири с позиций таксономической генетики // Генетика. 2004. Т. 40. № 11. С. 1490–1501.
- Агафонов А.В. Дифференциация рода *Elymus* L. (Triticeae: Poaceae) в Азиатской части России с позиций таксономической генетики // Сиб. ботан. вестник: электронный журнал. 2007а. Т. 2. Вып. 1. С. 5–15. <http://journal.csbg.ru>
- Агафонов А.В. Общая структура рекомбинационного генома *Elymus sibiricus* и взаимоотношения вида с морфологически близкими таксонами *E. pubiflorus*, *E. lineicus* и *E. yubaridakensis*. Сообщение I. Изменчивость электрофоретических спектров запасных белков эндосперма *E. sibiricus* как показатель внутривидовой дифференциации // Сиб. ботан. вестник: электронный журнал. 2007б. Т. 2. Вып. 2. С. 21–32. <http://journal.csbg.ru>
- Агафонов А.В., Агафопова О.В. Способ идентификации генотипов многолетних злаков трибы Пшеницевые (Triticeae). А.с. СССР № 1546022. 1989.
- Агафонов А.В., Агафопова О.В. SDS-электрофорез белков эндосперма у представителей рода Пырейник (*Elymus* L.) с различной геномной структурой // Сиб. биол. журнал. 1992. Вып. 3. С. 7–12.
- Агафонов А.В., Герус Д.Е., Дорогина О.В. Самоопыление видов рода *Elymus* (Triticeae: Poaceae) и его отражение на полипептидных спектрах белков эндосперма // Сиб. ботан. вестник: электронный журнал. 2008. Т. 3. Вып. 1/2. С. 21–26. <http://journal.csbg.ru>
- Агафонов А.В., Костина Е.В. Морфологическая изменчивость и полиморфизм белков эндосперма и гистона H1 у типичных и отклоняющихся природных форм *Elymus caninus* L. (Poaceae) // Сиб. экол. журнал. 2003. № 1. С. 17–27.
- Герус Д.Е., Агафонов А.В. Изменчивость *Elymus fibrosus* (Triticeae: Poaceae) по полипептидным спектрам белков эндосперма, выявляемая SDS-электрофорезом, в сравнении с данными по

- E. caninus* // Матер. 2 междунар. науч.-практ. конф. «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии». Барнаул: АзБука, 2003. С. 25–29.
- Герус Д.Е., Агафонов А.В. Биосистематический анализ происхождения некоторых таксонов и морфологически отклоняющихся форм, близких к *Elymus caninus* и *E. mutabilis* // Сиб. ботан. вестник: электронный журнал. 2006а. Т. 1. Вып. 1. С. 67–76. <http://journal.csbg.ru>
- Герус Д.Е., Агафонов А.В. Моделирование интрогрессивных процессов между *Elymus fibrosus* и *E. caninus* и их регистрация с помощью одномерного SDS-электрофореза // Генетика. 2006б. Т. 42. № 12. С. 1405–1413.
- Пешкова Г.А. *Elymus* L. – Пырейник // Флора Сибири. Новосибирск: Наука, 1990. Т. 2. С. 17–32.
- Пробатова Н.С. Мятликовые, или злаки – Poaceae Barnh. (Gramineae Juss.) // Сосудистые растения Советского Дальнего Востока. Л.: Наука, 1985. Т. 1. С. 89–382.
- Цвелев Н.Н. О геномном критерии родов у высших растений // Ботан. журнал. 1991. Т. 76. № 5. С. 669–676.
- Цвелев Н.Н., Пробатова Н.С. Роды *Elymus* L., *Elytrigia* Desv., *Agropyron* Gaertn., *Psathyrostachys* Nevski и *Leymus* Hochst. (Poaceae: Triticeae) во флоре России // Комаровские чтения. Владивосток: Дальнаука, 2010. Вып. 57. С. 5–102.
- Barkworth M.E., Cambell J.J.N., Salomon B. *Elymus* L. // Flora of North America / Eds M.E. Barkworth et al. N.Y.; Oxford: Oxford Univer. Press, 2007. V. 24. P. 288–343.
- Dewey D.R. The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial *Triticeae* // Gene Manipulation in Plant Improvement / Ed. J.P. Gustafson. N.Y.: Plenum Publ. Corp. 1984. P. 209–279.
- Diaz O., Salomon B., Bothmer R. von. Levels and distribution of allozyme and RAPD variation in populations of *Elymus fibrosus* (Schrenk) Tzvel. (Poaceae) // Gen. Res. Crop. Evol. 2000. V. 47. № 1. P. 11–24.
- Löve A. Conspectus of the Triticeae // Feddes Repert. 1984. V. 95. P. 425–521.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
- Sun G.-L., Diaz O., Salomon B., Bothmer R. von. Microsatellite variation and its comparison allozyme and RAPD variation in *Elymus fibrosus* (Schrenk) Tzvel. (Poaceae) // Hereditas. 1998. V. 129. P. 275–282.
- Sun G.-L., Diaz O., Salomon B., Bothmer R. von. Genetic diversity and structure in a natural *Elymus caninus* population from Denmark based on microsatellite and isozyme analyses // Plant. Syst. Evol. 2001. V. 227. P. 235–244.
- Wang R.R.-C., Bothmer R. von, Dvorak J. et al. Genome symbols in the Triticeae (Poaceae) // Proc. 2nd Intern. Triticeae Symp. / Eds R.R.-C. Wang, K.B. Jensen, C. Jaussi. Utah, USA: Logan, 1994. P. 29–34.

## GENETIC DIVERSITY IN NATURAL *ELYMUS FIBROSUS* (TRITICEAE: POACEAE) POPULATIONS ASSESSED FROM ENDOSPERM STORAGE PROTEINS

D.E. Gerus, A.V. Agafonov

Central Siberian Botanical Garden, SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: [agalex@bionet.nsc.ru](mailto:agalex@bionet.nsc.ru);

### Summary

The prolamine–gluteline complex of endosperm proteins was studied in *Elymus fibrosus* (Poaceae) by SDS-electrophoresis. Generally, *E. fibrosus* is characterized by an extremely low level of variability for both morphological and biochemical traits. The average polypeptide similarity between accessions is 49,3 %. Nevertheless, accession groups from Asian Russia and Finland involved in the study were clearly separated in the cladogram. This fact is in agreement with reported results of allozyme and RAPD-analyses. However, two West Siberian accessions are closer to the Finnish group than to other Asian ones.

**Key words:** *Elymus fibrosus*, variability, endosperm proteins, electrophoresis, special genetics.

## НАСЛЕДОВАНИЕ ОКРАСКИ ПЕРИКАРПИЯ И СОДЕРЖАНИЯ $\beta$ -КАРОТИНА У ОВОЩНОГО ПЕРЦА

О.О. Тимина<sup>1</sup>, О.Ю.Тимин<sup>2</sup>, С.К. Федоров<sup>3</sup>, Н. Томлекова<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Приднестровский государственный университет,  
Тирасполь, Приднестровье, e-mail: otimina@mail.ru;

<sup>2</sup> Государственное учреждение Республиканский ботанический сад,  
Тирасполь, Приднестровье, e-mail: otimin@mail.ru;

<sup>3</sup> Институт пищевых технологий, Кишинев, Молдова, e-mail: fiodoroffs@mail.ru;

<sup>4</sup> Институт овощеводства «Марица», Пловдив, Болгария, e-mail: nasia.tomlekova@gmail.com

Изучены выраженность и наследование признаков оранжево-красной окраски перикарпия и высокого содержания  $\beta$ -каротина в зависимости от генетического фона у овощного перца. Показано, что оранжево-красная окраска определяется мутантным геном *bc* и доминантным геном *CrtZ-2*. Определена группа сцепления мутантного гена *bc*, контролирующего высокий уровень  $\beta$ -каротина. Обсуждаются возможности его использования в селекции на улучшенный биохимический состав плодов.

**Ключевые слова:** *Capsicum annuum* L., перец овощной, селекция, биохимические признаки,  $\beta$ -каротин, окраска перикарпия, генетический контроль.

### Введение

Селекция на улучшенный биохимический состав сельскохозяйственных растений считается одним из приоритетных и актуальных направлений (Dascalov, 1991; Лудилев и др., 1999; Жученко, 2001). Овощной перец (*Capsicum annuum* L.) – экономически значимая культура для многих европейских и азиатских государств, обладает высокими пищевыми, технологическими и вкусовыми достоинствами и является одним из важнейших источников витаминов РР и С. В плодах перца отмечают и наличие разнообразных каротиноидов, в том числе и  $\beta$ -каротина (Лазурьевский, Гуцу, 1983), являющегося важнейшей составной частью пищевого рациона человека с антиоксидантным эффектом. Исходя из норм физиологических потребностей здорового среднестатистического человека в аскорбиновой кислоте и  $\beta$ -каротине (Нормы ..., 2008) и с учетом того, что антиоксидантный эффект аскорбиновой кислоты проявляется при ее высокой концентрации (Kanner, Budowski, 1978), в 100 г перикарпия перца, предназначенного для свежего потребления, для выраженного биологического эффекта

должно содержаться не менее 100 мг аскорбиновой кислоты и не менее 5 мг  $\beta$ -каротина. С учетом направления селекции для консервной промышленности это содержание должно быть в 1,5–2 раза выше ввиду теплового разрушения витаминов при переработке. Результатом молдавской селекции 1970–1990-х гг. явились сорта Подарок Молдовы, Ласточка, Виктория и другие, в плодах которых в фазу технической спелости содержание аскорбиновой кислоты варьировало в зависимости от условий года в пределах 100–150 мг/100 г сырого вещества (с. в.). При наступлении биологического созревания содержание витамина возрастало, как правило, до 170–200 мг. Но содержание  $\beta$ -каротина было невысоким, в пределах 1,5–2,0 мг/100 г с. в. в фазу биологической спелости. Поэтому дальнейшая работа должна была вестись в основном на улучшение показателя содержания  $\beta$ -каротина с контролем минимального и оптимального уровней содержания витамина С.

Среди методов создания новых сортов и гибридов с улучшенным биохимическим составом одно из ведущих мест занимает мутагенез. Большая и плодотворная работа в этом направлении была проведена на перце профессором



С. Даскаловым с сотрудниками (Институт генетики Болгарской АН, София) (Даскалов, Милкова, 1978; Tomleкова *et al.*, 2006). При рентгеновском облучении семян некоторых болгарских сортов перца были получены радиационные мутанты с ценными признаками: мужской стерильностью, устойчивостью к болезням, высоким содержанием  $\beta$ -каротина в перикарпии. Некоторые из этих мутантов, например, с генами мужской стерильности *ms-3* и *ms-8*, а также неидентифицированный мутант с высоким содержанием  $\beta$ -каротина в плодах были переданы в наше распоряжение для проведения селекционной работы в направлении получения гетерозисных гибридов. Однако полученный мутантный материал помимо ценных свойств обладал рядом нежелательных признаков, таких, как восприимчивость к вертициллезному увяданию, и, кроме того, длина вегетационного периода, окраска и форма плодов не соответствовали региональным требованиям потребителя. Поэтому с 1988 г. были начаты планомерные исследования по созданию нового исходного материала с участием болгарских мутантов сначала в Приднестровском научно-исследовательском институте сельского хозяйства, а затем продолжены в Приднестровском госуниверситете совместно с Республиканским ботаническим садом и Всероссийским институтом овощного хозяйства. С участием мутанта *ms-3* впервые был создан гибрид Юбилейный Семко, имеющий допуск к выращиванию в Российской Федерации и Республике Беларусь и востребованный в производстве уже более 10 лет (Тими́на, 1997). Параллельно аналогичная работа проводилась и с мутантом, накапливающим в плодах высокое содержание  $\beta$ -каротина, так как появилась реальная возможность увеличить содержание этого биологически активного соединения у новых сортов или гибридов и превратить культуру в источник комплекса натуральных витаминов. В то же время данные о содержании  $\beta$ -каротина в плодах с разнообразной окраской перикарпия были немногочисленны и нуждались в уточнениях. Поэтому целью нашей работы явилось выявление генетических механизмов проявления и наследования признаков «содержание  $\beta$ -каротина в плодах», а также «окраска плодов», что позволит обоснованно вести селекцию

на высокое содержание комплекса витаминов и интенсифицирует процесс создания не только сортов, но и гетерозисных гибридов.

### Материалы и методы

Для уточнения взаимосвязи признаков окраски плодов и содержания в них  $\beta$ -каротина использовали материал на основе *S. annuum* var. *annuum* L. с высоким содержанием провитамина А, разнообразный по окраске перикарпия в технической и биологической спелости молдавской селекции, и болгарский мутантный материал. Главными методами исследования были гибридизация, генетико-статистический и биохимический анализы. Проводили межлинейные и анализирующие скрещивания, беккроссы и последующие индивидуальные отборы. Гибриды получали на фертильной и стерильной основах. Гибриды на фертильной основе получали в пленочных необогреваемых теплицах традиционным способом (Методические указания ..., 1976, 1997) с кастрацией, изоляцией и маркировкой комбинаций. В случае скрещивания на стерильной основе пыльцу отцовской формы наносили на рыльце пестика материнской формы без кастрации. Выращивание растений перца в открытом грунте и в пленочных необогреваемых теплицах проводили рассадным способом согласно принятым агротехническим рекомендациям для культуры (Ершова, 1990). Посев на рассаду проводили в первых числах марта, высадку под пленочные укрытия – в конце апреля, возраст рассады 45–50 дней. Высадка в открытый грунт – 10–15 мая после окончания угрозы заморозков. Растения высаживали ленточным способом, расстояние между лентами 50 + 30 см, между растениями в ряду – 10–25 см в зависимости от габитуса куста: высокорослые через 20–25 см, среднерослые – 15–20 см, букетные – 10–15 см. В течение выращивания растений проводили подкормки согласно показанию контрольных биохимических анализов почвы. Изучали корреляционные зависимости между качественными показателями окраски перикарпия в технической фазе спелости и количественным содержанием  $\beta$ -каротина; наследование признака окраски и содержания витаминов у родительских форм и гибридов  $F_1$  генетико-статистическими методами (Рокицкий,

1974; Лакин, 1990; Тихомирова, 1990; Чесноков, 2009) с определением среднеквадратического отклонения ( $G$ ), коэффициента вариации ( $V$ ), бисериального коэффициента корреляции ( $r_{bs}$ ), степени доминирования ( $h_p$ ), частоты рекомбинации по окраске перикарпия ( $r$ ). Вычисление рекомбинации проводили у рекомбинантной инбредной популяции  $F_3$ , полученной из особей  $F_2$  посемейным отбором при самоопылении. Проводили прямой расчет пропорции рекомбинантных форм  $R = n/N$ , где  $n$  – фактическое количество рекомбинантных форм в популяции,  $N$  – общее число учтенных особей, и результат увеличивали в 2 раза согласно частоте кроссоверных гамет. Частоту рекомбинации определяли по формуле  $r = R/2(1-R)$ , используемой для популяций рекомбинантных инбредных линий, получаемых из особей  $F_2$  (Чесноков, 2009). Расчет генетической дистанции между локусами с аллелями желтой окраски  $y$  и высокого содержания  $\beta$ -каротина  $bc$  проводили по формуле Косамби:  $m_k = 25 \ln[(1+2r)/(1-2r)]$ . Прямой анализ  $\beta$ -каротина проводили только у  $F_1$ , о содержании  $\beta$ -каротина в  $F_2$  поколении судили по маркерной окраске перикарпия. Генетический анализ окраски перикарпия проводили в  $F_2$  и  $F_3$ . Обработка результатов проводилась с использованием пакета Statistika 6,0. Обозначения генов – согласно D. Wang, P. Bosland (2006).

Плоды перцев (130 образцов) оценивались по содержанию  $\beta$ -каротина в биологической фазе спелости методами определения по ГОСТ – 8756.22-80 (Продукты пищевые консервированные. Метод определения каротина) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Для объективной сопоставимости содержания  $\beta$ -каротина у генотипов с учетом различной обводненности ткани делали перерасчет на сухое вещество. У отдельных линий этими же методами определяли по необходимости содержание  $\beta$ -каротина и в фазу технической спелости. ВЭЖХ выполнялась на жидкостном хроматографе высокого давления Agilent technologies 1200 series с диодноматричным детектором при длине волны  $\lambda = 436 \text{ nm}$ .

**Условия хроматографирования.** Подвижная фаза ацетонитрил : хлороформ – 92 : 8. Скорость потока – 1,5 мл/мин. Хроматографическая колонка Zorbax XDB C18 4,6\*150 мм, 5 мкм. Объем

вводимой пробы 20 мкл. Время одного анализа: 30 мин. Стандартом служил  $\beta$ -каротин, свободный от  $\lambda$ -форм, фирмы «Sigma». Градуировочный график построен 8 точками с концентрациями 4,0; 2,857; 2,222; 2,000; 1,818; 1,538; 0,800; 0,342 мг/100 мл. Подготовка пробы проводилась ацетоном в щелочной среде с  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  с кварцевым песком до полного обесцвечивания. К экстракту в делительную воронку добавляли 15 мл гексана, взбалтывали и оставляли до разделения водно-ацетонового и гексанового слоев. Операцию повторяли до полного удаления следов ацетона. Экстракт гексана пропускали через сульфат натрия для обезвоживания и затем вводили в колонку через дозатор «Реодайн».

Витамин С определяли стандартным методом по ГОСТ 24556. Для исследования использовалась средняя проба из 4–5 плодов (плоды на первых двух ветвлениях). У линейного материала и гибридов  $F_1$  анализ проводился по 4 повторностям, у материала с неуставленным генотипом анализ проводился без повторностей. Окраска перикарпия определялась по фенотипу визуально по ее выраженности.

### Результаты исследований

Скрининг имеющегося генофонда *C. annuum* var. *annuum* по признаку высокого содержания  $\beta$ -каротина выявил источники этого биологически активного соединения у овощного перца, на основе которых был отселектирован новый линейный материал (Timin, Timina, 2007).

У линейного материала на основе молдавской селекции выявили фенотипическую зависимость между окраской плодов и содержанием каротина: линии со светлой окраской перикарпия (кремовой или белой) в технической спелости, как правило, содержали значительно меньшее количество  $\beta$ -каротина и в биологически зрелых плодах (табл. 1). Однако у линий, созданных на основе мутанта Оранжевая Капия с высоким содержанием  $\beta$ -каротина, данная закономерность нарушалась (табл. 2). В целом по созданным линиям подсчитанный бисериальный коэффициент корреляции между содержанием  $\beta$ -каротина и цветом плодов в технической фазе зрелости (темно-зеленые, зеленые и светло-зеленые, кремовые, темно-фиолетовые) оказался невысоким и незначимым ( $r_{bs} = 0,09$   $t_{\text{факт.}} = 0,82 < t_{0,95} = 2$ ).

Таблица 1

Содержание  $\beta$ -каротина в плодах овощного перца в фазе биологической спелости у различно окрашенных линий. Пленочные необогреваемые теплицы, весенне-летний оборот, 2004–2005 гг.

| Фенотип линии   | Содержание β-каротина, мг/100 г сухого вещества<br>ГОСТ 8756.22-80 |       |       | V     |
|---|--|-------|-------|-------|
|   | x ± m  | min   | max   |       |
| Линии, созданные без участия мутанта с высоким содержанием β-каротина |  |       |       |       |
| Зеленый/красный   | 23,12 ± 2,45   | 11,7  | 32,78 | 33,51 |
| Зеленый/желто-оранжевый   | 23,01 ± 2,1  | 20,24 | 29,26 | 18,36 |
| Белый/красный или желтый  | 7,83 ± 0,63  | 7,83  | 8,83  | 13,91 |
| Темно-зеленый/красный или оранжевый                                   | 22,63 ± 2,48   | 14,43 | 29,37 | 24,48 |
| Фиолетовый/красно-фиолетовый  | 44,52 ± 9,19   | 28,42 | 60,24 | 35,74 |

Таблица 2

Содержание  $\beta$ -каротина и витамина С в зависимости от фазы спелости у линий ( $F_5$ – $F_6$ ), созданных с участием мутанта Оранжевая Капия с высоким содержанием  $\beta$ -каротина в плодах (необогреваемые пленочные укрытия), 2004–2005 гг.

| Линия              | Окраска плодов в технической/<br>биологической фазах спелости | β-каротин, мг/100 г<br>сухого вещества,<br>ГОСТ 8756.22-80 |       | Витамин С, мг/100 г<br>сырого вещества |     |
|--------------------|---|--|-------|--|-----|
|                    |   | Фаза спелости  |       |  |     |
|                    |   | 1  | 2     | 1                                      | 2   |
| Оранжевая Капия St | темно-зеленый/оранжево-красный                                | 2,88   | 53,2  | 184,4                                  | –   |
| Л-29               | зеленый/оранжево-красный                                      | 2,51   | 89,28 | 194                                    | 260 |
| Л-22               | кремово-белый/оранжево-красный                                | 0,75   | 67,78 | 157                                    | 295 |
| Л-40               | светло-зеленый/оранжево-красный                               | 1,54   | 79,03 | 235                                    | 230 |

Примечание. 1 – техническая, 2 – биологическая фазы спелости, (–) – исследования не проводились.

Это означало, скорее всего, что пигментный состав и содержание каротина – независимые признаки, и поэтому, вероятно, можно значительно улучшать показатель содержания  $\beta$ -каротина в плодах разнообразного цвета.

Не была выявлена и значимая корреляция по содержанию витаминов по фазам спелости, а также между обоими витаминами в зависимости от фазы спелости. Практически не было связи в фазе технической спелости между содержанием сухого вещества, аскорбиновой кислоты и  $\beta$ -каротина. Однако важной и интересной характеристикой селекционной ценности образца оказались его дифференцированные показатели по накоплению  $\beta$ -каротина в технической и биологической фазах спелости. Хотя в технической фазе эти показатели невысокие, но

отличия по содержанию у генотипов имеются и они существенны (табл. 2).

У перспективных селекционных линий уточнили наследование содержания  $\beta$ -каротина в зависимости от окраски перикарпия. Наибольший интерес из созданного материала представляли линии Л-49 и полученный на ее основе питомник фиолетово-красных линий, а также Л-29, Л-40 и другие, полученные на основе мутанта Оранжевая Капия. Результаты анализа, проведенного ранее, показали, что содержание  $\beta$ -каротина при скрещивании контрастных по этому признаку линий Л-49 и Л-48 наследуется как полигенный признак (Тимина и др., 2010).

Генетический анализ линий, полученных с участием мутанта Оранжевая Капия, проведенный на основе скрещиваний с красными, желто-

оранжевыми и оранжево-красными линиями, показал другой тип наследования высокого содержания  $\beta$ -каротина с уточнением взаимосвязи признака и с окраской перикарпия (табл. 3, 4). Результаты свидетельствовали о том, что при скрещивании между собой желтоокрашенных линий у гибридов  $F_1$  не наблюдалось изменений окраски. В скрещиваниях красноокрашенных линий с желто- и оранжево-красными доминировала красная окраска. При скрещивании оранжево-желтых линий с оранжево-красными у плодов  $F_1$  отмечалась красная окраска. При дальнейшем самоопылении красноокрашенных  $F_1$  у  $F_2$  поколения в некоторых комбинациях скрещивания расщепление по окраске укладывалось в двухфакторную схему наследования: 9 красных : 3 оранжево-красных : 4 желто-оранжевых. Но у некоторых комбинаций скрещивания в  $F_2$  наблюдалось значимое превышение  $\chi^2$ , что объясняется возможной пониженной жизнеспособностью двойного рецессива (табл. 5, 6). Наблюдалось варьирование содержания  $\beta$ -каротина у гибридов  $F_1$  в зависимости от генетического фона: в вариантах скрещивания линий оранжево-красных с красными преобладало доминирование низкого значения признака. В вариантах скрещиваний оранжево-красных

с желто-оранжевыми генотипами преобладал промежуточный уровень наследования признака «содержание  $\beta$ -каротина». Результаты возвратного скрещивания  $F_1$  с желтой формой, являющейся двойным рецессивом, выявили расщепление и по окраске, и по содержанию  $\beta$ -каротина. При этом выделялись красные формы с низким и высоким содержанием  $\beta$ -каротина, оранжево-красные – с высоким и желто-оранжевые с низким содержанием  $\beta$ -каротина. Высокие коэффициенты вариации признака у линий и гибридов  $F_1$  показали нестабильность выраженности признака «содержание  $\beta$ -каротина» в плодах. Кроме того, в популяции  $F_3$  семей с оранжево-красным перикарпием обнаруживались красные и желто-оранжевые фенотипические варианты, а в потомстве желто-оранжевых – красные и оранжево-красные (табл. 7). Дальнейшие самоопыления и индивидуальные отборы по окраске перикарпия в ряде случаев приводили к стабилизации признака окраски и содержания  $\beta$ -каротина. В то же время не удалось получить линии желто-оранжевой окраски с таким же высоким содержанием  $\beta$ -каротина, как и у оранжево-красных. Биохимический анализ линейного материала показал совпадение высокого содержания  $\beta$ -каротина с красно-

Таблица 3

Характер наследования  $\beta$ -каротина и окраски перикарпия у гибридов  $F_1$   
(пленочная теплица), 2004–2005 гг.

| Комбинация скрещивания,<br>окраска перикарпия                                     | Содержание $\beta$ -каротина, мг/100 г<br>сухого вещества и окраска перикарпия |                |                          | hp    |
|---|--|----------------|--------------------------|-------|
|   | P <sub>1</sub>   | P <sub>2</sub> | F <sub>1</sub>           |       |
| Оранжевая Капия × Дуэт<br>(оранжево-красная × красная)                            | 38,747   | 8,624          | 26,167 (темно-красная)   | 0,17  |
| Винни-Пух × (Оранжевая Капия × Дуэт)<br>(темно-красная × оранжево-красная)        | 18,099   | 29,433         | 13,177 (темно-красная)   | –1,87 |
| Оранжевая Капия × Иоланта<br>(оранжево-красная × темно-красная)                   | 38,747   | 3,476          | 16,667 (темно-красная)   | –0,25 |
| (Дуэт × Т-119/8) × (Оранжевая Капия × Дуэт)<br>(темно-красная × оранжево-красная) | 17,688   | 35,506         | 16,978 (темно-красная)   | –1,08 |
| Л-48 × Л-49 (темно-красная × темно-красная)                                       | 30,0   | 41,88          | 40,73 (темно-красная)    | 0,55  |
| Катюша × Л-29 (желто-оранжевая × оранжево-красная)                                | 7,87   | 39,04          | 28,904 (темно-красная)   | 0,35  |
| Катюша × Л-38 (желто-оранжевая × желто-оранжевая)                                 | 7,87   | 23,53          | 17,102 (оранжево-желтая) | 0,18  |
| Л-147 × Л-29 (бледно-желтая × оранжево-красная)                                   | 12,0   | 39,04          | 29,21 (темно-красная)    | 0,27  |
| Ярослав × Л-29 (желто-оранжевая × оранжево-красная)                               | 10,9   | 39,04          | 13,24 (темно-красная)    | –0,83 |
| Ласточка × Л-29 (темно-красная × оранжево-красная)                                | 12,93  | 39,04          | 12,76 (темно-красная)    | –1,04 |



Таблица 4

Окраска перикарпия и уровень содержания  $\beta$ -каротина у родительских форм и гибридов  $F_1$  в анализирующих скрещиваниях. Пленочная теплица, 2004–2005 гг.

| Комбинация скрещивания |                       | Окраска перикарпия | $\beta$ -каротин, мг/100 г сухого веса, ВЖХ | Cv, % |
|------------------------|-----------------------|--------------------|---|-------|
| $P_1$                  | 46                    | оранжево-красная   | $55,39 \pm 7,64$                            | 27,56 |
| $P_2$                  | 29                    | - " -              | $94,5 \pm 26,53$                            | 68,77 |
| $F_1$                  | $46 \times 29$        | - " -              | $68,91 \pm 9,47$                            | 13,75 |
| $P_1$                  | 61                    | оранжево-красная   | $87,57 \pm 8,93$                            | 32,23 |
| $P_2$                  | 29                    | - " -              | $94,5 \pm 26,53$                            | 68,77 |
| $F_1$                  | $61 \times 29$        | - " -              | $68,94 \pm 23,52$                           | 73,58 |
| $P_1$                  | 147                   | желто-оранжевая    | $11,49 \pm 1,05$                            | 9,09  |
| $P_2$                  | 144                   | - " -              | $18,54 \pm 6,69$                            | 72,16 |
| $F_1$                  | $147 \times 144$      | - " -              | $12,97 \pm 1,56$                            | 31,82 |
| $P_1$                  | 46                    | оранжево-красная   | $55,39 \pm 7,64$                            | 27,56 |
| $P_2$                  | 144                   | желто-оранжевая    | $18,54 \pm 6,69^*$                          | 72,16 |
| $F_1$                  | $46 \times 144$       | темно-красная      | $41,88 \pm 6,15$                            | 14,68 |
| $P_1$                  | 61                    | оранжево-красная   | $87,57 \pm 8,93$                            | 32,23 |
| $P_2$                  | 144                   | желто-оранжевая    | $18,54 \pm 6,69^*$                          | 72,16 |
| $F_1$                  | $61 \times 144$       | темно-красная      | $24,26 \pm 0,76^*$                          | 6,30  |
| $P_1$                  | $F_1 (61 \times 147)$ | темно-красная      | $33,11 \pm 3,398^*$                         | 25,14 |
| $P_2$                  | 144                   | желто-оранжевая    | $18,54 \pm 6,69^*$                          | 72,16 |
| $F_1$                  | $P_1 \times P_2$      | темно-красная      | $70,62 \pm 7,59$                            | 21,49 |
| $F_1$                  | $P_1 \times P_2$      | оранжево-красная   | $65,34 \pm 7,81$                            | 23,91 |

Примечание. \* Значимая разница в сравнении с лучшим показателем по каждой комбинации скрещивания.

Таблица 5

Наследование окраски перикарпия в  $F_2$  комбинации скрещивания  
Л-144  $\times$  [(Дуэт  $\times$  Т-119/8)  $\times$  Л-61)] с учетом предполагаемой жизнеспособности гамет.  
Пленочная теплица, 2006 г.

| Фенотип   | Частота в популяции |           | $\chi^2$         |
|---|---------------------|-----------|------------------|
|   | фактическая         | ожидаемая |                  |
| 1. Расщепление с равноценной жизнеспособностью гамет 9 красных : 3 оранжево-красных : 4 желто-оранжевых                       |                     |           |                  |
| Красные   | 74                  | 77        | 0,117            |
| Оранжево-красные  | 37                  | 25,7      | 4,97             |
| Желто-оранжевые   | 26                  | 34,25     | 1,99             |
|   |                     |           | $\Sigma = 7,077$ |
| 2. Расщепление с предполагаемой дифференцированной жизнеспособностью гамет 9 красных : 3 оранжево-красных : 3 желто-оранжевых |                     |           |                  |
| Красные   | 74                  | 77        | 0,117            |
| Оранжево-красные  | 37                  | 25,7      | 4,97             |
| Желто-оранжевые   | 26                  | 25,6875   | 0,004            |
|   |                     |           | $\Sigma = 5,091$ |

Примечание.  $\chi^2_{\text{табл.}} = 5,99$  при  $p = 0,05$ .

Таблица 6

Наследование окраски перикарпия в  $F_2$  у некоторых гибридных комбинаций

| Комбинация скрещивания                    | Количество растений в $F_2$ с плодами |                  |                   | $\chi^2$ |
|---|---------------------------------------|------------------|-------------------|----------|
|   | красными                              | оранжево-желтыми | оранжево-красными |          |
| [(Дуэт × Т-119/8) × Л61] × Л147           | 82                                    | 23               | 21                | 4,33     |
| Л144 × [(Дуэт × Т-119/8) × Л61]           | 74                                    | 26               | 37                | 7,07     |
| Золотой Юбилей × [(Дуэт × Т-119/8) × Л61] | 44                                    | 16               | 16                | 0,726    |
| Ярослав × [(Дуэт × Т-119/8) × Л61]        | 43                                    | 16               | 25                | 0,54     |
| Ярослав × (Капия Оранжевая × Л474)        | 61                                    | 24               | 4                 | 12,159   |
| Ярослав × (Капия Оранжевая × Дуэт)        | 42                                    | 13               | 12                | 1,35     |

Примечание.  $\chi^2_{\text{теор.}} = 5,99$  при  $df = 2$ ,  $P = 0,95$ .

Таблица 7

Вариация окраски плодов в популяциях  $F_3$  оранжево-красных и желто-оранжевых семей комбинации Л-144 × {(Дуэт × Т-119/8) × Л-61}, 2006 г.

| Окраска плодов у отобранных семей в $F_2$ | Исследовано семей | Количество растений в $F_3$ с плодами |                  |                   | $\Sigma$ | Рекомбинантные формы R, % | Частота рекомбинации г, сМ |
|---|-------------------|---------------------------------------|------------------|-------------------|----------|---------------------------|----------------------------|
|   |                   | красными                              | желто-оранжевыми | оранжево-красными |          |                           |                            |
| Оранжево-красные                          | 7                 | 4                                     | 35               | 122               | 168      | 46,43                     | 0,43                       |
| Желто-оранжевые                           | 4                 | 6                                     | 83               | 2                 | 91       | 17,58                     | 0,36                       |

оранжевой окраской, которая может служить фенотипическим маркером этого признака. Дальнейшие отборы на высокое содержание  $\beta$ -каротина проводили по маркерной окраске перикарпия. Расчеты пропорций рекомбинантных форм в семьях оранжево-красных и желто-оранжевых показали хорошее совпадение показателей частоты рекомбинации (табл. 7), с учетом которой определено относительное расстояние между локусами оранжево-красной и желто-оранжевой окраски по Косамби, где  $m_k = 64,67$  сМ.

Полученные данные позволяют обсудить следующие вопросы: как вести селекцию на комплексное высокое содержание витаминов, почему окраска у мутантных линий красно-оранжевая; где располагается оранжево-красная мутация и почему в потомстве отборов по рецессивной окраске выделяются новые фенотипические варианты и самое главное – как эти результаты согласовываются с содержанием  $\beta$ -каротина.

### Обсуждение

Отсутствие значимых отрицательных корреляций между содержанием провитамина А и витамина С в плодах позволяет вести селекцию на комплексное высокое содержание витаминов традиционными методами с контролем оптимального содержания обоих витаминов биохимическим методом. Поскольку не найдена значимая корреляция между максимумами накопления провитамина А в технической и биологической фазах, это может означать то, что, скорее всего, содержание  $\beta$ -каротина в фазу технической и биологической спелости контролируется независимыми генными системами. В таком случае необходимо вести параллельную селекцию на высокое содержание провитамина А для каждой фазы. Поэтому, вероятно, проводимый нами только односторонний отбор по признаку «высокое содержание  $\beta$ -каротина» в плодах биологически спелых не привел к автоматическому увеличению содержания этого

витамина и в плодах технически спелых. Так как примерно две трети всего объема перца убирается в фазу технической спелости, в дальнейшем необходимо усилить это направление селекции для кардинального повышения содержания витамина.

Полученные данные подтвердили немногочисленные литературные сведения по наследованию окраски перикарпия: красная окраска доминирует по отношению к желтой и оранжево-красной. При скрещивании желто-оранжевых линий (обозначение гена желтой окраски *y*) гибриды  $F_1$  также наследовали эту же окраску. Поскольку желтая окраска – рецессивный признак, обусловленный делецией гена *CCS*, кодирующего фермент капсантинкапсорубинсинтазу (Lefebvre *et al.*, 1998; Thorup *et al.*, 2000), такой характер наследования свидетельствовал об идентичности генов (тест на аллелизм), контролирующих данный признак у скрещиваемых линий. Выполненный анализ показал также рецессивное наследование оранжево-красной окраски. Однако возвратное скрещивание красноокрашенного гибрида  $F_1$  с желтой формой давало расщепление по окраске на красные и оранжево-красные формы, что указывало, по крайней мере, на дигенный контроль красной окраски перикарпия. Таким образом, наши экспериментальные данные совпадают с виртуальной картой для *Capsicum* (Thorup *et al.*, 2000), созданной на основе сходства групп сцепления томата, баклажана, картофеля. Согласно виртуальной карте, должно быть два гена, которые контролируют превращение  $\beta$ -каротина в  $\beta$ -криптоксантин: ген *CrtZ-1*, находящийся в 6-й хромосоме, и *CrtZ-2*, находящийся в 3-й хромосоме. Согласно нашим результатам, красная окраска перикарпия определяется двумя кодоминантно функционирующими генами, один из которых мутировал. Тогда можно объяснить оранжево-красную окраску перикарпия как продукт функционирования мутантного гена *bc*, выделяющего  $\beta$ -каротин, окрашивающий субстрат в оранжевый цвет, и второго немутировавшего гена, метаболизирующего часть  $\beta$ -каротина до конечного продукта с изменением окраски на красную. Полученные результаты гибридологического и биохимического анализов с желтоокрашенными формами позволяют утверждать, что предположение (Chalukova *et al.*, 1993; Daskalov *et al.*, 1995) о том, что ген *bc*

является мутацией гена, кодирующего фермент  $\beta$ -каротингидроксилазу, является верным.

Поскольку восстанавливалось красное окрашивание перикарпия в скрещиваниях линий оранжево-красных и оранжево-желтых, т. е. при проведении теста на аллелизм мутантные гены *bc* и *y* (табл. 4) характеризуются как неаллельные, затрагивающие разные сайты комплементации, в то же время гены *bc* и *y* должны располагаться в одной и той же хромосоме. Это подтверждают данные, показывающие, что в  $F_3$  популяциях отборов по рецессивным признакам появились новые рецессивные фенотипические варианты. У оранжево-желтого потомства выщепляются оранжево-красные варианты и красные, а у оранжево-красных – оранжево-желтые и красные варианты, что может быть объяснено только наличием кроссинговера у гомологичных хромосом. Появление одновременно у  $F_3$  и красноокрашенных вариантов свидетельствует также об имеющемся цис-транс-эффекте между мутантными генами *bc* и *y*. Поскольку локализация *y* гена точно установлена в 6-й хромосоме (Lefebvre *et al.*, 1998), следовательно, и ген *bc* также располагается в этой же хромосоме и, таким образом, может представлять собой только мутацию гена *CrtZ-1*. Гены *bc* и *y* находятся в 6-й хромосоме, но располагаются достаточно далеко друг от друга и, как правило, сегрегируют независимо. Но в некоторых скрещиваниях  $\chi^2$  значительно отличался от табличного значения. Это явление может быть объяснено дифференциальной жизнеспособностью гамет: у двойного рецессива (*bc/bc y/y*) отмечается пониженная жизнеспособность и, возможно, частичная летальность (табл. 6, 7). Косвенным подтверждением возможной пониженной жизнеспособности части гамет служило и наблюдаемое нами массовое опадение завязи при скрещивании ряда желто-оранжевых и красно-оранжевых линий.

Высокие коэффициенты вариации выраженности признака «содержание  $\beta$ -каротина» у линий и гибридов свидетельствовали о влиянии экологических условий и о его нестабильности, возможно, за счет неполного подавления экспрессии рецессивного мутантного аллеля доминантным комплементарным либо за счет эффекта модификаторов. Таким образом, окраска перикарпия обуславливалась доминированием и комплементарным взаимодействием

генов, а содержание  $\beta$ -каротина варьировало согласно типу доминирования.

Проведенный анализ показал, что к известным генам окраски перикарпия и содержания  $\beta$ -каротина (Wang, Bosland, 2006) можно добавить новый идентифицированный мутантный ген *bc*. Он локализован в одной группе сцепления с *y*-геном, относительное расстояние между этими генами, по нашим расчетам, около 64,67 сМ. Определить расстояние между локусами по  $F_2$  в нашем случае не представлялось возможным. Во-первых, определение  $\beta$ -каротина прямым методом в  $F_2$  в силу большого объема анализов не проводилось, и о наличии мутантного гена судили по фенотипическому маркеру – оранжево-красной окраске перикарпия. Кроме того, в нашем случае гомозиготные рецессивы в  $F_2$  происходят за счет кроссоверных гамет, и для расчета можно использовать частоту встречаемости особей только одного фенотипического класса из четырех. И при этом этот класс обладает пониженной жизнеспособностью. Поэтому благодаря совпадению следующих показателей для генов *bc* и *y*: фенотипической выраженности, рецессивности, расположению в одной группе сцепления, но сегрегирующих независимо, кроссинговеру и цис-, транс-эффекту, – наиболее оптимальным явилось определение расстояния между локусами по  $F_3$ .

Несмотря на то что присутствие гена *bc* способно увеличить содержание  $\beta$ -каротина в плодах в 1,5–2 раза, использование данного мутанта в селекции имеет ограничения. Для стабильной выраженности фенотипа, что является одним из основных требований в селекции, необходима гомозиготность. Но даже гомозигота по двум генам *bc/bc CriZ-2/CriZ-2* при скрещивании с желтыми формами будет расщепляться по окраске перикарпия и по содержанию  $\beta$ -каротина из-за дигенности кодирования красной окраски. Кроме того, кроссинговер у гомологичных хромосом с генами *bc* и *y* будет приводить к появлению в потомстве вариантов, имеющих желто-оранжевые и оранжево-красные плоды, а также и красноокрашенные, что обусловит нестабильность выраженности признака окраски. Но использовать полученный мутант в гетерозисной селекции можно, если в скрещивание будут привлечены линии с одинаковой оранжево-красной окраской, созданные без

участия желтоокрашенных форм. Имеется и перспектива дальнейшего увеличения содержания  $\beta$ -каротина за счет получения новой мутации гена *CriZ-2*. Можно полагать, что такая мутация увеличит содержание антиоксиданта в перикарпии еще в 1,5–2 раза.

Выражаем благодарность коллективу исследователей Института генетики Болгарской АН (София), получивших под руководством и при непосредственном участии профессора С. Даскалова интересный материал как для практической селекции, так и для уточнения фундаментальных проблем каротиногенеза у *Capsicum*. Посвящаем данную работу его светлой памяти с глубокой признательностью.

Работа выполнялась в рамках международного гранта МАГАТЭ, IAEA RER/5/013 «Evaluation and Utilization of Natural and Mutant Germplasm in Solanaceae Species» и CRP15406 «Evaluation of natural and mutant resources for increased levels of carotenoids in crops with emphasis on pepper».

### Литература

- Ершова В.Л. Возделывание перца сладкого в МССР (рекомендации). Кишинев: Молдагроинформреклама, 1990. 16 с.
- Жученко А.А. Адаптивная система селекции растений (эколого-генетические основы). Монография. В 2 т. М.: Изд-во РУДН, 2001. Т. 1. С. 668–676.
- Лазурьевский Г.В., Гуцу Е.В. Метоболиты стручкового перца. Кишинев: Штиинца, 1983. С. 1–65.
- Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высш. шк., 1990. 352 с.
- Лудилов В.А., Гикало Г.С., Гим Р.А. Культура перца на Северном Кавказе. Краснодар: КГАУ, 1999. 214 с.
- Методические указания по селекции и семеноводству овощных культур (томаты, перец). М.: ВАСХНИЛ–ВНИИССОК, 1976. С. 1–78.
- Методические указания по селекции сортов и гибридов перца, баклажана для открытого и защищенного грунта. М.: РАСХН–ВНИИССОК, 1997. С. 1–88.
- Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации // Методические рекомендации / Под ред. В.А. Тутельян. 2008.
- Рокицкий П.Ф. Введение в статистическую генетику. Минск: Высшейш. шк., 1974. 148 с.
- Тимина О.О. Патент на селекционное достижение № 0040. Перец сладкий. Юбилейный Семко.



1997. Выдан: Государственной комиссией Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений по заявке № 9608745 с датой приоритета 17/12/96.
- Тимина О.О., Тимин О.Ю., Федоров С.К. Исследование экспрессии и взаимодействия генов антоциановой окраски и высокого содержания β-каротина у перца овощного в связи с селекцией на качество // Современные тенденции в селекции и семеноводстве овощных культур. Традиции и перспективы. II Междунар. науч.-практ. конф. (2–4 августа 2010 г.). Матер. докл., сообщений. ВНИИССОК. М.: Изд-во ВНИИССОК, 2010. Т. 1. С. 507–515.
- Чесноков Ю.В. Картирование локусов количественных признаков у растений. СПб: ВИР, 2009. 100 с.
- Тихомирова М.М. Генетический анализ. Л.: Ленингр. ун-т, 1990. 280 с.
- Chalukova M., Daskalov S., Lukarska E., Baralieva A. Beta-orange mutant in pepper (*Capsicum annuum* L.) // *Capsicum and Eggplant Newsletter*. 1993. N 12. P. 57–58.
- Даскалов С., Милкова Л. Хетерезисна селекция при пипера на стерильна основа // Генетика и селекция. НРБ. 1978. 11. № 2/3. С. 155–161.
- Daskalov S. Experimental mutagenesis and mutation breeding in pepper // *Capsicum Newsletter*. 1991. N 10. P. 13–20.
- Daskalov S., Chalukova M., Baralieva D., Lukarska E. Biochemical investigations of an induced beta-orange mutant in a sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) and developing varieties with increased beta-carotene content // IXth Meeting on Genetics and Breeding on *Capsicum* and *Eggplant*. Budapest (Hungary). August 21–25. 1995. P. 124–127.
- Kanner J., Budowski P. Carotene oxidizing factors in red pepper fruits (*Capsicum annuum* L.): Effect of ascorbic acid and copper in β-carotene – linoleic acid solid model // *J. Food Science*. 1978. V. 43. N 2. P. 524–526.
- Lefebvre V., Badillo A., Daubeze A.-M. *et al.* Genetic linkage between the *y* locus and the capsanthin – capsorubin synthase gene: a discriminating tool of red and yellow fruited peppers // Xth Meeting on Genetics and Breeding of *Capsicum* and *Eggplant*, Avignon-France-September 7–11. 1998. P. 253–256.
- Thorup T.A., Tanyolac B., Livinstone K.D. *et al.* Candidate gene analysis of organ pigmentation loci in the Solanaceae // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. N 21. P. 11192–11197.
- Timin O.Y., Timina O.O. Creation of hybrids of sweet pepper with improved biochemical content on sterile basis // *Progress in Research on Capsicum and Eggplant* / Ed. K. Niemirowicz-Szczytt. Warsaw University of Life Sciences Press, Warsaw, Poland, 2007. P. 245–254.
- Tomlekova N., Todorova V., Daskalov S. Creating variation in pepper (*Capsicum annuum* L.) through induced mutagenesis // *Plant Sciences*. 2007. N 44. P. 44–47.
- Wang D., Bosland P. The Genes of *Capsicum* // *Hort Science*. 2006. V. 41. N 5. P. 1169–1187.

## INHERITANCE OF PERICARP COLOR PATTERN AND β-CAROTENE CONTENT IN VEGETABLE PEPPER

O.O. Timina<sup>1</sup>, O.Y. Timin<sup>2</sup>, S.K. Fiodoroff<sup>3</sup>, N. Tomlekova<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Transnistrian State University, Tiraspol, Transnistria, e-mail: otimina@mail.ru;

<sup>2</sup> Republican Botanical Garden, Tiraspol, Transnistria, e-mail: otimin@mail.ru;

<sup>3</sup> Research Institute of Food Industry, Kishinev, Moldova, e-mail: fiodoroffs@mail.ru;

<sup>4</sup> Maritsa Vegetable Crops Research Institute, Plovdiv, Bulgaria, e-mail: nasia.tomlekova@gmail.com

### Summary

The genetic control of orange-red color pericarp and high β-carotene content in fruits with regard to genetic background has been studied in vegetable pepper. The orange-red color is determined by the mutant *bc* gene and the dominant *CrtZ-2* gene. The linkage group of the *bc* gene, which controls the high content of β-carotene has been determined. The application of the new mutant *bc* gene to the improvement of the biochemical composition of pepper fruits is discussed.

**Key words:** *Capsicum annuum*, vegetable pepper, breeding, biochemical characters, β-carotene, pericarp color, genetic control.

## BREEDING OF BULGARIAN COTTON VARIETIES WITH IMPROVED FIBER QUALITY

A. Stoilova

Field Crops Institute 6200 Chirpan, Bulgaria, e-mail: saldzhieva@abv.bg

In recent years, considerable progress has been made in Bulgarian cotton breeding for earliness and fiber quality. Its results are the new varieties Colorit, Darmi and Natalia. They have been obtained from crosses of *G. hirsutum* L. and bred lines of *G. hirsutum* L.  $\times$  *G. barbadense* L. origin. Their earliness and productivity are comparable to the variety Chirpan-539 (standard for earliness and productivity) and fiber length, to the variety Avangard-264 (standard for fiber quality). Natalia and Darmi are distinguished for their lint percentage, greater than in Avangard-264. Hierarchical cluster analysis based on six agronomic traits shows that Natalia is very similar to the standard variety Avangard-264, whilst Darmi is genetically more distant. All the genotypes are stable for different agronomic traits, which is valuable for further breeding.

**Key words:** cotton, *G. hirsutum*, varieties, fiber length, yield, cluster analysis, phenotypic stability.

### Introduction

The cotton breeding programs in Bulgaria are focused on the development of cultivars with high genetic potential for yield over 4500–5000 kg/ha as well as on the creation of cultivars with improved fiber qualities, especially in terms of length. In 1996, the cultivars Chirpan-539, Chirpan-603 (early and high yielding) and Avangard-264 (fiber 3 mm longer than the standard variety Beli izvor) were created and introduced in the production (Bozhinov *et al.*, 1996; Koynov, Stoilova, 1996). Other achievements in the breeding for earliness and productivity were the cultivars Beli Iskar and Beli Lom (Bozhinov M., Bozhinov B., 2004), while the cultivars Perla-267 and Vega were the results of breeding for fiber quality (Stoilova, Saldzhiev, 2000, 2005). Three new cotton varieties resulting from the breeding of fiber quality, Colorit, Darmi and Natalia, were recognized by IASAS (Executive Agency for Variety Testing, Approbation and Seed Control) in 2007–2008 (Report of IASAS, 2007, 2008).

The aim of this study was to determine the productive potential and fiber quality indices of new cotton varieties in comparison with the standard cultivars, as well as the combination of other valuable properties.

### Material and Methods

Three new cotton varieties were obtained by crosses of *G. hirsutum* L. and bred lines of *G. hirsutum* L.  $\times$  *G. barbadense* L. origin: Natalia (line 65  $\times$  T-073), Darmi (line 268  $\times$  C-9070), and Colorit (line 266  $\times$  Balkan). In 2002–2006, they were included in competitive cultivar trials, set up by the standard method, in four replications, with harvesting plots of 30,6 m<sup>2</sup> (2002–2005) and 20 m<sup>2</sup> (2006), and planting density of 60  $\times$  10  $\times$  1. The varieties were evaluated on the base of obtained data for the most important agronomic traits: September and total yields, boll weight, length and lint percentage. Fiber length was determined by the butterfly method. Ten plants from each replication were analyzed. Two standards were used: the cultivar Chirpan-539 for earliness and productivity and the cultivar Avangard-264 for fiber quality. Statistical program ANOVA was applied for data evaluation. Hierarchical cluster analysis based on the agronomic traits was also applied. The varieties were clustered using the Ward method (Ward, 1963). Program STABLE (Kang, Magari, 1995) was used to estimate genotype  $\times$  environment interaction and stability parameters  $\sigma_i^2$ ,  $S_i^2$  (Shukla, 1972), and Kang's YS<sub>i</sub> (Kang, 1993).

The variety Colorit was included in the state cultivar testing in 2001–2003; Darmi, in 2002–2004; and Natalia, in 2004–2007.

The period of study (2001–2007) included years of various temperature and rainfall supply: 2001 (warm and very dry) was exceptionally unfavorable in regard to the rainfall supply; 2002 and 2003 (warm and moderately wet) were very favorable for cotton; 2004 was cool and wet; 2005 – moderately cool and wet; 2006 – moderately warm and moderately dry and 2007 – very hot and moderately wet.

### Results and Discussion

The results of the competitive cultivar testing of new varieties averaged over the period 2002–2006 are shown in Table 1. In the average over the five-year period, the new varieties Natalia, Darmi and Colorit and both standards – Chirpan-539 and Avangard-264 did not differ in total yield of seed cotton. In terms of September yield, which is used as a criterion of earliness, Natalia and Darmi were inferior to Chirpan-539 by 7,0–7,2 % (standard for earliness and productivity), but the differences were statistically insignificant.

As for boll weight, Darmi was equal to Chirpan-539, while Natalia, Colorit and Avangard-264 had higher boll weights by 0,2 g. The average fiber length for the five-year period was insignificantly (0,3–0,5 mm) longer than that of Avangard-

264 (standard for fiber quality). In fiber length (28,7–28,9 mm) they surpassed Chirpan-539 by 2,2–2,4 mm. In terms of lint percentage Natalia and Darmi surpassed Avangard-264 by 1,7–1,9 %, but by this property they were behind Chirpan-539 by 1,4–1,6 %. Colorit had lower lint percentage and was approximately equal to Avangard-264, and considerably inferior (by 2,9 %) to Chirpan-539. The longer fiber of this variety was combined with a higher set of the first fruit branch: 21,0 cm at 18,9 cm for Chirpan-539 and 18,5 cm for Avangard-264 which makes it very suitable for machine picking of cotton.

Cluster analysis based on the data in Table 1 shows that the new varieties and the standard cultivar Avangard-264 are in one basic cluster. The cultivar Chirpan-539 is separated from them because of its shorter fiber and higher lint percentage (Fig. 1). The new varieties at a lower level of division show some genetic differences. Natalia is very similar to Avangard-264.

Two factor analysis of variance of the traits under study (Table 2) showed that the effect of genotypes was insignificant for total and September yields. Genotypes may differ in stability at insignificant mean values. The effect of years was significant for all traits. The genotype × environment interaction was significant for both the total yield and September yield as well as for the fiber length and lint percentage. A significant heterogeneity was detected only for fiber length.

**Table 1**  
Agronomic indices of Natalia, Darmi and Colorit for a five-year period (2002–2006)

| Cultivars          | Seed cotton yield, kg/ha | In % to Chirpan-539 | September yield, kg/ha | In % to Chirpan-539 | Boll weight, g   | Lint percentage, %  | Fiber length, mm    | Height of first fruit branch, cm |
|--------------------|--------------------------|---------------------|------------------------|---------------------|------------------|---------------------|---------------------|----------------------------------|
| Chirpan-539 (St.)  | 2355                     | 100,0               | 1740                   | 100,0               | 5,6              | 40,1                | 26,5                | 18,9                             |
| Avangard-264 (St.) | 2350                     | 99,8                | 1784                   | 102,5               | 5,8 <sup>+</sup> | 36,8 <sup>000</sup> | 28,4 <sup>+++</sup> | 18,5                             |
| Natalia            | 2353                     | 99,9                | 1619                   | 93,0                | 5,8 <sup>+</sup> | 38,7 <sup>00</sup>  | 28,9 <sup>+++</sup> | 19,1                             |
| Darmi              | 2300                     | 97,7                | 1615                   | 92,8                | 5,6              | 38,5 <sup>00</sup>  | 28,7 <sup>+++</sup> | 19,8                             |
| Colorit            | 2330                     | 98,9                | 1715                   | 98,6                | 5,8 <sup>+</sup> | 37,2 <sup>000</sup> | 28,8 <sup>+++</sup> | 21,0 <sup>++</sup>               |
| GD 5 %             | 245                      | 10,4                | 214                    | 12,3                | 0,2              | 1,0                 | 0,8                 | 1,4                              |
| GD 1 %             | 337                      | 14,3                | 295                    | 16,9                | 0,3              | 1,4                 | 1,1                 | 2,0                              |
| GD 0,1 %           | 464                      | 19,7                | 406                    | 23,3                | 0,5              | 1,9                 | 1,5                 | 2,8                              |
| Average for trial  | 2338                     |                     | 1695                   |                     | 5,7              | 38,2                | 28,2                | 19,4                             |

Table 2

Analysis of phenotypic variance of studied characters for stability

| Sources of variation | Degree of freedom | Mean squares           |                       |                     |                     |
|----------------------|-------------------|------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
|                      |                   | Seed cotton yield      | September yield       | Lint percentage, %  | Fiber length, mm    |
| Genotypes            | 4                 | 10775 <sup>ns</sup>    | 112456 <sup>ns</sup>  | 35,87 <sup>++</sup> | 20,42 <sup>++</sup> |
| Environments         | 4                 | 12089680 <sup>++</sup> | 6174913 <sup>++</sup> | 23,53 <sup>++</sup> | 3,56 <sup>++</sup>  |
| Interaction          | 16                | 133047 <sup>++</sup>   | 102192 <sup>++</sup>  | 2,27 <sup>++</sup>  | 1,30 <sup>++</sup>  |
| Heterogeneity        | 4                 | 19557 <sup>ns</sup>    | 156950 <sup>ns</sup>  | 3,87 <sup>ns</sup>  | 2,74 <sup>+</sup>   |
| Residual             | 12                | 170877 <sup>++</sup>   | 83940 <sup>++</sup>   | 1,74 <sup>++</sup>  | 0,82 <sup>++</sup>  |
| Pooled error         | 60                | 33360                  | 25548                 | 0,57                | 0,33                |

Notes. +, ++ – significant at the 0,05 and 0,01 probability level, respectively; ns – non-significant.

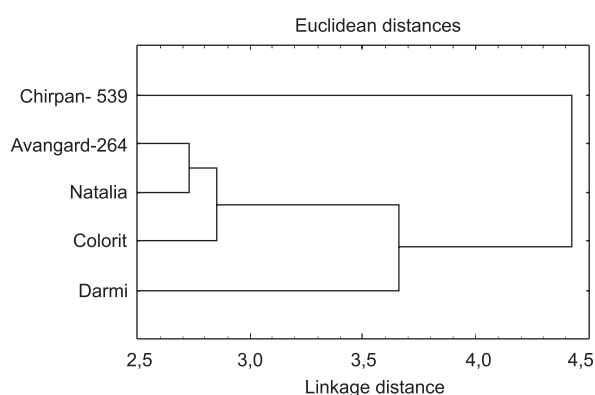


Fig. 1. Cluster analysis of 5 cotton varieties by 6 traits, Ward's method.

In terms of seed cotton yield the variance stability indices ( $\sigma_i^2$  and  $S_i^2$ ) determined as stable the varieties Avangard-264, Darmi, and Colorit (Table 3).

The  $YS_i$  index, which enables the simultaneous estimation for yield and stability, showed the highest breeding value for the standard variety Avangard-264. The varieties Avangard-264 and Colorit were stable also in September yield according to variance stability indices ( $\sigma_i^2$  and  $S_i^2$ ). According to the  $YS_i$  index, Avangard-264 was the most stable, and Colorit ranked second. As for breeding for lint percentage, useful stability based on the  $\sigma_i^2$  and  $S_i^2$  values was found for Avangard, Darmi and Colorit. According to the  $YS_i$  index, Darmi was the most valuable. In fiber length, the variance stability indices ( $\sigma_i^2$  and  $S_i^2$ ) showed that both standards, Chirpan-539 and Avangard-264, were stable. Avangard-264 was the most valuable according to the  $YS_i$  index.

Table 3

Stability parameters by Shukla ( $\sigma_i^2$  and  $S_i^2$ ) (1972) and Kang ( $YS_i$ ) (1993) for four traits of 5 genotypes

| Cultivars          | $\sigma_i^2$           | $S_i^2$                | $YS_i$ |
|--------------------|------------------------|------------------------|--------|
| Seed cotton yield  |                        |                        |        |
| Chirpan-539 (St.)  | 1394,033 <sup>++</sup> | 1733,498 <sup>++</sup> | 0      |
| Avangard-264 (St.) | -12,811 <sup>ns</sup>  | -0,988 <sup>ns</sup>   | 6+     |
| Natalia            | 4966,800 <sup>++</sup> | 6460,990 <sup>++</sup> | -1     |
| Darmi              | -89,706 <sup>ns</sup>  | -121,740 <sup>ns</sup> | -2     |
| Colorit            | 394,180 <sup>ns</sup>  | 472,076 <sup>ns</sup>  | -3     |
| September yield    |                        |                        |        |
| Chirpan-539 (St.)  | 1094,928 <sup>++</sup> | 992,177 <sup>+</sup>   | -1+    |
| Avangard-264 (St.) | 349,822 <sup>ns</sup>  | 601,599 <sup>ns</sup>  | 6+     |
| Natalia            | 1722,301 <sup>++</sup> | 1575,065 <sup>++</sup> | -9     |
| Darmi              | 1632,465 <sup>++</sup> | 1211,426 <sup>++</sup> | -10    |
| Colorit            | 310,363 <sup>ns</sup>  | -183,280 <sup>ns</sup> | 4+     |
| Lint percentage    |                        |                        |        |
| Chirpan-539 (St.)  | 6,736 <sup>++</sup>    | 5,259 <sup>++</sup>    | 0      |
| Avangard-264 (St.) | -0,114 <sup>ns</sup>   | 0,154 <sup>ns</sup>    | -2     |
| Natalia            | 5,249 <sup>++</sup>    | 3,177 <sup>++</sup>    | -1     |
| Darmi              | -0,187 <sup>ns</sup>   | 0,137 <sup>ns</sup>    | 6+     |
| Colorit            | -0,347 <sup>ns</sup>   | -0,048 <sup>ns</sup>   | -1     |
| Fiber length       |                        |                        |        |
| Chirpan-539 (St.)  | 0,070 <sup>ns</sup>    | 0,361 <sup>ns</sup>    | -2     |
| Avangard-264 (St.) | 0,001 <sup>ns</sup>    | 0,260 <sup>ns</sup>    | 5+     |
| Natalia            | 1,912 <sup>++</sup>    | 2,194 <sup>++</sup>    | 0      |
| Darmi              | 2,720 <sup>++</sup>    | 0,593 <sup>ns</sup>    | -2     |
| Colorit            | 1,804 <sup>++</sup>    | 0,705 <sup>ns</sup>    | -1     |



Within the state cultivar testing of cv. Colorit in 2001–2003, a total yield of 2260 kg/ha was obtained as the average for all stations included, 4,1 % higher than Avangard-264 (standard for fiber quality), and it did not differ from Chirpan-539. In lint yield, it also surpassed Avangard-264 by 4,6 %, but was inferior to Chirpan-539 by 3.6 %. In modal and staple length (29,0–31,3 mm), the gain over Avangard-264 was 1,2 and 0,6 mm, and Colorit showed a higher uniformity. The total yield of cv. Darmi averaged over three years (2002–2004) was 2500 kg/ha, 6,8 % higher than Avangard-264 and 2,0 % higher than Chirpan-539. In lint yield, it surpassed Avangard-264 by 7,4 % and was about equal to Chirpan-539. The variety Natalia yielded 2330 kg/ha as the average for 2004–2007 and exceeded both standards (Avangard-264 by 4,5 % and Chirpan by 3,5 %), in lint yield surpassed Avangard-264 by 7,1 % and was inferior to Chirpan-539 by 2,4 % (IASAS, 2007–2008).

### Conclusions

The varieties Natalia, Darmi and Colorit are the result of progress in breeding for fiber quality. Their fiber is 0.6 mm longer. It is combined with other advantages: higher lint percentage in Natalia and Darmi than in Avangard-264 and higher first fruit branch in Colorit.

These varieties had higher productivity than Avangard-264 in the state cultivar testing. Darmi and Natalia also overpowered Chirpan-539 in seed cotton yield by 2,0–3,5 %.

The new varieties and the standard cultivar Avangard-264 belonged to one basic cluster, and

it is preferable to use them in breeding programs with varieties further apart.

The cultivar Avangard-264 had superior combinations of yield and stability simultaneously as well as of fiber length and stability, and the new variety Darmi, of fiber lint percentage and stability.

### References

- Bozhinov M., Dimitrova L., Bozhinov B. Chirpan-603 and Chirpan-539 – new cotton varieties // *Plant Sci.* 1996. N 2. P. 35–37.
- Bozhinov M., Bozhinov B. Beli Lom and Beli Iskar – new cotton varieties // *Plant Sci. (BG)*. 2004. V. XLI. N 4. P. 331–337.
- Kang M.S. Simultaneous selection for yield and stability in crop performance trials. Consequence for growers // *Agron. J.* 1993. 85. P. 754–757.
- Kang M.S., Magari R. STABLE: a basic program for calculating stability and yield-stability statistics // *Agron. J.* 1995. V. 87. P. 276–277.
- Koynov G., Stoilova A. Avangard-264 – a new cotton variety // *Plant Sci.* 1996. N 4. P. 13–16.
- Shukla G.K. Some statistical aspects of partitioning genotype environmental components of variability // *Heredity*. 1972. V. 29. P. 237–245.
- Stoilova A., Saldzhiev I. Perla-267 – a new cotton variety // *Plant Sci.* 2000. 37. P. 274–277.
- Stoilova A., Saldzhiev I. Agronomic properties of the new cotton variety – Vega // *Field Crop Studies*. 2005. V. II – 2. P. 245–248.
- Reports of IASAS (Executive Agency for Variety Testing, Approbation and Seed Control), 2007, 2008.
- Ward J.H. Hierarchical grouping to optimize an objective functions // *J. of Amer. Statistical Association*. 1963. 58. P. 234–244.

## ОСОБЕННОСТИ ПЕРЕДАЧИ ХРОМОСОМЫ РЖИ 2R ПРИ БЕККРОССИРОВАНИИ ПШЕНИЧНО-РЖАНЫХ ЗАМЕЩЕННЫХ ЛИНИЙ 2R(2D) РАЗЛИЧНЫМИ СОРТАМИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Н.М. Красилова, И.Г. Адонина, О.Г. Силкова, В.К. Шумный

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

Изучен характер передачи хромосом ржи 2R при беккроссировании пшенично-ржаных замещенных линий 2R(2D)<sub>1</sub>, 2R(2D)<sub>2</sub> и 2R(2D)<sub>3</sub> (*Triticum aestivum* L. сорт Саратовская 29/ *Secale cereale* L. сорт Онохойская, 2n = 42) сортами мягкой пшеницы Саратовская 29 (C29), Новосибирская 67 (H67) и линией Лютеценс 307/97-23 (Лют. 307). В потомствах гибридов BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> 2R(2D)<sub>1</sub> × C29, 2R(2D)<sub>2</sub> × C29, 2R(2D)<sub>3</sub> × C29, 2R(2D)<sub>3</sub> × H67 и BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 2R(2D)<sub>3</sub> × Лют. 307, 2R(2D)<sub>1</sub> × H67, 2R(2D)<sub>1</sub> × Лют. 307; Лют. 307 × 2R(2D)<sub>1</sub> хромосомы ржи были обнаружены в дисомном, моносомном состояниях, встречались также телоцентрики и транслокации 2R/2D. Показано, что на частоту и характер передачи хромосомы 2R влиял генотип как пшенично-ржаной замещенной линии, так и сорта, используемого в скрещивании. При беккроссировании сортом H67 хромосомы ржи линий 2R(2D)<sub>1</sub> и 2R(2D)<sub>3</sub> чаще, чем в комбинациях скрещивания с Лют. 307 и C29, замещали хромосому 2D, после первого беккрасса в 26 % потомства гибридов образовывались хромосомы с перестройками. В потомстве реципрокного скрещивания линии 2R(2D)<sub>1</sub> с Лют. 307 хромосома 2R была обнаружена в кариотипах только двух растений. Обсуждаются возможные механизмы образования транслоцированных хромосом между гомеологами пшеницы и ржи.

**Ключевые слова:** *T. aestivum*, пшенично-ржаные замещенные линии, C-окрашивание, GISH, интрогрессия, телоцентрики, транслокации хромосом.

### Введение

Геном ржи (*Secale cereale* L.) является потенциальным источником для передачи полезных агрономических качеств мягкой пшенице (*Triticum aestivum* L.). Источником хроматина ржи в селекции на устойчивость являются пшенично-ржаные замещенные линии и линии с транслоцированными хромосомами (Friebe *et al.*, 1996; Rabinovich, 1998). Самыми распространенными являются транслокации T1RS.1BL и T1RS.1AL, которые присутствуют в геномах многих современных возделываемых коммерческих сортов (Lukaszewski, 1990; Villareal *et al.*, 1998; Mater *et al.*, 2004). Показано, что экспрессия генов устойчивости, содержания белка и урожайности зерна у линий пшеницы с транслокациями T1RS.1AL и T1RS.1BL зависит как от происхождения

хроматина ржи, так и от генотипической среды пшеницы (Dhaliwal *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 2004). Несмотря на многочисленные полезные признаки и свойства, которые приносит хромосома ржи 1RS для пшеницы, отмечается и ее отрицательное влияние на хлебопекарные качества (Martin, Stewart, 1986; Kim *et al.*, 2004).

Источником интрогрессии хозяйственно ценных качеств в геном пшеницы является также хромосома ржи 2R (Friebe *et al.*, 1996). Хромосома 2R не оказывает отрицательного действия на качество зерна (Knackstedt *et al.*, 1994; Hysing *et al.*, 2007), присутствие 2RL значительно увеличивает содержание арабиноксилана в зерне, который важен как для качества выпекаемых изделий, так и для питательной ценности злаков (Boros *et al.*, 2002). 2R в геноме пшеницы способствует более эффективному

использованию растениями воды (Ehdaie *et al.*, 2003). На хромосоме 2R локализованы также гены устойчивости к мучнистой росе, листовой и стеблевой ржавчине (Heun, Friebe, 1990; Friebe *et al.*, 1994; McIntosh *et al.*, 1995; Merker, Forsstrom, 2000; Hysing *et al.*, 2007), рессенской мухе (Friebe *et al.*, 1990; Sears *et al.*, 1992). Таким образом, присутствие генов устойчивости, хорошие характеристики качества пшеницы и отсутствие отрицательного влияния на агрономическую продуктивность, связанные с 2R, делают эту хромосому одним из источников для улучшения пшеницы.

Эффективность пшенично-ржаных транслокаций с 2RL так же, как и с 1RS, зависит от генотипической среды сорта, в который она переносится (Knackstedt *et al.*, 1994; Hysing *et al.*, 2007). Поэтому в практической селекции необходим детальный анализ передачи хромосом ржи в различные сорта. Целью данной работы было изучение характера передачи хромосом 2R при беккроссировании пшенично-ржаных замещенных линий 2R(2D)<sub>1</sub>, 2R(2D)<sub>2</sub> и 2R(2D)<sub>3</sub> сортами мягкой пшеницы в процессе создания почти изогенных пшенично-ржаных замещенных линий 2R(2D) на сортах мягкой пшеницы Саратовская 29 (С29), Новосибирская 67 (Н67) и линии Лютеценс 307/97-23 (Лют. 307).

### Материалы и методы

**Растительный материал.** В работе были использованы пшенично-ржаные замещенные линии 2R(2D)<sub>1</sub>, 2R(2D)<sub>2</sub> и 2R(2D)<sub>3</sub> (*T. aestivum* L. сорт Саратовская 29/ *S. cereale* L. сорт Онохойская,  $2n = 42$ ), в геноме которых пара хромосом пшеницы 2D замещена парой гомеологов ржи 2R (Силкова и др., 2006). Линии отличаются между собой генотипической средой пшеницы (Добровольская, 2003). У линий 2R(2D)<sub>1</sub>, 2R(2D)<sub>2</sub> и 2R(2D)<sub>3</sub> процент локусов с аллелями, отличными от Саратовской 29, составил 13,7 %, 32,0 % и 26,0 % соответственно. У данных линий аллели микросателлитных локусов, отличные от таковых сорта Саратовская 29, соответствуют аллелям, характерным для сорта Новосибирская 67. Геномы линий 2R(2D)<sub>1</sub> и 2R(2D)<sub>2</sub> содержат одну и ту же хромосому ржи, а линия 2R(2D)<sub>3</sub> – другую, так как эти линии получены в потомстве от разных гибридных

зерен F<sub>1</sub>. Линии 2R(2D)<sub>1</sub> используются в исследовании благодаря толерантности к высоким концентрациям NaCl, а 2R(2D)<sub>3</sub> – высоким продуктивным качествам (Силкова и др., 2008).

Беккроссирование линий проводилось сортами С29, Н67 и линией Лют. 307. Сорта С29 и Н67 находятся в коллекции Института цитологии и генетики СО РАН, линия Лют. 307 получена из CIMMYT.

Изучались кариотипы растений следующих комбинаций скрещивания:

- BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> 2R(2D)<sub>1</sub> × С29, 2R(2D)<sub>2</sub> × С29, 2R(2D)<sub>3</sub> × С29, 2R(2D)<sub>3</sub> × Н67 (1) (табл. 1).
- BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 2R(2D)<sub>3</sub> × Лют. 307, 2R(2D)<sub>1</sub> × Н67, 2R(2D)<sub>1</sub> × Лют. 307; Лют. 307 × 2R(2D)<sub>1</sub> (2) (табл. 2).

Предшествующие поколения гибридов (BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> (1) и F<sub>1</sub> (2)) выращивались в одинаковых условиях (поле 2010 г.), зерна BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> были получены при самоопылении. Гибриды BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> (1) и BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> (2) поколений анализировались в условиях гидропонной теплицы (осень 2010 г.).

**Цитологические методы.** Отбор растений с хромосомой 2R среди гибридов BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> (1) проводился на мейотических препаратах. Хромосомный состав кариотипов растений BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> и BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> идентифицировался на митотических препаратах с помощью С-метода дифференциального окрашивания хромосом (Badaev *et al.*, 1985). Препараты анализировали с помощью микроскопа «AxioStar» (Zeiss). Изображение регистрировалось цифровой камерой для микроскопов Leica DFC295. Для идентификации пшенично-ржаных транслокаций использовалась геномная *in situ* гибридизация в соответствии с ранее опубликованной методикой (Schubert *et al.*, 1998). Перед GISH препараты были обработаны РНКазой. Геномную ДНК *S. cereale* метили дигоксигенином с помощью реакции ник-трансляции и использовали в сочетании с 10–30-кратным избытком немеченой фрагментированной ДНК *T. aestivum*. Детекцию проводили с помощью антител к дигоксигенину, связанных с родамином (Anti-digoxigenin-rhodamine Fab fragments, Roche Applied Science). Препараты заключали в среду, замедляющую выцветание флюоресценции (Vectashield mounting medium, Vector Laboratories), содержащую 0,5 мкг/мл DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol, Sigma) для окрашивания хромосом, и анали-

Таблица 1

Цитологически проанализированные беккроссные потомства гибридов:  
 $2R(2D)_1 \times C29$ ,  $2R(2D)_2 \times C29$ ,  $2R(2D)_3 \times C29$ ,  $2R(2D)_3 \times H67$

| Комбинация скрещивания | Растения с хромосомой 2R в поколении гибридов $BC_1F_1$ (лето 2010 г.) | Потомства растений с 2R в $BC_1F_2$ поколении (осень 2010 г.) | Высеяно зерен (осень 2010 г.) | Изучено растений (осень 2010 г.) |
|------------------------|--|---|-------------------------------|----------------------------------|
| $2R(2D)_1 \times C29$  | 35–3   | 6   | 15                            | 10                               |
|                        | 35–7   | 7   | 4                             | 2                                |
| $2R(2D)_2 \times C29$  | 37–7   | 10  | 3                             | 2                                |
|                        | 37–8   | 11  | 9                             | 7                                |
|                        | 37–26  | 12  | 10                            | 10                               |
|                        | 37–27  | 13  | 9                             | 8                                |
| $2R(2D)_3 \times C29$  | 36–2   | 8   | 3                             | 3                                |
|                        | 36–3   | 9   | 33                            | 24                               |
| $2R(2D)_3 \times H67$  | 38–20  | 14  | 18                            | 16                               |
|                        | 38–25  | 15  | 6                             | 4                                |
|                        | 38–27  | 16  | 11                            | 11                               |
|                        | 38–47  | 17  | 10                            | 7                                |

Таблица 2

Получение гибридов  $BC_1F_1$ :  
 $2R(2D)_3 \times \text{Лют. 307}$ ,  $2R(2D)_1 \times H67$ ,  $2R(2D)_1 \times \text{Лют. 307}$ ,  $\text{Лют. 307} \times 2R(2D)_1$

| Комбинация скрещивания            | Поколение гибридов (лето 2010 г.) | Поколение гибридов (осень 2010 г.) | Высеяно зерен (осень 2010 г.) | Изучено растений (осень 2010 г.) |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| $2R(2D)_3 \times \text{Лют. 307}$ | $F_1$                             | $BC_1F_1$                          | 22                            | 15                               |
| $2R(2D)_1 \times H67$             | $F_1$                             | $BC_1F_1$                          | 22                            | 15                               |
| $2R(2D)_1 \times \text{Лют. 307}$ | $F_1$                             | $BC_1F_1$                          | 10                            | 5                                |
| $\text{Лют. 307} \times 2R(2D)_1$ | $F_1$                             | $BC_1F_1$                          | 12                            | 7                                |

зировали с помощью микроскопа «Axioskop» 2 Plus (Zeiss). Изображение регистрировалось CCD-камерой VC-44 (PCO).

### Результаты

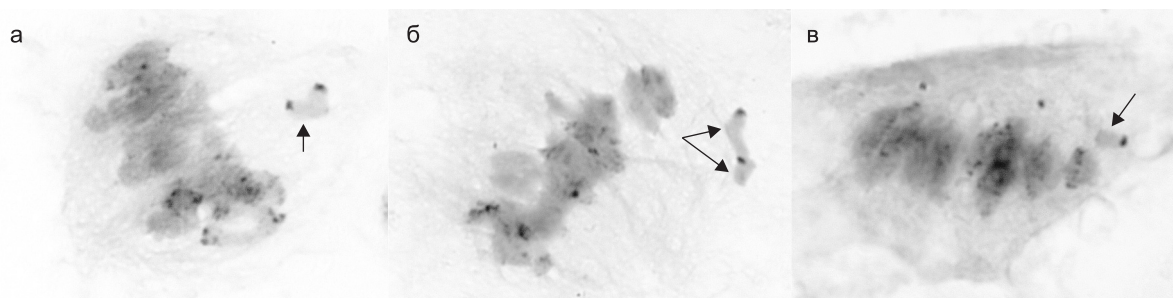
#### Изучение кариотипов гибридов $BC_1F_2$ : $2R(2D)_1 \times C29$ , $2R(2D)_2 \times C29$ , $2R(2D)_3 \times C29$ , $2R(2D)_3 \times H67$

Среди растений  $BC_1F_1$  (поле 2010 г.) были отобраны те, в геноме которых присутствовала хромосома ржи 2R (рис. 1, а, б), кариотип одного растения (38–25) содержал плечо 2R (рис. 1, в) (табл. 1).

У гибридов  $BC_1F_1$  комбинации скрещивания  $2R(2D)_1 \times C29$  хромосомы ржи были идентифицированы у двух растений (табл. 1). Анализ хромосомного состава у потомств этих растений показал, что передача чужеродной хромосомы происходит в половине случаев (табл. 3). В тех кариотипах гибридов  $BC_1F_2$ , которые содержали хромосому ржи 2R, она была в моносомном состоянии.

У гибридов  $BC_1F_1$  комбинации скрещивания  $2R(2D)_2 \times C29$  хромосомы ржи были обнаружены у четырех растений (табл. 1). Потомства этих растений различались по наличию 2R (от 0 до 60 %) (табл. 3). Хромосома ржи присутствовала в дисомном (рис. 2, а) и моносомном





**Рис. 1.** Метафаза I в мейозе у гибридов BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>.

Стрелками указаны: а – унивалентная хромосома ржи 2R; б – унивалентные хромосомы ржи 2R и пшеницы 2D; в – телоцентрик хромосомы ржи 2R.

состояниях (рис. 2, б), были идентифицированы также телоцентрики (рис. 2, в) (принадлежность к короткому/длинному плечам не была установлена) и центрическая транслокация T2R.2DL (рис. 2, г) (табл. 4).

В потомствах двух растений гибридов BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> комбинации скрещивания 2R(2D)<sub>3</sub> × C29 хромосомы ржи встречались с частотами 33,3 % и 45,8 % (табл. 3); в кариотипах гибридов BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> хромосома 2R присутствовала в моносомном, дисомном состояниях, также был обнаружен телоцентрик (табл. 4).

В кариотипах гибридов, являющихся потомством четырех растений BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 2R(2D)<sub>3</sub> × H67, хромосомы ржи встречались с частотами от 36,4 % до 85,7 % (табл. 3). Хромосома 2R была в моносомном и дисомном состояниях, встречались кариотипы с телоцентрическими хромосомами и T2R.2DL (табл. 4). Растений с телоцентриками среди всех изученных было 26,3 %. В потомстве гибрида 38-25 был обнаружен не только телоцентрик, но и пшенично-ржаная транслоцированная хромосома T2R.2DL.

**Таблица 3**

Частота встречаемости растений с хромосомами ржи 2R в BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> поколении гибридов (осень 2010 г.)

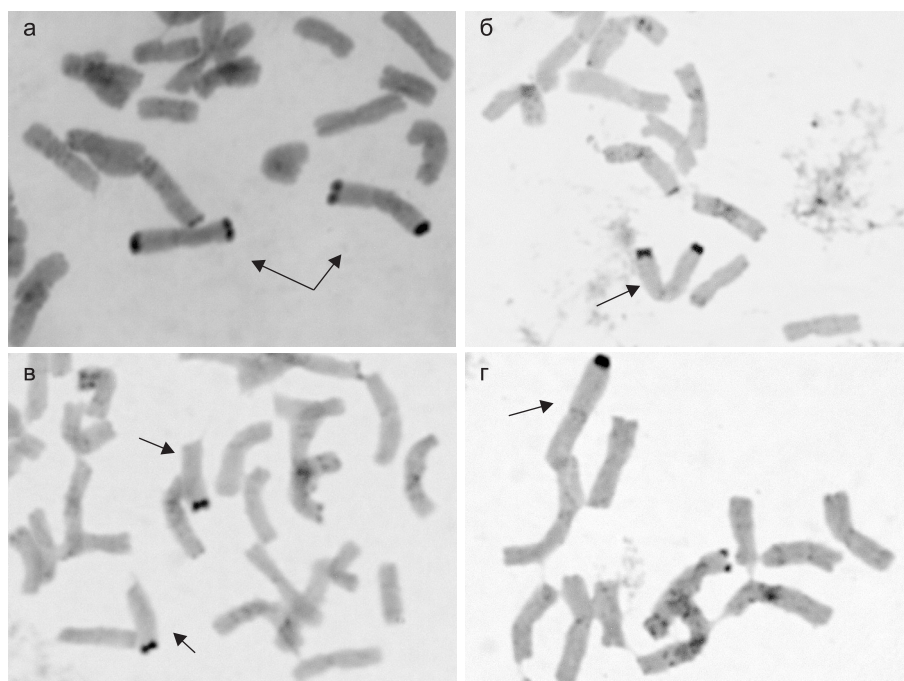
| Комбинация скрещивания    | № потомства | Изучено растений | Растений с хромосомой 2R, шт. (%) |
|---------------------------|-------------|------------------|-----------------------------------|
| 2R(2D) <sub>1</sub> × C29 | 6           | 10               | 6 (60)                            |
|                           | 7           | 2                | 1 (50)                            |
| 2R(2D) <sub>2</sub> × C29 | 10          | 2                | 1 (50)                            |
|                           | 11          | 7                | 0 (0)                             |
|                           | 12          | 10               | 6 (60)                            |
|                           | 13          | 8                | 2 (25)                            |
| 2R(2D) <sub>3</sub> × C29 | 8           | 3                | 1 (33,3)                          |
|                           | 9           | 24               | 11 (45,8)                         |
| 2R(2D) <sub>3</sub> × H67 | 14          | 16               | 13 (81,3)                         |
|                           | 15          | 4                | 2 (50)                            |
|                           | 16          | 11               | 4 (36,4)                          |
|                           | 17          | 7                | 6 (85,7)                          |

#### Изучение кариотипов гибридов BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>: 2R(2D)<sub>3</sub> × Лют. 307, 2R(2D)<sub>1</sub> × H67, 2R(2D)<sub>1</sub> × Лют. 307, Лют. 307 × 2R(2D)<sub>1</sub>

Среди изученных растений BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 2R(2D)<sub>3</sub> × Лют. 307 и 2R(2D)<sub>1</sub> × H67 около половины (53,33 %) было с хромосомой 2R (табл. 5). Однако в кариотипах гибридов 2R(2D)<sub>1</sub> × H67 кроме хромосом ржи нормальной структуры были обнаружены пшенично-ржаные транслокации T2R.2DL (рис. 3) и телоцентрик t2R (табл. 6). Растений с aberrantными хромосомами среди всех проанализированных было 26,7 %. Анализ кариотипов рецiproкных гибридов BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 2R(2D)<sub>1</sub> × Лют. 307 и Лют. 307 × 2R(2D)<sub>1</sub> позволил обнаружить только по одному растению с хромосомой ржи 2R в каждом из потомств.

#### Обсуждение

Результаты исследования хромосомного состава в кариотипах беккроссных потомств BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> и BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> поколений показали, что передача хромосомы 2R зависит как от генотипа пшенично-



**Рис. 2.** Фрагменты кариотипов растений  $BC_1F_2$  с хромосомами ржи 2R (указаны стрелками).

а – дисомик по хромосоме 2R; б – моносомик по хромосоме 2R; в – два телоцентрика t2R; г – центрическая транслокация T2R.2DL.

**Таблица 4**

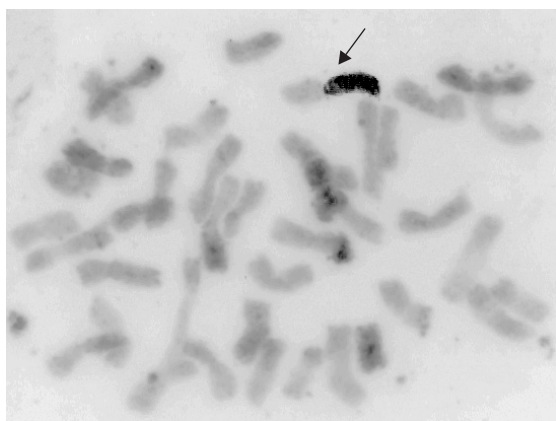
Характеристика кариотипов растений с хромосомами 2R в  $BC_1F_2$  поколении гибридов

| Комбинация скрещивания | № потомства | Количество хромосом 2R и их структура в кариотипе гибрида | Количество растений | Комбинация скрещивания | № потомства | Количество хромосом 2R и их структура в кариотипе гибрида | Количество растений |
|------------------------|-------------|---|---------------------|------------------------|-------------|---|---------------------|
| $2R(2D)_1 \times C29$  | 6           | 2R  | 6                   | $2R(2D)_3 \times H67$  | 14          | 2R  | 7                   |
|                        | 7           | 2R  | 1                   |                        |             | 2R2R  | 2                   |
| $2R(2D)_2 \times C29$  | 10          | T2R.2DL   | 1                   |                        |             | 2R+t2R  | 1                   |
|                        | 11          | –   | 0                   |                        |             | t2R   | 3                   |
|                        | 12          | 2R  | 5                   |                        | 15          | t2R+T2R.2DL**   | 1                   |
|                        |             | 2R+t2R*   | 1                   |                        |             | t2R   | 1                   |
|                        | 13          | 2R  | 1                   |                        | 16          | 2R  | 2                   |
|                        |             | 2R2R  | 1                   |                        |             | T2R.2DL   | 1                   |
| $2R(2D)_3 \times C29$  | 8           | 2R  | 1                   |                        |             | t2R   | 1                   |
|                        | 9           | 2R  | 7                   |                        | 17          | 2R  | 3                   |
|                        |             | 2R2R  | 3                   |                        |             | 2R2R  | 1                   |
|                        |             | t2R   | 1                   |                        |             | t2R   | 1                   |
|                        |             |   |                     |                        |             | t2R+t2R   | 1                   |

\* Телоцентрическая хромосома ржи; \*\* центрическая пшенично-ржаная транслокация.

**Таблица 5**  
Частота встречаемости растений  
с хромосомами ржи 2R  
в BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> поколении гибридов (осень 2010 г.)

| Комбинация скрещивания         | № потомства | Изучено растений | Растений с хромосомой 2R, шт. (%) |
|--------------------------------|-------------|------------------|-----------------------------------|
| 2R(2D) <sub>3</sub> × Лют. 307 | 25          | 15               | 8 (53,3)                          |
| 2R(2D) <sub>1</sub> × Н67      | 26          | 15               | 8 (53,3)                          |
| 2R(2D) <sub>1</sub> × Лют. 307 | 27          | 5                | 1 (20)                            |
| Лют. 307 × 2R(2D) <sub>1</sub> | 28          | 7                | 1 (14,3)                          |



**Рис. 3.** Геномная *in situ* гибридизация кариотипа растения 26-11 с хромосомой T2R.2DL (указана стрелкой).

**Таблица 6**  
Характеристика кариотипов  
растений с хромосомами 2R  
в BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> поколении гибридов

| Комбинация скрещивания         | № потомства | Количество хромосом 2R и их структура в кариотипе гибрида | Количество растений |
|--------------------------------|-------------|---|---------------------|
| 2R(2D) <sub>3</sub> × Лют. 307 | 25          | 2R  | 8                   |
| 2R(2D) <sub>1</sub> × Н67      | 26          | 2R  | 4                   |
|                                |             | t2R   | 1                   |
|                                |             | T2R.2DL   | 3                   |
| 2R(2D) <sub>1</sub> × Лют. 307 | 27          | 2R  | 1                   |
| Лют. 307 × 2R(2D) <sub>1</sub> | 28          | 2R  | 1                   |

ржаной замещенной линии, так и от генотипа сорта, используемого в скрещивании.

Частота интрогрессии хромосом ржи в геном пшеницы Лют. 307 зависела от генотипа линий. Замещение хромосомы пшеницы 2D при беккроссировании линии 2R(2D)<sub>3</sub> была успешной, 2R была обнаружена в кариотипах 53,3 % растений, в то время как хромосома ржи линии 2R(2D)<sub>1</sub> в потомстве реципрокных скрещиваний была идентифицирована у двух растений (16,7 %) (табл. 7). Аберрантных хромосом в потомствах данных скрещиваний не было обнаружено.

Влияние генотипа сорта было выявлено при сравнении частот передачи хромосомы 2R линии 2R(2D)<sub>1</sub> в геном сорта Н67 и линии Лют. 307 (табл. 7). Половина растений в потомстве BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 2R(2D)<sub>1</sub> × Н67 имела в своих кариотипах ржаную хромосому, в потомствах 2R(2D)<sub>1</sub> × Лют. 307 и Лют. 307 × 2R(2D)<sub>1</sub> таких растений было два (16,7 %) (табл. 7). Подобные результаты были получены при идентификации хромосомы 2R в кариотипах гибридов BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> 2R(2D)<sub>3</sub> × Н67 и 2R(2D)<sub>3</sub> × С29. Замещение хромосомы 2D у растений 2R(2D)<sub>3</sub> × Н67 происходило чаще, чем у 2R(2D)<sub>3</sub> × С29 (65,8 % и 44,4 % соответственно).

Анализ кариотипов интрогрессивных линий *T. aestivum* × *T. timopheevii* показал, что генотип родительского сорта мягкой пшеницы влияет на частоту и спектр замещений хромосом (Бадаева

**Таблица 7**  
Характер передачи хромосом ржи 2R в BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>  
и в BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> поколениях гибридов

| Комбинация скрещивания         | Изучено растений | Растений с хромосомой 2R, шт. (%) |                 |
|--------------------------------|------------------|-----------------------------------|-----------------|
|                                |                  | всего                             | с перестройками |
| 2R(2D) <sub>3</sub> × Лют. 307 | 15               | 8 (53,3)                          | 0               |
| 2R(2D) <sub>1</sub> × Н67      | 15               | 8 (53,3)                          | 4 (26,26)       |
| 2R(2D) <sub>1</sub> × Лют. 307 | 5                | 1 (20)                            | 0               |
| Лют. 307 × 2R(2D) <sub>1</sub> | 7                | 1 (14,3)                          | 0               |
| 2R(2D) <sub>1</sub> × С29      | 12               | 7 (58,3)                          | 0               |
| 2R(2D) <sub>2</sub> × С29      | 27               | 9 (33,3)                          | 2 (7,41)        |
| 2R(2D) <sub>3</sub> × С29      | 27               | 12 (44,4)                         | 1 (3,7)         |
| 2R(2D) <sub>3</sub> × Н67      | 38               | 25 (65,8)                         | 10 (26,3)       |

и др., 2010). Из шести гибридных комбинаций включая комбинации с участием Новосибирской 67 и Саратовской 29 интрогрессивные линии сорта Новосибирская 67 характеризовались наиболее широким спектром замещений и самым высоким средним числом замещений на геном гибрида. Ранее также была показана зависимость интрогрессии хромосом ржи от генотипической среды реципиента. Популяции  $F_2$  гибридов между пшенично-ржаной замещенной линией по хромосомам 1R+2R и сортами озимой пшеницы Holme и Kraka различались по частотам встречаемости хромосом ржи. В популяции гибридов  $F_2$ , полученных при скрещивании с сортом Holme, обнаружено 43 хромосомы 1R и 36 хромосом 2R, а в популяции гибридов  $F_2$ , полученных при скрещивании с сортом Kraka, – 104 хромосомы 1R и 81 хромосома 2R (Merker, Forsstrom, 2000).

В настоящей работе генотип сорта влиял и на частоты образования телоцентриков по хромосоме ржи и транслокаций T2R.2DL. В скрещиваниях с сортом C29 хромосомы ржи линий  $2R(2D)_2$  и  $2R(2D)_3$  в большинстве случаев передавались потомству нормальной структуры: только 2 (22,2 %) растения из 9 и 1 (8,3 %) растение из 12 с хромосомами 2R имели в своем кариотипе aberrантные хромосомы (табл. 7). В потомстве гибридов  $2R(2D)_1 \times C29$  транслоцированных хромосом 2R не было обнаружено. В то время как у гибридов  $2R(2D)_3 \times H67$  среди 25 растений с хромосомой 2R 10 (40 %) имели телоцентрические и транслоцированные хромосомы, а в  $BC_1F_1$  поколении гибридов  $2R(2D)_1 \times H67$  4 растения (50 %) из 8 в своих кариотипах содержали телоцентрики и транслокации (табл. 7). Таким образом, беккроссирование сортом H67 способствовало разрывам в районе центромер хромосом пшеницы 2D и ржи 2R и последующему воссоединению их плеч с образованием робертсоновских транслокаций.

В предыдущем исследовании по передаче хромосом пшеницы 5D и ржи 5R самоопыленному потомству  $F_2$  димоносомика 5R5D были выявлены особенности интрогрессии хромосомы 5R при 5R/5D замещении в геноме пшеницы сорта Саратовская 29. Хромосома 5R отличалась по характеру передачи от 2R, кроме телоцентриков t5RS она образовывала изохромосомы i5RS и хромосомы с делециями

T5RS.5RL-del., транслоцированных хромосом 5R/5D не было обнаружено (Силкова и др., 2011).

В нашем эксперименте мы обнаружили транслокации T2R.2DL в потомстве у растений с моносомными хромосомами 2R и 2D. Моносомное состояние хромосом является провокационным фоном для образования телоцентриков и транслокаций (Lukaszewski *et al.*, 1982; Badaev *et al.*, 1985; Davies *et al.*, 1985; Силкова и др., В печати). Интересно, что транслоцированные хромосомы T2R.2DL были обнаружены в последующем поколении растений, моносомных по хромосоме 2R. Это свидетельствует о том, что транслокации сформировались в течение одного мейотического цикла деления, когда обе хромосомы претерпевали поперечный разрыв хромосомы в районе центромеры и затем центрические слияния. Доказательство возможности образования робертсоновских транслокаций во время мейотического деления было получено при изучении мейоза растений, моносомных по хромосомам пшеницы 1A и *Elymus trachycaulus* 1H<sup>c</sup> с использованием GISH (Friebe *et al.*, 2005). Транслокации были обнаружены на стадии анафаза/телофаза II, это указывало на то, что центрическое слияние произошло в интеркинезе. Авторы предполагают, что причиной слияния плеч хромосом является неспособность их разорванных концов полностью стабилизироваться, восстанавливая теломеры, за один цикл деления. Хотя хромосомы пшеницы способны восстанавливаться *de novo* добавлением теломерных повторов, но это является постепенным процессом, для чего клетке необходимо пройти через несколько делений (Friebe *et al.*, 2001).

Таким образом, хромосома, не способная восстановить полностью функциональную теломеру за время прохождения одного клеточного цикла, восстанавливается слиянием с себе подобной, присутствующей в этом же ядре, в результате чего образуются транслокации. Кроме этого, в нашем эксперименте была обнаружена T2R.2DL в потомстве растения с моносомным t2R, что свидетельствует о возможности образования пшенично-ржаной транслокации при условии «свежего» места разрыва только одной хромосомы. Однако на сегодняшний день не установлено, насколько стабильна ранее восстановленная теломера у телоцентриков.



Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума СО РАН «Фундаментальные исследования, выполняемые совместно со сторонними научными организациями», интеграционный проект № 129.

### Литература

- Бадаева Е.Д., Будашкина Е.Б., Билинская Е.Н., Пухальский В.А. Закономерности межгеномных замещений хромосом у межвидовых гибридов пшеницы и их использование для создания генетической номенклатуры хромосом *Triticum timopheevii* // Генетика. 2010. Т. 46. С. 869–889.
- Добровольская О.Б. Характеристика пшенично-ржаных замещенных линий с использованием микросателлитных маркеров и изучение влияния отдельных хромосом ржи на показатели андрогенеза *in vitro*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 2003.
- Силкова О.Г., Добровольская О.Б., Дубовец Н.И. и др. Создание пшенично-ржаных замещенных линий с идентификацией хромосомного состава кариотипов С-бэндинг, GISH и SSR-маркерами // Генетика. 2006. Т. 42. Р. 793–802.
- Силкова О.Г., Щапова А.И., Шумный В.К. Передача генетического материала ржи в геном мягкой пшеницы методом межгеномного замещения хромосом // Информ. вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 4. С. 654–661.
- Силкова О.Г., Леонова И.Н., Красилова Н.М., Дубовец Н.И. Преимущественная элиминация хромосомы ржи 5R в потомстве димоносомиков 5R-5D // Генетика. 2011. Т. 47. № 8. С. 1064–1072.
- Badaev N.S., Badaeva E.D., Maximov N.G., Zelenin A.V. Cytogenetic investigation of hybrids produced by crossing of hexaploid Triticale with common wheats // Theor. Appl. Genet. 1985. V. 70. P. 536–541.
- Boros D., Lukaszewski A.J., Aniol A., Ochodzki P. Chromosome location of genes controlling the content of dietary fibre and arabinoxylans in rye // Euphytica. 2002. V. 128. P. 1–8.
- Davies P.A., Pallotta M.A., Driscoll C.J. Centric fusion between nonhomologous rye chromosomes in wheat // Can. J. Genet. Cytol. 1985. V. 27. P. 627–632.
- Dhaliwal A.S., Mares D.J., Marshall D.R. Effect of 1B/1R chromosome translocation on milling and quality characteristics of bread wheats // Cereal Chem. 1987. V. 64. P. 72–76.
- Ehdaie B., Whitkus R.W., Waines J.G. Root biomass, water-use efficiency, and performance of wheat-rye translocations of chromosomes 1 and 2 in spring bread wheat 'Pavon' // Crop Sci. 2003. V. 43. P. 710–717.
- Friebe B., Hatchett J.H., Sears R.G., Gill B.S. Transfer of Hessian fly resistance from Chaupon rye to hexaploid wheat via a 2BS/2RL wheat-rye chromosome translocation // Theor. Appl. Genet. 1990. V. 79. P. 385–389.
- Friebe B., Heun M., Tuleen N. *et al.* Cytogenetically monitored transfer of powdery mildew resistance from rye into wheat // Crop Sci. 1994. V. 34. P. 621–625.
- Friebe B., Jiang J., Raupp W.J. *et al.* Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status // Euphytica. 1996. V. 91. P. 59–87.
- Friebe B., Kynast R.G., Zhang P. *et al.* Chromosome addition by telomeric repeats in wheat occurs during the first mitotic divisions of the sporophyte and is a gradual process // Chromosome Res. 2001. V. 9. P. 137–146.
- Friebe B., Zhang P., Linc G., Gill B.S. Robertsonian translocations in wheat arise by centric misdivision of univalents at anaphase I and rejoining of broken centromeres during interkinesis of meiosis II // Cytogenet. Genome Res. 2005. V. 109. P. 293–297.
- Heun M., Friebe B. Introgression of powdery mildew resistance from rye into wheat // Phytopathology. 1990. V. 80. P. 242–245.
- Hysing S.C., Hsam S.L.K., Singh R.P. *et al.* Agronomic performance and multiple disease resistance in T2BS.2RL wheat-rye translocation lines // Crop Sci. 2007. V. 47. P. 254–260.
- Kim W., Johnson J.W., Baenziger P.S. *et al.* Agronomic effect of wheat-rye translocation carrying rye chromatin (1R) from different sources // Crop Sci. 2004. V. 44. P. 1254–1258.
- Knackstedt M.A., Sears R.G., Rogers D.E., Lookhart G.L. Effects of T2BS.2RL wheat-rye translocation on bread making quality in wheat // Crop Sci. 1994. V. 34. P. 1066–1070.
- Lukaszewski A.J. Frequency of 1RS.1AL and 1RS.1BL translocations in United States wheats // Crop Sci. 1990. V. 30. P. 1151–1153.
- Lukaszewski A.J., Gustafson J.P., Apolinarska B. Transmission of chromosomes through the eggs and pollen of triticale × wheat F1 hybrids // Theor. Appl. Genet. 1982. V. 63. P. 49–55.
- Martin D.J., Stewart B.G. Dough mixing properties of a wheat-rye derived cultivar // Euphytica. 1986. V. 35. P. 225–232.
- Mater Y., Baenziger S., Gill K. *et al.* Linkage mapping of powdery mildew and greenbug resistance genes on recombinant 1RS from 'Amigo' and 'Kavkaz' wheat-rye translocations of chromosome 1RS.1AL // Genome. 2004. V. 47. P. 292–298.
- McIntosh R.A., Friebe B., Jiang J. *et al.* Cytogenetical studies in wheat XVI. Chromosome location of a

- new gene for resistance to leaf rust in a Japanese wheat-rye translocation line // *Euphytica*. 1995. V. 82. P. 141–147.
- Merker A., Forsstrom P.O. Isolation of mildew resistant wheat-rye translocations from a double substitution line // *Euphytica*. 2000. V. 115. P. 167–172.
- Schubert I., Shi F., Fuchs J., Endo T.R. An efficient screening for terminal deletions and translocations of barley chromosomes added to common wheat // *Plant J*. 1998. V. 14. P. 489–495.
- Rabinovich S.V. Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. // *Euphytica*. 1998. V. 100. P. 323–340.
- Sears R.G., Hatchett J.H., Cox T.S., Gill B.S. Registration of Hamlet, a Hessian fly resistant hard red winter wheat germplasm // *Crop Sci*. 1992. V. 32. P. 506.
- Villareal R.L., Banuelos O., Mujeeb-Kazi A., Rajaram S. Agronomic performance of chromosome 1B and T1BL.1RS near-isolines in the spring bread wheat Seri M82 // *Euphytica*. 1998. V. 103. P. 195–202.

## TRANSMISSION OF RYE CHROMOSOME 2R IN BACKCROSSES OF WHEAT-RYE 2R(2D) SUBSTITUTION LINES TO VARIOUS COMMON WHEAT VARIETIES

N.M. Krasilova, I.G. Adonina, O.G. Silkova, V.K. Shumny

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

### Summary

Transmission of rye chromosome 2R in backcrosses of wheat-rye substitution lines 2R(2D)<sub>1</sub>, 2R(2D)<sub>2</sub> and 2R(2D)<sub>3</sub> (*Triticum aestivum* L. cv. Saratovskaya 29/ *Secale cereale* L. cv. Onokhoiskaya, 2n = 42) to common wheat varieties Saratovskaya 29 (S29), Novosibirskaya 67 (N67), and line Lutescens 307/97-23 (Lut307) has been studied. Rye chromosomes are present in the progeny of hybrids BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> 2R(2D)<sub>1</sub> × C29, 2R(2D)<sub>2</sub> × C29, 2R(2D)<sub>3</sub> × C29, 2R(2D)<sub>3</sub> × H67 and BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 2R(2D)<sub>3</sub> × Lut307, 2R(2D)<sub>1</sub> × H67, 2R(2D)<sub>1</sub> × Lut307; Lut307 × 2R(2D)<sub>1</sub> in the disomic and monosomic states; also, telocentrics and 2R/2D translocations have been recorded. The frequency and mode of 2R chromosome transmission is influenced by the genotypes of both the wheat-rye substitution line and the variety used in backcrossing. In the backcrossing to N67, rye chromosomes of lines 2R(2D)<sub>1</sub> and 2R(2D)<sub>3</sub> replace chromosome 2D more often than in crosses to Lut307 or S29. Chromosomes with aberrations have been found in 26 % of hybrids after the first backcross. In the reciprocal cross of 2R(2D)<sub>1</sub> to Lut307, chromosome 2R has been found only in two plants. Putative mechanisms forming translocations between homeological chromosomes of wheat and rye are considered.

**Key words:** *T. aestivum*, wheat-rye substitution lines, C banding, GISH, introgression, telocentrics, chromosome translocations.

## ЭВОЛЮЦИЯ И РАЗНООБРАЗИЕ *L1*-РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ В ГЕНОМАХ ПОКРЫТОСЕМЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Г.А. Смышляев<sup>1</sup>, А.Г. Блинов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования  
Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия,  
e-mail: g.smyshl@gmail.com;

<sup>2</sup> Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: blinov@bionet.nsc.ru

К настоящему времени имеются только отрывочные данные о разнообразии и структурных особенностях *L1*-ретротранспозонов покрытосеменных растений, касающиеся лишь отдельных элементов из небольшого числа геномов. В частности, отсутствует четкая классификация мобильных элементов данной группы в соответствии с их филогенетическим происхождением. Кроме того, также недостаточны данные о структурных характеристиках элементов из отдельных групп *L1*-ретротранспозонов покрытосеменных растений. В связи с этим нами была предпринята попытка провести комплексный структурно-филогенетический анализ *L1*-ретротранспозонов покрытосеменных растений. Была использована информация о геномах 19 представителей покрытосеменных растений, имеющаяся в свободном доступе. В результате проведенного анализа было выявлено три группы *L1*-элементов, различающихся на основе филогенетических взаимоотношений, реконструированных с помощью консервативного района обратной транскриптазы, а также на основе структурной организации этих элементов. Было показано, что ключевым фактором при возникновении новых типов *L1*-ретротранспозонов покрытосеменных растений стало появление новых типов белков, формирующих рибонуклеопротеиновую частицу ретротранспозона, а также приобретение некоторыми элементами последовательностей, кодирующих собственный белок RNH.

**Ключевые слова:** *L1*-non-LTR-ретротранспозоны, покрытосеменные растения, биоинформатический поиск, молекулярная эволюция.

### Введение

Ретротранспозоны – это мобильные генетические элементы, перемещающиеся с использованием фермента обратной транскриптазы. Они распространены в геномах всех эукариот и играют важную роль в функционировании и эволюции генома (Jurka *et al.*, 2005; Сергеева, Салина, 2011; Сормачева, Блинов, 2011). Перемещение ретротранспозонов может приводить к быстрому увеличению размера генома, как, например, было показано для генома риса (Ma, Bennetzen, 2004). Ретротранспозоны разделяют на две группы: LTR-ретротранспозоны, содержащие длинные концевые повторы (LTR – long terminal repeats) и non-LTR-ретротранспозоны, соответственно, не имеющие LTR. Non-LTR-ретротранспозоны – наиболее распространенные

мобильные элементы в геномах млекопитающих, составляющие около 1/3 генома человека (Lander *et al.*, 2001). В растениях они менее многочисленны, чем у млекопитающих, но, тем не менее, встречаются во многих растительных геномах (Turcotte *et al.*, 2001; Noma *et al.*, 1999).

Автономные non-LTR-ретротранспозоны обычно содержат две открытые рамки считывания (ORF – open reading frame), кодирующие белки, необходимые для ретротранспозиции.

ORF2 кодирует эндонуклеазу, обратную транскриптазу (RT) и иногда РНКазу (RNH). Non-LTR-ретротранспозоны могут содержать два различных типа эндонуклеаз: древние группы non-LTR-ретротранспозонов содержат сайт-специфичную эндонуклеазу, в то время как более молодые содержат апуриновую/апириமிдиновую эндонуклеазу (APE). Кроме того, элемент

из водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, филогенетически занимающий промежуточное положение между древними и молодыми элементами, содержит обе эндонуклеазы в одной рамке считывания (Kojima, Fujiwara, 2005). Элементы группы *L1* относятся к молодым non-LTR-ретротранспозонам и, соответственно, содержат APE эндонуклеазу. *L1*-non-LTR-ретротранспозоны распространены во многих эукариотических организмах: растениях, грибах и животных (Kojima, Fujiwara, 2004; Novikova *et al.*, 2008; ).

ORF1 *L1*-ретротранспозонов человека кодирует белок с предполагаемой шаперонной функцией. При этом формируется мультимерный комплекс, который связывается с мРНК элемента и препятствует ее разрушению (Martin *et al.*, 2006). У *L1*-элементов растений описано два различных типа ORF1. ORF1 первого типа содержит РНК-связывающий RRM (RNA recognition motif) домен и следующий за ним цистеиновый мотив (CCHC) (Khazina, Weichenrieder, 2009); ORF1 второго типа содержит несколько иной, более консервативный, RRM-домен без каких-либо следов цистеинового мотива (Heitkam, Schmidt, 2009).

Детально изучены *L1*-элементы человека, в то время как у растений описано всего несколько семейств *L1*-ретротранспозонов. Первым описанным *L1*-non-LTR-элементом растений был *Cin4*-элемент из генома кукурузы (Schwarz-Sommer *et al.*, 1987). Затем *L1*-элементы были обнаружены в геномах *Arabidopsis thaliana* (*Ta11-1* и *ATLN*), *Lilium speciosum* (*del2*), *Cannabis sativa* (*LINE-CS*), *Hordeum vulgare* (*BLIN*), *Beta vulgaris* (*Bv11* и *BNR*) и *Chlorella vulgaris* (*Zepp*) (Leeton, Smyth, 1993; Wright *et al.*, 1996; Higashiyama *et al.*, 1997; Noma *et al.*, 2000; Sakamoto *et al.*, 2000; Vershinin *et al.*, 2002; Heitkam, Schmidt, 2009; Wenke *et al.*, 2009).

Кроме описания отдельных семейств, до сих пор не было предпринято попыток идентификации основных филогенетических групп *L1*-ретротранспозонов растений, которая значительно упростила бы работу с информацией относительно этих элементов и расширила бы наши представления об эволюции этой группы мобильных элементов. Поэтому целью данной работы стало, во-первых, выявление основных филогенетических групп *L1*-ретротранспо-

зонов растений и изучение их разнообразия; во-вторых – определение структурных характеристик элементов из этих групп и, в-третьих – поиск основных событий, произошедших в эволюции *L1*-ретротранспозонов, приведших к наблюдаемому разнообразию этих мобильных элементов.

## Материалы и методы

Для биоинформатического поиска *L1*-элементов в геномах растений и в базе данных RepBase (Jurka *et al.*, 2005) использовался HMMERsearch (HMMER2), инструмент из программного обеспечения UGENE (<http://ugene.unipro.ru>). Этот инструмент позволяет проводить анализ с помощью скрытых марковских моделей (HMM профилей), представляющих собой статистическую модель разыскиваемой аминокислотной последовательности (Eddy, 1998). Мы использовали уже готовый HMM профиль для района RT *L1*-элементов, доступный вместе с пакетом программ MGEScan-non-LTR (Rho, Tang, 2009). После поиска копий *L1*-элементов в конкретном геноме с помощью HMMERsearch инструмента проводились выравнивание и филогенетический анализ найденных последовательностей с целью выявления копий одного и того же элемента. Выравнивание проводилось с использованием алгоритма MUSCLE (Edgar, 2004). Для филогенетического анализа использовался метод объединения ближайших соседей из пакета программ MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Для каждого из элементов из всех представленных в геноме копий выбиралась одна «мастер-копия», которая использовалась для последующего филогенетического анализа. После идентификации всех элементов проводился еще один филогенетический анализ с использованием аминокислотных последовательностей RT всех найденных «мастер-копий» элементов, а также аминокислотных последовательностей RT элементов из базы данных RepBase. В рамках этого анализа построение филогенетического дерева проводилось с помощью программы PhyML, использующей для реконструкции филогенетических отношений метод максимального правдоподобия (Guindon *et al.*, 2010). Для статистического подтверждения топологии дерева использовался тест близ-



кого правдоподобия (approximate likelihood-ratio test, aLRT) (Anisimova, Gascuel, 2006).

Кроме того, проводилось исследование структурных характеристик найденных элементов. Для этого найденные в геноме районы RT расширялись на 5000 п.н. в обе стороны. Далее в этих последовательностях и в элементах из базы данных RepBase разыскивались открытые рамки считывания и структурные домены, характерные для non-LTR-ретротранспозонов. Для поиска структурных доменов использовалась база данных консервативных доменов в NCBI (Marchler-Bauer *et al.*, 2011), а также онлайн-ресурс детекции гомологии и предсказания структуры белков HHPred (Söding, 2005).

## Результаты и обсуждение

### Поиск и молекулярно-филогенетический анализ

#### *L1*-non-LTR-ретротранспозонов растений

Для выявления разнообразия *L1*-non-LTR-ретротранспозонов растений был проведен биоинформатический анализ 19 геномов семенных растений: 8 однодольных и 11 двудольных (табл. 1). Осуществлялся поиск регионов обратной транскриптазы *L1*-элементов либо в целых геномных последовательностях (для 10 видов), либо в базе данных RepBase (для 9 видов) с помощью НММ профиля (табл. 1). Все обнаруженные в геномных последовательностях RT районы *L1*-элементов были использованы для филогенетического анализа с целью идентификации копий одного элемента (см. Материалы и методы).

Всего было обнаружено 67 различных *L1*-элементов в 10 исследованных геномах растений. Кроме того, использовались данные о 237 элементах, обнаруженных в 9 геномах растений с помощью поиска в базе данных RepBase. Для выявления основных эволюционных групп *L1*-ретротранспозонов растений на основе найденных RT-последовательностей проводился филогенетический анализ с использованием всех найденных элементов из всех исследованных геномов, а также ранее описанных элементов. В результате данного исследования было построено филогенетическое древо, на котором четко

выявляются три основные филогенетические группы *L1*-элементов покрытосеменных растений: *Tall*, *BNR* и *Cin4* (рис. 1).

*Tall*-группа оказалась самой распространенной – элементы этой группы были обнаружены почти во всех исследованных геномах. Элементы из групп *BNR* и *Cin4* были представлены в геномах двудольных и однодольных растений соответственно. Эти данные, полученные на основе филогенетического анализа RT-последовательностей *L1*-non-LTR-ретротранспозонов, находятся в соответствии с данными о структурной организации элементов: элементы из одной филогенетической группы имеют сходное строение и общие структурные особенности.

### Структурная организация *L1*-non-LTR-ретротранспозонов растений

Большинство геномов содержали предположительно активные копии *L1*-элементов одной или нескольких групп. Но в геномах ряда видов (*Carica papaya*, *Cucumis sativus* и *Manihot esculenta*) не было обнаружено ни одного полноразмерного элемента, что, возможно, говорит, с одной стороны, об отсутствии в них недавних событий ретротранспозиции *L1*-non-LTR-элементов. С другой стороны, альтернативным объяснением отсутствия полноразмерных копий *L1*-non-LTR-ретротранспозонов в геномах этих видов может быть более высокий уровень репрессии мобильных элементов геномом хозяина.

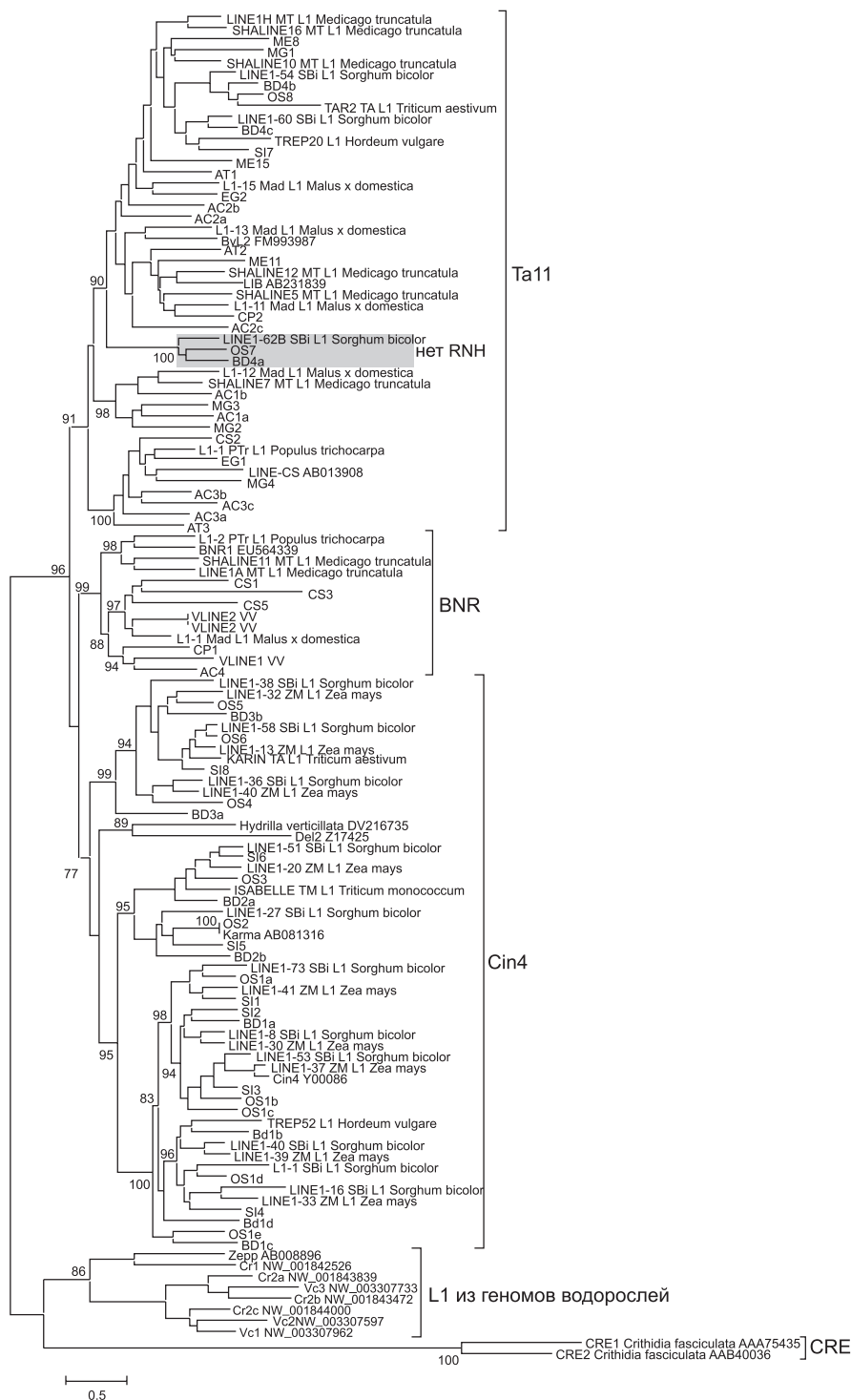
Для каждой из 3 групп *L1*-элементов была установлена общая структура входящих в ее состав элементов (рис. 2). Главным отличием элементов из разных групп оказалась структурная организация их ORF1: у *Tall*-элементов она оказалась представленной рамкой считывания первого типа, у *BNR* – второго типа и, наконец, у *Cin4*-элементов был обнаружен новый тип ORF1. Кроме того, важной отличительной чертой *Tall*-элементов является наличие у них RNH-домена в составе ORF2.

***Tall*-элементы.** Элементы группы *Tall* оказались наиболее распространенными по сравнению с другими описанными группами элементов. Они были обнаружены во всех исследованных геномах, кроме геномов *Vitis vinifera* и *Triticum monococcum*. В базе данных

Таблица 1

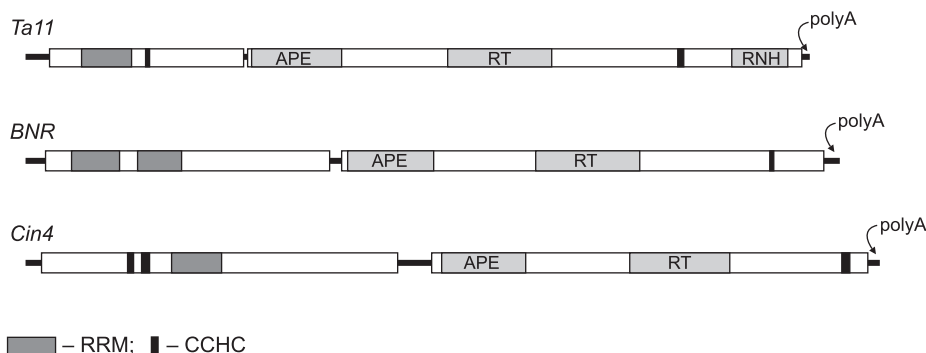
Таксономическое положение исследуемых видов растений и количество копий *L1*-ретротранспозонов в геноме

|  | Порядок      | Семейство     | Подсемейство   | Вид                            | Количество<br>RT в геноме | Источник данных /<br>размер генома |
|--|--------------|---------------|--|--------------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| <b>Однодольные</b><br>Подкласс Commelinids   | Poales       | Poaceae       | <i>BER</i><br>Pooideae                               | <i>Brachypodium distachyon</i> | 1421                      | Геном/272Mb                        |
|  |              |               |  | <i>Triticum monoccum</i>       | –                         | Repbase                            |
|  |              |               |  | <i>Triticum aestivum</i>       | –                         | Repbase                            |
|  |              |               |  | <i>Hordeum vulgare</i>         | –                         | Repbase                            |
| <b>Двудольные</b><br><i>Core eudicotyledons</i><br>Подкласс Asterids<br>Подкласс Rosids<br>Malvids<br><br>Fabids | Lamiales     | Phrymaceae    | <i>Ehrhartoideae</i><br><i>PACCAD</i><br>Panicoideae | <i>Oryza sativa</i>            | 750                       | Геном/372Mb                        |
|  |              |               |  | <i>Sorghum bicolor</i>         | –                         | Repbase                            |
|  |              |               |  | <i>Zea mays</i>                | –                         | Repbase                            |
|  |              |               |  | <i>Setaria italica</i>         | 1423                      | Геном/515Mb                        |
|  | Brassicales  | Brassicaceae  | <i>Papilionoideae</i>                                | <i>Mimulus guttatus</i>        | 649                       | Геном/430 Mb                       |
|  |              |               |  | <i>Arabidopsis thaliana</i>    | 277                       | Геном/135Mb                        |
|  |              |               |  | <i>Carica papaya</i>           | 549                       | Геном/135Mb                        |
|  |              |               |  | <i>Eucalyptus grandis</i>      | 2813                      | Геном/691Mb                        |
|  | Rosales      | Rosaceae      | <i>Spiraeoideae</i>                                  | <i>Medicago truncatula</i>     | –                         | Repbase                            |
|  |              |               |  | <i>Cucumis sativu</i>          | 108                       | Геном/203Mb                        |
|  |              |               |  | <i>Malus domestica</i>         | –                         | Repbase                            |
|  |              |               |  | <i>Manihot esculenta</i>       | 431                       | Геном/533Mb                        |
| <i>Rosids incertae sedis</i><br><i>Stem eudicotyledons</i>   | Malpighiales | Euphorbiaceae | <i>Crotonoideae</i>                                  | <i>Populus trichocarpa</i>     | –                         | Repbase                            |
|  |              |               |  | <i>Vitis vinifera</i>          | –                         | Repbase                            |
|  |              |               |  | <i>Aquilegia coerulea</i>      | 1133                      | Геном/302Mb                        |



**Рис. 1.** Филогенетическое дерево *L1*-элементов из геномов покрытосеменных растений, реконструированное с помощью метода максимального правдоподобия на основе аминокислотных последовательностей обратных транскриптаз.

Для обозначения найденных в геноме элементов использовались инициалы вида, в геноме которого был найден элемент, и номер элемента. Например, OS1a – это элемент из *Oryza sativa* под номером 1a. Для обозначения элементов, взятых из базы данных RepBase, использовалось исходное название элемента в базе данных, по которому данный элемент может быть в ней найден. Например: SHALINE12\_MT\_L1\_Medicago\_truncatula. Для обозначения элементов из GenBank использовались их название и номер доступа в GenBank. Например: Cin4\_Y00086. Подгруппа *Ta11*-элементов, не имеющая РНКазыН (RNH), выделена серым цветом. В качестве внешней группы использовались последовательности *CRE*-элементов, а также *L1*-элементы водорослей. Слева от узлов указана их статистическая достоверность, согласно тесту близкого правдоподобия.



**Рис. 2.** Схема строения элементов из трех различных групп *L1*-элементов растений.

APE – аспарагиновая протеаза; RT – обратная транскриптаза; RRM – РНК-связывающий домен; CCHC – цистеиновый мотив типа CCHC; RNH – РНКазaH; polyA – polyA трек.

RepBase эти два генома оказались представлены только элементами из *BNR*- и *Cin4*-групп. Возможно, что геномы *V. vinifera* и *T. monocoscut* также содержат *Ta11*-элементы, но они либо присутствуют в этих геномах в очень небольшом количестве копий, либо очень разрушены. По одной из этих причин они могли быть не обнаружены стандартными программами предсказания повторов. Таким образом, *Ta11*-группа оказалась единственной из исследованных групп, представленной в геномах как однодольных, так и двудольных растений.

Такое широкое распространение этой группы говорит о ее древнем происхождении, еще до разделения однодольных и двудольных растений, т. е. более 150 млн лет назад (Chaw *et al.*, 2004). Для данной группы *L1*-элементов, как и ожидалось, характерно наличие двух ORF. ORF1 представлена рамкой считывания первого типа, т. е. в ней присутствует RRM-домен, за которым следует цистеиновый мотив CCHC (рис. 2). RRM-домен и цистеиновый мотив являются единственными консервативными регионами ORF1, в то время как другие ее части значительно варьируют между элементами, что, скорее всего, говорит об отсутствии, с одной стороны, прямого функционального значения этих последовательностей ORF1. С другой стороны, размер ORF1 в целом консервативен и составляет около 1,5 тыс. п.н., поэтому можно предположить, что неконсервативная часть ORF1 необходима для поддержания пространственной конфигурации белка. RRM-домен так же, как и CCHC-мотив, вероятнее всего, участвует в связывании белка с РНК (Maris, 2005; Matsui *et al.*, 2009), таким

образом, подтверждая предположение о том, что белок, кодируемый ORF1, необходим для формирования рибонуклеопротеиновой частицы *L1*-элемента (Kolosha, 1997).

ORF2, кроме стандартных для *L1*-элементов APE- и RT-доменов и CCHC-мотива, содержит в своем составе еще и RNH-домен (рис. 2). Ни одна из других ранее описанных групп *L1*-элементов эукариот не содержит этого домена. Более того, появление RNH-последовательности в non-LTR-ретротранспозонах считается более поздним событием. Предполагается, что впервые этот домен появляется у non-LTR-ретротранспозонов в филогенетически более молодом семействе Jockey (Malik, 2005). Обнаружение RNH-домена в группе *Ta11*-элементов растений позволяет сделать вывод о независимом приобретении этого домена у разных групп non-LTR-ретротранспозонов. В пользу этого предположения говорит и тот факт, что у остальных non-LTR-элементов, обладающих RNH, CCHC-мотив располагается после RNH, в то время как у *Ta11*-элементов этот мотив расположен перед RNH (рис. 2).

Следует отметить, что наличие RNH-домена характерно не для всех элементов группы *Ta11*. У элементов *BD4a* из *Brachypodium distachyon*, *OS7* из *Oryza sativa* и *LINE1-62B* из *Sorghum bicolor* он отсутствует. Все три вышеупомянутых элемента формируют отдельную группу на филогенетическом дереве, поэтому можно предположить, что RNH в этой группе был утрачен (рис. 1).

***BNR*-элементы.** Элементы этой группы не были найдены ни в одном из исследованных



геномов злаков. Поэтому можно предположить, что *BNR*-группа специфична для двудольных растений. Однако ввиду отсутствия данных относительно геномов незлаковых однодольных в свободном доступе очевидно, что для проверки этой гипотезы требуется дополнительная информация.

Ранее была проведена работа, в которой были описаны основные характеристики представителей *BNR*-группы (Heitkam *et al.*, 2009). Главной особенностью элементов этой группы являются высококонсервативный «двойной» RRM-домен (рис. 2) и отсутствие цистеинового мотива в ORF1. ORF2 имеет стандартную для *L1*-элементов структуру и содержит домены APE и RT, а также цистеиновый мотив CCHC на ее С-конце. В нашем исследовании мы обнаружили новые элементы, относящиеся к этой группе, в геномах *Aquilegia coerulea*, *Carica papaya*, *Cucumis sativus*, *Malus domestica* и *Medicago truncatula*. Присутствие *BNR*-элементов в одном из самых примитивных двудольных *Aquilegia coerulea* из порядка Ranunculales говорит в пользу происхождения этой группы элементов до появления так называемых основных эудикотов (англ. core eudicots), т. е. более 110 млн лет назад (Chaw *et al.*, 2004).

***Cin4*-элементы.** Элементы из этой группы были обнаружены в геномах всех злаковых растений, исследованных в данной работе. Кроме того, в этой группе оказался и *del2*-элемент из *Lilium speciosum*, что говорит о том, что *Cin4*-элементы произошли до появления злаковых. В результате филогенетического анализа было выявлено несколько подгрупп элементов *Cin4*, однако, несмотря на филогенетические различия, элементы из этих подгрупп имеют сходную структурную организацию. При детальном анализе структуры ORF1 элементов из группы *Cin4* был выявлен новый, третий тип ORF1 *L1*-элементов растений. ORF1 элементов *Cin4* имеет RRM-мотив, сходный с таковым у *Tall*-элементов, но в отличие от последних элементы *Cin4* имеют не один, а два цистеиновых CCHC-мотива в первой рамке, которые располагаются не на С-конце, как у *Tall*-элементов, а в N-конце белка относительно RRM-мотива (рис. 2).

Кроме того, ORF1 элементов *Cin4* имеет большую протяженность и ее средняя длина составляет более 3 тыс. п.н. Для сравнения длина

ORF1 человека всего около 1 т.п.н. (GenBank: U93570). Остальная часть ORF1, за исключением двух CCHC-мотивов и RRM-домена, значительно варьирует между элементами *Cin4*-группы, что позволяет так же, как и для *Tall*-элементов, предположить ее функционирование в качестве стабилизатора пространственной структуры синтезируемого с ORF1 белка.

### Заключение

В результате проделанной работы были выявлены три группы *L1*-элементов покрытосеменных растений: *Tall*, *BNR* и *Cin4*. Каждая группа характеризуется особой структурой ORF1, в то время как ORF2 в целом сходна у всех групп, за исключением элементов *Tall*, которые содержат RNH-домен. Элементы из групп *Tall* и *BNR* имеют ORF1 первого и второго типов соответственно. Структуры ORF1 этих двух типов были ранее установлены. Для группы *Cin4* был выявлен новый, третий, тип ORF1, характеризующийся наличием двух цистеиновых CCHC мотивов и RRM-домена. Таким образом, основными эволюционными событиями, происходившими в эволюции *L1*-ретротранспозонов и приведшими к появлению новых групп элементов, по-видимому, являлись изменения, связанные с функционированием ORF1. Белок, синтезируемый с этой рамки считывания, участвует в создании рибонуклеопротеиновой частицы и имеет шаперонные функции, препятствуя, таким образом, разрушению мРНК элемента клеточными нуклеазами.

Кроме того, важным событием в эволюции *L1*-элементов было приобретение некоторыми из них белка RNH, что привело к появлению группы *Tall*-элементов. Для оценки времени появления данных групп элементов, а также выяснения истоков происхождения этих групп элементов следует провести дальнейшие исследования распространения *L1*-ретротранспозонов в базальных группах покрытосеменных растений.

### Благодарности

Работа была выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (государственный контракт № 14.740.11.1191).

## Литература

- Сергеева Е.М., Салина Е.А. Мобильные элементы и эволюция генома растений // Вавиловск. журн. генет. и селекции. 2011. Т. 15. № 2. С. 382–398.
- Сормачева Н.Д., Блинов А.Г. LTR ретротранспозоны растений // Вавиловск. журн. генет. и селекции. 2011. Т. 15. № 2. С. 351–381.
- Anisimova M., Gascuel O. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative // Syst. Biol. 2006. V. 55. P. 539–552.
- Chaw S.M., Chang C.C., Chen H.L., Li W.H. Dating the monocot-dicot divergence and the origin of core eudicots using whole chloroplast genomes // J. Mol. Evol. 2004. V. 58. P. 424–441.
- Eddy S.R. Profile hidden Markov models // Bioinformatics. 1998. V. 14. P. 755–763.
- Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. P. 1792–1797.
- Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V. *et al.* New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0 // Syst. Biol. 2010. V. 59. P. 307–321.
- Heitkam T., Schmidt T. *BNR* – a *LINE* family from *Beta vulgaris* – contains a RRM domain in open reading frame 1 and defines a *L1* sub-clade present in diverse plant genomes // Plant J. 2009. V. 59. P. 872–882.
- Higashiyama T., Noutoshi Y., Fujie M., Yamada T. *Zepp*, a *LINE*-like retrotransposon accumulated in the *Chlorella* telomeric region // EMBO J. 1997. V. 16. P. 3715–3723.
- Jurka J., Kapitonov V.V., Pavlicek A. *et al.* Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements // Cytogenet. Genome Res. 2005. V. 110. P. 462–467.
- Khazina E., Weichenrieder O. Non-LTR retrotransposons encode noncanonical RRM domains in their first open reading frame // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 731–736.
- Kojima K.K., Fujiwara H. Cross-genome screening of novel sequence-specific non-LTR retrotransposons: various multicopy RNA genes and microsatellites are selected as targets // Mol. Biol. Evol. 2004. V. 21. P. 207–217.
- Kojima K.K., Fujiwara H. An extraordinary retrotransposon family encoding dual endonucleases // Genome Res. 2005. V. 15. P. 1106–1117.
- Kolosha V.O., Martin S.L. *In vitro* properties of the first ORF protein from mouse *LINE-1* support its role in ribonucleoprotein particle formation during retrotransposition // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 10155–10160.
- Lander E.S., Linton L.M., Birren B. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome // Nature. 2001. V. 409. P. 860–921.
- Leeton P.R., Smyth D.R. An abundant *LINE*-like element amplified in the genome of *Lilium speciosum* // Mol. Gen. Genet. 1993. V. 237. P. 97–104.
- Ma J., Bennetzen J.L. Rapid recent growth and divergence of rice nuclear genomes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 12404–12410.
- Malik H.S. Ribonuclease H evolution in retrotransposable elements // Cytogenet. Genome Res. 2005. V. 110. P. 392–401.
- Marchler-Bauer A., Lu S., Anderson J.B. *et al.* CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39. P. 225–229.
- Maris C., Dominguez C., Allain F.H. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression // FEBS J. 2005. V. 272. P. 2118–2131.
- Martin S.L. The ORF1 protein encoded by *LINE-1*: structure and function during *L1* retrotransposition // J. Biomed. Biotechnol. 2006. DOI: 10.1155/JBB/2006/45621.
- Matsui T., Tanaka T., Endoh H. *et al.* The RNA recognition mechanism of human immunodeficiency virus (HIV) type 2 NCp8 is different from that of HIV-1 NCp7 // Biochemistry. 2009. V. 48. P. 4314–4323.
- Noma K., Ohtsubo E., Ohtsubo H. Non-LTR retrotransposons (*LINEs*) as ubiquitous components of plant genomes // Mol. Gen. Genet. 1999. V. 261. P. 71–79.
- Noma K., Ohtsubo H., Ohtsubo E. *ATLN* elements, *LINEs* from *Arabidopsis thaliana*: identification and characterization // DNA Res. 2000. V. 7. P. 291–303.
- Novikova O., Fet V., Blinov A. Non-LTR retrotransposons in fungi // Funct. Integr. Genomics. 2008. V. 9. P. 27–42.
- Rho M., Tang H. *MGES* cannon-LTR: computational identification and classification of autonomous non-LTR retrotransposons in eukaryotic genomes // Nucl. Acids Res. 2009. V. 37:e143.
- Sakamoto K., Ohmido N., Fukui K. *et al.* Site-specific accumulation of a *LINE*-like retrotransposon in a sex chromosome of the dioecious plant *Cannabis sativa* // Plant Mol. Biol. 2000. V. 44. P. 723–732.
- Schwarz-Sommer Z., Leclercq L., Gobel E., Saedler H. *Cin4*, an insert altering the structure of the *Al* gene in *Zea mays*, exhibits properties of nonviral retrotransposons // EMBO J. 1987. V. 6. P. 3873–3880.
- Söding J. Protein homology detection by HMM-HMM comparison // Bioinformatics. 2005. V. 21. P. 951–960.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N. *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and

- maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. (submitted) (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>)
- Turcotte K., Srinivasan S., Bureau T. Survey of transposable elements from rice genomic sequences // Plant J. 2001. V. 25. P. 169–179.
- Vershinin A. V., Druka A., Alkhimova A. G. *et al.* *LINEs* and *gypsy*-like retrotransposons in *Hordeum* species // Plant Mol. Biol. 2002. V. 49. P. 1–14.
- Wenke T., Holtgräbe D., Horn A. V. *et al.* An abundant and heavily truncated non-LTR retrotransposon (*LINE*) family in *Beta vulgaris* // Plant Mol. Biol. 2009. V. 71. P. 585–597.
- Wright D. A., Ke N., Smalle J. *et al.* Multiple non-LTR retrotransposons in the genome of *Arabidopsis thaliana* // Genetics. 1996. V. 142. P. 569–578.

## EVOLUTION AND BIODIVERSITY OF *L1*-RETROTRANSPOSONS OF ANGIOSPERMS

G. A. Smyshlyaev<sup>1</sup>, A. G. Blinov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Novosibirsk State University Novosibirsk, Russia,  
e-mail: [g.smyshl@gmail.com](mailto:g.smyshl@gmail.com);

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: [blinov@bionet.nsc.ru](mailto:blinov@bionet.nsc.ru)

### Summary

Only limited data regarding the biodiversity and structural features of *L1*-retrotransposons of angiosperms related to individual elements from a few genomes are available to date. There is no clear classification of mobile elements of this group according to their phylogenetic origin. Moreover, data on structural features are also incomplete and are not in accordance with possible *L1*-groups. Therefore, we have attempted to conduct comprehensive structural and phylogenetic analysis of *L1*-retrotransposons of angiosperms in the present investigation. We used information on 19 genomes of angiosperm species available from databases, and three clades of *L1*-elements discerned on the basis of their reverse transcriptase phylogeny as well as on structural organization have been revealed. It has been shown that the crucial force giving rise to new types of *L1*-retrotransposons was an emergence of the new protein types forming ribonucleoprotein particle and acquisition of RNH protein coding region by several elements.

**Key words:** *L1*-non-LTR-retrotransposons, angiosperms, bioinformatical search, molecular evolution.

## СЕЛЕКЦИЯ ПШЕНИЦЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ВРЕДНЫМ КЛОПАМ (*EURYGASTER SPP.*): НЕТ ЛИ РИСКА?

В.А. Крупнов

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

Пшеница является повседневным ценнейшим продуктом питания, но она вызывает аллергию или целиакию примерно у 1 из 100 человек (прежде всего у детей). Во многих регионах вредные клопы сильно снижают урожай и качество зерна. В условиях потепления климата создаются благоприятные условия для расширения ареала распространения и «усиления вредоносности» клопов. В селекции из двух известных подходов (генетическая защита растений – материнского организма и генетическая защита потомства – семян) первый подход представляется менее рискованным для здоровья человека. Пшеница нуждается в такой защите от вредителей, при которой не снижаются не только реологические свойства клейковины, но также и питательная ценность зерна. Основной путь решения этой проблемы – это разработка интегрированной системы управления численностью клопов, включающей наряду с технологическими, биологическими, химическими методами и генетическую защиту, которые в комплексе позволили бы выращивать экологически безопасную пшеницу. Весьма актуально также создание сортов пшеницы с пониженным содержанием в зерне детерминантов аллергии и целиакии.

**Ключевые слова:** вредные клопы, устойчивость растений, устойчивость семян, потери урожая, снижение качества зерна, аллергия, целиакия.

Пшеница – исключительно ценный продукт питания: она богаче риса белком (в 1,5–2 раза), большая часть его представлена уникальной, вязкоэластичной клейковиной (глиадины и глютенины), что позволяет выпекать хлеб, изготавливать лапшу, спагетти и многие другие ценнейшие продукты повседневного питания. В зерне имеются все незаменимые аминокислоты, макро- и микроэлементы, витамины; в нем значительно больше, чем в зерне риса, компонентов диетических волокон, крайне важных для питания человека (Shewry, 2009; Okarter *et al.*, 2010). Производство пшеницы растет в тесной связи с ростом народонаселения на планете. В настоящее время валовой сбор зерна пшеницы превышает 600 млн т в год, т. е. приближается к 100 кг зерна на душу населения (<http://faostat.fao.org/>). В последнее время наметилась тенденция к увеличению потребления пшеницы в странах Юго-Восточной Азии, а также в США (Rubio-Tapia *et al.*, 2009; Atchison *et al.*, 2010).

**Ущерб от клопов.** На Ближнем и Среднем Востоке, в Центральной Азии, на Севере Африки, Востоке и Юго-Востоке Европы большой ущерб урожаю и качеству зерна пшеницы наносят клопы: клоп вредная черепашка (*Eurygaster integriceps* Puton.), маврский клоп (*E. maura* L.) и австрийский клоп (*E. austriacus* Schr.) (El Bouhssini *et al.*, 2009; Mehrabadi *et al.*, 2010). Эти клопы не менее вредоносны и в нашей стране, особенно на Северном Кавказе, в Нижнем и Среднем Поволжье и сопредельных регионах (Каменченко и др., 2010). Клопы имеют одну генерацию в год с обязательной диапаузой во взрослом состоянии, весьма теплолюбивы, наивысшую активность проявляют при 25–30 °C и выше (Iranipour *et al.*, 2010; Mehrabadi *et al.*, 2010), могут мигрировать на многие километры (Гриванов, Захаров, 1958) и подниматься в горы на высоту до 1800–2000 м (Parker *et al.*, 2011). Потепление климата способствует расширению ареала их распространения и вредоносности. При теплой солнечной погоде перезимовавшие



клопы спариваются и самки откладывают на листья пшеницы, ячменя, ржи, овса до 100–150 яиц и более.

В Нижнем Поволжье массовое размножение клопов, в особенности вредной черепашки, наблюдалось в 1900–1905, 1909–1912, 1938–1942, 1953–1958, 1964–1968, 1982–1984, 1998–2002, 2008–2010 гг., как правило, в сочетании с ранневесенней и летней засухой, теплой сухой осенью и глубоким снежным покровом, устанавливающимся с первой половины зимы (Гриванов, Захаров, 1958; Каменченко и др., 2010).

Перезимовавшие клопы питаются на растениях в течение всего периода вегетации. При этом наблюдаются увядание и засыхание как листьев, так стеблей, а также уродливость и «белоколосость», изреживание стеблестоя. Чем больше клопов на колосе, тем выше потери урожая – снижение числа и массы 1000 зерен, натурной массы зерна. В годы массового размножения они могут полностью уничтожить урожай (Гриванов, Захаров, 1958; Kinaci E., Kinaci G., 2007).

Клопы наносят также большой вред качеству зерна: в нем снижается содержание белка и клейковины, резко ухудшается «сила» (вязкость, эластичность) клейковины (Sivri *et al.*, 1999; Rosell *et al.*, 2002; Aja *et al.*, 2004; Olanca *et al.*, 2009) и она становится непригодной для выпечки высококачественного хлеба (Кретович, Токарев, 1938; Kretovich, 1944; Марушев, 1968; Козьмина, 1976; Емельянов, 1992; Теняева, 2004; Kinaci E., Kinaci G., 2007), а также для изготовления макаронных изделий и других продуктов (Ozderen *et al.*, 2008; Гапонов и др., 2009; Salis *et al.*, 2010).

**Взаимодействие фитофага и растения.** В последнее время значительно продвинулось изучение механизмов взаимодействия клопов с формирующимися на материнском растении семенами (Hosseininaveh *et al.*, 2009; Mehrabadi, Bandani, 2009; Darkoh *et al.*, 2010; Mehrabadi *et al.*, 2010; Zibae *et al.*, 2011).

Снаружи зерновка защищена цветочной и колосковой пленками, однако эти барьеры (как и другие морфологические признаки) не представляют особых трудностей для клопа, его стилет (колюще-сосущий аппарат) преодолевает и плодовую, и семенную оболочки и внедряется в самых различных местах: от хохолка до зародыша.

Вокруг клопиных проколов резко изменяется цвет зерновки (белесые пятна, иногда с черной точкой в месте укула). Со слюной клоп вводит в зерно различные протеолитические и амилазные ферменты, при этом  $\alpha$ -амилаза превращает крахмал в мальтозу, которая затем гидролизруется глюкозидазой в глюкозу; оптимальная температура активности  $\alpha$ -амилазы 30–35 °C (Mehrabadi *et al.*, 2009, 2010). Недавно из зерна пшеницы, поврежденного *Eurygaster integriceps*, выделен и идентифицирован еще один фермент – пролил эндопротеаза (prolyl endoprotease), который относится к отдельному классу сериновых протеаз (Darkoh *et al.*, 2010).

Основными протеолитическими ферментами клопов являются химотрипсин и трипсин, которые гидролизуют белки, оптимальная температура их активности около 30–35 °C (Hosseininaveh *et al.*, 2009). Высокомолекулярные глютеины, по-видимому, более чувствительны к протеолитическим ферментам, чем глиадины (Sivri *et al.*, 1998, 1999).

Обычно изучается влияние клопов только на муку и семолину, между тем огромную ценность представляют также отруби (покровы зерновки), составляющие не менее 15 % от массы зерна (Jerkovic *et al.*, 2010). Отруби богаты растворимыми и нерастворимыми диетическими волокнами и биологически активными компонентами, крайне важными для нормального функционирования кишечника и предупреждения сердечно-сосудистых болезней (Vitaglione *et al.*, 2008).

Против ферментов, вводимых клопами в зерновку, мобилизуются ингибиторы  $\alpha$ -амилазы, химотрипсина, трипсина, в частности, весьма эффективные ингибиторы  $\alpha$ -амилазы обнаружены в семенах тритикале (T-O $\pm$ AI) (Mehrabadi *et al.*, 2010). Однако последствия взаимодействия между этими ферментами клопов и их ингибиторами неизвестны. Судя по данным исследований на трансгенных растениях, экспрессия рекомбинантных ингибиторов протеиназ может сопровождаться самыми неожиданными плейотропными эффектами (Schlüter *et al.*, 2010).

**Борьба с клопами.** У клопов много врагов, представленных разными видами хищников, паразитов и патогенов, которые в природных

условиях накладывают значимый отпечаток на размножение популяций вредителя (Алехин, 2002; Canhilal *et al.*, 2008; Kutuk *et al.*, 2010). Однако этот путь биологического управления численностью клопов еще не получил развития (Алехин, 2002). Пока основным средством их уничтожения являются инсектициды. В середине прошлого века широко применяли опыливание посевов дустом ДДТ (дихлор-дифенил-трихлорэтан) (Гриванов, Захаров, 1958), который оказал огромное отрицательное влияние на окружающую среду, включая водную биоту. В последние годы посевы обрабатывают новыми менее опасными инсектицидами (децис-экстра, кинмикс, кинфос, моспилан, БИ-58 Новый др.) (Каменченко и др., 2010). При этом растут цены как на пестициды, так и на обработку ими посевов, загрязняется окружающая среда.

Как показал опыт трансгенной селекции кукурузы и других культур, использование Bt-протоксинов от *Bacillus thuringiensis* Berl. позволяет вполне успешно защищать растения от некоторых весьма опасных насекомых. Между тем против создания и внедрения на фермерские поля аналогичной трансгенной пшеницы решительно выступает общественность во многих странах, особенно в Европе (Shewry, 2009).

**Подходы традиционной селекции.** В связи с тем что клопы кормятся как на растениях, так и на зерне, предложены два подхода к селекции пшеницы на устойчивость к этим вредителям: 1) генетическая защита растений, т. е. материнского организма и 2) генетическая защита семян в процессе их формирования и созревания.

Первый подход основан на возможности выявления морфологических и физиологических признаков – детерминантов устойчивости к клопам вегетативных частей растений (побеги, листья, колос). Известны сообщения о влиянии на устойчивость к клопам остистости/безостистости колоса, плотности прилегания чешуй к зерну и других признаков (Пайкин, Степаненко, 1958; Сусидко, Федько, 1977). Эти различия обычно наблюдаются в условиях естественного заселения растений на делянках сортов и линий в селекционных посевах, когда клоп имеет «право» выбора.

Как показывают исследования в ИКАРДА (The International Center for Agricultural Research

in the Dry Areas, ICARDA), расположенном на севере Сирии, для выявления сортов и линий, устойчивых к клопам, нужны контролируемые условия, при которых можно равномерно заселить клопами все растения на каждой делянке посева. В результате скрининга генотипов из мировой коллекции в поле в тканевых садках размером (6 × 9 × 3 м), в которые вносят вышедших из зимовки клопов из расчета 6 особей на 1 м<sup>2</sup>, выявлены 1 образец твердой пшеницы и 8 образцов мягкой пшеницы с «хорошим уровнем устойчивости» растений в фазу трубкования (El Bouhssini *et al.*, 2009). Создание сортов с использованием этих образцов должно показать, насколько они ценны для повышения уровня устойчивости растений к клопам, а также насколько при этом типе устойчивости изменяется питательная ценность и безопасность продукции для человека.

В нашей стране большое внимание уделяется второму подходу (генетическая защита семян) как более доступному (Шапиро, Вилкова, 1976; Емельянов, 1992; Кузьменко, 2005). Этот подход основан на многочисленных работах, свидетельствующих о достоверных различиях между сортами по степени снижения качества зерна, поврежденного клопами. При этом о качестве зерна обычно судят на основе общепринятых методов оценки (анализ содержания белка и клейковины, ее реологических свойств и качества конечной продукции (хлеб, спагетти и другие изделия). У неустойчивых сортов уже при повреждении свыше 5 % зерна качество, как правило, снижается достоверно (Karababa, Ozan, 1998; Hariri *et al.*, 2000; Гапонов и др., 2009). Между тем у устойчивых сортов и линий снижение качества начинается при более высоком проценте повреждения. Например, сорта озимой пшеницы: Саратовская 90, Саратовская остистая, Смуглянка; яровой мягкой пшеницы: Саратовская 29, Саратовская 42, Саратовская 62, Саратовская 70, Прохоровка, яровой твердой пшеницы – Людмила, Краснукотка 10, Валентина – в период с 2000 по 2005 гг. при повреждении клопом до 15–20 % зерна показали высокий уровень качества клейковины (Каменченко и др., 2010). Не исключено, что такой высокий уровень устойчивости зерна к повреждению вредителями связан с непрерывным отбором на урожай и высокое качество зерна,

который проводится с 1911 г. в условиях почти ежегодного нашествия на селекционные поля вредных клопов (Марушев, 1968; Мамонтова, 1980; Васильчук, 2001; Кузьменко, 2005).

Высокое качество зерна детерминируется в основном высокомолекулярными глютеинами (Payne *et al.*, 1979; Rakszegi *et al.*, 2008). Поэтому неслучайно отмечается ассоциация устойчивости качества зерна к клопу с определенными субъединицами высокомолекулярных глютеинов (Fatehi *et al.*, 2009; Hossaini *et al.*, 2009). Не исключено, что чем выше уровень «силы» клейковины, тем выше запас прочности у клейковины в случае повреждения клопами.

В детерминации качества зерна определенную роль играет глиадин (Khatkar *et al.*, 2002; Теняева, 2004). Сообщается об отрицательном влиянии источника корма на жизнеспособность и плодовитость фитофага (Шапиро, Вилкова, 1976; Теняева, 2004). Неблагоприятное влияние глиадина на кишечник (индукция энтеропатии) подтверждается экспериментами на молодых крысах (Stepankova *et al.*, 2003). Некоторые сорта мягкой пшеницы, устойчивые к клопам, занимают огромные площади, например, под сортом Саратовская 29 они превышали 21 млн га (Мамонтова, 1980), как эти сорта влияют на состав популяций клопов, не известно.

При этих двух подходах к селекции на устойчивость к вредителям зерна нельзя не учитывать две очень важные особенности пшеницы.

**Аллергия и целиакия.** Пшеница входит в первую восьмерку аллергенов (the «big eight» food allergens), которые провоцируют 90 % реакций пищевой аллергии (Shewry, 2009). Основными проявлениями пшеничной аллергии могут быть астма, анафилаксия, носовая аллергия, крапивница, экзема, атопия, чувствительность к аспирину и пшеничная аллергия, ревматоидные артриты (Inomata, 2009; Morita *et al.*, 2009; Shewry, 2009). Аллергия на пшеничную муку и изделия из нее проявляется у генетически предрасположенных людей с частотой от 1 : 70 до 1 : 200 (Caputo *et al.*, 2010).

Пшеница является также фактором целиакии (celiac disease), которая представляет собой атрофию ворсинок слизистой оболочки тонкой кишки и нарушение всасывания пищи, содержащей в клейковине белки. Хрониче-

скими симптомами целиакии являются боли в кишечнике, диарея, головная боль, замедление роста, остеопороз, бесплодие, лимфома и другие болезни. Встречается она у генетически предрасположенных детей и взрослых не реже, чем аллергия, в большинстве районов мира (Vader *et al.*, 2003; Wieser, Koehler 2008; Camarca *et al.*, 2009; Cummins, Roberts-Thomson, 2009; Vaccino *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2010; Zingone *et al.*, 2010). К сожалению, в доступных публикациях нам не удалось найти информации о частоте встречаемости аллергии и целиакии в нашей стране.

Эффекторами целиакии могут быть субъединицы низко- и высокомолекулярных глютеинов,  $\alpha/\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\omega$ -глиадинов (van Herpen *et al.*, 2006; Stepniak *et al.*, 2008; Van den Broeck *et al.*, 2010). Эти особенности зерна пшеницы нельзя не учитывать в селекции. Не ведет ли отбор на сохранение хороших реологических показателей клейковины и технологических показателей конечной продукции из поврежденного зерна к накоплению генов (аллелей) – детерминантов еще более сильных аллергенов и антипитательных свойств у новых сортов? Не ведет ли повреждение клопами зерна к модификациям в экспрессии эпитопов аллергии и целиакии? Ведь только в клейковине различают около 100 индивидуальных белков (Shewry, 2009). Анализ 36 современных сортов и 50 старых ландрасов свидетельствует о тенденции к возрастанию частоты встречаемости в современных сортах детерминантов целиакии, в частности эпитопа Glia- $\alpha 9$  (Van den Broeck *et al.*, 2010).

### Заключение

Во многих регионах России огромный урон урожаю и качеству зерна пшеницы наносят вредные клопы. Химическая защита от них требует непрерывного возрастания затрат на приобретение и внесение инсектицидов и далеко не безопасна для окружающей среды. При урожайности зерна не выше 1–1,5 т/га не каждый фермер решается использовать пестициды, особенно при низких ценах на товарное зерно. Заманчивы перспективы генетической и биологической защиты растений от клопов, но из-за отсутствия финансирования эти направления не развиваются в должных масштабах.

Селекция сводится в основном лишь к отбору на сохранение хороших реологических показателей клейковины и технологических показателей конечной продукции из поврежденного зерна. Сорта с этим типом устойчивости к клопам отвечают требованиям внутреннего рынка по содержанию клейковины. Однако питательная ценность этого зерна сомнительна. Россия является одним из крупнейших экспортеров пшеницы, и на мировой рынок нужно поставлять зерно, не поврежденное клопами. В селекции на устойчивость к клопам на переднем плане должна быть генетическая защита растений от переживавших клопов. Такие сорта должны стать одним из звеньев интегрированной системы управления численностью клопов, включающей наряду с технологическими и биологическими методами и химические средства. Россия – это страна, где традиционно уровень потребления хлеба высокий. Поэтому весьма актуально изучение содержания в отечественных сортах детерминантов аллергии и целиакии.

### Литература

- Алехин В.Т. Вредная черепашка // Защита и карантин растений. 2002. № 4. С. 3–16.
- Васильчук Н.С. Селекция яровой твердой пшеницы. Саратов, 2001. 123 с.
- Гриванов К.П., Захаров Л.З. Вредители полевых культур. Саратов: Сарат. кн. изд-во, 1958. 236 с.
- Гапонов С.Н., Васильчук Н.С., Шутарева Г.И. Влияние вредной черепашки (*Eurygaster integriceps* Puton.) на качество зерна твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) // Аграрный вестн. Юго-Востока. 2009. № 2. С. 23–26.
- Емельянов Н.А. Экологические основы регуляции численности и вредоносности вредной черепашки в Юго-Восточном регионе Европейской части страны: Автореф. дис. ... д-ра с-х. наук. СПб, 1992. 45 с.
- Каменченко С.Е., Лебедев В.Б., Наумова Т.В. Вредоносность клопа вредная черепашка (*Eurygaster integriceps*) // Аграрный вестн. Юго-Востока. 2010. № 1(4). С. 36–37.
- Козьмина Н.П. Биохимия зерна и продуктов его переработки. М.: Колос, 1976. 375 с.
- Кретович В.Л., Токарев Р.Р. Биохимические изменения в зерне пшеницы, поврежденной клопом черепашкой // Биохимия. 1938. Т. 3. Вып. 3. С. 387–396.
- Кузьменко А.И. Саратовские сорта яровой мягкой пшеницы (практическая селекция). Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2005. 300 с.
- Мамонтова В.Н. Селекция и семеноводство яровой пшеницы. М.: Колос, 1980. 287 с.
- Марушев А.И. Качество зерна пшениц Поволжья. Саратов: Приволж. кн. изд-во, 1968. 212 с.
- Пайкин Д.М., Степаненко Л.Е. Об устойчивости сортов пшениц к вредной черепашке // Бюл. науч.-техн. информ. по защите растений. ВИЗР. 1958. № 2. С. 3–6.
- Сусидко П.И., Федько И.А. Устойчивость озимой пшеницы к вредной черепашке // Защита растений. 1977. № 1. С. 23–24.
- Теняева О.Л. Глиадиновый комплекс зерна озимой пшеницы, устойчивой к вредной черепашке (*Eurygaster integriceps* Put.): Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Саратов, 2004.
- Шапиро И.Д., Вилкова Н.А. Значение пищевого фактора в проблеме вредной черепашки (*Eurygaster integriceps* Put.) // Тр. ВИЗР. Вопросы экологии вредных насекомых. Л., 1976. Вып. 48. С. 14–29.
- Aja S., Perez G., Rosell C.M. Wheat damage by *Aelia* spp. and *Eurygaster* spp.: effects on gluten and water-soluble compounds released by gluten hydrolysis // J. Cereal Sci. 2004. V. 39. P. 187–193.
- Atchison J., Head L., Gates A. Wheat as food, wheat as industrial substance; comparative geographies of transformation and mobility // Geoforum. 2010. V. 41. P. 236–246.
- Camarca A., Anderson R.P., Mamone G. *et al.* Intestinal T cell responses to gluten peptides are largely heterogeneous: implications for a peptide-based therapy in celiac disease // J. Immunol. 2009. V. 182. P. 4158–4166.
- Canhailal R., Reid W., Kutuk H., El-Bouhssini M. Susceptibility of sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae), to various entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) (PDF) // J. Agric. Urban Entom. 2008. V. 24. P. 19–26.
- Caputo I., Lepretti M., Martucciello S., Esposito C. Enzymatic strategies to detoxify gluten: implications for celiac disease // Enzyme Res. V. 2010. Article ID 174354, 9 pages, 2010. doi:10.4061/2010/174354.
- Cummins A.G., Roberts-Thomson I.C. Prevalence of celiac disease in the Asia-Pacific region // J. Gastroen. Hepatol. 2009. V. 24. P. 1347–1351.
- Darkoh C., El-Bouhssini M., Baum M., Clack B. Characterization of a prolyl endoprotease from *Eurygaster integriceps* Puton (Sunn pest) infested wheat // Arch. Insect. Biochem. Physiol. 2010. V. 74. P. 163–178.
- El Bouhssini M., Street K., Joubi A. *et al.* Sources of wheat resistance to Sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton, in Syria // Genet. Resources and Crop Evol. 2009. V. 56. P. 1065–1069.
- Fatehi F., Behamta M.R., Zali A.A. Evaluating the resistance to sunn pest (*Eurygaster integriceps* Put.)



- and its relationship with high-molecular-weight glutenin subunit in wheat // *Asian J. Plant Sci.* 2009. V. 8. P. 82–85.
- Hariri G., Williams P.C., El-Harameinc F.J. Influence of pentatomid insects on the physical dough properties and two-layered flat bread baking quality of syrian wheat // *J. Cereal Sci.* 2000. V. 31. P. 111–118.
- Hossaini S.F., Haghparast R., Bahrami N., Haghi Y. Study of genetic variation of resistance to sunn pest using SPT index // *Asian J. Plant Sci.* 2009. V. 8. P. 380–384.
- Hosseininaveh V., Bandani A., Hosseininaveh F. Digestive proteolytic activity in the Sunn pest, *Eurygaster integriceps* // *J. Insect. Sci.* 2009. V. 9. P. 70–78.
- Inomata N. Wheat allergy // *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2009. V. 9. P. 238–244.
- Iranipour S., Pakdel A.K., Radjabi G. Life history parameters of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps*, held at four constant temperatures // *J. Insect. Sci.* 2010. V. 10. P. 106.
- Jerkovic A., Kriegel A.M., Bradner J.R. *et al.* Strategic distribution of protective proteins within bran layers of wheat protects the nutrient-rich endosperm // *Plant Physiol.* 2010. V. 152. P. 1459–1470.
- Karababa E., Ozan A.N. Effect of wheat bug (*Eurygaster integriceps*) damage on quality of a wheat variety grown in Turkey // *J. Sci. Food Agric.* 1998. V. 77. P. 399–403.
- Khatkar B.S., Fido R.J., Tatham A.S., Schofield J.D. Functional properties of wheat gliadins. I. Effects on mixing characteristics and bread making quality // *J. Cereal Sci.* 2002. V. 35. P. 299–306.
- Kinaci E., Kinaci G., Yildirim A.F., Atli A. Sunn pest problems in Central Anatolia and the role of wheat varieties in integrated control // *Euphytica.* 1998. V. 100. P. 63–67.
- Kinaci E., Kinaci G. Genotypic variations in yield and quality of wheat damaged by sunn pest (*Eurygaster spp.*) // *Pak. J. Bot.* 2007. V. 39. P. 397–403.
- Kretovich V.L. Biochemistry of the damage to grain by wheat bug // *Cereal Chem.* 1944. V. 21. P. 1–16.
- Kutuk H., Canhilal R., Islamoglu M. *et al.* Predicting the number of nymphal instars plus new-generation adults of the Sunn pest from overwintered adult densities and parasitism rates // *J. Pest Sci.* 2010. V. 83. P. 21–25.
- Mehrabadi M., Bandani A.R. Study on salivary glands  $\alpha$ -amylase in wheat bug *Eurygaster maura* (Hemiptera: Scutelleridae) // *Am. J. Appl. Sci.* 2009. V. 6. P. 555–560.
- Mehrabadi M., Bandani A.R., Saadati F. Inhibition of Sunn pest, *Eurygaster integriceps*,  $\alpha$ -amylases by  $\alpha$ -amylase inhibitors (T- $\alpha$ AI) from Triticale // *J. Insect. Sci.* 2010. V. 10. P. 179.
- Mehrabadi M., Bandani A.R., Saadati F., Ravan S. Sunn pest, *Eurygaster integriceps* Putton (Hemiptera: Scutelleridae), digestive  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and  $\beta$ -glucosidase // *J. Asia Pacific Entomol.* 2009. V. 12. P. 79–83.
- Morita E., Matsuo H., Chinuki Y. *et al.* Food-dependent exercise-induced anaphylaxis -importance of omega-5 gliadin and HMW-glutenin as causative antigens for wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis // *Allergol. Int.* 2009. V. 58. P. 493–498.
- Okarter N., Liu C.-S., Sorrells M.E., Liu R.H. Phytochemical content and antioxidant activity of six diverse varieties of whole wheat // *Food Chem.* 2010. V. 119. P. 249–257.
- Olanca B., Sivri D., Koksel H. Effects of suni-bug (*Eurygaster spp.*) damage on size distribution of durum wheat (*Triticum durum* L.) proteins // *Eur. Food Res. Techn.* 2009. V. 229. P. 813–820.
- Ozderen T., Olanca B., Sanal T. *et al.* Effects of suni-bug (*Eurygaster spp.*) damage on semolina properties and spaghetti quality characteristics of durum wheats (*Triticum durum* L.) // *J. Cereal Sci.* 2008. V. 48. P. 464–470.
- Parker B.L., Amir-Maafi M., Skinner M. *et al.* Distribution of Sunn Pest, *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae), in overwintering sites // *J. Asia-Pacific Entom.* 2011. V. 14. P. 83–88.
- Payne P.I., Corfield K.G., Blackman J.A. Identification of a high molecular weight subunit of glutenin whose presence correlates with breadmaking quality in wheats of related pedigree // *Theor. Appl. Genet.* 1979. V. 55. P. 153–159.
- Rakszegi M., Pastori G., Jones H.D. *et al.* Technological quality of field-grown transgenic lines of commercial wheat cultivars expressing the 1Ax1 HMW glutenin subunit gene // *J. Cereal Sci.* 2008. V. 47. P. 310–321.
- Rosell C.M., Aja S., Bean S., Lookhart G. Effect of *Aelia spp.* and *Eurygaster spp.* damage on wheat proteins // *Cereal Chem.* 2002. V. 79. P. 801–805.
- Rubio-Tapia A., Kyle R.A., Kaplan E.L. *et al.* Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease // *Gastroenterology.* 2009. V. 137. P. 88–93.
- Salis L., Goula M., Valero J., Gordun E. Prolamin proteins alteration in durum wheat by species of the genus *Eurygaster* and *Aelia* (Insecta, Hemiptera) // *Spanish J. Agr. Res.* 2010. V. 8. P. 82–90.
- Shewry P.R. Wheat // *J. Exp. Bot.* 2009. V. 60. P. 1537–1553.
- Sivri D., Koksel H., Bushuk W. Effect of wheat bug (*Eurygaster maura*) proteolytic enzymes on electrophoretic properties of gluten proteins // *N.Z. J. Crop Hort. Sci.* 1998. V. 26. P. 117–125.
- Sivri D., Sapirstein H.D., Koksel H., Bushuk W. Effects of wheat bug (*Eurygaster maura*) protease on glutenin proteins // *Cereal Chem.* 1999. V. 76. P. 816–820.
- Schlüter U., Benchabane M., Munger A. *et al.* Recombinant protease inhibitors for herbivore pest control:

- a multitrophic perspective // J. Exp. Bot. 2010. V. 61. P. 4169–4183.
- Stepankova R., Kofronová O., Tucková L. *et al.* Experimentally induced gluten enteropathy and protective effect of epidermal growth factor in artificially fed neonatal rats // J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2003. V. 36. P. 96–104.
- Stepniak D., Wiesner M., Ru A.H. *et al.* Large-scale characterization of natural ligands explains the unique gluten-binding properties of HLA-DQ2 // J. Immunol. 2008. V. 180. P. 3268–3278.
- Vaccino P., Becker H.A., Brandolini A. *et al.* A catalogue of *Triticum monococcum* genes encoding toxic and immunogenic peptides for celiac disease patients // Mol. Gen. Genom. 2009. V. 281. P. 289–300.
- Vader L.W., Stepniak D.T., Bunnik E.M. *et al.* Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains // Gastroenterology. 2003. V. 125. P. 1105–1113.
- van den Broeck H.C., de Jong H.C., Salentijn E.M. *et al.* Presence of celiac disease epitopes in modern and old hexaploid wheat varieties: wheat breeding may have contributed to increased prevalence of celiac disease // Theor. Appl. Genet. 2010. V. 121. P. 1527–1539.
- van Herpen T.W.J.M., Goryunova S.V., van der Schoot J. *et al.* Alpha-gliadin genes from the A, B, and D genomes of wheat contain different sets of celiac disease epitopes // BMC Genomics. 2006. V. 7. P. 1–13.
- Vitaglione P., Napolitano A., Fogliano V. Cereal dietary fibre: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut // Trends in Food Sci. Techn. 2008. V. 19. P. 451–463.
- Xie Z., Wang C., Wang K. *et al.* Molecular characterization of the celiac disease epitope domains in  $\alpha$ -gliadin genes in *Aegilops tauschii* and hexaploid wheats (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 2010. V. 121. P. 1239–1251.
- Wieser H., Koehler P. The biochemical basis of celiac disease // Cereal Chem. 2008. V. 85. P. 1–13.
- Zibae A., Bandani A.R., Malagoli D. Purification and characterization of phenoloxidase from the hemocytes of *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae) // Compar. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. and Mol. Biol. 2011. V. 158. P. 117–123.
- Zingone F., Capone P., Ciacci C. Celiac disease: Alternatives to a gluten free diet // World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther. 2010. 1(1). P. 36–39. Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/2150-5349/full/v1/i1/36.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.4292/wjgpt.v1.i1.36>.

## WHEAT BREEDING FOR RESISTANCE TO SUNN PEST (EURYGASTER SPP.): IS THERE ANY RISK?

V.A. Krupnov

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

### Summary

Wheat is among the most valuable daily foodstuff items. However, it induces allergy or celiac disease in approximately one of hundred persons. most often, in children. In many regions, harmful sunn bugs considerably reduce crop yield and grain quality. Climate warming provides favorable conditions for expansion of the geographic range of these bugs and enhances their harmfulness. There are two major approaches to tackle this problem: genetic protection of plants, the maternal organisms, and genetic protection of seeds, the progeny. The former approach appears to be less risky for human health. Wheat requires such protection against sunn bugs that would impair neither gluten rheology nor the nutritional value of grain. The basic way is the development of an integrated system for controlling bugs that would include, in addition to technological, biological, and chemical methods, genetic protection. Taken together, these components would allow growing environmentally safe wheat. It is also relevant to develop wheat cultivars with reduced contents of allergy and celiac disease determinants.

**Key words:** sunn pest, plant resistance, seed resistance, yield loss, grain quality deterioration, allergy, celiac disease.

## ГЕНОМ *DROSOPHILA MELANOGASTER*: СВЯЗЬ СОСТОЯНИЯ ХРОМАТИНА С РЕГУЛЯЦИЕЙ СПЛАЙСИНГА И ТРАНСКРИПЦИИ

В.Н. Бабенко<sup>1</sup>, В.Ф. Матвиенко<sup>2</sup>, И.А. Зыков<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup> Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования  
Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Учреждение Российской академии наук Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

При анализе хроматиновых модификаций был определен ряд свойств хроматина, присущего районам экзонов. Выявлена чрезвычайная изменчивость распределения модификаций гистонов в районах экзонов в зависимости от типа клеток. Был проведен анализ связи интенсивности альтернативного сплайсинга с определенным типом хроматина и идентифицированы его наиболее характерные типы. В качестве иллюстрации проведен анализ распределения хроматиновых меток в гене *DScam*, имеющем чрезвычайно большое количество транскриптов, оцененное в 38 тыс. Сделан вывод, что ген *DScam* комплексно регулируется состоянием хроматина на уровне как доменов, так и экзонов.

**Ключевые слова:** *Drosophila melanogaster*, геном, регуляция генов, экзон, интрон, альтернативный сплайсинг, транскрипция, хроматин, изменчивость.

### Введение

#### Организация хроматина

Новые технологии геномного картирования существенно изменили взгляд на организацию хроматина у высших эукариот. Возникает представление, что мультигенные хроматиновые домены – скорее правило, чем исключение. Понимание организации хроматиновых доменов важно не только для фундаментального изучения регуляции генов, но также и для выяснения этиологии различных болезней. Например, рак часто сопровождается хромосомными транслокациями, которые разрушают хроматиновые домены. Как следствие, нарушается активность не только генов, затронутых транслокацией, но и соседних генов. Соответственно, вероятность последствий определенных хромосомных транслокаций может быть определена близостью вовлеченных локусов в ядре.

Детальная карта хроматиновых доменов может быть полезна для практического ис-

пользования в технологии контролируемой экспрессии трансгенов, например, в генной терапии. Экспрессия трансгенов может сильно меняться в зависимости от сайта встраивания. Хроматиновые домены – одна из наиболее вероятных причин (Babenko *et al.*, 2010). Селекция интеграции трансгенов в хроматиновые домены с предпочтительным временным или пространственным паттерном может помочь обеспечить оптимальную экспрессию трансгена.

Помимо протяженных мультигенных хроматиновых районов, упомянутых выше, существует также градация более мелкого масштаба. В частности, в данной работе будет показано, что такие небольшие по длине элементы генома, как экзоны, могут обладать состоянием хроматина, отличным от их окружения.

#### Позиционирование нуклеосом на экзонах

В 2009 г. рядом авторов был выявлен факт высокого сродства нуклеосом к районам экзонов (Andersson *et al.*, 2009; Nahkuri *et al.*, 2009;

Schwartz *et al.*, 2009; Spies *et al.*, 2009; Tilgner *et al.*, 2009). Этот факт был неожиданным, поскольку считалось, что АТ-богатые районы, т. е. районы интронов, имеют большее сродство к нуклеосомам. Выяснилось, что данное свойство (сродство нуклеосом к экзонам, ведущее к относительно стабильному их позиционированию) присуще организмам с длинными интронами, у которых происходит «экзонное» определение границ сплайсинга (exon definition; Berget, 1995), где инициация сплайсинга начинается с определения границ экзона, а не интрона. Суть данного процесса заключается в том, что маркируются границы экзонов с помощью U2 и U1 малых ядерных РНК, которые связываются между собой через экзон на преинициационном комплексе сплайсосомы, и лишь позже происходит замена связи на традиционную – через интрон (Schneider *et al.*, 2010).

Факт позиционирования нуклеосомы в районе экзона является чрезвычайно важным для сплайсинга и объясняет, каким образом происходит узнавание короткого (100–150 п.н.) экзона среди длинных, до 100–200 т.п.н., интронов. Имеются факты, подтверждающие, что «экзонные» нуклеосомы имеют специфическую модификацию гистонов (Huff *et al.*, 2010). В нашей работе мы выявили гистонные модификации, характерные для экзонов в геноме *Drosophila melanogaster*.

#### **Модификации гистонов и состояния хроматина**

Консорциум modENCODE, созданный в 2007 г. и работающий над аннотированием функциональных элементов ДНК в модельных организмах (Celniker *et al.*, 2009), подвел итоги в недавней публикации (The modENCODE Consortium, 2010). В частности, в процессе анализа полногеномного распределения сочетаний 18 гистоновых модификаций у *D. melanogaster* были выявлены 30 устойчивых состояний хроматина с наибольшим известным на сегодняшний день разрешением (до 200 п.н.) и 9 состояний хроматина для более крупного масштаба (до 1 т.п.н.) (The modENCODE Consortium, 2010). Каждое состояние хроматина характеризуется определенным поднабором гистонных модификаций, который был уточнен методом

главных компонент. Были рассмотрены мужская линия клеток эмбриональной стадии S2, а также мужская линия клеток ЦНС личиночной стадии BG3. Индекс состояния хроматина начинался с активного эухроматина (1) и кончался закрытым гетерохроматином (30 или 9, в зависимости от разрешения).

Аналогичную работу выполнили авторы из Голландии (Fillion *et al.*, 2010), но для определения состояний хроматина они взяли наряду с четырьмя модификациями гистона H3 сайты обогащения 49 хроматиновыми белковыми факторами, полученные в независимом эксперименте и другим методом, нежели в консорциуме modENCODE. Было выявлено 5 устойчивых состояний хроматина, обозначенных цветами (желтый, красный, зеленый, синий, черный). Красный и желтый хроматин соответствовал открытому хроматину (эухроматин), синий (PcG-type), зеленый (HP1-type) и черный (SUUR-type) – закрытому эухроматину. Районы отдельных типов хроматина не перекрывались и охватывали 99,8 % генома *D. melanogaster*. Была рассмотрена только одна клеточная линия – Kc167.

В целом обе работы хорошо соответствуют друг другу, в частности, закрытый и открытый эухроматин в обоих случаях определяется раздельными, т. е. неперекрывающимися, состояниями хроматина. Имеются также различия, заключающиеся, прежде всего, в разном количестве состояний хроматина из-за различного разрешения методов и наборов выбранных факторов.

#### **Механизмы взаимодействия хроматина и сплайсинга**

Сплайсинг – процесс вырезания белок-кодирующих районов РНК (интронов). Он обеспечивается сложным каскадом каталитических реакций при помощи сплайсосомы. Процесс сплайсинга, в результате которого структура зрелых мРНК различается по составу экзонов, называется альтернативным сплайсингом.

Кроме сплайсинга существуют другие процессы альтернативной транскрипции, вносящие вклад в генерацию вариантов мРНК. Известно, что тканеспецифическая экспрессия гена в значительной мере осуществляется выбором старта транскрипции (Shabalina *et al.*, 2010). В частности, наиболее частый тип вариации



транскриптов (более 50 % всей вариации) у *D. melanogaster* – это альтернативный старт транскрипции, за ним следует альтернативный сайт терминации транскрипции, затем – пропуск экзона (Lee *et al.*, 2004).

После обнаружения рядом авторов связи скорости транскрипции и паттерна сплайсинга, а также присутствия факторов сплайсинга на С-терминальном домене РНК-полимеразы II в процессе транскрипции (Alexander, Beggs, 2010), стало очевидно, что регуляция сплайсинга осуществляется котранскрипционно.

Намек на прямую роль модификаций гистонов в регуляции альтернативного сплайсинга возникает из сравнительного картирования набора гистоновых модификаций вдоль нескольких генов, у которых альтернативный сплайсинг зависит от белкового фактора сплайсинга, связывающегося с полипиримидиновым трактом в интроне (polypyrimidine tract binding protein, PTB). Исследователи обнаружили сильную корреляцию между несколькими модификациями гистонов в альтернативно сплайсирующихся районах и результатом сплайсинга (Luso *et al.*, 2010). Оказалось, что PTB-зависимые гены были обогащены H3K36me3 и обеднены H3K4me3 в районах альтернативных экзонов. Экспериментальное изменение состава этих гистоновых маркеров было достаточно для переключения паттерна сплайсинга экзонов PTB-зависимых генов. В данном случае H3K36me3 выступает в качестве платформы для привлечения белка PTB на пре-мРНК. Это происходит с помощью адаптерного белка MRG15, специфично связывающегося с H3K36me3. Таким образом, H3K36me3, MRG15, PTB образуют адаптерную систему хроматин–сплайсинг.

Другим примером является человеческий ген *cyclin D1*. Хроматин-адаптерный белок CHD1 содержит хромодомен, специфично узнающий H3K4me3, которым обогащен *cyclin D1*. С другой стороны, CHD1 связывается с компонентами комплекса U2 мРНК, но не с U1 мРНК (Sims *et al.*, 2007). Уменьшение концентрации H3K4me3 или CHD1 изменяет эффективность сплайсинга пре-мРНК гена и уменьшает связь комплексов SF3a и U2 мРНК с пре-мРНК.

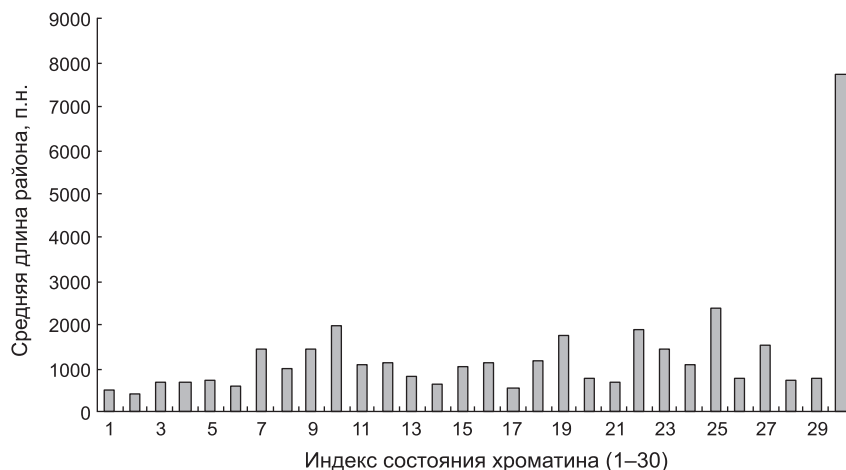
Масс-спектрометрический анализ белков, связывающихся с H3K9me3, выявил хроматин-ассоциированный белок HP1 и факторы сплай-

синга Srp20 и ASF/SF2. Chip-эксперименты подтвердили, что HP1 связывается с ASF/SF2 в клетках человека (Loomis *et al.*, 2009), а в клетках мухи HP1 связывается с hnRNP-комплексами (Piacentini *et al.*, 2009). Эти результаты указывают на возможную роль H3K9me3 в регуляции или привлечении факторов сплайсинга, опосредованных хроматин-адаптерным белком HP1, хотя функциональная связь пока не ясна. Наконец, возможны другие комбинации взаимодействующих модификаций гистонов и хроматин-связывающих белков и факторов сплайсинга.

### Материалы и методы

Для анализа использовался геном *D. melanogaster* по аннотации версии 5.12 (www.flybase.org). В качестве альтернативных генов были отобраны локусы, содержащие транскрипты с пропуском (альтернативностью) экзона. Выборка альтернативно сплайсирующихся генов была скомпилирована на основе анализа транскриптов в каждом локусе и идентификации альтернативных экзонов. Было идентифицировано 4938 генов с альтернативным экзоном. Данные о состояниях хроматина были взяты из работ (The modENCODE Consortium, 2010). Общая выборка насчитывала 64210 экзонов из 21024 транскриптов (flybase v.5.12).

При анализе колокализации разных наборов состояний хроматина с экзонами экзон считался перекрытым определенным хроматином *i*, если он имел хотя бы 1 общий нуклеотид. Мы оценили частоту случаев перекрытия экзонов более чем одним типом хроматина. Обнаружено, что случаи перекрытия экзона одновременно тремя хроматинами для линии клеток S2 при максимальной 30-компонентной сегрегации хроматина (The modENCODE Consortium, 2010) практически не наблюдаются (34 случая из 64210 экзонов, < 0,063 %). Двумя хроматинами экзон перекрывается примерно в 20 % случаев (14429 из 64210 экзонов для Flybase 5.12). Для линии BG3 распределение одновременных перекрытий было аналогично. Таким образом, число различных состояний экзонных реализаций с учетом покрытия экзона одновременно несколькими хроматинами было 72639 в линии S2, и 71824 состояний – в линии BG3.



**Рис. 1.** Средняя длина районов состояния хроматина, определенных по 30 градациям (The modENCODE Consortium, 2010).

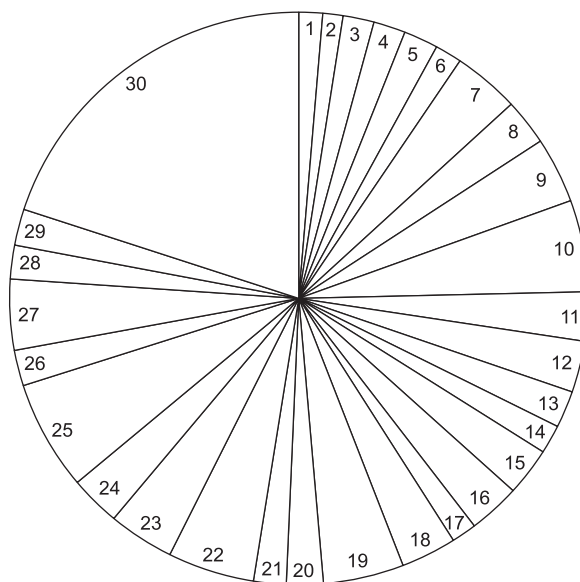
Основанием для такого критерия перекрытия (хотя бы один общий нуклеотид, см. выше) было распределение длин районов хроматина (рис. 1). Средняя длина районов, соответствующая различным типам хроматина, не превышает трех т.п.н., за исключением закрытого эухроматина (хром. 30). Мы не рассматривали районы более 13 т.п.н., которых было менее 1 % в максимальном случае (хром. 25).

Исходя из распределения длин районов на рис. 1, 2 сравнивались между собой только состояния 1–29. Исключительную по длине категорию 30 мы включали только для иллюстративности.

## Результаты

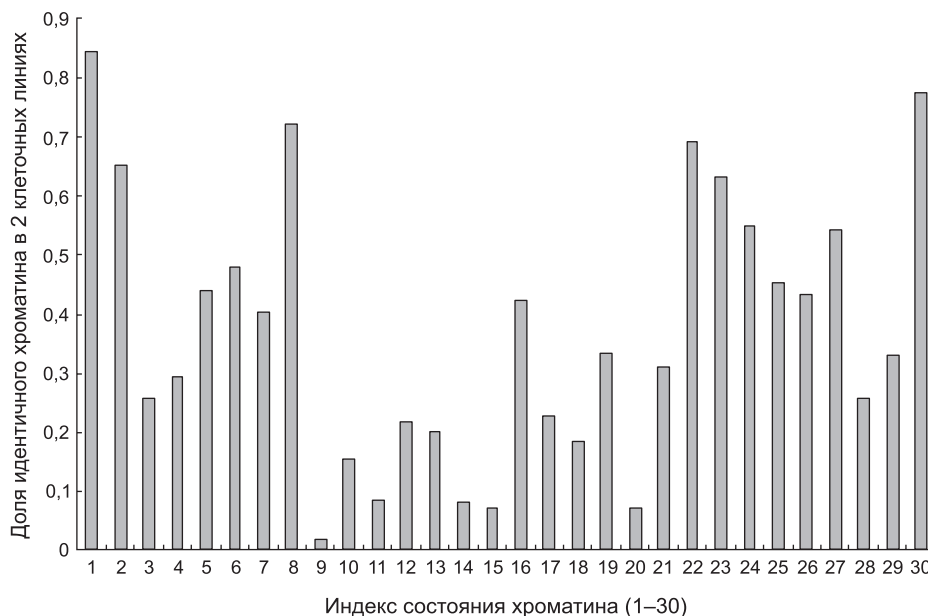
### Тканеспецифичная вариабельность гистоновых модификаций в районах генов (экзонов)

Были исследованы две клеточные линии S2 и BG3, использованные в работе консорциума (The modENCODE Consortium, 2010) для того, чтобы оценить вариабельность распределения состояний хроматина в генах. При анализе выяснилось, что распределения хроматина на одних и тех же экзонах отличаются между клеточными линиями BG3 и S2 примерно в 50 % случаев (34111 из 74210 случаев реализации экзона в транскрипте (таблица flybasegene, Fujita *et al.*, 2010)) при классификации 30 состояний. При анализе 9-компонентного хроматина



**Рис. 2.** Относительная доля каждого из состояний в геноме *D. melanogaster*.

различие линий было меньше – около 20 % (14760 из 67315). При анализе распределения изменений в зависимости от типа хроматина при сравнении двух клеточных линий S2 и BG3 (рис. 3) обнаружено, что при консервативности крайних случаев хроматина (выраженный эухроматин 1 и конститутивный гетерохроматин 30 в случае 30 компонентов) определенные состояния хроматина меняются очень значительно (рис. 3). Так как общая длина хроматина не дает полную картину транзиту типов хроматина от одной линии к другой, мы приводим таблицу (Приложение см. на сайте [www.bionet.nsc.ru/vogis/pict\\_](http://www.bionet.nsc.ru/vogis/pict_)



**Рис. 3.** Частота сохранения состояния хроматина при сравнении двух клеточных линий S2 и BG3 на экзонах при рассмотрении 30-компонентного хроматина.

pdf/2011/15\_3/16\_S1.pdf) для более подробного рассмотрения.

#### Тканеспецифичные сайты старта и терминации транскрипции

Мы решили выяснить, как модификации гистонов в районах сайтов стартов и терминации транскрипции варьируют в зависимости от клеточных линий. Для этого мы сравнили распределение числа стартов транскрипции по состояниям хроматина для двух клеточных линий BG3 и S2 (рис. 4, а, б). Видно более консервативное состояние хроматина сайтов терминации транскриптов в линии BG (большинство сайтов находятся в состояниях 1–8, 30). Состояние хроматина оценивалось для всех доступных транскриптов в базе данных Flybase 5.12. Состояние хроматина 30 соответствует гетерохроматину, занимающему 25 % генома (см. Материалы и методы), и потому избыточному в обоих случаях (а) и (б).

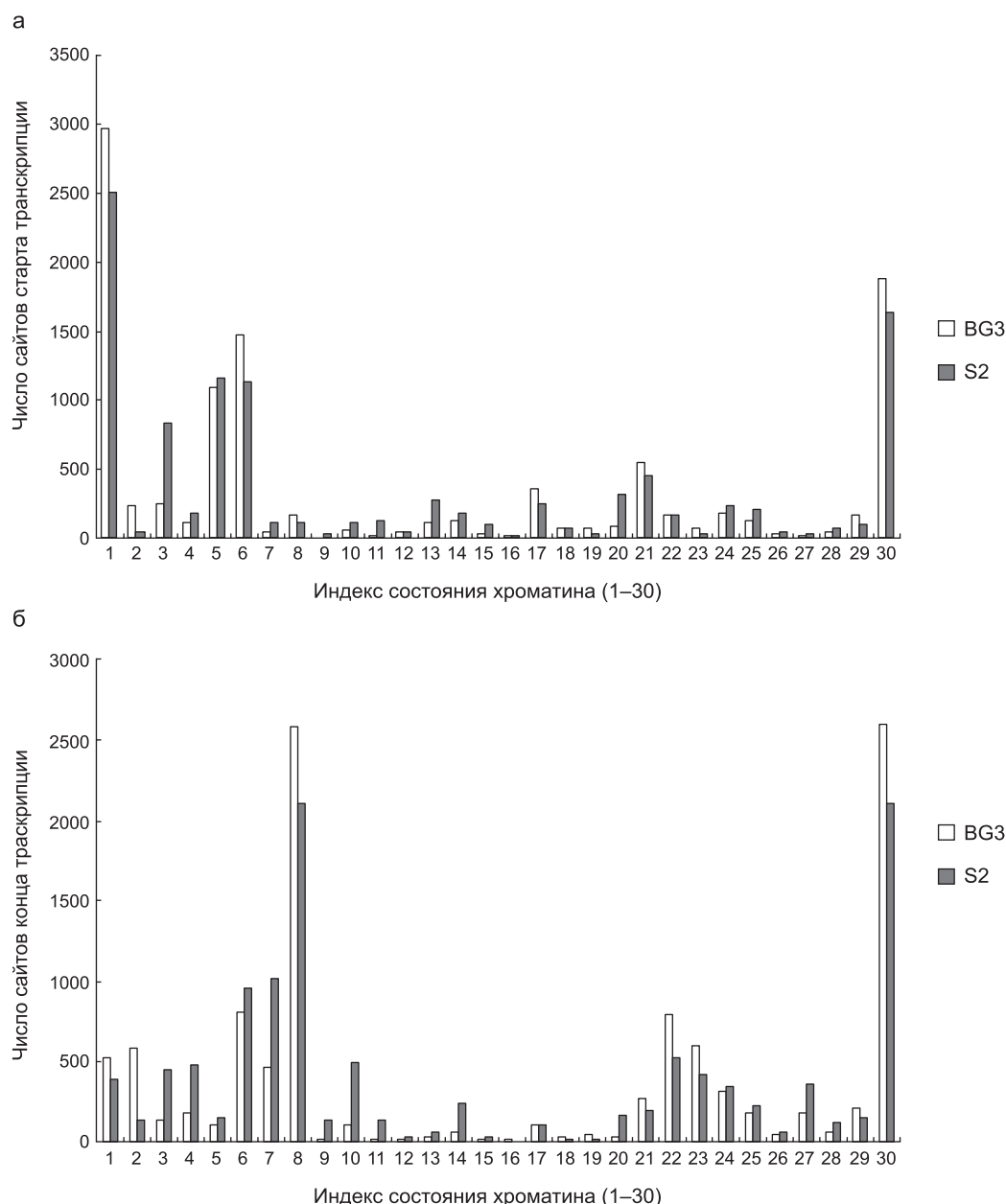
Можно также утверждать, что основным хроматиновым состоянием, в котором начинается транскрипция, является тип хроматина 1, соответствующий конститутивному эухроматину и находящийся в таком состоянии вне зависимости от времени и типа клеток. Это соответствует выводам предыдущей работы (The

modENCODE Consortium, 2010). Значительное число стартов транскрипции также расположены в хроматине 3, 5, 6, число которых, как видно из рис. 4, а, значительно варьирует в зависимости от типа клеток. Можно говорить, что обеспечение доступа к этим стартам зависит от типа ткани (Morillon *et al.*, 2003; Patraquim *et al.*, 2011).

Сайты терминации транскрипции в основном расположены в хроматине 8 (рис. 4, б) вне зависимости от типа клеток. Кроме хроматина 8, можно также отметить состояния 6, 7, 22 (рис. 4, б), в которых расположены сайты терминации транскрипции, но в гораздо меньшей мере. Стоит отметить, что состояния хроматина, характерные для сайта полиаденилирования и содержащие аналогичные метки, были найдены также у человека (Spies *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2011; Khaladkar *et al.*, 2011).

#### Идентификация хроматина, специфичного для экзонов

Одна из поставленных задач состояла в том, чтобы убедиться, насколько состояние хроматина может быть специфично для экзонов. С помощью пересечения районов состояний хроматинов с экзонами и последующей нормализацией на длину, занимаемую специфическим



**Рис. 4.** Число сайтов старта (а) и терминации (б) транскрипции в зависимости от состояния хроматина и клеточной линии (BG3, S2).

хроматином, мы оценили плотность экзонов в каждом из видов хроматина (рис. 5).

При аннотации выяснилось, что большинство экзонов лежит в открытом хроматине. Заметим, что состояния хроматина, представленные на рис. 5, можно смело назвать экзон-специфичными, поскольку плотность экзонов варьирует от 15 до 65 %. Средняя длина экзона в геноме *D. melanogaster* равна 160 п.н., таким образом, имеет место прямая связь типа хроматина с наличием в районе экзона. Поясняя

феномен экзонного хроматина, стоит заметить, что размер одного района любого (кроме 30) состояния хроматина, равный 2–3 т.п.н. (рис. 1), приблизительно соответствует одному экзону в генах средней длины (> 3 т.п.н.), таким образом, термин «плотность экзонов» более отражает метод его (хроматина) определения, а не физический феномен. Для того чтобы исключить из рассмотрения короткие (в том числе мульти-экзонные) гены, которые могут быть покрыты целиком одним хроматином, и, таким образом,



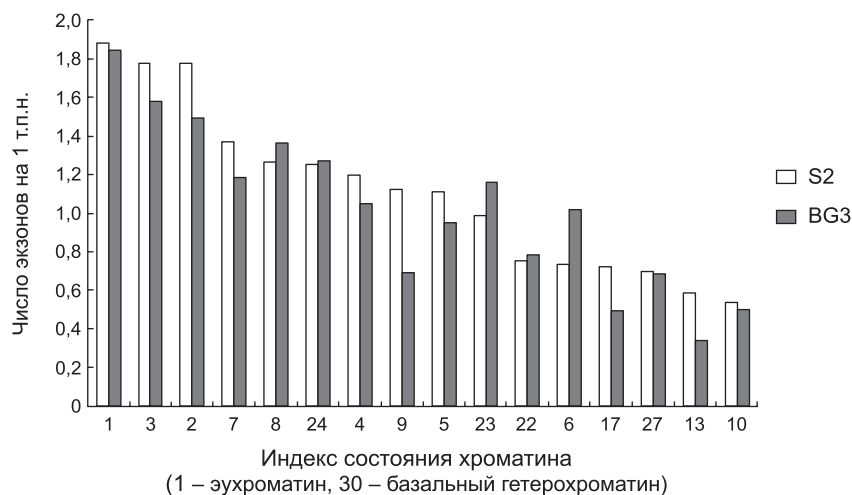


Рис. 5. Распределение плотности экзонов в зависимости от типа хроматина.

Приведены только типы хроматинов, имеющие плотность экзонов больше 0,5 на 1 т.п.н. (см. Приложение 1). Общее количество экзонов 64210. Индексы хроматина упорядочены по убыванию плотности экзонов.

искажить специфичность хроматина в экзонах, мы ограничили рассмотрение типов хроматина с плотностью экзонов не менее 0,5 экзона на 1 т.п.н. (рис. 5), что подразумевает наличие в среднем одного экзона в одном районе хроматина.

#### Связь альтернативно сплайсирующихся генов со специфичными типами хроматина (класс генов с возможным хроматин-зависимым сплайсингом)

Геном *D. melanogaster* был просканирован для выявления генов, которые альтернативно сплайсируются и имеют в своем составе экзоны со специфическим хроматином. В результате нами было выявлено 4938 генов с альтернативным сплайсингом (пропуском экзона; см. Материалы и методы). В табл. 1 приведены наиболее часто встречающиеся хроматины экзонов в этих генах.

Большинство генов с альтернативным пропуском экзона содержат хроматин-специфичные интронные энхансеры сплайсинга (табл. 1), что в целом соответствует недавно проведенному исследованию, выявившему энхансеры в интронах как основные сигналы тканеспецифичной экспрессии вариантов мРНК (Barash *et al.*, 2010). При этом стоит подчеркнуть, что экзонные хроматины, которые не были исследованы в упомянутой работе Barash

с соавт. (2010), по всей видимости, играют существенную роль в альтернативном сплайсинге (Pray-Grant *et al.*, 2005; Gunderson, Johnson, 2009; Li, Shogren-Knaak, 2009; Piacentini *et al.*, 2009; Luco *et al.*, 2010).

#### Ген *DScam* и хроматин

Мы решили более подробно остановиться на возможном влиянии хроматина на альтернативный сплайсинг путем анализа гена *DScam* в линии S2.

Было рассмотрено, какие именно типы хроматинов из 30 возможных (The modENCODE Consortium, 2010) содержит ген *DScam* в линии клеток S2. В результате рассмотрения обнаружилось (рис. 6), что кассетные кластеры экзонов 4 и 6 (Graveley, 2008) принадлежат типу хроматина 19, при этом эти два кластера разделены конститутивным экзоном 5, принадлежащим к типу хроматина 10. Кластер кассетных экзонов 9 принадлежит к типу хроматина 9 (Приложение 3). Отличительная черта кластера экзонов 9 – в нем встречаются также хроматины 10, 28 и 29 в отдельных экзонах (рис. 6), что говорит о гетерогенности кластера экзонов 9 в отличие от экзонов 4 и 6.

Одной из основных характеристик экзонного хроматина является модификация H3K36me3 (The modENCODE Consortium, 2010; Приложение 2), хотя есть хроматины и из интронной груп-

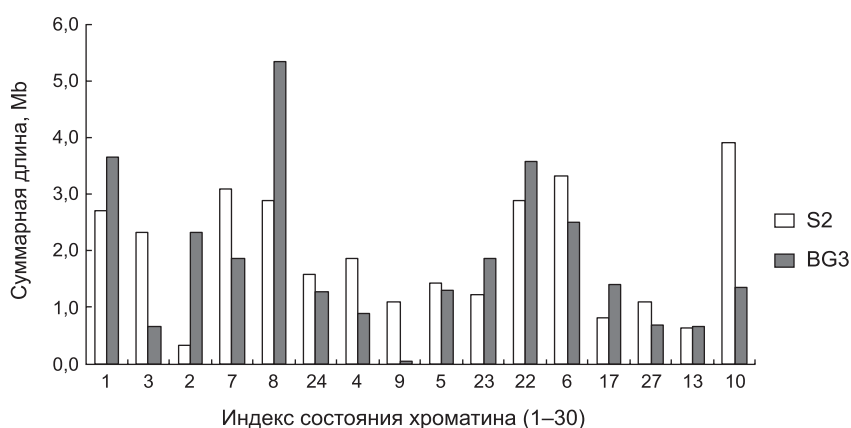
Таблица 1

Типы хроматина, наиболее часто встречающиеся  
в экзонах альтернативно сплайсирующихся генов

| Частота<br>альтернативного<br>сплайсинга | Состояние<br>хроматина | Число генов<br>с альтернатив-<br>ным экзоном | Общее число ге-<br>нов, содержащих<br>данный хроматин | Описание состояния хроматина*    |
|--|------------------------|--|---|----------------------------------|
| 0,40                                     | 13                     | 112  | 278   | Активный интрон/промотор         |
| 0,36                                     | 5                      | 357  | 996   | Активный TSS/экзон               |
| 0,31                                     | 15                     | 70   | 229   | Активный интрон/промотор         |
| 0,30                                     | 12                     | 41   | 135   | Активный интрон/промотор         |
| 0,27                                     | 16                     | 13   | 49  | Активный интрон/промотор         |
| 0,26                                     | 27                     | 52   | 200   | Гетерохроматин                   |
| 0,25                                     | 17                     | 115  | 454   | Активный интрон/промотор         |
| 0,22                                     | 19                     | 39   | 174   | Открытый хроматин                |
| 0,21                                     | 23                     | 91   | 425   | Экзон самцовых генов X-хромосомы |
| 0,21                                     | 11                     | 80   | 379   | Активный интрон/промотор         |
| 0,21                                     | 10                     | 186  | 890   | Активный экзон/ элонгация        |
| 0,20                                     | 20                     | 145  | 709   | Открытый хроматин                |
| 0,19                                     | 18                     | 47   | 246   | Открытый хроматин                |
| 0,19                                     | 14                     | 81   | 431   | Активный интрон/промотор         |
| 0,18                                     | 7                      | 259  | 1405  | Активный экзон/ элонгация        |

Примечание. Представлены категории типов хроматина, в которых доля экзонов со специфичным хроматином > 0,17 (столбец 1, посчитанный как доля генов в столбце 3 относительно генов столбца 4).

\* См. Приложение 2.

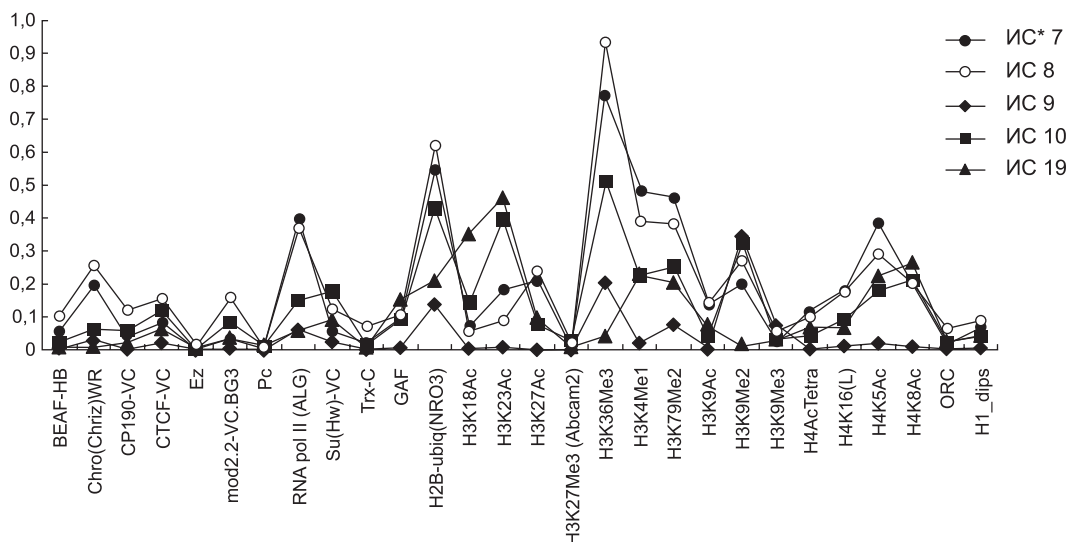


**Рис. 6.** Распределение суммарной длины хроматина, характерного для экзонов, в клеточных линиях в порядке убывания плотности экзонов (соответствует рис. 5).

пы (13, 17; рис. 5; Приложение 2) и даже гетерохроматиновой (23, 24; рис. 5; Приложение 2).

Хроматин типа 19 характеризуется наличием ацетилированных модификаций гистона H3 (H3K18ac, H3K23ac; рис. 7), с одной стороны, и практически полным отсутствием меток H3K36me3, H3K9me2 в отличие от других сравниваемых (экзонных) хроматинов, с другой

стороны, что говорит о специфической регуляции экзонов в этом хроматине (The modENCODE Consortium, 2010). Хроматины 9 и 19 являются узкоспециализированным хроматином – всего 768 районов и 902 соответственно. При этом хроматин 9 очень сходен по составу хроматиновых белков и гистоновых модификаций с хроматином 10, в то время как хроматин 19 значительно



**Рис. 7.** Состав специфических состояний хроматина 7, 8, 9, 10 и 19, встречающихся в гене *DScam*, по хроматиновым белкам и гистоновым модификациям.

Виден характерный пик в районе H3K36me3 для экзонных хроматинов 7–10. \* ИС – индекс состояния хроматина.

отличается от этих двух. Основная черта типа хроматина 9 – наличие экзон-специфичной метки H3K36me3 (The modENCODE Consortium, 2010; рис. 7). На то, что хроматин 9 является экзон-специфичным, указывает и плотность экзонов: 1 экзон на 1 т.п.н. хроматина (рис. 5; Приложение 1). При этом на то, что тип хроматина 19 не экзон-специфичный, указывает отсутствие метки H3K36Me3 и плотность экзонов в нем: 0,4 экзона на 1 т.п.н. (Приложение 1).

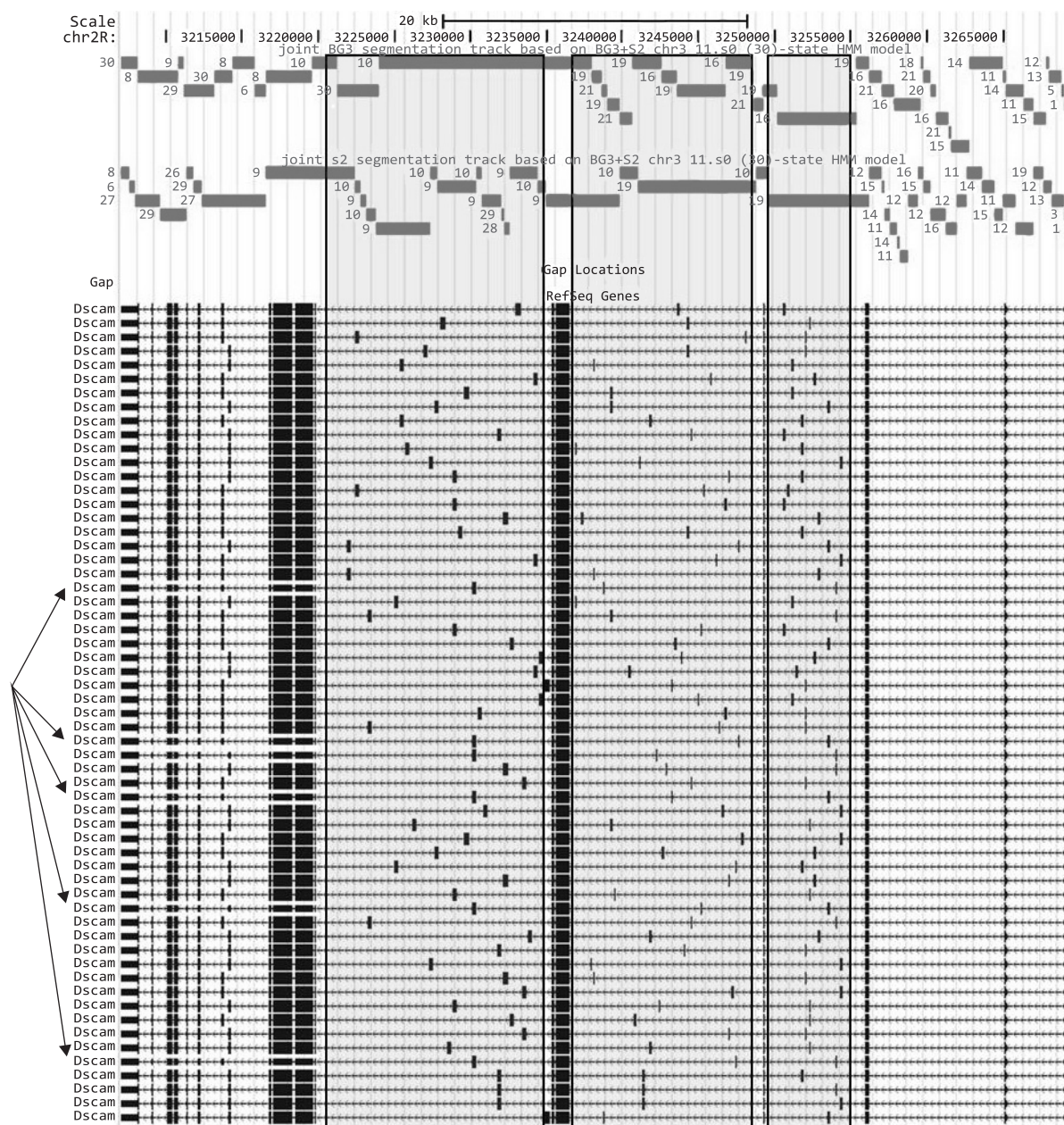
Необходимо отметить и тот факт, что в линии клеток BG3 хроматин в гене *Dscam* кардинально отличается (рис. 8). В частности, вместо хроматина 9 в кластерах экзонов 6–9 появляется непрерывный хроматин 10 (рис. 8), что говорит о совершенно другом статусе хроматиновой регуляции данного гена в линии клеток BG3, или, другими словами, транскрипция и сплайсинг *DScam* происходят совершенно по-другому.

#### Возможные механизмы регуляции сплайсинга на основе специфического хроматина

Из табл. 2, а видно, что наиболее часто встречающийся тип хроматина в экзонах – 9 (кластер экзонов 9, рис. 7), 19 (кластер экзонов 4 и 6; рис. 7), а также 10 (конститутивные экзоны). Из табл. 2, б видно, что хроматин влияет на инициацию, элонгацию и терминацию транс-

крипции, так как 5' UTR (хроматин 1) и 3' UTR (хроматин 8) хроматины качественно отличаются от хроматинов белок-кодирующей части гена (хроматин 9). В целом, интерпретируя данные табл. 2, б, можно описать структуру хроматина вдоль гена *DScam* следующим образом: открытый хроматин 1 в начале гена выступает вместе с регулируемым хроматином 13, обеспечивая тканеспецифичный старт транскрипции. Два последующих экзона также имеют уникальный для гена хроматин 11 и 12, который, по всей вероятности, также несет регуляторные функции. Начиная с 17-го экзона хроматин имеет метки позднереплицирующегося хроматина (табл. 2, б).

Для описания возможного механизма влияния хроматина на экспрессию обратимся к рис. 7. Как видно из рис. 7, хроматин 9, встречающийся наиболее часто в экзонах, является типичным экзонным хроматином с меткой H3K36me3 (Graveley *et al.*, 2010; The modENCODE Consortium, 2010; Kharchenko *et al.*, 2011). Хроматин 19, к которому относятся кассетные экзоны 4 и 6, не является экзон-специфичным хроматином и характеризуется ацетилированием гистона H3 (рис. 7). Набор кассетных экзонов 9 отличается от экзонов 4 и 6 и гетерогенен по типам экзонного хроматина: часть экзонов относится к хроматину 9, 10, а часть – к 28, 29. Примечательно, что один из экзонов с типом



**Рис. 8.** Альтернативный сплайсинг транскриптов DScam (нумерация экзонов справа налево) и состояния хроматина (30-компонентная градация; The modENCODE Consortium, 2010).

Показано распределение типов хроматина для двух клеточных линий: BG3 (верхний серый трек) и S2 (нижний серый трек). Блоки экзонов 4, 6 и 9 показаны в рамках справа налево соответственно. Транскрипты с преждевременным стоп-кодом указаны стрелками (Fujita *et al.*, 2011).

хроматина 9 содержит преждевременный стоп-кодон (рис. 8) и, возможно, является фактором подавления экспрессии с помощью NMD (non-sense-mediated decay) (Hansen *et al.*, 2009).

Как видно из табл. 1, хроматин 19 можно отнести к регулируемому сплайсингу (частота альтернативного сплайсинга высокая), также экзоны с редким хроматином 9, 13 – наиболее

вероятные кандидаты на регуляцию тканеспецифичного сплайсинга. Хроматин 10, наблюдаемый в DScam, также имеет отношение к альтернативному сплайсингу (табл. 1).

Известно, что в гене *DScam* при сплайсинге экзонов 4 и 6 вблизи конститутивных экзонов 3 и 5 соответственно существуют докерные сайты, которые избирательно образуют комп-



Таблица 2, а

Состояние хроматина  
и число уникальных экзонов в гене *DScam*

| Индекс хроматина | Число различных экзонов |
|------------------|-------------------------|
| 1                | 1                       |
| 8                | 1                       |
| <b>9</b>         | <b>38</b>               |
| <b>10</b>        | <b>11</b>               |
| 11               | 1                       |
| 12               | 1                       |
| 13               | 1                       |
| <b>19</b>        | <b>41</b>               |
| 26               | 1                       |
| 27               | 4                       |
| 28               | 2                       |
| 29               | 7                       |

Примечание. Экзоны, имеющие отношение к альтернативному сплайсингу, выделены цветом.

лементарную связь с акцептором одного из кассетных экзонов (4) 6 (Graveley, 2008). Как видно из рис. 8, экзон 5 находится в экзонном типе хроматина 10 (экзон 3 – в типе хроматина 12), в то время как кассетные экзоны 4 и 6 расположены в «доменном» хроматине 19. Возможно, именно это состояние хроматина опосредует механизм комплементарного связывания «докер–акцептор» путем обеспечения оптимальной скорости РНК-полимеразы II для котранскрипционного сплайсинга, а также работы белковых факторов по выбору специфического экзона путем модификации вторичной структуры (May *et al.*, 2011).

#### Тканеспецифическая экспрессия генов в линиях BG3 и S2

В результате исследований было выявлено, что наиболее существенно меняются 16 состояний хроматина, содержащие экзоны с большой плотностью, или «экзонные» состояния хроматина (рис. 5, 6). Мы выявили достоверное изменение длин всех экзонных хроматинов при сравнении одной линии с другой. Помимо изменения общей длины, экзоны крайне интенсивно меняют состояния хроматина, находясь именно в этих состояниях (Приложение 3).

Таблица 2, б

Распределение типов хроматина  
вдоль гена *DScam*

| Индекс состояния хроматина | Номер экзона |
|----------------------------|--------------|
| <b>1, 13</b>               | <b>1</b>     |
| 11                         | 2            |
| 12, 19                     | 3            |
| <b>19</b>                  | <b>4</b>     |
| <b>10</b>                  | <b>5</b>     |
| <b>10, 19</b>              | <b>6</b>     |
| <b>9</b>                   | <b>7</b>     |
| <b>9</b>                   | <b>8</b>     |
| <b>9, 10, 28, 29</b>       | <b>9</b>     |
| <b>9</b>                   | <b>10</b>    |
| <b>9</b>                   | <b>11</b>    |
| <b>9</b>                   | <b>12</b>    |
| <b>9</b>                   | <b>13</b>    |
| <b>9</b>                   | <b>14</b>    |
| <b>9</b>                   | <b>15</b>    |
| <b>9</b>                   | <b>16</b>    |
| <b>27</b>                  | <b>17</b>    |
| 29                         | 18           |
| 29, 26                     | 19           |
| 29                         | 20           |
| 29                         | 21           |
| 29                         | 22           |
| <b>27</b>                  | <b>23</b>    |
| <b>8, 27</b>               | <b>24</b>    |

Примечание. Серым выделены кластеры экзонов 4, 6, 9. Экзонный хроматин выделен жирным шрифтом.

Наиболее кардинальные изменения претерпевают следующие состояния хроматинов при рассмотрении S2→BG3 транзиции: 3 (S2) → 1, 2, 3 (BG3), 4 (S2) → 2, 4 (BG3), 9 (S2) → 8, 10, 23 (BG3), 15 → 11–16 (BG3), 19 (S2) → 12, 16, 19 (BG3). Заметим, что хроматин 9, который широко представлен в гене *DScam*, исчезает практически полностью в линии BG3 (рис. 6; Приложение 1), в то время как хроматин 2 ведет себя обратным образом.

В проведенном исследовании было подтверждено наличие специфического типа хроматина в районах сайтов терминации транскрипции (Spies *et al.*, 2009; The modENCODE Consortium, 2010; Khaladkar *et al.*, 2011). В

результате исследования состава хроматина 8 выяснилось, что он коррелирует с присутствием *chriz*-сайтов белка *chriz*, *polII* и отсутствием выраженных ацетилированных модификаций гистона H3 (рис. 7). Наиболее близким хроматином является хроматин 9 (рис. 7), но присутствие сайтов белков *chriz* и *polII* вносит основное отличие, характеризую открытый хроматин, с одной стороны, и задержку полимеразы и соответственно их повышенную концентрацию при окончании транскрипции, с другой стороны (Khaladkar *et al.*, 2011).

Как видно из результатов, существует значимая связь между типом хроматина экзона и его включением в зрелый транскрипт. Было проиллюстрировано распределение типов хроматина на примере гена *DScam*, одного из наиболее выдающихся генов в плане гипервариабельности экзонного состава транскриптов. Сделан вывод, что этот ген содержит специфичные состояния хроматина, имеющие отношение к производству специфических транскриптов. Дальнейшие исследования позволят выяснить непосредственные механизмы, обеспечивающие регуляцию сплайсинга специфическим состоянием хроматина.

### Выводы

1. Показано наличие локальных, присущих экзонам, хроматиновых состояний – «экзонных» хроматинов (рис. 5).

2. «Экзонные» хроматины тканеспецифичны и наиболее подвержены изменению в зависимости от линии клеток (рис. 6). Они характеризуются маркером H3K36Me3 для типов хроматинов 1–10 и H3K16ac (самцовые X-сцепленные гены) для типов хроматинов 22–24, 27 (рис. 7).

3. Один из «экзонных» хроматинов (состояние 8) является мажорным хроматином (исключая состояние 30) по содержанию сайтов терминации транскрипции (рис. 4). Он характеризуется всего двумя гистонными модификациями (H3K36me3 и в меньшей степени H2-ubiquit.), а также коррелирует с районами связывания белка *chriz* и задержки *polII* (рис. 7).

4. Позиции старта и конца транскрипции сосредоточены в нескольких основных хроматинах в линии BG3. В линии S2 они находятся в более распределенном состоянии (рис. 4).

5. Докерные сайты кассетных экзонов 4 и 6 гена *DScam* лежат в районах хроматина 19, который, возможно, обеспечивает механизм связывания «докер–акцептор» (рис. 8) (May *et al.*, 2011).

### Багодарности

Мы выражаем признательность Т. Колесниковой, А. Горчакову и А. Катохину за обсуждение и критические замечания во время написания статьи. Работа частично финансировалась Госконтрактом № 16.512.11.2274 Минобрнауки РФ.

### Литература

- Alexander R., Beggs J.D. Cross-talk in transcription, splicing and chromatin: who makes the first call? // *Biochem. Soc. Trans.* 2010. V. 38. N 5. P. 1251–1256.
- Andersson R., Enroth S., Rada-Iglesias A. *et al.* Nucleosomes are well positioned in exons and carry characteristic histone modifications // *Genome Res.* 2009. V. 9. N 10. P. 1732–1741.
- Babenko V.N., Makunin I.V., Brusentsova I.V. *et al.* Paucity and preferential suppression of transgenes in late replication domains of the *D. melanogaster* genome // *BMC Genomics.* 2010. V. 11. P. 318.
- Barash Y., Calarco J.A., Gao W. *et al.* Deciphering the splicing code // *Nature.* 2010. V. 465. N 7294. P. 53–59.
- Berget S.M. Exon recognition in vertebrate splicing // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. N 6. P. 2411–2414.
- Celniker S.E., Dillon L.A., Gerstein M.B. *et al.* modENCODE Consortium. Unlocking the secrets of the genome // *Nature.* 2009. V. 459. N 7249. P. 927–930.
- Fujita P.A., Rhead B., Zweig A.S. *et al.* The UCSC Genome Browser database // *Nucl. Acids Res.* 2011. 39 (Database issue). D876–882.
- Graveley B.R. Mutually exclusive splicing of the insect *Dscam* pre-mRNA directed by competing intronic RNA secondary structures // *Cell.* 2005. V. 123. N 1. P. 65–73.
- Graveley B.R., Brooks A.N., Carlson J.W. *et al.* The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster* // *Nature.* 2011. V. 471. N 7339. P. 473–479.
- Gunderson F.Q., Johnson T.L. Acetylation by the transcriptional coactivator Gcn5 plays a novel role in co-transcriptional spliceosome assembly // *PLoS Genet.* 2009. 5. p. e1000682.
- Guo J., Garrett M., Micklem G., Brogna S. Poly(A) signals located near the 5' end of genes are silenced by a general mechanism that prevents premature 3'-end processing // *Mol. Cell. Biol.* 2011. V. 31. N 4. P. 639–651.

- Hansen K.D., Lareau L.F., Blanchette M. *et al.* Genome-wide identification of alternative splice forms down-regulated by nonsense-mediated mRNA decay in *Drosophila* // PLoS Genet. 2009. V. 5. N 6. P. e1000525.
- Huff J.T., Plocik A.M., Guthrie C., Yamamoto K.R. Reciprocal intronic and exonic histone modification regions in humans // Nat. Struct. Mol. Biol. 2010. V. 17. N 12. P. 1495–1499.
- Khaladkar M., Smyda M., Hannehalli S. Epigenomic and RNA structural correlates of polyadenylation // RNA Biol. 2011. V. 8. N 3. P. 1–9.
- Kharchenko P.V., Alekseyenko A.A., Schwartz Y.B. *et al.* Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila melanogaster* // Nature. 2011. V. 471. N 7339. P. 480–485.
- Lee B.T., Tan T.W., Ranganathan S. DEDB: a database of *Drosophila melanogaster* exons in splicing graph form // BMC Bioinformatics. 2004. V. 5. P. 189.
- Li S., Shogren-Knaak M.A. The Gcn5 bromodomain of the SAGA complex facilitates cooperative and cross-tail acetylation of nucleosomes // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 9411–9417.
- Loomis R.J., Naoe Y., Parker J.B. *et al.* Chromatin binding of SRp20 and ASF/SF2 and dissociation from mitotic chromosomes is modulated by histone H3 serine 10 phosphorylation // Mol. Cell. 2009. V. 33. N 4. P. 450–461.
- Luco R.F., Pan Q., Tominaga K. *et al.* Regulation of alternative splicing by histone modifications // Science. 2010. V. 327. N 5968. P. 996–1000.
- May G.E., Olson S., McManus C.J., Graveley B.R. Competing RNA secondary structures are required for mutually exclusive splicing of the Dscam exon 6 cluster // RNA. 2011. V. 17. N 2. P. 222–229.
- Morillon A., Karabetsov N., O'Sullivan J. *et al.* Isw1 chromatin remodeling ATPase coordinates transcription elongation and termination by RNA polymerase II // Cell. 2003. V. 115. P. 4. P. 425–435.
- Nahkuri S., Taft R.J., Mattick J.S. Nucleosomes are preferentially positioned at exons in somatic and sperm cells // Cell Cycle. 2009. V. 8. P. 3420–3424.
- Patraquim P., Warnefors M., Alonso C.R. Evolution of Hox post-transcriptional regulation by alternative polyadenylation and microRNA modulation within twelve *Drosophila* genomes // Mol. Biol. Evol. 2011. In press.
- Piacentini L., Fanti L., Negri R. *et al.* Heterochromatin protein 1 (HP1a) positively regulates euchromatic gene expression through RNA transcript association and interaction with hnRNPs in *Drosophila* // PLoS Genet. 2009. V. 5. N 10. P. e1000670.
- Pray-Grant M.G., Daniel J.A., Schieltz D. *et al.* Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation // Nature. 2005. V. 433. P. 434–438.
- Schneider M., Will C.L., Anokhina M. *et al.* Exon definition complexes contain the tri-snRNP and can be directly converted into B-like precatalytic splicing complexes // Mol. Cell. 2010. V. 38. N 2. P. 223–235.
- Schwartz S., Meshorer E., Ast G. Chromatin organization marks exon-intron structure // Nat. Struct. Mol. Biol. 2009. V. 16. N 9. P. 990–995.
- Shabalina S.A., Spiridonov A.N., Spiridonov N.A., Koonin E.V. Connections between alternative transcription and alternative splicing in mammals // Genome Biol. Evol. 2010. V. 2. P. 791–799.
- Sims R.J., Millhouse S., Chen C.F. *et al.* Recognition of trimethylated histone h3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing // Mol. Cell. 2007. V. 28. P. 665–676.
- Spies N., Nielsen C.B., Padgett R.A., Burge C.B. Biased chromatin signatures around polyadenylation sites and exons // Mol. Cell. 2009. V. 36. N 2. P. 245–254.
- The modENCODE Consortium, Roy S., Ernst J., Kharchenko P.V. *et al.* Identification of functional elements and regulatory circuits by *Drosophila* modENCODE // Science. 2010. V. 330. N 6012. P. 1787–1797.
- Tilgner H., Nikolaou C., Althammer S. *et al.* Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition // Nat. Struct. Mol. Biol. 2009. V. 16. N 9. P. 996–1001.

## Приложение 1

Статистика состояний хроматина  
по содержанию уникальных  
экзонных последовательностей  
для двух линий клеток S2 и BG3

| Индекс состояния хроматина | Линия BG3     |                     |                       | Линия S2      |                     |                       |
|----------------------------|---------------|---------------------|-----------------------|---------------|---------------------|-----------------------|
|                            | Число экзонов | Длина хроматина, Mb | Плотность экзонов, Kb | Число экзонов | Длина хроматина, Mb | Плотность экзонов, Kb |
| 1                          | 6760          | <b>3,66</b>         | <b>1,85</b>           | 5092          | <b>2,70</b>         | <b>1,88</b>           |
| 2                          | 3464          | <b>2,32</b>         | <b>1,49</b>           | 575           | <b>0,32</b>         | <b>1,77</b>           |
| 3                          | 1031          | <b>0,65</b>         | <b>1,58</b>           | 4117          | <b>2,32</b>         | <b>1,78</b>           |
| 4                          | 927           | <b>0,88</b>         | <b>1,05</b>           | 2240          | <b>1,87</b>         | <b>1,20</b>           |
| 5                          | 1240          | <b>1,31</b>         | <b>0,95</b>           | 1592          | <b>1,43</b>         | <b>1,11</b>           |
| 6                          | 2549          | <b>2,51</b>         | <b>1,02</b>           | 2447          | <b>3,33</b>         | <b>0,73</b>           |
| 7                          | 2216          | <b>1,87</b>         | <b>1,19</b>           | 4236          | <b>3,09</b>         | <b>1,37</b>           |
| 8                          | 7291          | <b>5,35</b>         | <b>1,36</b>           | 3644          | <b>2,89</b>         | <b>1,26</b>           |
| 9                          | 25            | <b>0,04</b>         | <b>0,69</b>           | 1225          | <b>1,09</b>         | <b>1,13</b>           |
| 10                         | 675           | <b>1,35</b>         | <b>0,50</b>           | 2106          | <b>3,91</b>         | <b>0,54</b>           |
| 11                         | 89            | 0,34                | 0,26                  | 639           | 2,04                | 0,31                  |
| 12                         | 215           | 1,16                | 0,19                  | 241           | 1,00                | 0,24                  |
| 13                         | 226           | 0,66                | 0,34                  | 371           | <b>0,63</b>         | <b>0,59</b>           |
| 14                         | 342           | 1,80                | 0,19                  | 632           | 1,58                | 0,40                  |
| 15                         | 193           | 1,44                | 0,13                  | 348           | 1,86                | 0,19                  |
| 16                         | 233           | 1,56                | 0,15                  | 67            | 0,61                | 0,11                  |
| 17                         | 693           | 1,40                | 0,50                  | 588           | <b>0,82</b>         | <b>0,72</b>           |
| 18                         | 443           | 2,90                | 0,15                  | 418           | 2,11                | 0,20                  |
| 19                         | 364           | 1,98                | 0,18                  | 304           | 1,58                | 0,19                  |
| 20                         | 305           | 1,02                | 0,30                  | 1112          | 2,62                | 0,42                  |
| 21                         | 2372          | 7,64                | 0,31                  | 1264          | 3,06                | 0,41                  |
| 22                         | 2802          | <b>3,58</b>         | <b>0,78</b>           | 2191          | <b>2,90</b>         | <b>0,76</b>           |
| 23                         | 2155          | <b>1,86</b>         | <b>1,16</b>           | 1212          | <b>1,23</b>         | <b>0,99</b>           |
| 24                         | 1626          | <b>1,28</b>         | <b>1,27</b>           | 1992          | <b>1,59</b>         | <b>1,26</b>           |
| 25                         | 1658          | 6,26                | 0,26                  | 1903          | 7,06                | 0,27                  |
| 26                         | 528           | 2,61                | 0,20                  | 632           | 2,93                | 0,22                  |
| 27                         | 468           | <b>0,68</b>         | <b>0,68</b>           | 758           | <b>1,09</b>         | <b>0,70</b>           |
| 28                         | 662           | 1,96                | 0,34                  | 765           | 2,06                | 0,37                  |
| 29                         | 1928          | 8,23                | 0,23                  | 980           | 2,97                | 0,33                  |
| 30                         | 20730         | 61,37               | 0,34                  | 20519         | 67,01               | 0,31                  |

Примечание. Жирным шрифтом выделены строки, в которых плотность экзонов превышает 0,5 на 1 т.п.н. Различие между клеточными линиями в длине хроматина более чем в 2 раза выделено светло-серым цветом. Различие более чем в три раза выделено темно-серым.

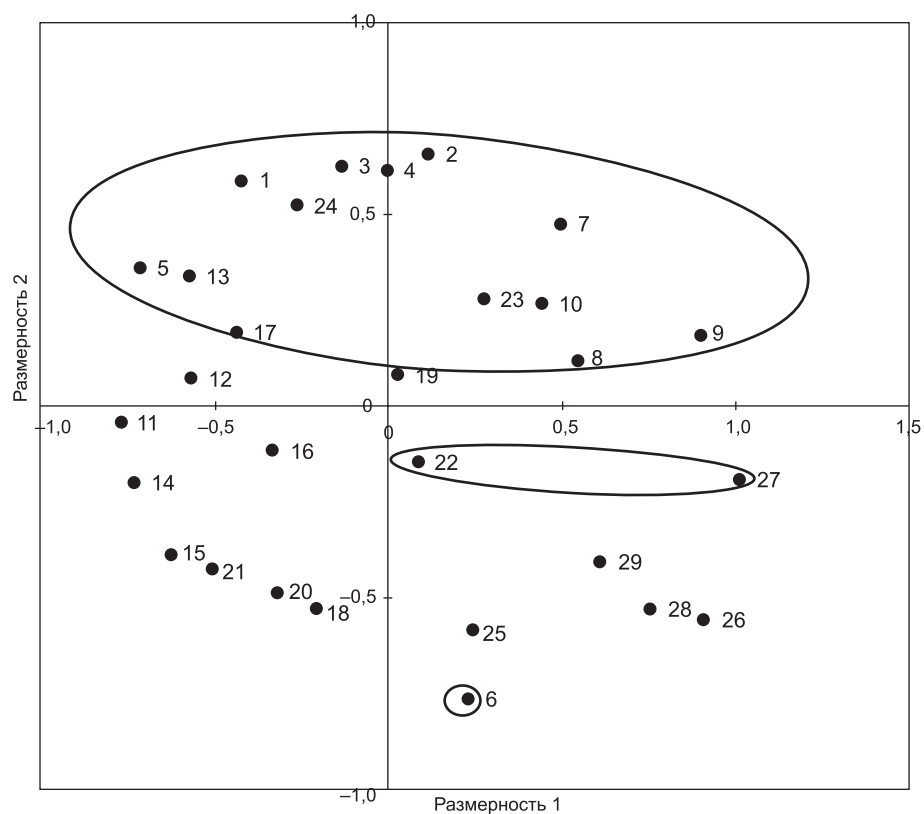
## Приложение 2

Обозначение состояний хроматина  
(из: The modENCODE Consortium, 2010)

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| Активный TSS/экзон                 | 1  |
|                                    | 2  |
|                                    | 3  |
|                                    | 4  |
|                                    | 5  |
|                                    | 6  |
| Активный экзон/элонгация           | 7  |
|                                    | 8  |
|                                    | 9  |
|                                    | 10 |
| Активный интрон/промотор           | 11 |
|                                    | 12 |
|                                    | 13 |
|                                    | 14 |
|                                    | 15 |
|                                    | 16 |
|                                    | 17 |
| Открытый хроматин                  | 18 |
|                                    | 19 |
|                                    | 20 |
|                                    | 21 |
| Экзон самцовых генов X-хромосомы   | 22 |
|                                    | 23 |
|                                    | 24 |
| Специфичный хроматин               | 25 |
| Гетерохроматин                     | 26 |
|                                    | 27 |
| Интеркалярный гетерохроматин       | 28 |
|                                    | 29 |
| Базальный межгенный гетерохроматин | 30 |



## Приложение 3



Многомерное шкалирование 30-компонентного хроматина, построенного по распределению 18 гистонных факторов (The modENCODE Consortium, 2010). Экзон-специфичные состояния, при которых плотность экзонов в среднем по двум линиям больше 0,5 экзона/т.п.н., обведены овалом.

***DROSOPHILA MELANOGASTER* GENOME:  
CORRELATION OF CHROMATIN STATE  
WITH SPLICING AND TRANSCRIPTION REGULATION**

**V.N. Babenko<sup>1</sup>, V.F. Matvienko<sup>2</sup>, I.A. Zykov<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: bob@bionet.nsc.ru;

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia,

**Summary**

Features characteristic of exon regions have been revealed by analysis of chromatin modifications. The distribution of histone modifications in exon regions is broadly variable among cell types. The correlation of the rate of alternative splicing with a certain chromatin type has been analyzed, and its most characteristic types have been identified. The distribution of chromatin labels in the *DScam* gene, producing an enormous number of transcript, assessed to be 38000, is presented as an example. It is concluded that this gene undergoes integrated regulation by the chromatin state at the levels of domains and exons.

**Key words:** *Drosophila melanogaster*, genome, gene regulation, exon, intron, alternative splicing, transcription, chromatin, variability.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА СПОНТАННЫХ ДОМИНАНТНЫХ ЛЕТАЛЬНЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНОМЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Ю.Н. Иванов

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

Описан метод определения количества спонтанных доминантных летальных мутаций (ДЛМ) в геноме плодовой мушки *Drosophila melanogaster* по выживанию зигот. Оценка среднего числа спонтанных ДЛМ в полном геноме (аутосомы + X-хромосома) равна  $0,0224 \pm 0,0057$ . ДЛМ составляют примерно 2/3 всех спонтанных мутаций, возникающих в геноме, а смертность от ДЛМ составляет около 4 % от всех зигот.

**Ключевые слова:** *D. melanogaster*, доминантные летальные мутации (ДЛМ), выживание зигот, регуляторное значение мутационного процесса, смертность зигот от ДЛМ.

### Введение

Доминантной летальной мутацией (ДЛМ) называется любая вновь возникшая мутация, которая вызывает гибель зиготы немедленно, в первом же поколении (Hadorn, 1961; Ivanov, 1998a). Любая, в том числе рецессивная летальная (РЛМ) или даже видимая (ВМ), мутация в силу отрицательного влияния на жизнеспособность может вызвать немедленную гибель зиготы, и в таком случае она регистрируется как ДЛМ (Ivanov, 1998b). Если же мутация сначала выживает, а вызывает гибель потом, в последующих поколениях, то ее уже нельзя считать ДЛМ, хотя бы она проявила летальное действие в гетерозиготе: вызванная ею гибель будет уже относиться к случайной смертности. Именно так понимаются ДЛМ, о которых пойдет речь в работе. Трудность определения количества ДЛМ состоит в том, что нельзя разделить непосредственно гибель зигот от ДЛМ и случайную смертность: это можно сделать только путем специальной организации опыта. Работа содержит описание такого опыта и его результаты при решении данной проблемы на *Drosophila melanogaster*.

### Материал и методика

Для устранения помех, привносимых случайной смертностью, был применен следующий метод. При одинаковых условиях в популяции Кантон-С подсчитывалось выживание зигот на стадии от яйца до имаго: 1) без облучения и 2) при облучении самцов-родителей  $\gamma$ -лучами, так что один геном каждой зиготы был облучен для повышения частоты ДЛМ. Для определения степени ее повышения у тех же самых самцов-родителей методом Меллер-5 ( $M5 = Basc$ ) определялась частота возникновения мутаций в X-хромосоме: 1) без облучения и 2) при облучении. Согласно допущению, число ДЛМ в облученном геноме возросло так же, как число мутаций в X-хромосоме, тогда как случайная смертность в вариантах (1) и (2) оставалась одинаковой, что и позволило исключить ее из уравнений для выживания делением одного на другое.

Пусть  $Q$  – доля зигот, выживших на стадии от яйца до имаго;  $u$  – частота возникновения РЛМ и ВМ в X-хромосоме;  $A$  – среднее число ДЛМ в полном геноме (аутосомы + X-хромосома) и  $a$  – среднее число РЛМ и ВМ, возникающих в X-хромосоме без облучения;  $\tilde{Q}$ ,  $\tilde{u}$ ,  $\tilde{A}$  и  $\tilde{a}$  – те же

величины, но при облучении самцов-родителей  $\gamma$ -лучами;  $R$  – частота гибели зигот от случайных причин (летальных генетических факторов, кроме ДЛМ, и неблагоприятных влияний среды);  $s$  – доля генов X-хромосомы во всем геноме и  $e$  – основание натуральных логарифмов.

Имеем следующие соотношения. Частота  $Q$  выживания зигот без облучения равна произведению вероятности того, что в зиготу не попадет ни одной ДЛМ, на вероятность того, что зигота не погибнет от случайных причин. Первая вероятность равна  $e^{-X}$ , где  $X$  есть среднее число ДЛМ в зиготе, т. е. параметр распределения Пуассона, которому подчиняется число ДЛМ в зиготе. Число полных геномов в зиготе самки равно 2, в зиготе самца  $2 - s$ , ибо самец вместо второй X-хромосомы содержит генетически пустую Y-хромосому. Тогда «средняя», «интерсексуальная» зигота при соотношении полов 1 : 1 содержит  $2 - s/2$  полных генома, а среднее число ДЛМ в ней равно  $X = A(2 - s/2)$ . Отсюда первая вероятность равна  $e^{-X} = e^{-A(2-s/2)}$ . Вторая вероятность равна  $1 - R$ . Поэтому

$$Q = e^{-A(2-s/2)}(1 - R). \quad (1)$$

Аналогично находится выражение для частоты  $\tilde{Q}$  выживания зигот при облучении самцов-родителей, когда один из геномов зиготы оказывается облученным. Но теперь среднее число ДЛМ в «средней между полами» зиготе будет равно  $\frac{(A + \tilde{A}) + [A + \tilde{A}(1 - s)]}{2} = A + \tilde{A}(1 - s/2)$ , где в левой части первое слагаемое в числителе  $(A + \tilde{A})$  – число ДЛМ в зиготе самки, а второе  $[A + \tilde{A}(1 - s)]$  – число ДЛМ в зиготе самца. Вероятность того, что в «средней» зиготе не будет ни одной ДЛМ, равна  $e^{-[A + \tilde{A}(1 - s/2)]}$ , а искомое выражение будет

$$\tilde{Q} = e^{-[A + \tilde{A}(1 - s/2)]}(1 - R). \quad (2)$$

Частота  $u$  возникновения мутаций в X-хромосоме измеряется как вероятность хотя бы одной мутации в ней и равна дополнению до единицы вероятности того, что ни одной такой мутации не произойдет. Последняя вероятность находится из распределения Пуассона с параметром  $a$  и равна  $e^{-a}$ , откуда

$$u = 1 - e^{-a}. \quad (3)$$

Аналогично частота возникновения мутаций в X-хромосоме при облучении самцов-родителей равна

$$\tilde{u} = 1 - e^{-\tilde{a}}, \quad (4)$$

где  $\tilde{a}$  – параметр распределения Пуассона для числа мутаций, возникающих в X-хромосоме при облучении.

Еще одно уравнение есть допущение, что число ДЛМ в геноме пропорционально числу мутаций, возникающих в X-хромосоме:

$$\frac{A}{\tilde{A}} = \frac{a}{\tilde{a}}. \quad (5)$$

Уравнения (1)–(5) образуют систему с неизвестными  $A, \tilde{A}, a, \tilde{a}$  и  $R$ , решая которую, находим выражение для среднего числа спонтанных ДЛМ в полном геноме:

$$A = \frac{\ln \frac{\tilde{Q}}{Q}}{(1 - s/2) \left[ 1 - \frac{\ln(1 - \tilde{u})}{\ln(1 - u)} \right]}.$$

Величины  $\tilde{Q}, Q, \tilde{u}$  и  $u$  получаются в независимых опытах, поэтому погрешность величины  $A$  находится по простой формуле, которую ради краткости можно дать в общем виде как оценку дисперсии функции нескольких независимых переменных:

$$s^2_f = D[f(x_1, x_2, \dots, x_n)] = \sum_{i=1}^n \left( \frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 s^2_{x_i},$$

где  $\frac{\partial f}{\partial x_i}$  – значение частной производной функции  $f$  по  $x_i$  в точке  $(\hat{x}_1, \hat{x}_2, \dots, \hat{x}_n)$ ;  $\hat{x}_i$  – опытное значение  $x_i$  и  $s^2_{x_i}$  – оценка дисперсии величины  $\hat{x}_i$  (Вентцель, 1962).

Опыт проведен в двух повторностях. В каждой были взяты две группы самцов из лабораторной популяции Кантон-С: 1) необлученные и 2) облученные  $\gamma$ -лучами дозой 1500 Р. Те и другие были скрещены с самками дикого типа (+) из популяции Кантон-С и одновременно, в тех же пробирках, с самками линии M5 (Basc). В потомстве самок (+) определялось выживание зигот на стадии от яйца до имаго:  $Q$  в варианте (1) и  $\tilde{Q}$  в варианте (2). В скрещиваниях с самками M5 определялась частота возникновения мутаций в X-хромосоме спермиев:  $u$  в варианте (1) и  $\tilde{u}$  в варианте (2). Общий план опыта изображен на схеме.

## Результаты

Результаты двух повторностей опыта представлены в табл. 1 и 2. В рубрике (а) приведены



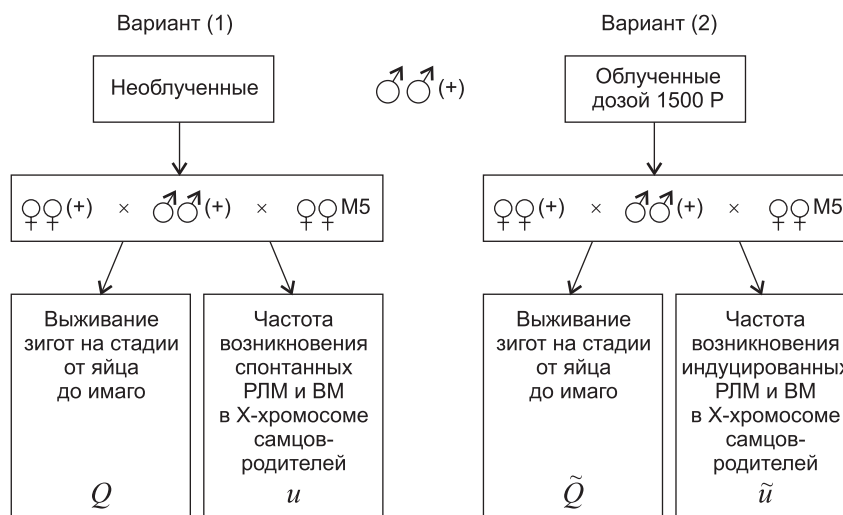
Схема опыта по определению количества ДЛМ в геноме *D. melanogaster*.

Таблица 1

Определение количества ДЛМ в полном геноме (аутосомы + X-хромосома)  
*Drosophila melanogaster* по выживанию зигот  
 в потомстве облученных и необлученных самцов

## а) Данные опыта

| Условия опыта                     | Число<br>яиц<br>$N$ | Число<br>имаго<br>$n$ | Выжи-<br>вание<br>$n/N$ | Выживание при вы-<br>ровненных условиях<br>плотности популяции<br>$Q(104)$ | Мутабельность<br>в X-хромосоме<br>самцов-родителей, %<br>$u$ | Объем<br>выборки<br>гамет |
|-----------------------------------|---------------------|-----------------------|-------------------------|--|--|---------------------------|
| При облучении<br>самцов-родителей | 3198                | 2038                  | 0,6373                  | $0,6374 \pm 0,0191$<br>$m = 25$  | $3,197 \pm 0,504$  | 1220                      |
| Без облучения                     | 3593                | 2925                  | 0,8141                  | $0,8621 \pm 0,0154$<br>$m = 23$  | $0,203 \pm 0,034$  | 17243                     |

## б) Вычисленные величины

| Условия опыта                  | Среднее число РЛМ<br>и ВМ в X-хромосоме<br>$a$ | Среднее число<br>ДЛМ в геноме<br>$A$ | Случайная<br>смертность<br>$R$ | Смертность<br>зигот<br>от ДЛМ |
|--------------------------------|--|--------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| При облучении самцов-родителей | 0,03249  | $0,3559 \pm 0,0467$                  | 0,1002                         | 0,2913                        |
| Без облучения                  | 0,00203  | $0,0223 \pm 0,0062$                  |                                | 0,0415                        |

Примечание. Первая повторность опыта.  $m$  – число культур.

измеренные, а в рубрике (б) – вычисленные величины. В первом опыте при измерении выживания на стадии от яйца до имаго оказалось, что доля выживших зигот  $Q$  или  $\tilde{Q}$  зависит от числа мух  $x$ , развившихся в стаканчике. При большом числе мух, т. е. при высокой плотности популяции, доля выживших существенно снижалась, и наоборот. Линейные приближения этой зависимости в вариантах (1) и (2) суть функции

$$1) Q(x) = 0,9664 - 9,988 \cdot 10^{-4}x;$$

$$2) \tilde{Q}(x) = 0,7208 - 7,991 \cdot 10^{-4}x.$$

Среднее число имаго в стаканчике в вариантах было 127,2 и 81,5 соответственно. Такое различие по плотности населения создавало и различие случайной смертности  $R$ . Однако эта помеха была устранена приведением выживания зигот в обоих вариантах к одной и той же плотности населения мух в культуре, а имен-

Таблица 2

Определение количества ДЛМ в полном геноме (аутосомы + X-хромосома)  
*D. melanogaster* по выживанию зигот в потомстве облученных и необлученных самцов

## а) Данные опыта

| Условия опыта                  | Общее выживание $n/N$        | Среднее выживание в культуре |                            | Мутабельность в X-хромосоме самцов-родителей, %<br>$u$ | Объем выборки гамет |
|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|--|---------------------|
|                                |                              | Число культур $m$            | $Q \pm \frac{s}{\sqrt{m}}$ |  |                     |
| При облучении самцов-родителей | $\frac{791}{2730} = 0,2897$  | 30                           | $0,2630 \pm 0,0380$        | $3,197 \pm 0,504$                                      | 1220                |
| Без облучения                  | $\frac{1071}{2571} = 0,4166$ | 27                           | $0,3577 \pm 0,0446$        | $0,203 \pm 0,034$                                      | 17243               |

## б) Вычисленные величины

| Условия опыта                  | Среднее число РЛМ и ВМ в X-хромосоме<br>$a$ | Среднее число ДЛМ в геноме<br>$A$ | Случайная смертность<br>$R$ | Смертность зигот от ДЛМ |
|--------------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| При облучении самцов-родителей | 0,03249                                     | $0,3625 \pm 0,2250$               | 0,6265                      | 0,2958                  |
| Без облучения                  | 0,00203                                     | $0,0227 \pm 0,0151$               |                             | 0,0423                  |

Примечание. Вторая повторность опыта. Обозначения те же, что в табл. 1.

но к среднему числу мух между вариантами  $\frac{1}{2}(127,2 + 81,5) \approx 104$ . Величины выживания  $Q(104)$  и  $\tilde{Q}(104)$  будут уже относиться к условиям одинаковой плотности населения, в которых случайная смертность  $R$  будет тоже одинаковой. Именно они и приведены в табл. 1 (а) как корректирующие величину выживания  $n/N$ , где  $N$  – общее число яиц, а  $n$  – число разившихся мух во всех культурах варианта.

Оценка доли  $s$ , которую составляют гены X-хромосомы во всем геноме, получена из данных, заимствованных в работах других авторов (Дубинин, 1966; Lindsley, Grell, 1968; Kavenoff, Zimm, 1973; Корочкина, 1977; Жимулев, 1993). Вычисленные величины в таблицах получены при  $s = 0,19$ .

## Обсуждение

Осреднение результатов обеих повторностей опыта с весами, равными  $s_i^{-2}$  ( $i = 1, 2$ ), дает среднее число спонтанных ДЛМ в полном геноме  $A = 0,0224 \pm 0,0057$ . Среднее число спонтанных РЛМ и ВМ, возникающих во всем геноме, вычисленное из среднего их числа в X-хро-

мосоме  $a = 0,00203$  и ее доли в геноме  $s = 0,19$ , равно  $0,0107$ . Всего вместе с ДЛМ в геноме возникает в среднем  $0,0107 + 0,0224 = 0,0331$  спонтанных мутаций, а доля ДЛМ среди них составляет 68 %. ДЛМ – самый многочисленный класс мутаций в спонтанном мутагенезе, и экологическое значение их очень велико. Выясняется, что мутационный процесс играет регуляторную роль в экосистеме, и ДЛМ являются в нем главным агентом смертности, ограничивающим плотность популяции вида (Ivanov, Ivannikov, 1997). ДЛМ являются важнейшим фактором эмбриональной смертности при индуцированном мутагенезе (Hадorn, 1961), поэтому особый интерес представляет частота гибели зигот от спонтанных ДЛМ. Как мы видели, среднее число спонтанных ДЛМ в «средней» зиготе при первичном соотношении полов 1 : 1 равно  $A(2 - s/2)$ , а доля зигот, не получивших ни одной ДЛМ, равна  $e^{-A(2-s/2)}$ . Доля зигот, погибших от ДЛМ, равна  $1 - e^{-A(2-s/2)}$ , что при  $A = 0,0224$  и  $s = 0,19$  дает величину 0,0418.

Переносим результаты, полученные для популяции Кантон-С, на другие популяции *D. melanogaster*, приходим к выводам:

1. Среднее число спонтанных ДЛМ в полном геноме (аутосомы + X-хромосома), вычисленное при допущении, что число их пропорционально числу возникающих рецессивных летальных и видимых мутаций, так что прирост числа ДЛМ также прямо пропорционален дозе  $\gamma$ -лучей, равно  $(224 \pm 57) \cdot 10^{-4}$ , что составляет примерно 2/3 всех возникающих в геноме мутаций.

2. Частота гибели зигот от спонтанных ДЛМ составляет около 4 %.

### Литература

- Вентцель Е.С. Теория вероятностей. М.: Наука, 1962. С. 240–247.
- Дубинин Н.П. Эволюция популяций и радиация. М.: Атомиздат, 1966. 743 с.
- Жимулев И.Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск: Наука, 1993. 491 с.
- Корочкина Л.С. Морфология и некоторые функциональные характеристики хромосом рода *Drosophila* // Проблемы генетики в исследованиях на дрозофиле. Новосибирск: Наука, 1977. С. 112–151.
- Hadorn E. Developmental Genetics and Lethal Factors. London: Methuen and Co Ltd; N.Y.: John Wiley and Sons, Inc., 1961. XVIII + 355 p.
- Ivanov Yu.N. Estimation of the number of spontaneous dominant lethal mutations in the genome of *D. melanogaster* // Drosophila Inform. Serv. 1998a. V. 81. P. 193–197.
- Ivanov Yu.N. Estimation of the number of genic dominant lethal mutations in the genome of fruit fly *D. melanogaster* using ethylmethane sulphonate // Drosophila Inform. Serv. 1998b. V. 81. P. 186–193.
- Ivanov Yu.N., Ivannikov A.V. Difference in mutation rates between flies of small and large body sizes in natural *D. melanogaster* populations and regulatory meaning of this phenomenon // Drosophila Inform. Serv. 1997. V. 80. P. 57–59.
- Kavenoff R., Zimm B.H. Chromosoma sized DNA molecules from *Drosophila* // Chromosoma. 1973. V. 41. P. 1–27.
- Lindsley D.L., Grell E.H. Genetic Variations of *D. melanogaster* // Carnegie Inst. Wash. Public. 1968. N 627. 472 p.

## ESTIMATION OF THE NUMBER OF SPONTANEOUS DOMINANT LETHAL MUTATIONS IN THE GENOME OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Yu.N. Ivanov

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

### Summary

A method of estimation of the number of spontaneous dominant lethal mutations (DLM) in the genome of the fruit fly *Drosophila melanogaster* on the base of zygote survival is described. The mean number of spontaneous DLM in the whole genome (autosomes + X chromosome) is estimated to be  $(224 \pm 57) \cdot 10^{-4}$ . DLM constitute about 2/3 of all spontaneous mutations arising in the genome, and the zygote mortality from DLM is about 4 %.

**Key words:** *D. melanogaster*, dominant lethal mutations (DLM), survival of zygotes, regulatory significance of the mutation process, mortality of zygotes from DLM.

## ГЕНЕТИКА И ПРИОРИТЕТНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СУПЕРМЕЛКИХ МИНИ-СВИНЕЙ ДЛЯ МЕДИКО-БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ

В.Н. Тихонов, В.Е. Бобович

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

В результате многолетней межподвидовой гибридизации домашних и диких свиней европейского и азиатского происхождения под иммуноцитогенетическим контролем создана новая форма особо мелких карликовых лабораторных свиней для медико-биотехнологического использования. Первая отечественная популяция супермелких микросибсов имеет уникальный кариотипический полиморфизм по числу хромосом ( $2n = 36, 37$  и  $38$ ), а также не встречающуюся ни у одной породы домашних свиней необычную короткую форму слезной кости черепа (*os lacrimale*), особо раннюю репродуктивную скороспелость, своеобразные иммуногенетические характеристики концентрации аллелей кровогрупповых локусов *EAA*, *EAD*, *EAE*, *EAF*, *EAG* и *EAL*. Супермелкие мини-свиньи открывают возможность наиболее адекватного и экономичного моделирования широкого круга медико-биотехнологических исследований.

**Ключевые слова:** свиньи лабораторные, мини- и микросибс (лабораторная сибирская свинья), иммуногенетика, робертсоновская транслокация, краниология.

### Введение

Лабораторные миниатюрные свиньи в настоящее время все шире используются во многих странах как новый вид лабораторных животных для решения широкого круга проблем, имеющих важное значение для медицинских, ветеринарных и селекционно-генетических исследований. Ежегодно публикуются многие сотни работ, выполненных на мини-свиньях с тех пор как на них была продемонстрирована наибольшая адекватность организму человека при радиоактивном воздействии и изучении метаболического синдрома (Тихонов, 2010).

В мировой лабораторной практике используют более 10 породных популяций мини-свиней, из которых наиболее удачными признаются созданные в США (хэнфордские, хормельские и юкатанские) и в ФРГ (геттингенские). Первые отечественные лабораторные свиньи, выведенные в Институте цитологии и генетики СО РАН, «минисибс» (миниатюрная сибирская свинья), по основным параметрам мини-свиней – ди-

намике роста живой массы, репродуктивным свойствам и жизнеспособности – полностью соответствуют лучшим зарубежным популяциям (Тихонов, 1990, 2010). Однако в последние годы возникла необходимость в дальнейшей селекционно-генетической работе по уменьшению их живой массы и адаптации к условиям содержания в современных вивариях, что обеспечивает более рациональное и экономичное их содержание и, главное, соответствует требованиям, необходимым для адекватного решения широкого круга новых медико-биотехнологических задач (Тихонов, Жучаев, 2008).

### Материалы и методы

Создание первых мини-свиней в нашей стране было начато в конце 1960-х гг. в Институте цитологии и генетики СО АН СССР. Для этой цели впервые была использована оригинальная методика отдаленной межподвидовой гибридизации с использованием иммуно- и цитогенетического мониторинга. В многолетней работе

были получены и генетически изучены гибриды двух альтернативно различающихся по ростовой и репродуктивной скороспелости культурных пород свиней азиатского и европейского происхождения (вьетнамская порода и шведский ландрас), а также 2 подвидов диких кабанов (среднеазиатский и центрально-европейский). Выбор указанных исходных популяций (генофондов) для нового вида лабораторных животных, а также иммуно- и цитогенетические методы изучения были определены особыми специфическими требованиями, которые предъявляют к ним в связи с научными задачами (Tikhonov, 1996; Петухов и др., 2005).

### Результаты

Основной целью при создании компаундного желательного генома лабораторной свиньи прежде всего остается значительное уменьшение величины тела животного – карликовость,

что определяет удобство работы и стоимость содержания (рис. 1). Поэтому первой задачей являлся поиск адекватных исходных генофондов карликовости. С учетом результатов зарубежного опыта и отечественных возможностей было решено использовать геномы доступных популяций свиней, в генофонде которых могут находиться локусы, детерминирующие разную степень карликовости различного генезиса: мелких индокитайских домашних свиней, родственных *Sus scrofa vittatus*, и наиболее мелких горных диких кабанов из Средней Азии, *Sus scrofa nigripes*.

Размеры тела и органов мини-свиней детерминируются белковым соматотропным гормоном роста, который образуется в передней части гипофиза и состоит из 191 аминокислоты. По нашим данным, экспрессия фенотипической карликовости у миниатюрных свиней при определенных геномах может выражаться в 10 и более раз сильнее, чем у человека. Так, при



**Рис. 1.** Взрослый самец минисибс (живая масса 30 кг) с наследственным геномом карликовости (справа) рядом с обычным самцом нормального размера родительской породы шведский ландрас (живая масса 300 кг).



нормальном хорошем росте обычные свиньи современных пород в 6-месячном возрасте имеют живую массу 100 кг, а мини-свиньи могут иметь в этом возрасте менее 10 кг живой массы. Основным исходным пулом генов карликовости послужили вьетнамские черные масковые свиньи, изученные нами в зоопарках Кубы, и горный среднеазиатский кабан из популяции Сары-Челекского заповедника (Киргизия), использованный нами и при создании ландрас-кабаньих гибридов.

Мировой опыт использования разных исходных пород азиатского происхождения для выведения мини-свиней показывает, что они имеют крайне нежную конституцию и генетически обусловленный обмен веществ, который ведет к раннему патологическому ожирению. Они характеризуются гомозиготным генотипом по аллелям, детерминирующим черную пигментацию кожи и щетины и некоторыми другими нежелательными для лабораторных животных качествами. Поэтому на начальном этапе выведения мини-свиней мы использовали скрещивание домашних азиатских свиней с наиболее подходящими дикими предковыми формами, что придает им крепость конституции и позволяет фиксировать эффект взаимодействия генов карликовости разного генезиса в компаундном геноме.

В связи с нежелательными поведенческими и некоторыми другими физиологическими особенностями у азиатских диких и домашних свиней в качестве родоначальников породной группы мини-свиней было сочтено целесообразным включить в число исходных форм известную старую европейскую культурную породу домашних свиней – шведский ландрас. Биологические особенности этой породы были нам хорошо знакомы по многолетней селекционно-генетической работе с ней. Методами отдаленной межподвидовой гибридизации и воспроизводительным скрещиванием вышеописанных исходных форм в течение 40-летней селекционно-генетической работы под иммуно- и цитогенетическим контролем было получено около 10 тыс. гибридных животных 20 поколений.

Селекционно-генетическую работу при выведении миниатюрных свиней проводили под иммуногенетическим мониторингом по

антигенам систем групп крови (Тихонов, 1967, 1991). С 1969 г. она сопровождалась и цитогенетическим анализом (Tikhonov, Troshina, 1974, 1980), который в последние годы проводили при участии Н.М. Астаховой и М.Л. Кочневой (Тихонов, 2010).

Для понимания молекулярно-генетических особенностей генома отечественных микро-свиней следует постоянно иметь в виду, что одним из непосредственных их ближайших прародителей является вьетнамская порода, которая происходит от азиатского подвида *S. s. vittatus*. Последнее обстоятельство адекватно отражается в консервативных особенностях генома вьетнамских свиней, что убедительно подтверждается изучением у них частот азиатских иммуногенетических маркерных аллелей локусов *EAD*, *EAE*, *EAF* (Тихонов, 1991). Эти маркеры хорошо отражают многовековую историю микроэволюции и участия геномов азиатских предковых форм в процессе пороодообразования фактически всех современных домашних пород свиней, в том числе и крупной белой, беркширской и разных внутривидовых типов кемеровской. Микроэволюция геномов мини- и микросибсов хорошо прослеживается у всех современных культурных черно-пестрых и белых пород, особенно при сравнении с микроэволюционными изменениями при выведении миниатюрных сибирских лабораторных свиней. Динамика частот аллелей и генотипов локусов систем групп крови *EAA*, *EAD*, *EAE*, *EAF*, *EAG* и *EAL* (соответственно расположенных в хромосомах: 1, 12, 9, 17, 15 и 4), систем полиморфных белков сыворотки крови и гемолизатов одинаково адекватно моделируют сложнейшие элементы процесса пороодообразования микросибсов (Тихонов, 2010).

В дальнейшем особое внимание было уделено селекции по снижению пре- и постнатальной, а также ростовой скороспелости и возрасту достижения репродуктивной зрелости. В результате многолетней селекционно-генетической работы удалось закрепить уровень генетической скороспелости, который сейчас соответствует лучшим американским породным группам миниатюрных лабораторных свиней хэндфордских и юкатанских в ведущей специализированной медико-биологической лаборатории Чарльза Риверса (США). Достигнутая живая масса мини-свиней

в США и России наиболее адекватна организму взрослого человека среднего телосложения.

Результаты по снижению и фиксации живой массы минисибсов при получении последних поколений микросибсов позволили создать питомник супермелких мини-свиней, которых мы назвали микросибс, или суперминисибс (рис. 2–4). Данные, приведенные в табл. 1, свидетельствуют о значительном превосходстве микросибсов по мелкорослости над лучшей американской группой «мини-юкатанские», полученной в последние годы при длительной

селекции местной мелкой мексиканской свиньи, очень давно разводившейся в этом регионе.

Большое внимание оказалось необходимым придавать изучению оптимального времени наступления полового созревания и оплодотворения, а также потенциальной и фактической плодовитости. Многие самки микросибсов даже при недостаточно удовлетворительных условиях кормления и содержания могут успешно давать первое потомство ранее достижения ими календарного возраста 12 мес., а некоторые даже ранее 10 мес. Продолжительность

Таблица 1

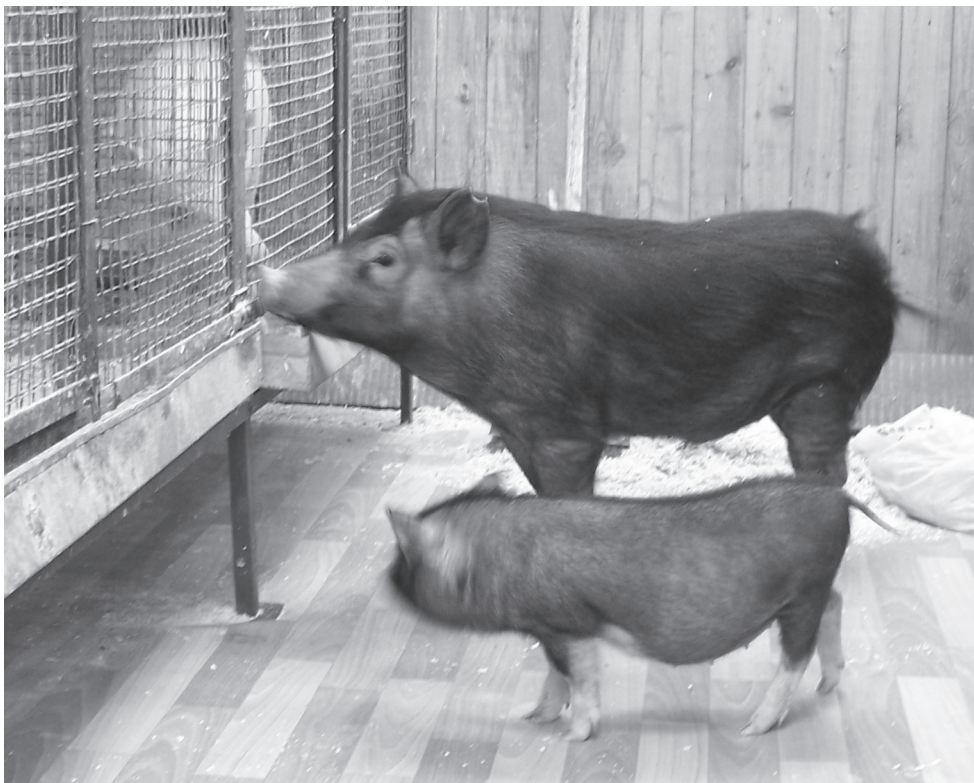
Динамика живой массы у мини-свиней и микропигов США, мини- и микросибсов ИЦиГ СО РАН (для сравнения приведены данные по исходной породе минисибсов – ландрас)

| Популяции            | Живая масса (кг) животных в возрасте (мес.) |       |       |       |
|----------------------|---|-------|-------|-------|
|                      | 2   | 4     | 6     | 12    |
| мини-хэнфорд, США    | 8–11  | 20–29 | 32–42 | 50–70 |
| мини-юкатанская, США | 7–9   | 15–20 | 25–30 | 45–65 |
| минисибс, Россия     | 8–11  | 20–30 | 35–40 | 50–70 |
| микропиги, США       | 6–8   | 12–14 | 16–20 | 35–50 |
| микросибс, Россия    | 4–5   | 10–12 | 15–20 | 30–35 |
| ландрас, Россия      | 20  | 50    | 100   | 200   |



Рис. 2. Свиноматка микросибс Веста № 472, давшая первое потомство (6 поросят) в возрасте 12,5 месяцев.





**Рис. 3.** Супермелкий хряк минисибс Хрюн (живая масса в 12 мес. – 27 кг) и свинка микросибс Мотя (живая масса в возрасте 5 мес. – 5 кг).



**Рис. 4.** Свиноматка микросибс № 242 с поросятами-отъемышами (опоросилась в возрасте 12 мес.).

беременности (супоросность) у минисибсов в разные годы колебалась от  $112,9 \pm 0,2$  (1980 г. по 62 опоросам) до  $115,1 \pm 0,3$  дня (1983–1986 гг. по 147 опоросам). Эти данные близки к продолжительности супоросности у геттингенских мини-свиней (115,3 дней), но следует отметить, что у вьетнамских свиней супоросность значительно короче  $112,3 \pm 0,2$  дня, а у свиней ландрасской породы продолжительнее:  $116,7 \pm 0,6$ . Кстати, у диких кабанов она еще больше: 115–120 дней (Козло, 1975; Данилкин, 2002). Уже в пренатальный период интенсивность роста живой массы у мини-свиней значительно меньше, чем у обычных домашних свиней, о чем можно судить по живой массе новорожденных поросят и в 3-недельном возрасте. Минисибсы имели живую массу при рождении  $639,9 \pm 14,4$  г, т. е. в 2–2,5 раза меньше, чем у ландрасов (1359 г) и по мере дальнейшего постнатального роста разница по живой массе увеличивается, достигая во взрослом состоянии 4–5-разовой кратности. Живая масса микросибсов при рождении колеблется от 400 до 680 г и составляет в среднем меньше 550 г. На 80-й день эмбрионального периода плоды

имеют массу от 200 до 280 г, а на 90-й день – около 300 г, тогда как у крупной белой породы в этом возрасте – более 600 г (Тихонов, 1950).

Для мини- и микросибсов характерной очень редкой генетической особенностью является необычное строение черепа, не встречающееся ни у одной культурной породы свиней (рис. 5, 6). Индекс коэффициента соотношения роста длины к ширине (высоте окологлазничной впадины) слезной кости всегда менее 1. У всех известных домашних пород свиней и изученных европейских и азиатских кабанов этот индекс наоборот больше 1, и увеличение его (удлинение слезной кости) связывают с увеличением доли европейских и уменьшением доли азиатских родоначальников в геноме современных домашних пород свиней, имеющих глобальное распространение (Адлерберг, 1933; Филиппченко, 1933; Genov *et al.*, 1999; Данилкин, 2002).

### Обсуждение результатов

Лабораторные свиньи служат наилучшим модельным объектом и заслуженно пользуются



**Рис. 5.** Соотношение размеров, формы лобной и лицевой (носовой) частей черепа, а также наклона затылочного гребня у взрослых хряков минисибс (на переднем плане) и родительской формы европейского кабана (на заднем плане).





**Рис. 6.** Слезная кость (*os lacrimale*) хряка минисибс № 157 с вертикальным расположением в черепе, индекс соотношения ее длины к высоте 0,5.

репутацией оптимально удачной модели для медико-биологических экспериментов, благодаря тому что их органы размерами, анатомическими и функциональными особенностями в норме и патологии в наибольшей степени сходны с человеческими.

У мини-свиней и людей практически одинаковая топография артерий и вен кардиоваскулярной системы. Небольшое анатомическое отличие заключается только в том, что у свиньи имеется дополнительная малая левая непарная вена (*v. azygous minor*), которая входит в коронарный синус. У других лабораторных животных – крыс, кроликов, собак – кардиоваскулярная топография сосудов и гемодинамические особенности отличаются от человеческих в значительно большей степени. Такое же сходство справедливо отмечается и в отношении поджелудочной железы, органов выделения (включая почки), нейроэндокринной и половой систем.

Для медико-биологических исследований приоритетную роль играет особенно большое сходство органов пищеварительной системы мини-свиней и человека, которое обусловлено

общим растительно-мясным типом питания, их «всеядностью». Желудок у мини-свиней типичный однокамерный, относительная длина кишечника очень велика и примерно в 10 раз больше длины туловища.

Благодаря одинаковому типу питания и особенностям липидного и углеводного метаболизма, человек и мини-свиньи имеют очень похожий метаболический синдром. Они болеют аналогичными болезнями, в том числе спонтанным инфарктом и диабетом 2-го типа, которые справедливо называют «чумой 21-го века». Именно эти обстоятельства способствовали широкому использованию мини-свиней для моделирования и изучения метаболического синдрома. Метаболический синдром включает несколько важных симптомов: снижение чувствительности тканей организма к инсулину, абдоминальное ожирение и нарушения липидного обмена, повышенное артериальное давление. Метаболический синдром одинаково быстро приводит к развитию сахарного диабета второго типа (инсулиннезависимого), атеросклерозу, ишемической болезни сердца.



В индустриальных странах в настоящее время от метаболического синдрома страдает уже более 10–20 % населения старше 30 лет.

Именно мини-свиньям выпала важная миссия стать наиболее подходящими испытателями новых средств лечения метаболического синдрома. Проблемы ожирения, липидного и углеводного (особенно с инсулиновым компонентом) обмена на мини-свиньях изучают давно, но, к сожалению, не по всем комплексам метаболического обмена. Наиболее успешно пока проходят создание и совершенствование биоксенопротезов клапанов сердца в Кемеровском кардиологическом центре под руководством академика Л.С. Барбараша. Кстати, первые отечественные ксенобиопротезы клапанов сердца в нашей стране были изготовлены при использовании сердец от мини-свиней. Они могут быть весьма полезны и при дальнейшей разработке новых усовершенствованных ксенобиопротезных сердечных клапанов и кардиохирургических инструментов для всей линейки автоматического манипулирования с особо мелкими сосудами разных органов. При трансплантации сердечных клапанов, когда они предназначены для имплантации пациентам детского возраста, ситуация часто осложняется тем, что размер импланта не меняется по мере роста больного. Удачное решение этой проблемы нашли специалисты Ганноверской лаборатории биотехнологии и искусственных органов им. Лейбница. Из клапанов сердца мини-свиньи, использованной в качестве донора, удаляли все мышечные клетки и оставляли только каркас из соединительной ткани. Затем этот каркас заселяли стволовыми клетками, выделенными из костного мозга или крови реципиента. Такой новый, выращенный за несколько недель, клапан не вызывает иммуногенетического отторжения, связанного с гистонесовместимостью, и, главное, ксенобиопротез клапана растет вместе с пациентом. Работа по созданию «растущего биопротеза клапана сердца» была отмечена на высшем уровне премией Президента ФРГ.

Сейчас в США, Китае и других странах многие ученые интенсивно ведут работы на молекулярно-генетическом уровне по преодолению гистонесовместимости между организмом человека и органами мини-свиней, рассматри-

ваемыми в качестве наиболее вероятных возможных доноров. Из выявленных нескольких генов, отвечающих за гистонесовместимость, уже удастся половину инактивировать нокаутированием при трансгенезе.

В нашей стране за последние 15 лет проведены тысячи успешных ксенотрансплантаций клапанов сердца людям, в том числе значительное число операций сделано пациентам детского возраста. При этом во многих случаях не потребовалось проведения повторных трансплантаций. К сожалению, официальное использование в детской кардиохирургии имплантов для ксенотрансплантаций в нашей стране пока не разрешено законом. Это, естественно, задерживает и экспериментальное изучение актуальной проблемы трансплантации ксенобиопротезов от мини-свиней.

Ежегодно во всем мире в трансплантациях органов остро нуждаются сотни тысяч пациентов, но эта потребность не может и никогда не сможет быть удовлетворена за счет только человеческих донорских органов. Даже в таких сравнительно небольших странах, как Англия, ежегодно производят более 10 тыс. трансплантаций. Хронический и практически бесконечный дефицит неизбежно усугубляется объективными причинами: очень высокой индивидуальной иммуногенетической специфичностью органов, необычайной трудностью их получения и, к сожалению, очень высокой стоимостью. При этом в качестве доноров для ксенотрансплантации из всех животных можно рассматривать лишь мини-свиней как по этическим и анатомо-генетическим, так и по чисто финансовым причинам.

Потенциальный мировой рынок в отношении сердец, почек, поджелудочных желез и других органов мини-свиней для ксенотрансплантации человеку даже при современных возможностях обеспечения гистосовместимости по самым осторожным расчетам превосходит 5 млрд долларов. Но еще более значительная сумма вложения требуется для изучения и лечения гастроэнтерологических заболеваний (включая диабет) и нейроэндокринных болезней, а также болезней Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона, эпилепсии и многих других.

В 1998–2010 гг. на базе ИЦиГ СО РАН при участии кардиохирургов Научно-исследова-

тельского института патологии кровообращения (НИИПК) МЗ России им. Е.Н. Мешалкина было начато экспериментальное изучение возможности использования минисибсов в качестве наиболее вероятных потенциальных доноров для ксенотрансплантации частей и всего сердца человеку. Экспериментальные кросстрасплантации сердца между мини-свиньями показали полную осуществимость таких пересадок уже в настоящее время по реальным технологическим и хирургическим возможностям, обеспечивающим необходимое поддержание соответствующей гемодинамики. Однако остается актуальной необходимость дальнейшего изучения новых методов обеспечения гистосовместимости на основе трансгенеза мини-свиней с использованием генетических элементов из стволовых клеток эмбрионов человека. Кстати, такие опыты успешно продолжаются в Массачусетском университете США (под руководством известного ученого Д. Тейлор), а также в нескольких университетах континентального Китая и на Тайване.

В 2005 г. в одном из аграрных университетов КНР удалось успешно осуществить клонирование необходимых для трансплантации поросят. А в 2009 г. китайские медики провели серию ксенотрансплантаций разных внутренних органов от мини-свиней шимпанзе. Китайский ученый Янг Хоньцзы, руководивший международным проектом со стороны КНР, сообщил, что первые опыты по ксенотрансплантации будут продолжены в специальной научной лаборатории при Клиническом центре трансплантологии провинции Сычуань. Предполагается сделать попытку пересадить свиную печень, поджелудочную железу, почки и другие органы, наиболее востребованные в клинической медицине при ксенотрансплантации, нескольким шимпанзе.

Изучение возможности модификации генома свиней и их клонирование для ксенотрансплантации органов человеку интенсивно ведут также в Австралии, Южной Корее, ФРГ. В настоящее время работа по геномодификации и клонированию минисибсов с использованием стволовых клеток для создания гистосовместимого генома, обеспечивающего толерантность при ксенотрансплантации органов человеку, находится на начальных этапах. Основным методом

является клонирование трансгенных мини-свиней с нокаутированными генами, что блокирует формирование полисахаридов, участвующих в образовании альфа-1.3-галактозилтрансферазы (*GGTA1*) у доноров.

## Литература

- Адлерберг Г.П. К вопросу о происхождении домашних свиней // Проблема происхождения домашних животных. М.: Изд-во АН СССР, 1933. С. 185–210.
- Данилкин А.А. Свиньи. М.: Геос, 2002. 309 с.
- Козло П.Г. Дикий кабан. Минск: Ураджай, 1975. 224 с.
- Петухов В.Л., Тихонов В.Н., Желтиков А.И. Генофонд скороспелой мясной породы свиней. Новосибирск: ИПЦ «Юпитер», 2005. 631 с.
- Тихонов В.Н. Некоторые вопросы эмбрионального роста и развития свиньи: Дис. ... канд. биол. наук. М.: ВИЖ, 1950. 208 с.
- Тихонов В.Н. Использование групп крови при селекции животных. М.: Колос, 1967. 391 с.
- Тихонов В.Н. Генетика мини-свиней. Новосибирск: ИГиГ СО АН СССР, 1990. 209 с.
- Тихонов В.Н. Иммуногенетический и биохимический полиморфизм домашних и диких свиней. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. 303 с.
- Тихонов В.Н. Лабораторные мини-свиньи, генетика и медико-биологическое использование. Новосибирск: Наука, 2010. 304 с.
- Тихонов В.Н., Жучаев К.В. Микроэволюционная теория и практика породообразования свиней. Новосибирск: Наука РАН, 2008. 394 с.
- Филиппченко Ю.А. Краниологические исследования диких видов свиней // Проблемы происхождения домашних животных. М.: Изд-во АН СССР, 1933. С. 157–184.
- Genov P.V. A review of the cranial characteristics of the Wild Boar (*Sus scrofa* Linnaeus 1758), with systematic conclusions // Mammal Rev. 1999. V. 29. N 4. P. 205–238.
- Tikhonov V.N. The siberian miniature pig, its development, genetics, and use in biomedical research // Advances in Swine in Biomedical Research. Plenum Press, N.Y., London, 1996. V. 2. P. 693–707.
- Tikhonov V.N., Troshina A.I. Chromosome translocations in the karyotypes of wild boars *Sus scrofa* L. of the European and Asian areals of the USSR // Theor. Appl. Genet. Berlin, 1974. V. 45. P. 1294–1298.
- Tikhonov V.N., Troshina A.I. Marker chromosome translocation Tr.1 and Tr. 2 in development of commercial Landrace × Wild Boar Hybrids and Siberian minipigs // 4th European Colloquium on Cytogenetics. Uppsala, Sweden, 1980. P. 242–249.

## GENETICS AND MAJOR APPLICATIONS OF SUPERSMALL PIGS IN MEDICINE AND BIOTECHNOLOGY

V.N. Tikhonov, V.E. Bobovich

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

### Summary

Long-term immunocytogenetically controlled hybridization of domestic pig breeds and wild pigs of European and Asian origin has brought about a breed population of very small laboratory pigs that can be used in medicine and biotechnology. The first Russian population of supersmall Microsibs is uniquely polymorphic in chromosome set ( $2n = 36, 37$ , or  $38$ ). Other features are the unusually short lacrimal bone (*os lacrimale*), not found in any domestic breed; very early reproductive maturity; and specific immunogenetic features of the concentrations of blood type alleles of loci: *EAA*, *EAD*, *EAE*, *EAF*, *EAG*, and *EAL*. Supersmall pigs allow the most adequate and economic modeling in many tasks of medicine and biotechnology.

**Key words:** laboratory pigs, Mini- and Microsibs (laboratory Siberian swine), immunogenetics, robertsonian translocation, craniology.

## РАБОЧЕЕ СОВЕЩАНИЕ им. ВИЛЬГЕЛЬМА БЕРНХАРДА «КЛЕТОЧНОЕ ЯДРО»

25–29 августа 2011 г. в Латвийском университете (г. Рига) состоялось 22-е Рабочее совещание им. Вильгельма Бернхарда, внесшего неоценимый вклад в развитие клеточной биологии, широко известного своими работами по изучению клеточных органелл, инициировавшего регулярное проведение таких совещаний начиная с 1969 г.

Клеточная биология и ее центральная проблема – организация клеточного ядра по сравнению с молекулярной биологией, особенно молекулярной генетикой, современной биохимией, до сих пор находится на начальных стадиях своего развития, несмотря на то что исторически ее зарождение было основой формирования базовых биологических наук. По-видимому, это обусловлено особой сложностью перехода от собственно молекулярного уровня организации живого материала, генных сетей, составляющих сегодня существенную часть новой области исследований – системной биологии, к структурно-функциональной организации клетки – элементарной единице всего живого.

Большинство исследований в области системной биологии в настоящее время сосредоточено на изучении структурно-функциональной организации геномов, ландшафтной геномике, тонком рисунке регуляции и взаимодействий различных метаболических путей, проблемах симбиотических взаимоотношений между разными таксонами, но внутриклеточные и межклеточные связи с разными уровнями организации материала наследственности в пространстве клеточного ядра по-прежнему остаются недостаточно исследованными.

В этом отношении проведенное совещание им. В. Бернхарда существенно отличается от многих традиционных клеточных, цитогенетических, молекулярно-генетических конференций, поскольку именно на этом совещании были собраны специалисты, в задачи которых входила, прежде всего, необходимость связать

молекулярно-генетические процессы классического жизненного цикла клетки, клеточного деления и ее гибели, в частности апоптоза, с теми событиями, которые происходят на цитологическом уровне, с динамическими событиями в жизни клеточного ядра, с поведением разных клеточных органелл.

Организация и проведение совещания были поддержаны грантом Европейского фонда регионального развития «Поддержка научных достижений и международной интеграции Латвийского института органического синтеза».

Работа совещания была открыта вступительным докладом председателя Международного комитета профессора Н. Сьяксте, в котором он подчеркнул, что специфические особенности проводимого научного форума, центральным вопросом которого является клеточное ядро, связаны с тем, что совещание организовано и проводится Институтом органического синтеза. Основной задачей этого научного учреждения является создание новых лекарственных средств, мишенью действия которых являются живые объекты на разных уровнях их организации, от конкретных нуклеотидных мотивов, клеток и клеточных популяций до популяционного уровня многоклеточных организмов включая поиск молекулярно-генетических маркеров предрасположенности к различным генетически детерминированным заболеваниям. Успешность и оптимизация разработок таких препаратов требуют развития знаний об организации материала наследственности и ключевых звеньев поддержки его целостности, обеспечения регуляции его функций, нарушения которых приводит к развитию различных патологий, в частности онкологических заболеваний. Очевидна правомерность такой постановки задачи, связанной с необходимостью последовательного увеличения «адресности» лекарственных средств, создания «золотой пули», специфичной для каждого патогена, для каждой

измененной клетки и клеточной популяции, о которой писал знаменитый исследователь, Нобелевский лауреат 1908 г. П. Эрлих.

Работа совещания была подразделена на 9 секций, на которых исследователи из 23 разных стран представили около 50 устных докладов по следующим темам: «Ядрышко и рРНК», «Хромосомы», «Полиплоидия», «Ядра растительных клеток», «Эпигенетика», «Транскрипция и ядерно-цитоплазматический транспорт», «Организация хроматина», «Развитие, старение и апоптоз» и секция «Повреждения ДНК и их репарация». По этим же темам были широко представлены стендовые доклады.

Совокупность докладов первой секции достаточно неожиданно высветила качественно новый подход к пониманию функции ядрышка, ранее обсуждавшийся в отдельных научных публикациях, а в данном случае представленный во всей своей полноте. Судя по накопленным данным, ядрышко функционирует не только для обеспечения биогенеза рибосом, но и как центральная органелла накопления и освобождения ключевых регуляторных сигналов прохождения клеточного цикла и клеточного деления. Динамика его формирования и инволюции является структурной основой цикличности клеточной жизни и, кроме того, вовлекается в сложные межхромосомные взаимодействия в интерфазном ядре. Интересным вопросом является обнаруженное присутствие пре-рРНК на хроматидах в анафазе и ее возможное участие в организации межхроматидных взаимодействий при продвижении хромосом к телофазе.

Секция «Хромосома» включала ряд докладов об архитектонике хромосом в интерфазном ядре, особенностях организации метафазных хромосом и сложности фибриллярной сети метафазной пластинки, элементы которой участвуют далее в анафазном движении хроматид. Особый интерес вызвал доклад А. Форера (Канада), в котором были, в частности, представлены экспериментальные данные о том, что в синхронном движении хроматид к полюсам клетки могут принимать участие те элементы, которые обеспечивают межхроматидные связи. По-видимому, дефекты описанной А. Форером сети могут быть связаны с известным феноменом асинхронности расщепления хроматид в конце метафазы, ассоциированного с нарушением сегрегации

хромосом и наблюдавшегося в клетках периферической крови человека в связи с повышенной предрасположенностью к лейкозам.

На секции «Полиплоидия» в представленных докладах рассматривались множественные функциональные значения этого явления – этап клеточной дифференцировки отдельных органов и тканей, один из вариантов выхода в апоптоз клеток с множественными повреждениями ДНК, способ избегания старения, а также реверсия к экспрессии эмбриональных генов. Подробно обсуждались цикличность и ее условия для полиплоидизации–деполиплоидизации, выхода полиплоидных клеток в митоз с формированием в последующем псевдодиплоидных клеточных клонов с повышенной генетической гетерогенностью между ними. В докладе Е. Эренпрейса (Латвия) обсуждались результаты собственных исследований, свидетельствующие о том, что в ряде случаев при эндополиплоидизации происходит активация экспрессии ряда генов, являющихся классическими маркерами эмбриональных стволовых клеточных популяций, обладающих плюрипотентностью. Значимость этих работ трудно переоценить, поскольку хорошо известно, что главной проблемой терапии онкологических заболеваний является поиск надежных маркеров именно стволовых, для данной опухоли, клеток, представленных менее одним процентом от всей клеточной популяции опухоли. Известно также, что одним из первых предопухолевых цитогенетических изменений является появление полиплоидных клеток, многополюсных митозов. Эти же явления наблюдаются в процессе «клеточного кризиса» в начальных стадиях адаптации клеток к культуральным условиям при их первичном посеве, перенесении из *in vivo* в *in vitro*. И если этот процесс в цикле полиплоидизации–деполиплоидизации сопровождается спонтанным формированием псевдодиплоидных стволовых плюрипотентных клеток, это может объяснить такие специфические особенности опухолевых клеток, как генетическая нестабильность, одновременная экспрессия эмбриональных и тканеспецифичных генов, а также облегчить поиск надежных маркеров стволовых для данной опухоли клеток.

На секции «Ядра растительных клеток» подробно рассматривались элементы ядерного



скелета, участвующие в организации хроматина; дефекты фактора фолдинга хроматина и связанные с ними укорочения теломер и делеции некоторых копий рДНК, функциональная значимость интегральных процессов ацетилирования/деацетилирования гистонов. В докладе П. Шау (Англия) представлена уникальная модель позиционной информации и разобраны ее генетические основы, когда клетка корешка арабидопсиса формирует волосок (трихобласт) только в том случае, если она расположена на межклеточном контакте двух клеток подлежащего слоя, но не на одиночной клетке (атрихобласт).

На секции «Эпигенетика» обсуждались особенности ядерного импорта в опухолевых клетках и возможности их использования для терапевтических целей; специфика изменений рисунка метилирования ДНК в материнском и отцовском пронуклеусах зиготы кроликов; спектры заболеваний, связанных с мутациями в генах, кодирующих белки ядерной ламина, а также в нуклеотидных последовательностях, оказывающих влияние на вовлечение проксимальных к этим мутациям участков геномной ДНК в ассоциации с элементами ядерного матрикса.

Секция «Транскрипция и ядерно-цитоплазматический транспорт» была представлена докладами, в которых подробно рассматривались структурно-функциональные особенности организации интерфазного ядра и их изменения в результате активации транскрипции отдельных участков, в том числе и при вирусной инфекции. Обсуждались гены, продукты которых участвуют в пересечении метаболических путей, вовлеченных в регуляцию генных сетей, в частности контролируемых глюкокортикоидными гормонами, при индукции выхода клеток в апоптоз при множественных повреждениях ДНК. В докладе А. Шарф (Чехия) наглядно продемонстрирован рисунок распределения убиквитин-протеосомной системы, принимающей участие в регуляции транскрипции, в пространствах интерфазного ядра, занятых эухроматином. Ярким событием стал доклад Т. Кремера (Германия), представившего подробный анализ различных уровней организации хроматина в трехмерном пространстве интерфазного ядра и их динамики в процессе вовлечения в транскрипцию различных геном-

ных областей, а также отличий динамических изменений хроматина во времени между интерфазными ядрами эмбриональных стволовых клеток мыши и фибробластов мыши.

На секции «Организация хроматина» рассматривалась зависимость упаковки хроматина в связи с разной транскрипционной активностью, проблемы оценок петлевой организации хроматина и участков его суперспирализации, обсуждались различные уровни фолдинга хроматина и возможности его моделирования на основании решения задач самосборки и упаковки полимера в заданные размеры интерфазного ядра на примере хромосом дрожжей. В докладе по моделированию Т. Охияма (Япония) приходит к выводу о том, что физические свойства геномной ДНК и селективные взаимоотношения между нуклеосомами, которые вступают в межнуклеосомные ассоциации в случае их связей с гомологичными последовательностями ДНК, являются ключевыми факторами механизмов фолдинга геномной ДНК. На этой же секции был представлен доклад М. Кремер (Германия), в котором она изложила, в частности, полученные ею данные по сравнительному анализу пространственных характеристик активно работающей хромосомы X и лайонизированной, образующей тельце Барра. Инактивация X-хромосомы обусловлена транскрипцией с локуса Xist длинной некодирующей РНК, связывающейся затем с хроматином X хромосомы и блокирующей транскрипцию ее основных районов. В докладе М. Кремер впервые было показано, что, несмотря на традиционные представления о том, что инактивированная X-хромосома представляет пример факультативного гетерохроматина, объемы территорий интерфазного ядра, занимаемых ДНК обеих X-хромосом, существенно не отличаются друг от друга. Основные отличия обусловлены упаковкой собственно хромосомы – инактивированная представляет собой округлое тельце, активная – вытянутую структуру, в которой отчетливо выделяются длинная ось и поперечная короткая. Эти данные открывают новый, ранее неизвестный уровень упаковки хроматина, связанный с геометрическими особенностями организации территории хромосомы в пространстве интерфазного ядра и, по-видимому, имеющий непосредственное отношение к суммарной транскрипционной активности хромосом.

Секция «Развитие, старение и апоптоз» объединяла доклады, в которых рассматривались, в частности, метаболические пути и изменения их взаимодействий в стрессирующих условиях, а также глубокие изменения структуры интерфазного ядра, вплоть до повреждения ядерной оболочки и выхода ядерных элементов в цитоплазму у стареющих клеток. Показаны тканеспецифические особенности клеточного ответа на стрессирующие факторы. Так, в докладе В. Видлака (Польша) представлены данные о том, что на соматических клетках (гепатоцитах) белки теплового шока выполняют защитную функцию, а на сперматоцитах – блокирующую экспрессию генов сперматогенеза и индуцирующую апоптоз.

Секция «Повреждения ДНК и их репарация» была представлена наибольшим количеством докладов. В них обсуждались ключевые звенья метаболических путей репарации ДНК, взаимодействий между ними; возможные механизмы вовлечения в эти процессы боковых метаболических путей, временные и генотипические особенности спектров повреждения ДНК генотоксическими агентами, а также избирательность действия некоторых ДНК-повреждающих агентов на определенные нуклеотидные мотивы. В ряде докладов были представлены экспериментальные данные об участии белка p53 в разных метаболических путях, контролирующих не только выход клеток с множественными повреждениями ДНК в апоптоз, но и процессы репарации. В докладе И. Ржешовска-Вольны (Польша), на основании анализа индуцируемых ионизирующим облучением изменений профилей генной экспрессии в ряде опухолевых клеточных линий человека обнаружено определенное сходство нуклеотидных мотивов в совокупности мРНК генов, экспрессия которых увеличивается. В частности, наблюдалась относительная перепредставленность нуклеотидных мотивов, комплементарных к членам различных семейств мРНК. Полученные данные позволяют предполагать определенное сходство событий, вовлеченных в ответ на ионизирующее облучение в

исследованных клеточных линиях, и участие в них регуляторных явлений, связанных с мРНК. В докладе С. Ходыревой (Россия) подробно рассматривался каскад ферментов, последовательно участвующих в репарации апурин/апириமிдиновых сайтов. Особый интерес вызвали доклады, в которых были представлены данные о протекторной роли по отношению к повреждениям ДНК, вызываемым окислительным стрессом, таких белков, как Тау (доклад М.-К. Галас, Франция), поли(АДФ-рибоза) полимеразы 1 (PARP-1), активность которой индуцируется некоторыми производными бета-карбонил-1,4-дигидропиридина (доклад Н. Рябоконт, Беларусь).

Доклады сопровождалась подробными обсуждениями, которые продолжались и у стендовых докладов, и в кулуарах совещания, а также в процессе блестяще организованной культурной программы.

На всех участников большое впечатление произвел органнй концерт (органист Е. Лисицина) с участием выдающейся певицы И. Багеле.

Проведенное совещание произвело на участников большое впечатление не только безупречной организацией его работы, отличными отелями и ресторанами, вечной красотой Риги, но и четкостью и понятностью мотивации организаторов совещания – Президента международного комитета профессора Н. Сяксте, Латвийского института органического синтеза, Латвийского университета, собравших на одну дискуссионную площадку специалистов в разных областях исследований структуры, функции, повреждений и репарации генетического материала. Именно это объединение еще раз продемонстрировало важность взаимодействий таких разных специалистов для успешного движения в поисках путей создания новых средств защиты, коррекции и управления работой генетического аппарата. Как отмечал великий физиолог И.П. Павлов, лауреат Нобелевской премии 1904 г.: «Нет ничего более практичного хорошей теории».

Материалы совещания представлены на сайте <http://www.wbw22.lv/?sub=36>

**Т.Т. Глазко**

Российский государственный аграрный университет МСХА  
им. К.А. Тимирязева, Москва

Отредактировано и подготовлено к печати  
в редакционно-издательском отделе ИЦиГ СО РАН

Редакторы: А.А. Ончукова, И.Ю. Ануфриева  
Дизайн: А.В. Харкевич  
Компьютерная графика: А.В. Харкевич, Т.Б. Коняхина  
Компьютерная верстка: Т.Б. Коняхина, Н.С. Глазкова

Подписано в печать 26.09.2011 г.  
Формат бумаги 60×84 1/8. Усл.-печ. л. 20,8. Уч.-изд. л. 19,6  
Тираж 400. Заказ 332

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН»  
630090, Новосибирск, Морской проспект, 2