ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Том 15

4

ОСНОВАН В 1997 г.

декабрь 2011

Содержание

ИЗОФОРМЫ РЕЦЕПТОРА ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ, ОБРАЗУЮЩИЕСЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ СТАР-	
ТОВ ТРАНСЛЯЦИИ мРНК В.М. Меркулов, Т.И. Меркулова	621
МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДНК ЖЕНЩИНЫ ИЗ ПЕЩЕРЫ КАМИННАЯ (ГОРНЫЙ АЛТАЙ) ЭПОХИ ПОЗДНЕГО НЕОЛИТА	
А.С. Пилипенко, В.И. Молодин, А.Г. Ромащенко	633
ПОИСК РЕГУЛЯТОРНЫХ SNPs, СВЯЗАННЫХ С РАЗВИТИЕМ РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ, В ГЕНАХ <i>АРС</i> И <i>MLH1</i>	
Е.В. Антонцева, Л.О. Брызгалов, М.Ю. Матвеева, Е.В. Кашина, Н.В. Чердынцева, Т.И. Меркулова	644
ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ <i>PEANUT</i> НА ДЕЛЕНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ И ГЕНЕРАТИВ- НЫХ КЛЕТОК <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	
К.А. Ахметова, С.А. Федорова	653
ОСОБЕННОСТИ СБОРКИ ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКИ В ПРОЦЕССЕ МИТОЗА В РАННИХ ЭМБРИОНАХ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	
А.А. Струнов, Е.А. Онищенко, Е.В. Киселева	661
ХАРАКТЕРИСТИКА ВРЕМЕННЫХ ПАРАМЕТРОВ ПРОЯВЛЕНИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙ- СТВИЯ ИНЪЕКЦИЙ ЭКЗОГЕННОЙ ДНК НА ФОНЕ ПРЕДОБРАБОТКИ ЦИТОСТАТИКОМ ЦИК ПОФОСФАНОМ	
Е.В. Долгова, А.С. Проскурина, В.П. Николин, Н.А. Попова, Е.А. Алямкина, К.Е. Орищенко, А.Г. Шилов, Я.Р. Ефремов, Е.Р. Черных, А.А. Останин, С.С. Богачев, А.В. Прокопенко, Е.М. Малкова, О.С. Тара- нов, Т.С. Гвоздева, В.А. Рогачев, С.Н. Загребельный, М.А. Шурдов	674
ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ЭКСТЕРЬЕРНЫХ И ИНТЕРЬЕРНЫХ ПРИЗНАКОВ ХОРЬКОВ (<i>MUSTELA PUTORIUS</i> LINNAEUS, 1758) В ХОДЕ ИХ ПРОМЫШЛЕННОЙ ДОМЕСТИ- КАЦИИ	
О.И. Федорова, Е.А. Тюрина	690
ПЕРВЫЕ ЭТАПЫ ПРОМЫШЛЕННОЙ ДОМЕСТИКАЦИИ СТЕПНОГО СУРКА (<i>MARMOTA BOBAK</i> MULLER, 1776)	
О.И. Федорова	697

О РАЗВЕДЕНИИ, МЕЖВИДОВОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ И СОХРАНЕНИИ ГЕНОФОНДОВ ПУШНЫХ ЗВЕРЕЙ, ИМЕЮЩИХ ОБЛИГАТНУЮ ЭМБРИОНАЛЬНУЮ ДИАПАУЗУ Г.К. Исакова	705
АБЕРРАНТНАЯ ОКРАСКА «ЧЕРНЫЙ ОГУЗОК» У КРАСНОЙ ПОЛЕВКИ (<i>MYODES RUTILUS</i>) ИЗ ОКРЕСТНОСТЕЙ НОВОСИБИРСКОГО АКАДЕМГОРОДКА	
М.А.Потапов, П.М. Бородин, Т.И. Аксенович, В.В.Панов, О.Ф.Потапова, Л.А.Прасолова, В.И. Евсиков.	709
ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА СЕМЕЙСТВА АЛЬФА-МАКРОГЛОБУЛИНОВ СВИНЬИ В СВЯЗИ С НЕКОТОРЫМИ ПРОБЛЕМАМИ СЕЛЕКЦИИ В.И. Ермолаев, М.А. Савина, С.П. Князев, Н.С. Юдин, Р.Б. Айтназаров, В.А. Бекенев, В.С. Деева,	720
С.В. Никитин	/20
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ХРОМАТИНА В ЯДРАХ РАСТУЩИХ ООЦИТОВ XENOPUS LAEVIS К.Н. Морозова, А.А. Струнов, Е.В. Киселева	732
НОВОЕ ОГРАНИЧЕНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ИХ ПРИМЕНЕ- НИЯ В ПОПУЛЯЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ (НА ПРИМЕРЕ ПАНМИКТИЧЕСКИХ	
ПОПУЛЯЦИИ) В.В. Горбачев	746
RELATIVELY CONSERVED COMMON SHORT SEQUENCES IN TRANSCRIPTION FACTOR BINDING SITES AND miRNA	
P. Putta, Yu.L. Orlov, N.L. Podkolodnyy, C.K. Mitra	750
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИ- ЗАЦИИ ГЕНОВ И ГЕНОМОВ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ <i>Е.К. Хлесткина</i>	757
ЭВОЛЮЦИЯ БАЗОВОГО ЧИСЛА ХРОМОСОМ В СЕМЕИСТВЕ ЗЛАКОВЫХ (РОАСЕАЕ BARNH.)	
А.И. Щапова	769
НОВЫЙ МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ ПРИЗНАК В РОДЕ <i>TRITICUM</i> L. Е.В. Твердохлеб	781
1	
КОМПЬЮТЕРНАЯ СИСТЕМА WheatPGE ДЛЯ АНАЛИЗА ВЗАИМОСВЯЗИ ФЕНОТИП- ГЕНОТИП-ОКРУЖАЮЩАЯ СРЕДА У ПШЕНИЦЫ	
М.А. Генаев, А.В. Дорошков, Е.В. Морозова, Т.А. Пшеничникова, Д.А. Афонников	784
ВЗАИМОСВЯЗЬ КОРМОВОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ С ВЫСОТОЙ РАСТЕНИЙ И ПРО- ДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ПЕРИОДА ВЕГЕТАЦИИ ЛЮЦЕРНЫ В ЗАСУШЛИВОМ ПОВОЛЖЬЕ	
Т.Н. Попова, В.А. Найдович	794
РЕПРОДУКТИВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РОЗО- ВОЦВЕТКОВОГО ДЕКОРАТИВНОГО ГИБРИДА <i>FRAGARIA</i> × <i>POTENTILLA</i> (COPT FREL) В СЕЛЕКЦИИ КРУПНОПЛОДНОЙ ЗЕМЛЯНИКИ <i>С.О. Батудин, Л.Л. Кузнецова</i>	800
ТРАНСПЛАСТОМНЫЕ РАСТЕНИЯ <i>С.Н. Щелкунов, Ю.М. Константинов, Е.В. Дейнеко</i>	808

ГМО И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ РАСТЕНИЙ: ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ И АГРОТЕХНИ- ЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ	
Ю.В. Чесноков	818
ОТ СЪЕЗДА – К СЪЕЗДУ: ВЕКОВАЯ ПОСТУПЬ СЕЛЕКЦИОНЕРОВ-РАСТЕНИЕВОДОВ В.Н. Ожерельева, В.В. Кириченко	828
АКАДЕМИК РАН НИКОЛАЙ ПАВЛОВИЧ БОЧКОВ (19.10.1931–28.09.2011)	833

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

FOUNDED IN 1997

4

December 2011

Content

GLUCOCORTICOID RECEPTOR ISOFORMS GENERATED BY ALTERNATIVE SPLICING AND ALTERNATIVE TRANSLATION INITIATION V.M. Merkulov, T.I. Merkulova	621
MITOCHONDRIAL DNA OF A LATE NEOLITHIC WOMAN FROM KAMINNAYA CAVE (GORNY ALTAI)	
A.S. Pilipenko, V.I. Molodin, A.G. Romashchenko	633
SEARCH FOR REGULATORY SNPs ASSOCIATED WITH COLON CANCER IN THE APC AND MLH1 GENES	
E.V. Antontseva, L.O. Bryzgalov, M.Yu. Matveeva, E.V. Kashina, N.V. Cherdyntseva, T.I. Merkulova	644
EFFECT OF MUTATIONS IN THE <i>PEANUT</i> GENE ON SOMATIC AND GERM LINE CELL DIVISION IN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	
K.A. Akhmetova, S.A. Fedorova	653
A FEATURE OF NUCLEAR ENVELOPE FORMATION DURING MITOSIS IN EARLY DROSOPHILA MELANOGASTER EMBRYOS A.A. Strunov, E.A. Onischenko, E.V. Kiseleva	661
TIME-COURSE ANALYSIS OF THE TOXIC ACTION OF EXOGENOUS DNA ADMINISTERED UPON CYCLOPHOSPHAMIDE PRETREATMENT E.V. Dolgova, A.S. Proskurina, V.P. Nicolin, N.A. Popova, E.A. Alyamkina, K.E. Orishchenko, A.G. Shilov,	
Y.R. Efremov, E.R. Chernykh, A.A. Ostanin, S.S. Bogachev, A.V. Procopenko, E.M. Malkova, O.S. Taranov, T.S. Gvozdeva, V.A. Rogachev, S.N. Zagrebelniy, M.A. Shurdov	674
REORGANIZATION OF EXTERNAL AND INTERNAL FEATURES IN FERRETS (<i>MUSTELA PUTORIUS</i> LINNAEUS, 1758) UNDER FARMING DOMESTICATION	(00
O.I. Fedorova, E.A. Iyurina	690
INITIAL STEPS OF FARM DOMESTICATION OF THE STEPPE MARMOT (<i>MARMOTA BOBAK</i> MULLER, 1776)	
O.I. Fedorova	697

BREEDING, INTERSPECIES HYBRIDIZATION, AND PRESERVATION OF THE GENE POOLS OF FUR-BEARING CARNIVORES WITH AN OBLIGATE EMBRYONIC DIAPAUSE <i>G.K. Isakova</i> .	705
THE ABERRANT «BLACK RUMP» COAT COLORATION IN NORTHERN RED-BACKED VOLES (<i>MYODES RUTILUS</i>) CAUGHT IN THE VICINITY OF THE NOVOSIBIRSK ACADEM- COPODOK	
M.A. Potapov, P.M. Borodin, T.I. Axenovich, V.V. Panov, O.F. Potapova, L.A. Prasolova, V.I. Evsikov	709
STUDY OF THE SWINE ALPHA-MACROGLOBULIN GENE FAMILY POLYMORPHISM IN THE CONTEXT OF SOME PROBLEMS OF ANIMAL BREEDING V.I. Yermolaev, M.A. Savina, S.P. Knyazev, N.S. Yudin, R.B. Aitnazarov, V.A. Bekenev, V.S. Deeva, S.V. Nikitin.	720
A CHROMATIN DISTRIBUTION IN NUCLEI OF GROWING XENOPUS LAEVIS OOCYTES K.N. Morozova, A.A. Strunov, E.V. Kiseleva	732
A NEW LIMITATION OF MICROSATELLITE MARKERS FOR THEIR USE IN POPULATION RESEARCH BY THE EXAMPLE OF PANMICTIC POPULATIONS V.V. Gorbachev	746
RELATIVELY CONSERVED COMMON SHORT SEQUENCES IN TRANSCRIPTION FACTOR BINDING SITES AND miRNA <i>P. Putta, Yu.L. Orlov, N.L. Podkolodnyy, C.K. Mitra</i>	750
MOLECULAR METHODS OF THE ANALYSIS OF THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ORGANIZATION OF GENES AND GENOMES IN HIGHER PLANTS E.K. Khlestkina	757
EVOLUTION OF THE BASIC CHROMOSOME NUMBER IN POACEAE (BARNH.) <i>A.I. Shchapova</i>	769
A NEW MORPHOLOGICAL TRAIT IN THE GENUS <i>TRITICUM</i> L. <i>E.V. Tverdokhleb</i>	781
WheatPGE: A SYSTEM FOR ANALYSIS OF RELATIONSHIPS AMONG PHENOTYPE, GENOTYPE AND ENVIRONMENT IN WHEAT M.A. Genaev, A.V. Doroshkov, E,V. Morozova, T.A. Pshenichnikova, D.A. Afonnikov	784
CORRELATIONS OF ALFALFA FORAGE YIELD WITH PLANT HEIGHT AND VEGETATION DURATION IN THE DROUGHTY VOLGA REGION T.N. Popova, V.A. Naydovich	794
REPRODUCTION FEATURES OF THE PINK-FLOWERING ORNAMENTAL <i>FRAGARIA</i> × <i>POTENTILLA</i> (CV. FREL) HYBRID AND PROSPECTS OF ITS USE IN GARDEN STRAWBERRY BREEDING	
S.O. Baturin, L.L. Kuznetsova	800
TRANSPLASTOME PLANTS S.N. Shchelkunov, Yu.M. Konstantinov, E.V. Deineko	808
GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS AND GENETIC POOLS OF PLANTS: ENVIRONMENTAL AND AGRICULTURAL SAFETY Yu V Chesnokov	818
	010

FROM CONGRESS TO CONGRESS: AGE-OLD STEP OF PLANT BREEDERS V.N. Ozherelieva, V.V. Kirichenko	828
ACADEMICIAN NIKOLAY PAVLOVICH BOCHKOV (19.10.1931–28.09.2011)	833

ИЗОФОРМЫ РЕЦЕПТОРА ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ, ОБРАЗУЮЩИЕСЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ СТАРТОВ ТРАНСЛЯЦИИ мРНК

В.М. Меркулов, Т.И. Меркулова

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, email: merkti@niboch.nsc.ru

Рецептор глюкокортикоидных гормонов (NR3C1) – транскрипционный фактор, контролирующий множество физиологических процессов в организме млекопитающих. По современным оценкам рецептор глюкокортикоидов участвует в регуляции экспрессии тысяч генов, однако наборы таких генов в различных типах клеток существенно отличаются. Различаются также амплитуда, направленность, временная и дозовая зависимость ответа на гормон как для одного и того же гена в разных типах клеток, так и для разных генов в одной и той же клетке. Такая специфичность действия рецептора глюкокортикоидов обусловлена, с одной стороны, особенностями организации регуляторных районов его генов-мишеней, а с другой – сложностью организации гена самого рецептора, имеющего 9 альтернативных промоторов и дающего начало множеству белковых изоформ за счет альтернативного сплайсинга мРНК и использования альтернативных стартов трансляции. В настоящем обзоре обобщены современные знания об изоформах рецептора глюкокортикоидов и механизмах их образования.

Ключевые слова: рецептор глюкокортикодов, ген, промоторы, альтернативный сплайсинг, старты трансляции, изоформы белка.

Введение

Глюкокортикоидные гормоны контролируют множество физиологических процессов в организме позвоночных животных. Глюкокортикоиды участвуют в регуляции углеводного, белкового и липидного обмена, в поддержании водного и электролитного баланса, обладают антивоспалительным и иммуносуппрессорным действием. Эти гормоны играют важную роль в адаптации организма к различным «стрессам», таким, как травма, тяжелые инфекционные заболевания, интоксикация и т. п. Они также вносят существенный вклад в регуляцию процессов размножения и поведения (Hierholze, Buhler, 1996; Sapolsky et al., 2000). Глюкокортикоиды вовлечены в контроль пролиферации, дифференцировки и апоптоза многих типов клеток, при этом эффекты глюкокортикоидов в разных клетках могут быть прямо противоположными (Hierholze, Buhler, 1996). В частности, хорошо

известно, что эти гормоны оказывают антипролиферативное действие на большинство типов клеток (Fowden, Forhead, 2009), однако есть данные о стимулировании пролиферации некоторых из них, например клеток эпителия тонкого кишечника (Tutton, Barkia, 1988). Известно также, что глюкокортикоиды вызывают апоптоз макрофагов, моноцитов и Т-лимфоцитов, но оказывают антиапоптогенное действие на клетки эндометрия, эпителия молочной железы, фибробласты и гепатоциты (Viegas *et al.*, 2008).

Действие глюкокортикоидов на клетки-мишени реализуется через их связывание с внутриклеточным белком-рецептором. Рецептор глюкокортикоидов (ГР, NR3C1) является лиганд-активируемым фактором транскрипции из суперсемейства ядерных рецепторов (Смирнов, 2002). После связывания с гормоном и перехода из цитоплазмы в ядро клетки ГР осуществляет позитивную или негативную регуляцию генов, присоединяясь к опознаваемым им участкам ДНК (элементы глюкокортикоидной регуляции, GREs) и/или вступая в белок-белковые взаимодействия с другими факторами транскрипции (Kumar, Thompson, 2005; Kassel, Herrlich, 2007).

В геноме млекопитающих имеется только один ген, кодирующий ГР. Обеспечивая огромное многообразие эффектов глюкокортикоидных гормонов, этот ген экспрессируется практически во всех типах клеток организма (Thompson, 1987), и продукт его является регулятором экспрессии множества генов. По грубым прикидкам, основанным на данных массового выявления контролируемых глюкокортикоидами генов в различных типах клеток, число генов-мишеней ГР в геноме человека может составлять до 10-20 % от всех генов (Lu et al., 2007; Oakley, Cidlowski, 2011). Однако наборы таких генов в различных типах клеток существенно различаются (So et al., 2007). Различаются также амплитуда, направленность, временная и дозовая зависимость ответа на гормон как для одного и того же гена в разных типах клеток, так и для разных генов в одной и той же клетке (John et al., 2009).

Такая специфичность действия ГР обеспечивается целым рядом механизмов, среди которых можно выделить две основные группы. В основе механизмов первой группы лежит структура самого гена ГР, включающая наличие множества альтернативных промоторов (Сао-Lei et al., 2011) и допускающая образование различных изоформ белка-рецептора за счет альтернативного сплайсинга мРНК и использования альтернативных стартов трансляции при синтезе белка (Oakley, Cidlowski, 2011). Основа второй группы механизмов заложена в организации регуляторных районов генов-мишеней ГР и включает как особенности структурной организации GREs (Merkulov, Merkulova, 2009), так и возможность взаимодействия ГР с другими транскрипционными факторами, сайты связывания которых могут находиться как вблизи GREs, так и на значительном удалении от них в тех же самых или в других регуляторных районах гена (Truss, Beato, 1993; Schoneveld et al., 2004). В настоящем обзоре на примере гена ГР человека приводятся анализ и обсуждение механизмов первой группы.

1. Альтернативные промоторы гена ГР

Согласно последним данным, не менее половины генов человека имеют альтернативные промоторы – в среднем на ген приходится 3,1 промотора (Kimura et al., 2006). Для гена ГР человека к настоящему времени идентифицировано 9 альтернативных промоторов. Эти промоторы сконцентрированы в двух районах: проксимальном, занимающем ~5 т.п.н. перед стартом трансляции, и дистальном, находящемся на расстоянии ~ -30 т.п.н. относительно этого старта (Breslin et al., 2001; Turner, Muller, 2005, Presul et al., 2007; Cao-Lei et al., 2011). Все промоторы расположены перед альтернативными первыми экзонами гена ГР (рис. 1). Соответствующие варианты мРНК образуются в результате соединения донорных сайтов сплайсинга этих экзонов с акцепторным сайтом сплайсинга экзона 2, в котором расположен стартовый кодон белоккодирующей последовательности рецептора. Таким образом, формируется серия мРНК, кодирующих один и тот же белок, но различающихся по длине и структуре 5'-UTR. Число вариантов мРНК с различными 5'-UTR увеличивается изза существования внутренних донорных сайтов сплайсинга в экзонах 1А (Breslin et al., 2001) и 1С (Turner, Muller, 2005) (рис. 1).

Показано, что представленность вариантов мРНК с разными 5'-UTR может существенно варьировать в различных органах, тканях и типах клеток человека. В частности, при исследовании клеток крови и биопсийного материала из ряда органов было установлено, что мРНК, содержащая экзон 1D, обнаруживается исключительно в гиппокампе, при том, что гиппокамп оказался единственным органом, где были найдены все варианты мРНК с различными 5'-UTR. Транскрипты, содержащие экзоны 1Е и 1F, экспрессируются преимущественно в клетках иммунной системы (Turner, Muller, 2005). Экспрессия транскриптов, включающих варианты экзона 1А, происходит в основном в клетках гемопоэтического ряда (Breslin et al., 2001), тогда как транскрипт с экзоном 1G кроме этих клеток встречается также в печени, легких и сердечной мышце (Turner, Muller, 2005). Наиболее широко представленными в различных органах и типах клеток оказались транскрипты, содержащие экзоны 1В и 1СЗ (Turner, Muller,



Рис. 1. Альтернативные нетранслируемые экзоны 1 гена ГР человека (по: Presul et al., 2007).

Экзоны показаны темными стрелками. Светлые стрелки – укороченные варианты экзонов 1А и 1С. АТG – старт трансляции.

2005). Причины тканевой специфичности использования различных промоторов пока не ясны. Скорее всего, они заключаются в специфике наборов регуляторных элементов (сайтов связывания транскрипционных факторов) в альтернативных промоторах гена ГР. К настоящему времени выявлено уже немало таких сайтов как в проксимальном, так и дистальном регуляторных районах гена ГР (см. обзор Turner et al., 2010). Однако поскольку большая часть идентифицированных на данный момент сайтов принадлежит вездесущим факторам транскрипции (Sp1, AP1, AP2, YY1, NF-кВ, ГР), очевидно, что для выяснения механизмов тканевой специфичности требуется дальнейшее изучение этих районов.

Известно также, что содержание вариантов мРНК ГР с разными 5'-UTR может по-разному изменяться под действием регуляторных сигналов. Показано, например, что уровень мРНК, содержащей варианты экзона 1А, резко изменяется в ответ на обработку клеточных линий CEM-C7 и IM-9 глюкокортикоидными гормонами, тогда как уровни мРНК, содержащих экзоны 1В и 1СЗ, не меняются. При этом оказалось, что под действием глюкокортикоидов содержание транскриптов, включающих 1А, возрастает в клетках линии СЕМ-С7 (выделена из Т-лимфоцитов больного острой лимфобластной лейкемией), где глюкокортикоидные гормоны вызывают апоптоз, и снижается в клетках В-лимфомы (IM-9), где этого не происходит (Breslin et al., 2001). «Переключателем» индукции/репрессии служит расположенный в промоторе 1А композиционный элемент, включающий «полусайт» связывания ГР – TGTTCT (Merkulov, Merkulova, 2009) и участок, с которым связываются либо с-Муb, либо PU.1 (Geng, Vedeckis, 2005). В клетках CEM-C7 с высоким уровнем экспрессии с-Муb и низким уровнем экспрессии PU.1 с композиционным элементом связывается комплекс с-Муb-ГР, что приводит к усилению синтеза транскриптов, содержащих экзон 1А, а в IM-9 клетках, где ситуация обратная – связывание комплекса PU.1-ГР с тем же элементом приводит к подавлению транскрипции (Geng, Vedeckis, 2005).

Такая сложная картина распределения мРНК ГР с различными вариантами 5'-UTR, зависящая от типа и состояния клеток, ставит вопрос о том, какую функциональную нагрузку могут нести эти белок-некодирующие последовательности. В настоящее время предлагаются несколько возможных механизмов влияния альтернативных 5'-UTR на структуру и уровень экспрессии соответствующего белкового продукта.

Во-первых, альтернативные 5'-UTR могут формировать разные вторичные структуры и различаться по составу регуляторных сигналов, что может влиять на эффективность экспорта соответствующих мРНК из ядра, их стабильность и интенсивность трансляции. Существование этих механизмов показано на примере ряда генов (Derrigo et al., 2000; Hughes, 2006). Для ГР таких данных пока получить не удалось. Так, было показано, что в клетках линии СЕМ-С7 человека стабильность вариантов мРНК ГР, содержащих экзоны 1В, 1С и 1АЗ, одинакова. Не отличалась также и интенсивность их трансляции, которая измерялась в экспериментах по трансфекции плазмидных конструкций, экспрессирующих эти варианты мРНК в Е8.2 клетки мыши (Pederson et al., 2004). Однако, поскольку другие варианты мРНК ГР пока не изучались, преждевременно отвергать возможность участия перечисленных механизмов в глюкокортикодной регуляции.

Во-вторых, альтернативные 5'-UTR за счет специфики их пространственной структуры могут влиять на альтернативный сплайсинг белок-кодирующих экзонов и, соответственно, на продукцию разных изоформ белка (Hughes, 2006). Сами альтернативные промоторы также могут влиять на выбор вариантов сплайсинга, что обусловлено физическими контактами транскрипционной машины и сплайсосомы (Maniatis, Reed, 2002; Kornblihtt, 2005). Показано, в частности, что связывание специфических наборов факторов транскрипции в промоторном районе гена может определять выбор того или иного варианта сплайсинга (Nogues et al., 2002; Rosonina et al., 2003). В настоящее время уже есть несколько примеров, когда образование определенных изоформ ГР за счет альтернативного сплайсинга определяется либо структурой 5'-UTR мРНК, либо использованием определенных промоторов в процессе транскрипции (приведены в Разделе 2).

В-третьих, альтернативные 5'-UTR могут влиять на выбор сайтов инициации трансляции (Hughes, 2006). В гене ГР идентифицировано 8 альтернативных сайтов инициации трансляции и, соответственно, выявлено 8 трансляционных изоформ белка (Lu, Cidlowski, 2006). Однако вопрос о связи альтернативных 5'-UTR мРНК ГР с продукцией его трансляционных изоформ до сих пор остается почти неизученным. На настоящий момент лишь в единственной работе имеются сведения об усилении продукции одной из изоформ ГР при использовании конкретного промотора (приводятся в Разделе 3).

2. Изоформы ГР, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга мРНК

Альтернативный сплайсинг мРНК является одним из основных механизмов образования нескольких белковых продуктов с одного гена. По современным оценкам мРНК 92–94 % мультиэкзонных генов человека подвержены альтернативному сплайсингу, и в среднем на каждый ген приходится 3 изоформы белка, образующиеся с использованием этого механизма (Pan *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Для ГР в настоящее время известны 8 таких изоформ (рис. 2, 3), в формировании которых участвуют 8 транслируемых экзонов кодирующего этот белок гена – экзоны 2–9 (Encio *et al.*, 1991).

Первый транслируемый экзон (экзон 2) кодирует аминотерминальный (NTD) или так называемый иммуногенный домен ГР (а.о. 1–419),



Рис. 2. Изоформы ГР, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга (по: Oakley, Cidlowski, 2011).

Экзоны обозначены арабскими цифрами, интроны – римскими. α и β – участки экзона 9, кодирующие С-конец ГРα и ГРβ соответственно. NTD – аминотерминальный домен, DBD – ДНК-связывающий домен, LBD – лиганд-связывающий домен; цифры справа – длина белковой молекулы в а.о.



Рис. 3. Варианты альтернативного сплайсинга мРНК ГР человека с делециями экзона 2 различной длины (по: Geng *et al.*, 2005).

1А1/Е2дист – соединение донорного сайта сплайсинга экзона 1А1 с внутренним дистальным акцепторным сайтом сплайсинга экзона 2; 1А2/Е2прокс – соединение донорного сайта сплайсинга экзона 1А2 с внутренним проксимальным акцепторным сайтом экзона 2; 1А3/Е3 – соединение донорного сайта сплайсинга экзона 1А3 с акцепторным сайтом экзона 3; 1B/E3 – соединение донорного сайта сплайсинга экзона 1В с акцепторным сайтом экзона 3. AF1 – ответственный за трансактиваторные функции участок аминотерминального домена.

основной функцией которого является активация транскрипции генов-мишеней рецептора за счет взаимодействия с компонентами базальной транскрипционной машины (Ford et al., 1997) и/или с коактиваторными белками (Robyr et al., 2000). Ответственный за эти функции участок τ,, он же AF-1, расположен в районе 77–262 a.o. аминотерминального домена (Miesfeld et al., 1987). Экзоны 3 и 4 кодируют ДНК-связывающий домен ГР (DBD; 420-480 a.o.), при этом каждый из цинковых пальцев этого домена кодируется отдельным экзоном. Экзоны 5-8 и 5'-конец экзона 9 совместно кодируют гормон-связывающий домен (LBD) ГР. Помимо связывания гормона этот домен также осуществляет ряд других функций. Во-первых, в отсутствие глюкокортикоидов он обеспечивает связывание ГР с белками теплового шока, что необходимо для локализации свободного рецептора в цитоплазме клетки (Pratt, 1993). Во-вторых, домен содержит сигналы ядерной локализации и участвует в транспорте гормон-рецепторного комплекса в ядро клетки и его димеризации (Picard, Ymamoto, 1987). И наконец, гормон-связывающий домен ГР, так же, как и его иммуногенный домен, содержит трансактиваторные участки: т, и AF-2 (Hollenberg, Evans, 1988; Danielian et al., 1992), опознаваемые рядом коактиваторных белков. За счет альтернативного сплайсинга формируются изоформы ГР, укороченные с С- или N-конца, а также изоформы с внутренними делецией и вставкой.

2.1. ГРа и ГРβ

ГРа и ГРВ образуются в результате использования альтернативных акцепторных сайтов сплайсинга в экзоне 9 (рис. 2) Эти изоформы рецептора идентичны вплоть до аминокислотного остатка 727, после которого ГРа содержит 50 уникальных а.о., а ГРβ-15 а.о. ГРα представляет собой классический рецептор глюкокортикоидов, в отсутствие гормона находится в цитоплазме клетки в комплексе с белками теплового шока и функционирует как лиганд-зависимый транскрипционный фактор. Специфичный для ГРа участок кодирует фрагмент лиганд-связывающего домена, необходимый для связывания глюкокортикоидов, для взаимодействия с белками теплового шока, а также для трансактиваторной функции рецептора (район AF2). ГРВ не способен связываться с гормоном, постоянно находится в ядре клетки и является доминантным ингибитором ГРа (Oakley et al., 1996, 1997). Предложено несколько механизмов антагонистического действия ГРВ, которые включают его конкуренцию с ГРа за места посадки в регуляторных районах генов (GREs), конкуренцию за коактиваторы, а также образование неактивных гетеродимеров Γ Pα/ Γ Pβ (Oakley *et al.*, 1999).

Так же, как и мРНК ГРа, мРНК ГР β обнаруживается повсеместно (Bamberger *et al.*, 1995; Oakley *et al.*, 1996), хотя выявляется на существенно более низком уровне. При этом в норме в большинстве тканей и клеточных линий содержание β изоформы белка либо в десятки раз ниже, чем содержание нормального рецептора, либо она вообще не детектируется (Oakley et al., 1997; Pujols et al., 2002). Поэтому какое-то время существовало мнение, что изоформа ГРВ может вообще не иметь функционального значения (Hecht et al., 1997). Однако в некоторых типах клеток, таких, как нейтрофилы и клетки эпителия желчных протоков печени и терминальных бронхиол легких, ГРВ экспрессируется на весьма высоком уровне (Oakley et al., 1997; Oakley, Cidlowski, 2011). Показано также, что β изоформа ГР может стать доминирующей при обработке клеток провоспалительными цитокинами TNFa и IL1, и это может быть механизмом развития нечувствительности к глюкокортикоидным гормонам (Webster et al., 2001). Напротив, агенты, увеличивающие относительный уровень экспрессии а изоформы (например, метотрексат, широко используемый для лечения аутоиммунных заболеваний и воспаления), повышают чувствительность клеток к глюкокортикоидам (Goecke et al., 2007). Высокий уровень ГРВ наблюдается у ряда пациентов с нечувствительными к гормональной терапии формами астмы, ревматоидного артрита, системной красной волчанки, острой лимфобластоидной лейкемией и др. (Lewis-Tuffin, Cidlowski, 2006). Массовые анализы экспрессии генов показали, что ГРВ может индуцировать и репрессировать множество генов, нерегулируемых ГРа, т. е. помимо ингибирования действия а изоформы ГР, ГРВ обладает собственными регуляторными функциями (Lewis-Tuffin et al., 2007; Kino et al., 2009).

Причины повышенной продукции ГРВ-изоформы пока до конца не выяснены. Однако установлено, что в нейтрофилах это явление связано с преобладанием одного белка из группы серинаргинин-обогащенных факторов сплайсинга – SRp30c. Показано, что подавление экспрессии этого белка с помощью РНК-интерференции приводит к существенному снижению содержания ГРβ при возрастании концентрации ГРα (Хи et al., 2003). Такие же результаты получены на клеточной линии рака предстательной железы (Zhu et al., 2007). Другой известной причиной является встречающийся у людей полиморфизм (АЗ669G), разрушающий участок дестабилизации AUUUA в мРНК ГРВ, что приводит к увеличению продолжительности ее жизни и,

соответственно, накоплению данной изоформы рецепторного белка (Schaaf, Cidlowski, 2002).

2.2. ГР-П

Кроме ГРВ известна еще одна изоформа ГР, укороченная с С-конца, – ГР-П. Причиной ее образования является нарушение в процессе сплайсинга, когда расположенный между экзонами 7 и 8 интрон VII не вырезается (рис. 2). В самом начале этого интрона в рамке считывания расположен стоп-кодон, что приводит к синтезу белка с укороченным на 101 о.а. лиганд-связывающим доменом, не способным связывать глюкокортикоидные гормоны. Изоформа первоначально была обнаружена в клетках гормоннечувствительной множественной миеломы (Moalli et al., 1993). У ряда пациентов в этих клетках содержание мРНК ГР-П превышает содержание мРНК ГР-а. мРНК ГР-П найдена также в клетках некоторых других злокачественных опухолей и даже в нормальных лимфоцитах, где ее содержание составляет менее 20 % от суммарной мРНК ГР. В экспериментах по котрансфекции показано, что в зависимости от используемой клеточной линии присутствие ГР-П может оказывать как позитивный, так и негативный эффект на опосредуемую ГР-а глюкокортикоидную индукцию (de Lange et al., 2001).

Важно отметить, что продукция ГР-П связана с использованием одного из альтернативных промоторов гена ГР человека. Так, на клеточной линии лимфобластов показано, что при образовании этой изоформы преимущественно используется промотор 1С, в то время как для продукции классического ГР (ГРа) – промотор 1В (Russcher *et al.*, 2007).

2.3. Изоформы ГР-А и ГРу

Известны также одна изоформа с делецией внутренних районов ГР и одна – со вставкой в район экзона 4. ГР-А-изоформа образуется в результате присоединения донорного сайта сплайсинга в конце экзона 4 к акцепторному сайту в начале экзона 8 без нарушения рамки считывания, в результате чего в белке отсутствует часть гормон-связывающего домена, кодируемая экзонами 5, 6, и 7 (рис. 2). Эта изоформа не способна связывать гормон и обнаружена в клетках гормон-нечувствительной множественной миеломы (Moalli *et al.*, 1993).

Причиной образования у-изоформы ГР является использование альтернативного донорного сайта сплайсинга в начале интрона III, в результате чего экзон 3 удлиняется на 3 нуклеотида и в белке появляется вставка остатка аргинина между цинковыми пальцами ДНК-связывающего домена. ГРү не отличается от ГРа по способности связывать гормон и взаимодействовать с GREs, но характеризуется пониженной способностью активировать экспрессию большинства геновмишеней (Ray et al., 1996; Meijsing et al., 2009). Однако для некоторых генов ГРу оказывается более сильным активатором (Meijsing et al., 2009). С экспрессией ГРу связывают нечувствительность к глюкокортикоидной терапии кортикотрофных аденом и детской острой лимфобластоидной лейкемии (Ray et al., 1996; Beger et al., 2003).

2.4. Укороченные с N-конца изоформы ГР

Все найденные на настоящий момент укороченные с N-конца изоформы ГР образуются при участии лишь некоторых из альтернативных экзонов 1. Во-первых, обнаружены варианты мРНК с пропущенным экзоном 2, получающиеся в результате присоединения донорных сайтов сплайсинга экзонов 1В и 1АЗ к акцепторному сайту сплайсинга экзона 3, что приводит к появлению варианта ГР, лишенного иммуногенного домена (рис. 3). Еще 2 укороченные с N-конца изоформы ГР образуются за счет использования альтернативных акцепторных сайтов сплайсинга экзона 2. Показано, что донорный сайт экзона 1А1 может присоединяться к дистальному акцепторному сайту, а донорный сайт экзона 1А2 – к проксимальному (Geng et al., 2005). Описанные варианты мРНК имеются в небольших количествах в клетках CEM-C7 и IM-9. Продуцируемые с них белковые изоформы находятся в клеточном ядре вне зависимости от присутствия глюкокортикоидных гормонов (Geng et al., 2005).

3. Трансляционные изоформы ГР

Помимо альтернативного сплайсинга премРНК, к образованию различных изоформ белка может приводить использование альтернативных стартов трансляции зрелой мРНК (Коchetov, 2008). Согласно работам лаборатории Дж.А. Цидловски (Yudt, Cidlowski, 2001; Lu, Cidlowsky, 2005, 2006; Oakley, Cidlowski, 2011), c мРНК ГРα считываются несколько форм белка, отличающихся по размеру N-концевого района. Авторы показали, что синтез этих форм осуществляется за счет инициации трансляции на нескольких альтернативных стартовых кодонах AUG в позициях: (1) – форма А, (27) – форма В, (86, 90, 98) – форма С (С1-С3), (316, 331, 336) – форма D (D1-D3) (рис. 4). Все трансляционные изоформы сохраняют гормон-связывающий домен и демонстрируют одинаковое сродство к глюкокортикоидным гормонам (Lu et al., 2007). Все они, кроме изоформы D, в отсутствие гормона локализованы в цитоплазме клеток и переходят в ядро после образования гормон-рецепторных комплексов. Изоформы серии D (D1-D3) локализованы в клеточном ядре независимо от присутствия гормона (Lu, Cidlowsky, 2005). Все изоформы способны распознавать GRE и стимулировать экспрессию GRE-содержащих репортерных конструкций, однако они различались по эффективности глюкокортикоидной индукции. Наиболее активной в стимуляции транскрипции под действием глюкокортикоидов оказалась изоформа C, наименее – D (Lu, Cidlowsky, 2005).

С использованием культур клеток человека было показано, что разные трансляционные изоформы ГР есть практически везде, хотя их соотношение различно в линиях клеток разного происхождения. Аналогичные результаты были получены при изучении представленности трансляционных изоформ ГР крысы в различных органах. В частности, было показано, что изоформа D преобладает в селезенке, где на ее долю приходится около половины всего ГР, а в печени и тимусе наиболее представленной является изоформа В. Содержание изоформы С во всех органах было ниже, чем содержание других изоформ, при этом в легких и поджелудочной железе этой изоформы было больше, чем в других органах (Lu, Cidlowsky, 2005).

Были установлены и различия в биологических эффектах трансляционных изоформ ГР человека. Так, было показано, что апоптоз клеток остеосаркомы индуцируется с различной эффективностью различными изоформами ГР:



Рис. 4. Трансляционные изоформы ГРа (по: Oakley, Cidlowski, 2011).

Звездочками указано положение альтернативных AUG кодонов в мРНК, цифры внутри – номера экзонов. AF1 – ответственный за трансактиваторные функции участок аминотерминального домена, DBD – ДНК-связывающий домен, LBD – лиганд-связывающий домен.

экспрессия изоформы С значительно быстрее и чаще приводила к апоптозу в сравнении с изоформами А и В, тогда как экспрессия изоформы **D** обладала очень слабым апоптогенным действием (Lu *et al.*, 2007). С помощью микрочипового анализа удалось установить, что наборы генов, контролируемых отдельными изоформами ГР в этих клетках, существенно различаются. При этом оказалось, что экспрессия почти 2200 генов меняется под действием хотя бы одной из изоформ ГР, а 189 генов одинаково регулировались всеми изоформами (Lu, Cidlowsky, 2005).

Таким образом, есть все основания предполагать, что функции трансляционных изоформ ГР существенно различаются. Поэтому большой интерес представляет поиск механизмов, контролирующих продукцию тех или иных трансляционных вариантов этого белка. Пока об этих механизмах практически ничего неизвестно. Лишь в одной работе была показана возможность связи между альтернативными 5'UTR мРНК ГР и образованием определенных трансляционных изоформ. Оказалось, что если 5'UTR соответствует экзону 1АЗ, то в этом случае возрастает относительное количество изоформы ГР В по сравнению с вариантами мРНК, где 5'UTR представлена экзонами 1В и 1C (Pederson *et al.*, 2004).

Заключение

Рецептор глюкокортикоидных гормонов так же, как и другие транскрипционные факторы, осуществляет регуляцию транскрипции генов, находясь в составе сложных мультибелковых комплексов, собирающихся в регуляторных районах генов. Набор белков, формирующих такие комплексы, включает другие факторы транскрипции, коактиваторы/корепрессоры, медиаторы, хроматин-ремоделирующие белки и зависит как от первичной структуры конкретного регуляторного района гена, так и от типа и состояния клетки, где этот ген экспрессируется (Panne, 2008; Hager et al., 2009; Tsai, Nussinov, 2011). Таким образом, для осуществления регуляции транскрипции ГР вступает во множество белок-белковых взаимодействий, специфичных для регуляторных районов различных генов. Например, в регуляторных районах генов, экспрессирующихся в печени, сайты связывания ГР-GREs соседствуют с сайтами связывания так называемых «печень-обогащенных» факторов – представителей семейств HNF1, HNF3 (по новой номенклатуре FoxA), HNF4, HNF6 и С/ЕВР, и соответствующие белковые ансамбли обеспечивают глюкокортикоидную индукцию этих генов в печени (Schoneveld et al., 2004). А в генах, экспрессирующихся в ряде структур мозга, партнерами ГР чаще всего оказываются представители семейств АР1- и CREB-факторов транскрипции, а также специфичный для тканей мозга представитель семейства Oct1 (Brm2) и специфичный для гипофиза фактор Pit1 (Subramanian et al., 1988; Diaz-Gallardo et al., 2010). Иногда взаимодействие ГР с белком-партнером изначально необходимо для достижения нужного сродства рецептора к определенному участку ДНК. Это происходит, когда сайт связывания ГР на ДНК содержит лишь половину классического GRE (AGAACAnnnTGTTCT) – гексануклеотид ТGTTCT, с которым взаимодействует мономер рецепторного белка, в отличие от связывания димера ГР с классическим сайтом (Merkulov, Merkulova, 2009). В подобных случаях связывание ГР с его сайтом стабилизируется другим транскрипционным фактором: XGRAF в промоторной области гена у-фибриногена шпорцевой лягушки (Morin et al., 2001); Ets2 в промоторном районе гена СҮР27 крысы (Mullick et al., 2001); РТF1-промотор – в гене α-амилазы 2 мыши (Slater *et al.*, 1993).

Можно предполагать, что наборы белковпартнеров, с которыми способна взаимодействовать та или иная изоформа ГР, различаются, что неизбежно должно отражаться как на специфике множеств генов-мишеней для различных изоформ, так и на характере регуляции отдельных генов. Сравнение состава генов-мишеней для ГРа и ГРβ (Lewis-Tuffin *et al.*, 2007; Kino *et al.*, 2009), а также для различных трансляционных изоформ ГРа (Lu, Cidlowsky, 2005) подтверждает такое предположение. Поскольку продукция отдельных изоформ ГР характеризуются как определенной тканеспецифичностью, так и различиями в реакции на внешние стимулы, представляется очевидным, что, обладая различным регуляторным потенциалом, изоформы рецептора глюкокортикоидных гормонов могут вносить существенный вклад в специфику гормональной регуляции.

Литература

- Смирнов А.Н. Ядерные рецепторы: номенклатура, лиганды, механизмы влияния на экспрессию генов // Биохимия. 2002. Т. 67. С. 1157–1181.
- Bamberger C.M., Bamberger A.M., de Castro M., Chrousos G.P. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans // J. Clin. Invest. 1995. V. 95. P. 2435–2441.
- Beger C., Gerdes K., Lauten M. *et al.* Expression and structural analysis of glucocorticoid receptor isoform gamma in human leukaemia cells using an isoform-specific real-time polymerase chain reaction approach // Br. J. Haematol. 2003. V. 122. P. 245–252.
- Breslin M.B., Geng C.D., Vedeckis W.V. Multiple promoters exist in the human GR gene, one of which is activated by glucocorticoids // Mol. Endocrinol. 2001. V. 8. P. 1381–1395.
- Cao-Lei L., Leija S.C., Kumsta R. *et al.* Transcriptional control of the human glucocorticoid receptor: identification and analysis of alternative promoter regions // Hum. Genet. 2011. V. 129. P. 533–543.
- Danielian P.S., White R., Lees J.A., Parker M.G. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors // The EMBO J. 1992. V. 11. P. 1025–1033.
- de Lange P., Segeren C.M., Koper J.W. *et al*. Expression in hematological malignancies of a glucocorticoid receptor splice variant that augments glucocorticoid receptor-mediated effects in transfected cells // Cancer Res. 2001. V. 61. P. 3937–3941.
- Derrigo M., Cestelli A., Savettieri G., Di Liegro I. RNAprotein interactions in the control of stability and localization of messenger RNA // Int. J. Mol. Med. 2000. V. 5. P. 111–123.
- Diaz-Gallardo M.Y., Cote-Velez A., Charli J.L., Joseph-Bravo P. The rapid interference between glucocorticoids and cAMP activating signalling in hypothalamic neurons prevents binding of phosphorylated cAMP binding protein and glucocorticoid receptor at CRE-like and composite GRE sites of thyrotrophin-releasing hormone gene promoter // J. Neuroendocrinol. 2010. V. 22. P. 282–293.

- Encio I.J., Detera-Wadleigh S.D. The genomic structure of the human glucocorticoid receptor // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 7182–7188.
- Ford J., McEwan I.J., Wright A.P., Gustafsson J.A. Involvement of the transcription factor IID protein complex in gene activation by the N-terminal transactivation domain of the glucocorticoid receptor *in vitro* // Mol. Endocrinol. 1997. V. 11. P. 1467–1475.
- Fowden A.L., Forhead A.J. Endocrine regulation of feto-placental growth // Horm. Res. 2009. V. 72. P. 257–265.
- Geng C.D., Pedersen K.B., Nunez B.S., Vedeckis W.V. Human glucocorticoid receptor alpha transcript splice variants with exon 2 deletions: evidence for tissue- and cell type-specific functions // Biochemistry. 2005. V. 44. P. 7395–7405.
- Geng C.D., Vedeckis W.V. c-Myb and members of the c-Ets family of transcription factors act as molecular switches to mediate opposite steroid regulation of the human glucocorticoid receptor 1A promoter // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 43264–43271.
- Goecke I.A., Alvarez C., Henríquez J. *et al.* Methotrexate regulates the expression of glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms in normal human peripheral mononuclear cells and human lymphocyte cell lines *in vitro* // Mol. Immunol. 2007. V. 44. P. 2115–2123.
- Hager G.L., McNally J.G., Mistell T. Transcription dynamics // Mol. Cell. 2009. V. 35. P. 741–752.
- Hecht K., Carlstedt-Duke J., Stierna P. *et al.* Evidence that the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor does not act as a physiologically significant repressor // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 26659–26664.
- Hierholzer K., Buhler H. Metabolism of cortical steroid hormones and their general mode of action // Comprehensive Human Physiology / Eds R. Greger, U. Windhorst. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1996. P. 79–93.
- Hollenberg S.M., Evans R.M. Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor // Cell. 1988. V. 55. P. 899–906.
- Hughes T.A. Regulation of gene expression by alternative untranslated regions // Trends Genet. 2006. V. 22. P. 119–122.
- John S., Johnson T.A., Sung M.H. *et al*. Kinetic complexity of the global response to glucocorticoid receptor action // Endocrinology. 2009. V. 150. P. 1766–1774.
- Kassel O., Herrlich P. Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: molecular aspects // Mol. Cell. Endocrinol. 2007. V. 275. P. 13–29.
- Kimura K., Wakamatsu A., Suzuki Y. et al. Diversification of transcriptional modulation: large-scale iden-

tification and characterization of putative alternative promoters of human genes // Genome Res. 2006. V. 1. P. 55–65.

- Kino T., Manoli I., Kelkar S. *et al.* Glucocorticoid receptor (GR) beta has intrinsic, GR-alpha-independent transcriptional activity // Biochim. Biophys. Res. Commun. 2009. V. 381. P. 671–675.
- Kochetov A.V. Alternative translation start sites and hidden coding potential of eukaryotic mRNAs // BioEssays. 2008. V. 30. P. 683–691.
- Kornblihtt A.R. Promoter usage and alternative splicing // Curr. Opin. Cell. Biol. 2005. V. 17. P. 262–268.
- Kumar R., Thompson E.B. Gene regulation by glucocorticoid receptor: Structure: function relationship // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2005. V. 94. P. 310–319.
- Lewis-Tuffin L.J., Cidlowski J.A. The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2006. V. 1069. P. 1–9.
- Lewis-Tuffin L.J., Jewell C.M., Bienstock R.J. *et al.* Human glucocorticoid receptor beta binds RU-486 and is transcriptionally active // Mol. Cell. Biol. 2007. V. 27. P. 2266–2282.
- Lu N.Z., Cidlowski J.A. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes // Mol. Cell. 2005. V. 18. P. 331–342.
- Lu N.Z., Cidlowski J.A. Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity // Trends Cell. Biol. 2006. V. 16. P. 301–307.
- Lu N.Z., Collins J.B., Grissom S.F., Cidlowski J.A. Selective regulation of bone cell apoptosis by translational isoforms of the glucocorticoid receptor // Mol. Cell. Biol. 2007. V. 20. P. 7143–7160.
- Maniatis T., Reed R. An extensive network of coupling among gene expression machines // Nature. 2002. V. 416. P. 499–506.
- Meijsing S.H., Pufall M.A., So A.Y. *et al.* DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity // Science. 2009. V. 324. P. 407–410.
- Merkulov V.M., Merkulova T.I. Structural variants of glucocorticoid receptor binding sites and different versions of positive glucocorticoid responsive elements: Analysis of GR-TRRD database // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2009. V. 115. P. 1–8.
- Miesfeld R., Godowski P.J., Maler B.A., Yamamoto K.R. Glucocorticoid receptor mutants that define a small region sufficient for enhancer activation // Science. 1987. V. 236. P. 423–427.
- Moalli P.A., Pillay S., Krett N.L., Rosen S.T. Alternatively spliced glucocorticoid receptor messenger RNAs in glucocorticoid-resistant human multiple myeloma cells // Cancer Res. 1993.V. 53. P. 3877–3879.

- Morin B., Woodcock G.R., Nichols L.A., Holland L.J. Heterodimerization between the glucocorticoid receptor and unrelated DNA-binding protein *Xenopus* glucocorticoid receptor accessory factor // Mol. Endocrinol. 2001. V. 15. P. 458–466.
- Mullick J., Anandatheerthavarada H.K., Amuthant G. *et al.* Physical interaction and functional synergy between glucocorticoid receptor and Ets2 proteins for transcription activation of the rat cytochrome P-450c27 promoter // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 18007–18017.
- Nogues G., Kadener S., Cramer P. *et al.* Transcriptional activators differ in their abilities to control alternative splicing // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 43110–43114.
- Oakley R.H., Cidlowski J.A. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids // J. Biol. Chem. 2011. V. 286. P. 3177–3184.
- Oakley R.H., Jewell C.M., Yudt M.R. *et al.* The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 27857–27866.
- Oakley R.H., Sar M., Cidlowski J.A. The human glucocorticoid receptor β-isoform: expression, biochemical properties, and putative function // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 9550–9559.
- Oakley R.H., Webster J.C., Sar M. *et al.* Expression and subcellular distribution of the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor // Endocrinology. 1997. V. 138. P. 5028–5038.
- Pan Q., Shai O., Lee L.J. *et al.* Deep surveying of alternative splicing complexity in human transcriptome by high-throughput sequencing // Nat. Genet. 2008. V. 40. P. 1413–1415.
- Panne D. The enhancesome // Curr. Opin. Struct. Biol. 2008. V. 18. P. 236–242.
- Pedersen K.B., Geng C.D., Vedeckis W.V. Three mechanisms are involved in glucocorticoid receptor autoregulation in a human T-Lymphoblast cell line // Biochemistry. 2004. V. 43. P. 10851–10858.
- Picard D., Yamamoto K.R. Two signals mediate hormonedependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor // EMBO J. 1987. V. 6. P. 3333–3340.
- Pratt W.B. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 21455–21458.
- Presul E., Schmidt S., Kofler R., Helmberg A. Identification, tissue expression, and glucocorticoid responsiveness of alternative first exons of the human glucocorticoid receptor // J. Mol. Endocrinol. 2007. V. 38. P. 79–90.

- Pujols L., Mullol J., Roca-Ferrer J. *et al.* Expression of glucocorticoid receptor alpha- and beta-isoforms in human cells and tissues // Am. J. Cell. Physiol. 2002. V. 283. P. C. 1324–C1331.
- Ray D.W., Davis J.R., White A., Clark A.J. Glucocorticoid receptor structure and function in glucocorticoid-resistant small cell lung carcinoma cells // Cancer Res. 1996. V. 56. P. 3276–3280.
- Robyr D., Wolffe A.P., Wahli W. Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity of steroid tasks // Mol. Endocrinol. 2000. V. 14. P. 329–347.
- Rosonina E., Bakowski M.A., McCracken S., Blencowe B.J. Transcriptional activators control splicing and 3'-end cleavage levels // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 43034–43040.
- Russcher H., Dalm V.A., de Jong F.H. *et al.* Associations between promoter usage and alternative splicing of the glucocorticoid receptor gene // J. Mol. Endocrinol. 2007. V. 38. P. 91–98.
- Sapolsky R.M., Romero L.M., Munck A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions // Endocrinol. Rev. 2000. V. 21. P. 55–89.
- Schaaf M.J., Cidlowski J.A. AUUUA motifs in the 3'UTR of human glucocorticoid receptor alpha and beta mRNA destabilize mRNA and decrease receptor protein expression // Steroids. 2002. V. 67. P. 627–636.
- Schoneveld O.J., Gaemers I.C., Lamers W.H. Mechanisms of glucocorticoid signaling // Biochem. Biophys. Acta. 2004. V. 1680. P. 114–128.
- Slater E.P., Hesse H., Muller J.M., Beato M. Glucocorticoid receptor binding site in the mouse alphaamylase 2 gene mediates response to the hormone // Mol. Endocrinol. 1993. V. 7. P. 907–914.
- So A.Y., Chaivorapol C., Bolton E.C. *et al.* Determinants of cell- and gene-specific transcriptional regulation by the glucocorticoid receptor // PLoS Genet. 2007. V. 3. e94.
- Subramanian N., Cairns W., Okret S. Glucocorticoids repress transcription from a negative glucocorticoid response element recognized by two homeodomaincontaining proteins Pbx and Oct1 // J. Biol. Chem. 1988. V. 273. P. 23567–23574.
- Thompson E.B. The structure of the human glucocorticoid receptor and its gene // J. Steroid Biochem. 1987. V. 27. P. 105–108.
- Turner J.D., Alt S.R., Cao L. *et al.* Transcriptional control of the glucocorticoid receptor: CpG islands, epigenetics and more // Biochem. Pharmacol. 2010. V. 80. P. 1860–1868.
- Turner J.D., Muller C.P. Structure of the glucocorticoid receptor (NR3C1) gene 5'-untranslated region: identification, and tissue distribution of multiple new human exon 1 // J. Mol. Endocrinol. 2005. V. 35. P. 283–292.

- Truss M., Beato M. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribo-nucleic acids and transcription factors // Endocrine Rev. 1993 V. 14. P. 459–478.
- Tsai C.-J., Nussinov R. Gene specific transcription activation via long-range allosteric shape-shifting // Biochem. J. 2011. V. 439. P. 15–25.
- Tutton P.J., Barkla D.H. Steroid hormones as regulators of the proliferative activity of normal and neoplastic intestinal epithelial cells // Anticancer Res. 1988. V. 8. P. 451–456.
- Viegas L.R., Hoijman E., Beato M., Pecci A. Mechanisms involved in tissue-specific apoptosis regulated by glucocorticoids // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2008. V. 109. P. 273–278.
- Wang E.T., Sandberg R., Luo S. *et al.* Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes // Nature. 2008. V. 456. P. 470–476.
- Webster J.C., Oakley R.H., Jewell C.M., Cidlowski J.A. Proinflammatory cytokines regulate human gluco-

corticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 6865–6870.

- Xu Q., Leung D.Y., Kisich K.O. Serine-arginine-rich protein p30 directs alternative splicing of glucocorticoid receptor pre-mRNA to glucocorticoid receptor beta in neutrophils // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 27112–27118.
- Yudt M.R., Cidlowski J.A. Molecular identification and characterization of A and B forms of the glucocorticoid receptor // Mol. Endocrinol. 2001. V. 15. P. 1093–1103.
- Zhu J., Gong J.Y., Goodman O.B. Jr. *et al.* Attenuates pre-mRNA splicing of glucocorticoid receptor by regulating the expression of serine-arginine protein p30c (SRp30c) in prostate cancer cells // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1773. P. 1087–1094.

GLUCOCORTICOID RECEPTOR ISOFORMS GENERATED BY ALTERNATIVE SPLICING AND ALTERNATIVE TRANSLATION INITIATION

V.M. Merkulov, T.I. Merkulova

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

Summary

The glucocorticoid hormone receptor (NR3C1) is a transcription factor controlling a large variety of physiological processes in mammals. According to modern estimates, the glucocorticoid receptor regulates the expression of thousands of genes; however, the sets of glucocorticoid-controlled genes in different cell types are different. The magnitude, direction, and kinetics of the hormone response are broadly variable both for the same gene in various cell types and for different genes in the same cell. The specificity of glucocorticoid receptor action is determined, on the one hand, by the features of the sequence and architecture of target gene regulatory regions and on the other hand, by the complex organization of the glucocorticoid receptor gene itself. The gene has nine alternative promoters and produces numerous protein isoforms as a result of alternative splicing and alternative translation initiation. Here we describe the recent knowledge on the origin and properties of glucocorticoid receptor isoforms.

Key words: glucocorticoid receptor, gene, promoters, alternative splicing, alternative translation initiation, protein isoforms.

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДНК ЖЕНЩИНЫ ИЗ ПЕЩЕРЫ КАМИННАЯ (ГОРНЫЙ АЛТАЙ) ЭПОХИ ПОЗДНЕГО НЕОЛИТА

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

¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: alexpil@bionet.nsc.ru; ² Учреждение Российской академии наук Институт археологии и этнографии Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

Представлены результаты молекулярно-генетического анализа митохондриальной ДНК женщины из пещеры Каминная (Горный Алтай) эпохи позднего неолита (середина IV тысячелетия до н. э.). Установлена принадлежность исследованного образца к восточно-евразийской гаплогруппе А4. Филогеографический анализ свидетельствует об информативности вариантов А4 для реконструкции ранних этапов этногенетических процессов на юге Западной и Восточной Сибири.

Ключевые слова: молекулярная генетика, митохондриальная ДНК человека, гаплогруппа A, палеогенетика, неолит, этногенез, Сибирь.

Введение

Накопленные к настоящему времени данные молекулярной генетики, физической антропологии, археологии, лингвистики, этнографии свидетельствуют о важной роли Центральноазиатского региона в процессах формирования современного населения Евразии. В значительной степени это обусловлено наличием в регионе обширных высокогорных областей (Алтае-Саянская горная страна, Тибет), которые одновременно разделяют ареалы генетически контрастных групп населения Евразии и служат для них контактной зоной. Разнообразие природно-климатических зон и условий, обилие ресурсов (биотических, каменного и рудного сырья) с древнейших времен привлекали сюда человека. Относительная изолированность отдельных участков горных областей обеспечивала возможность сосуществования в определенные периоды времени локальных групп (популяций) человека и сохранение различий в структуре их генофонда на протяжении длительных периодов времени.

Одним из наиболее интересных в этом отношении регионов является Горный Алтай.

Современное коренное население этой территории достаточно хорошо изучено с точки зрения этногеномики, этнографии и лингвистики (Народы России..., 1994; Derenko et al., 2003, 2007; Starikovskaya et al., 2005; Народы мира..., 2007; Gokcumen et al., 2008). Древние группы населения Горного Алтая изучены фрагментарно. Согласно археологическим данным, представители рода Ното населяли территорию Горного Алтая непрерывно в течение по меньшей мере последних 800 тыс. лет. Исследование палеолитических стоянок позволило проследить постепенную эволюцию каменной индустрии, протекавшую на местной основе на протяжении нескольких сотен тысяч лет (Деревянко, Шуньков, 2005; Деревянко, 2011). Опубликованные к настоящему времени палеогенетические результаты свидетельствуют о принадлежности открытых антропологических останков эпохи верхнего палеолита к двум видам человека - неандертальцам и «денисовцам» (Krause et al., 2010). Палеоантропологический материал, достоверно относящийся к анатомически современному населению Горного Алтая, известен только начиная с периода позднего неолита-раннего металла. При этом наиболее ранний серийный материал, датируемый IV–III тысячелетиями до н. э., получен для населения афанасьевской культуры эпохи ранней бронзы. Возможность участия автохтонного неолитического населения в происхождении афанасьевского населения Горного Алтая является предметом дискуссии (Солодовников, 2003; Чикишева, 2010). В связи с этим афанасьевские материалы так же, как и массовые коллекции последующих эпох, сложно использовать для получения отчетливого представления о древнейшем автохтонном населении Горного Алтая анатомически современного типа.

Наиболее древними на территории Горного Алтая останками, достоверно принадлежащими *Homo sapiens*, на данный момент можно считать поздненеолитические палеоантропологические материалы, которые были получены при исследовании двух индивидуальных погребений: мужчины в пещере Нижнетыткескенская (Кирюшин и др., 1995) и женщины в пещере Каминная (Маркин, 2000). Всестороннее исследование этих материалов, несмотря на единичность, может быть информативно для реконструкции культурного и генетического фона, существовавшего в Горном Алтае в периоды, предшествующие эпохе палеометалла.

Исследование посвящено анализу структуры митохондриальной ДНК из останков женщины, погребенной в пещере Каминная в эпоху позднего неолита. Оно дополняет ранее опубликованные специальные работы, посвященные анализу археологического (культурного) контекста данного погребения (Маркин, 2000) и характеристике останков методами физической антропологии (Чикишева, 2000) и генетики (Чикишева и др., 2007).

Материалы и методы

Палеоантропологические материалы. Пещера Каминная расположена в северо-западной части среднегорного Алтая в Усть-Канском районе Республики Алтай в долине реки Каракол. На памятнике зафиксированы следы обитания человека как в плейстоцене (различные периоды палеолита), так и в голоцене (неолит, эпоха бронзы, железа и средневековья) (Маркин, 2000).

Материалом для исследования послужили фрагменты скелета женщины возраста 23–25 лет (Чикишева, 2000), погребение которой было обнаружено С.В. Маркиным в 1994 г. и датируется серединой IV тысячелетия до н. э. (эпоха позднего неолита; радиоуглеродные даты получены для кусочков угля, обнаруженных чуть выше костяка в заполнении могильной ямы) (Маркин, 2000).

Останки представлены почти полным скелетом (отсутствовали только кости левой ступни). Перед отбором проб для палеогенетического анализа была проведена визуальная оценка степени макроскопической сохранности костных останков. Были выявлены признаки значительной деградации костей посткраниального скелета (включая все длинные кости конечностей – наиболее подходящий для палеогенетического исследования посткраниальный материал): хрупкость и ломкость костей, сильная эрозия поверхности компактного костного вещества. Эти признаки, как правило, указывают на разрушение органических составляющих скелета и низкую сохранность ДНК в останках. Низкая степень сохранности скелета нехарактерна для большинства палеоантропологических материалов из Горного Алтая и, по-видимому, является следствием особенностей локальных условий среды, в которой находились останки после погребения. Более высокую степень сохранности демонстрировала только одна из ключиц. При обследовании черепа погребенной было выявлено хорошее состояние зубов, свидетельствующее о возможной высокой сохранности ДНК. Вследствие этого для проведения молекулярно-генетического анализа были взяты два зуба и ключица.

Экстракция ДНК. Предварительную обработку палеоантропологического материала и экстракцию ДНК проводили методами, описанными в работе А.S. Pilipenko с соавт. (2010). Поверхность механически очищали от загрязнений и обрабатывали 7%-м раствором гипохлорита натрия для разрушения возможных загрязнений современной ДНК. Затем поверхность образца удаляли механически на глубину ~1 мм и облучали образец ультрафиолетом не менее 1 ч с каждой стороны. После этого зубы размалывали до состояния мелкодисперсного порошка с помощью аналитической мельницы. Из компактного вещества ключицы высверливали костный порошок сверлом диаметром 2 мм. Для выделения ДНК костный порошок в течение 48 ч выдерживали в лизирующем 5М гуанидинизотиоционатном буфере (Pilipenko *et al.*, 2010). Экстракцию проводили смесью фенола и хлороформа, а затем хлороформом. ДНК из водной фазы осаждали изопропанолом в присутствии 1М хлорида натрия с последующей двукратной промывкой 75%-м раствором этилового спирта. Полученный осадок растворяли в воде и хранили в замороженном состоянии при температуре –20°С.

Анализ нуклеотидной последовательности мтДНК. Амплификацию ГВСІ мтДНК проводили двумя разными методами: амплификация четырех коротких перекрывающихся фрагментов с помощью однораундовой ПЦР (Haak *et al.*, 2005) и амплификация одного длинного фрагмента с помощью «вложенной» ПЦР (включала два раунда реакции) (Пилипенко и др., 2008) (табл. 1). Участки ГВСП и кодирующей области мтДНК, использованные для подтверждения и уточнения филогенетического положения исследованного образца, и последовательность праймеров, использованных для амплификации этих участков, приведены в табл. 1. Продукты амплификации фрагментов ГВСІ клонировали с помощью набора pGEM-T Easy Vector System Kit (Promega, США) и секвенировали 8–15 клонов для каждого фрагмента. Нуклеотидную последовательность других фрагментов мтДНК определяли прямым автоматическим секвенированием.

Определение последовательности нуклеотидов проводили с использованием набора реактивов ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, USA) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Для проведения секвенирующей реакции использовали те же праймеры, что и для амплификации. Продукты секвенирующей реакции анализировали на приборе ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) в Межинститутском центре автоматического секвенирования ДНК (www.sequest.niboch.nsc.ru, Новосибирск). Полученные последовательности сравнивали с уточненной Кембриджской референсной последовательностью мтДНК (Andrews et al., 1999). Филогенетическую интерпретацию последовательностей осуществляли в соответствии с существующей

Таблица 1

Асследуемый фрагмент (позиция) в мтДНК данной работы)		Праймеры	Ссылка на праймеры	
ГВС I (15997-16141)	A, A4	L15996/16142	Haak et al., 2005	
ГВС I (16118-16232)		L16117/H16233		
ГВС I (16210-16355)		L16209/H16356		
ГВС I (16286-16409)		L16287/H16410		
ГВС I (16074-16366)	A, A4	1 раунд ПЦР: L16046/H16401 2 раунд ПЦР: L16073/H16367	Pilipenko et al., 2008	
663	А	L635/H677	Lalueza-Fox et al., 2004	
152 (в ГВС II)	A4	L16517/H160	Lalueza-Fox et al., 2004	
1442	A4a	L1361/1493	Ermini et al., 2008	
16189 (в ГВС I)	A4b	L16117/H16233	Haak et al., 2005	
200 (в ГВС II)	A4c	L140/H242	Ermini et al., 2008	
151 (в ГВС II)	A4d	L16517/H160 и L140/H242	Lalueza-Fox <i>et al.</i> , 2004 Ermini <i>et al.</i> , 2008	
146, 153 (в ГВС II) 16111 (в ГВС I)	A2	L16517/H160 и L15996/H142	Lalueza-Fox <i>et al.</i> , 2004 Haak <i>et al.</i> , 2005	
654	A6	L635/H677	Lalueza-Fox et al., 2004	

Фрагменты и отдельные информативные позиции в митохондриальной ДНК, исследованные в данной работе, и праймеры, использованные для их анализа

классификацией структурных вариантов мтДНК (van Oven, Kayser, 2009).

Для проведения филогенетического анализа использовали собственную базу данных по структуре ГВСІ мтДНК, сформированную из литературных данных, включающую более 20 тыс. образцов из современных популяций человека Евразии.

Меры против контаминации. Все работы с древним материалом были выполнены в лабораторных помещениях, специально предназначенных для работы с древней ДНК. Помещения оборудованы независимой системой приточной вентиляции с функцией фильтрации воздуха с созданием градиента его давления от более чистых к менее чистым помещениям, системой облучения ультрафиолетом, ламинарными шкафами второго класса защиты и другим оборудованием. Персонал лаборатории использовал комплекты спецодежды для чистых помещений, проводилась частая смена стерильных перчаток. Все рабочие поверхности и приборы регулярно обрабатывались 5 %-м раствором гипохлорита натрия и облучались ультрафиолетом. Контрольные пробирки чистоты системы (без добавления палеоматериала) проходили через полную процедуру экстракции и амплификации параллельно с древними образцами для выявления возможного загрязнения используемых реактивов и оборудования. Для всех сотрудников палеогенетической лаборатории, имеющих доступ в чистые помещения, а также для специалистов-антропологов, осуществлявших палеоантропологический анализ останков и отбор материалов для генетического исследования, было проведено определение последовательности ГВСІ мтДНК для выявления возможной контаминации материалов.

Результаты

Структура исследованного образца мтДНК и его филогенетическое положение. Определить первичную последовательность фрагментов мтДНК удалось только из материала зубов. Результаты, полученные для двух зубов, обработка и экстракция ДНК из которых проводились с перерывом более одного месяца, полностью совпадали. Из материала посткраниального скелета (ключица) ни в одном из использованных нами вариантов ПЦР не было получено продуктов амплификации. Это коррелирует с низкой степенью сохранности посткраниального материала, отмеченной нами при отборе образцов.

На первом этапе эксперимента анализу была подвергнута последовательность ГВСІ мтДНК (табл. 2). Анализ четырех перекрывающихся фрагментов длиной от 115 до 146 п.н. (здесь и далее длина и положение фрагментов указаны без учета последовательности праймеров) позволил определить последовательность нуклеотидов участка ГВСІ мтДНК в положении 15997-16409. Указанный участок последовательности ГВСІ образца из пещеры Каминной отличался от Кембриджской референсной последовательности мтДНК (rCRS) (Andrews et al., 1999) транзициями в четырех позициях: С16223Т, С16290Т, G16319А, Т16362С (гаплотип 16223-16290-16319-16362). Мотив 16223Т-16290Т-16319А свидетельствует о принадлежности исследуемого образца мтДНК к гаплогруппе А восточно-евразийского кластера гаплогрупп мтДНК. Принадлежность исследованного образца мтДНК к гаплогруппе А подтверждена наличием транзиции A663G в кодирующей части мтДНК, которая маркирует все линии этой гаплогруппы. Дополнительная замена в положении 16362 свидетельствует о принадлежности исследованного варианта к подгруппе А4.

Таблица 2

Структура гаплотипа ГВС І и статус информативных позиций в ГВСІІ и кодирующей части образца мтДНК из пещеры Каминная

Исследуемый	Нуклеотид-	Маркируемая
фрагмент	ные замены	группа мтДНК
(позиция)	в образце	(в контексте
в мтДНК	из Каминной	данной работы)
ГВС І	16223 C-T	A4
(15997-16409)	16290 C-T	
	16319 G-A	
	16362 T-C	
152 (в ГВС II)	152 T-C	A4
663	663 A-G	А

Примечание. Указаны только позиции, отличающиеся от Кембриджской референсной последовательности.

Согласно современной классификации (van Oven, Kayser, 2009), в составе группы А4 помимо корневого варианта выделяют несколько подгрупп, которые маркируются нуклеотидными заменами как в ГВСІ, так и в ГВСІІ и кодирующей области мтДНК (рис. 1). Для уточнения положения исследованного образца на филогенетическом дереве гаплогруппы А4 были выбраны позиции в контрольном районе и кодирующей части мтДНК, маркирующие отдельные подгруппы А4 (табл. 1). По последовательности ГВСІ образец из пещеры Каминная соответствует корневому варианту гаплогруппы А4. Анализ выбранных позиций за пределами ГВСІ также показал, что исследуемый нами образец мтДНК не принадлежит ни к одной из выделенных на данный момент подгрупп А4. Поскольку мы не имеем полной последовательности мтДНК индивида из пещеры Каминная, существует вероятность того, что исследованный вариант может отличаться по полной последовательности митохондриального генома от образцов, соответствующих корневому структурному варианту гаплогруппы А4 на глобальном филогенетическом дереве полных геномов мтДНК. Поэтому узел А4* на рис. 1, к которому относится исследованный древний образец мтДНК, в данном случае объединяет в себя варианты гаплогруппы А4, не относящиеся ни к одной из ее подгрупп, выделенных к настоящему времени.

Достоверность полученных экспериментальных результатов. Доказательство достоверности экспериментальных результатов – одно из основных условий успешного выполнения палеогенетического анализа останков анатомически современного человека. В процессе исследования мтДНК погребенной из пещеры Каминная помимо строгого соблюдения общепринятых требований к условиям проведения эксперимента (см. Материалы и методы) было получено несколько прямых и косвенных свидетельств достоверности экспериментальных данных: результаты анализа ДНК из нескольких независимых экстрактов из материала двух разных зубов, а также результаты повторных ПЦР из каждого экстракта полностью совпадают; данные, полученные для разных участков молекулы мтДНК (ГВСІ, ГВСІІ, позиции в кодирующей части), не противоречат друг другу и могут быть однозначно интерпретированы филогене-



Рис. 1. Филогенетическое дерево гаплогруппы A4 митохондриальной ДНК, построенное по результатам анализа полных последовательностей мтДНК (по: van Oven, Kayser, 2009).

тически; гаплотип образца мтДНК из пещеры Каминная не совпадает с мтДНК исследователей (палеоантропологов и палеогенетиков), контактировавших с останками до или в процессе их палеогенетического исследования, или же имевших доступ в чистые помещения в период проведения палеогенетического эксперимента; вероятность тотальной контаминации скелета одним вариантом мтДНК, относящимся к восточно-евразийской гаплогруппе, от археолога или случайного человека крайне маловероятна; клонирование ПЦР-продуктов в бактериальном векторе и секвенирование нескольких клонов позволили выявить характерную для древней ДНК вырожденность последовательности клонов, являющуюся результатом дезаминирования цитозина (рис. 2); реконструкция консенсусной последовательности по результатам секвенирования нескольких клонов исключает вероятность влияния процессов дезаминирования цитозина или случайных ошибок полимеразы в ПЦР на конечные экспериментальные данные; в процессе эксперимента для исследуемого образца установлена характерная для древней ДНК обратная зависимость между размером амплифицируемого фрагмента ДНК и эффективностью ПЦР (успешная амплификация только коротких фрагментов мтДНК). Перечисленные факты в совокупности позволяют считать полученные данные о структуре образца мтДНК представителя населения позднего неолита

	A. A. A.	
	Α	
		م د ر
	Å	
16210 16220 16230 16240 16250	16260 16270 16280 16290 16300 16310 16320 16330 16340 16350 16360 16:	370 16380 16390 16400 :
CAAGCAAGTAACCCTCAACCAATCAACCAATCAACTAACT		.
A		
······································		
5		
E	A. A. A.	
	ДА.	
	Д.	
5		
		E
	с	
	т	
	. В.	TTTT. T. TTT

Горного Алтая высокодостоверными и соответствующими существующим требованиям мирового уровня в данной области науки.

Обсуждение результатов

Варианты мтДНК, относящиеся к гаплогруппе А, широко представлены в генофондах популяций человека восточной части Евразии. В составе гаплогруппы А на данный момент выделяют значительное число подгрупп. Многие из них характеризуются специфичным распространением в генофондах современного населения Евразии, что делает гаплогруппу А информативной для реконструкции эволюционного прошлого популяций человека включая ранние этапы их становления в плейстоцене. Полученные экспериментальные результаты свидетельствуют о принадлежности образца мтДНК женщины, погребенной в пещере Каминная, к корневому (или близкому к корневому) варианту восточно-евразийской гаплогруппы А4. Кластер А4 в целом также характеризуется широким распространением. Согласно существующей классификации, в его состав входит и подгруппа А2, которая резко контрастирует с другими подгруппами А4 в отношении картины разнообразия и представленности в современных коренных популяциях Евразии. Ее линии представлены только в генофондах популяций северо-востока Сибири и на севере Дальнего Востока, где формируют основу генофонда мтДНК некоторых популяций (Volodko et al., 2008). Учитывая специфику распространения и значительный возраст ответвления этой группы от остальных подгрупп, мы исключили ее линии из дальнейшего рассмотрения (далее под кластером А4 мы подразумеваем А4 без учета А2). С исключением подгруппы А2 ареал распространения линий А4 значительно сокращается. Основная область его распространения включает Центральную Азию (включая Южную Сибирь), территорию Китая, Восточной Азии, некоторых стран Юго-Восточной Азии, среднеазиатский регион. Таким образом, территория Горного Алтая, откуда происходит исследованный нами палеоантропологический материал, расположена на северо-западной периферии ареала гаплогруппы А4.

Выделение многих подгрупп в составе гаплогруппы А4 базируется на анализе позиций в кодирующей части мтДНК. Филогеографический анализ, выполненный с использованием данных о статусе информативных позиций в кодирующей части мтДНК, мог бы быть информативнее по сравнению с анализом последовательностей ГВСІ мтДНК. Однако его проведение пока ограничено небольшой численностью опубликованных последовательностей. Поэтому при проведении подробного филогеографического анализа вариантов гаплогруппы А4 мы использовали только данные о вариабельности ГВСІ мтДНК.

В использованной нами для анализа выборке современного населения Евразии общей численностью более 20 тыс. человек мы обнаружили 190 носителей вариантов гаплогруппы A4. Из них 46 были идентичны исследованному нами древнему образцу. Анализ их географического распространения показал, что образцы с «корневым» вариантом гаплотипа ГВСІ представлены повсеместно на территории ареала A4 гаплогруппы. В частности, этот вариант выявлен в генофонде большинства популяций современного коренного населения Горного Алтая и сопредельных с ним территорий.

Интересно, что «корневой» вариант гаплогруппы А4 – практически единственный, демонстрирующий столь широкое распространение. Остальные варианты (и их группы) формируют субкластеры, специфичные для разных частей ареала гаплогруппы. Так, специфичными для стран Юго-Восточной Азии (в частности Тайланда) и Китая являются линии с общими мотивами <u>16124</u>-16223-16290-16319-16362 и 16223-16274-16290-16319-16362, а субкластер с общим мотивом 16223-16260-16290-16319-16362 встречается только в восточной части Индии (Metspalu et al., 2004). В популяциях Центральной Азии, Южной Сибири (включая Горный Алтай) и сопредельных территорий (Западная Сибирь и даже Волго-Уральский регион) присутствуют специфичные линии, не выявленные у населения Юго-Восточной Азии и Китая. Примером может служить линия с гаплотипом 16223-16249-16290-16319-16362, которая специфична для Южной Сибири и прилегающих областей Монголии (Kolman et al., 1996; Derenko et al., 2003, 2007; Gokcumen et al., 2008). По

результатам секвенирования полных митохондриальных геномов линия с этим гаплотипом ГВСІ была выделена в особую подгруппу A4a1 на едином филогенетическом дереве мтДНК человека (van Oven, Kayser, 2009).

Другим специфичным для северной части ареала гаплогруппы А4 субкластером является группа вариантов с общим мотивом 16039-16189-16223-16290-16319-16256-16362 (входит в состав А4b подгруппы). Варианты этой группы распространены в Сибири – на территории Алтае-Саянской горной страны (у хакасов, алтайских казахов) (Derenko et al., 2007; Gokcumen et al., 2008), в Центральной Сибири (эвенки, якуты) (Федорова и др., 2003; Starikovskaya et al., 2005; Pakendorf et al., 2006; Derenko et al., 2007), Западной Сибири (ханты, манси, коми, кеты) (Дербенева и др., 2002; Derbeneva et al., 2002; Губина и др., 2005; Pimenoff et al., 2008), а также в Волго-Уральском регионе (Бермишева и др., 2002). Южнее они встречаются только у казахов Казахстана и киргизов (Comas et al., 1998).

Таким образом, характер распространения субкластеров гаплогруппы A4 позволяет разделить ее общий ареал на южную (включает Китай и Юго-Восточную Азию) и северную (включает Центральную Азию и прилегающие южные районы Западной Сибири, в том числе и Горный Алтай, и Восточной Сибири, а также Зауралье) части, каждая из которых характеризуется наличием специфических подгрупп A4. Общим элементом для генофондов их населения является корневой вариант A4.

По-видимому, первоначально именно носители корневого варианта распространились по всему современному ареалу гаплогруппы А4. Дальнейшая диверсификация этой группы на субкластеры шла независимо в северной и южной его частях. Ранние периоды протекания этой диверсификации отражают общие этапы развития популяций, отнесенных к каждой из двух обширных территориальных групп. Датировать это разделение сложно (последовательности ГВСІ не позволяют получить датировки приемлемой точности). Однако период «изоляции» северной и южной групп популяций должен был быть достаточным для образования целого ряда субкластеров. Ранее присутствие вариантов гаплогруппы А4 методами палеогенетики было зафиксировано для некоторых древних популяций юга Центральной Азии: население эпохи железа (VII-III вв.) Центрального Казахстана (Lalueza-Fox et al., 2004), популяция хунну Северо-Восточной Монголии (~ III в. до н. э.) (Keyser-Tracqui et al., 2003) – все они демонстрируют присутствие в генофондах как корневого варианта А4, так и его производных. Для популяций лесостепной зоны Западной Сибири (северные по отношению к Горному Алтаю), сопоставимых по возрасту с исследованным в данной работе образцом, присутствие линий гаплогруппы А4 не выявлено (Наши неопубл. данные). На глубокую древность расселения носителей корневого варианта А4 указывает ранний возраст отделения подгруппы А2, которое, по некоторым оценкам, произошло порядка 16 тыс. лет назад. При этом вероятным местом возникновения подгруппы А2 является территория Аляски или крайний северо-восток Евразии (Volodko *et al.*, 2008).

С учетом изложенных результатов филогеографического анализа вариантов гаплогруппы А4 ее обнаружение у представителя населения Горного Алтая эпохи позднего неолита не является неожиданным. В этот период диверсификация генофондов населения южной и северной групп популяций – носителей линий А4 гаплогруппы – уже протекала относительно независимо, хотя специфические кластеры могли еще не сформироваться.

Данные по филогеографии А4 согласуются с результатами исследования неолитических материалов из различных районов Южной Сибири методами физической антропологии, которые свидетельствуют о существовании комплекса признаков, объединяющих краниологические материалы Горного Алтая и бассейна Среднего Енисея (Чикишева, 2010). Также антропологические данные свидетельствуют о связи некоторых неолитических популяций юга Западной Сибири с прибайкальским неолитическим населением (Дремов, 1997; Кунгурова, Чикишева, 2002). Таким образом, методами краниологии фиксируется комплекс признаков, который маркирует наличие древнего общего субстрата у рассматриваемых неолитических популяций наряду с несомненными отличиями в их краниологической характеристике. Аналогично генофонд мтДНК современного населения различных районов юга Сибири демонстрирует как существенные отличия, так и элементы, происхождение которых связано с периодами общей эволюции этих групп, а также более поздних контактов популяций.

Эти положения коррелируют и с результатами анализа элементов материальной культуры неолитического населения региона. Культурное сходство, которое демонстрируют неолитические могильники Горного и предгорного Алтая -Каминная, Усть-Иша, Иткуль (Молодин, 1999) и недавно исследованный могильник Солонцы-5 (Кунгурова, 2005), свидетельствует о существовании особой культурной группы, сформировавшейся в северных предгорьях и горах Алтая в эпоху позднего неолита. Восточный вектор связей населения, оставившего данные могильники, демонстрируемый археологическими и антропологическими материалами, подтверждается палеогенетическими данными, полученными для останков из пещеры Каминная.

Таким образом, совокупность данных по филогеографии вариантов А4 в современных популяциях, а также полученное в данной работе прямое доказательство присутствия этой гаплогруппы в генофонде населения Горного Алтая эпохи позднего неолита позволяют рассматривать этот компонент генофонда мтДНК в качестве потенциально информативного маркера для реконструкции ранних этногенетических процессов, протекавших на территории южных районов Западной и Восточной Сибири.

Таким образом, результаты исследования мтДНК индивида из неолитического погребения в пещере Каминная свидетельствуют о присутствии в составе генофонда мтДНК наиболее ранней группы анатомически современного населения Горного Алтая, доступной для палеогенетического исследования, восточно-евразийского компонента (гаплогруппы А4). Эти данные хорошо согласуются с результатами исследования современного аборигенного населения южных районов Западной и Восточной Сибири, согласно которым в этих регионах были локализованы очаги диверсификации некоторых восточно-евразийских гаплогрупп (Derenko et al., 2003, 2007; Starikovskaya et al., 2005). Полученные результаты противоречат высказанным ранее предположениям о присутствии лишь западно-евразийских гаплогрупп в генофонде мтДНК населения Горного Алтая и начале «интенсивного смешения западных и восточных генных потоков» в регионе в эпоху железа, в период существования здесь населения пазырыкской культуры (Чикишева и др., 2007). На наш взгляд, наиболее вероятно, что генофонд мтДНК населения Горного Алтая был смешанным, т. е. состоял из западно- и восточно-евразийских гаплогрупп уже в эпоху неолита (а возможно, и раньше). Этногенетические процессы в течение последующих эпох изменяли состав и соотношение гаплогрупп мтДНК в генофонде, который оставался смешанным.

Работа поддержана грантами РФФИ 09-06-00357а, РФФИ 11-06-12006-офи-м, РГНФ 10-01-00193а и Междисциплинарным интеграционным проектом СО РАН № 115 (2009–2011 гг.).

Литература

- Бермишева М., Тамбетс К., Виллемс Р., Хуснутдинова Э. Разнообразие гаплогрупп митохондриальной ДНК у народов Волго-Уральского региона России // Молекуляр. биология. 2002. Т. 36. № 6. С. 990–1001.
- Губина М.А., Осипова Л.П., Виллемс Р. Анализ материнского генофонда по полиморфизму митохондриальной ДНК в популяциях хантов и коми Шурышкарского района ЯНАО // Коренное население Шурышкарского района Ямало-Ненецкого автономного округа: демографические, генетические и медицинские аспекты. Новосибирск, 2005. С. 105–117.
- 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. 1554–1560.
- Деревянко А.П. Верхний палеолит в Африке и Евразии и формирование человека современного анатомического типа. Новосибирск, 2011. 560 с.
- Деревянко А.П., Шуньков М.В. Раннепалеолитическая стоянка Карама на Алтае: первые результаты исследований // Археология, этнография и антропология Евразии. 2005. № 3 (23). С. 52–69.
- Дремов В.А. Население Верхнего Приобья в эпоху бронзы: Антропологический очерк. Томск: Изд-во Томск. гос. ун-та, 1997. 260 с.
- Кирюшин Ю.Ф., Кунгуров А.Л., Степанова Н.Ф. Археология Нижнетыткескенской-1 пещеры. Барнаул: Изд-во Алтайск. гос. ун-та, 1995. 150 с.

- Кунгурова Н.Ю. Могильник Солонцы-5. Культура погребенных неолита Алтая. Барнаул, 2005. 128 с.
- Кунгурова Н.Ю., Чикишева Т.А. Результаты исследования неолитического могильника Солонцы-5 на р. Бия // Проблемы археологии, этнографии, антропологии Сибири и сопредельных территорий. Т. 8. Новосибирск: Изд-во ИАЭТ СО РАН, 2002. С. 121–129.
- Маркин С.В. Неолитическое погребение Северо-Западного Алтая // Археология, этнография и антропология Евразии. 2000. № 2 (2). С. 53–64.
- Молодин В.И. Неолитические погребения на озере Иткуль и некоторые соображения по поводу погребальных комплексов данной эпохи в предгорьях и горах Алтая // Проблемы неолита–энеолита юга Западной Сибири. Кемерово, 1999. С. 36–57.
- Народы мира. Энциклопедия / Под ред. Л.М. Минц. М., 2007. 638 с.
- Народы России: энциклопедия / Гл. ред. В.А. Тишков. М.: Большая Рос. энциклопедия, 1994. 479 с.
- Пилипенко А.С., Ромащенко А.Г., Молодин В.И. и др. Особенности захоронения младенцев в жилищах городища Чича-I Барабинской лесостепи по данным анализа структуры ДНК // Археология, этнография и антропология Евразии. 2008. № 2. С. 57–67.
- Солодовников К.Н. Материалы к антропологии афанасьевской культуры // Древности Алтая. 2003. № 10. С. 3–28.
- Федорова С.А., Бермишева М.А., Виллемс Р. и др. Анализ линий митохондриальной ДНК в популяции якутов // Молекуляр. биология. 2003. Т. 37. С. 643–653.
- Чикишева Т.А. Новые данные об антропологическом составе населения Алтая в эпохи неолита–бронзы // Археология, этнография и антропология Евразии. 2000. № 1 (1). С. 139–148.
- Чикишева Т.А. Динамика антропологической дифференциации населения юга Западной Сибири в эпохи неолита–раннего железного века: Автореф. дис. ... д-ра ист. наук. Новосибирск: Ин-т археологии и этнографии СО РАН, 2010. 50 с.
- Чикишева Т.А., Губина М.А., Куликов И.В. и др. Палеогенетическое исследование древнего населения Горного Алтая // Археология, этно-графия и антропология Евразии. 2007. № 4 (32). С. 130–142.
- Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F. *et al.* Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA // Nat. Genet. 1999. V. 23. P. 147.
- Comas D., Calafell F., Mateu E. *et al.* Trading genes along the Silk Road: mtDNA sequences and the origin of Central Asian populations // Am. J. Hum. Genet. 1998. V. 63. P. 1824–1838.

- Derbeneva O.A., Starikovskaya E.B., Wallace D.C., Sukernik R.I. Traces of early Eurasians in the Mansi of Northwest Siberia revealed by mitochondrial DNA analysis // Am. J. Hum. Genet. 2002. V. 70. P. 1009–1014.
- Derenko M.V., Grzybowski T., Malyarchuk B.A. et al. Diversity of mitochondrial DNA lineages in South Siberia // Ann. Hum. Genet. 2003. V. 67. P. 391–411.
- Derenko M., Malyarchuk B., Grzybowski T. *et al.* Phylogeographic analysis of mitochondrial DNA in Northern Asian populations // Am. J. Hum. Genet. 2007. V. 81. P. 1025–1041.
- Ermini L., Olivieri C., Rizzi E. *et al.* Complete mitochondrial genome sequence of the Tyrolean Iceman // Curr. Biol. 2008. V. 18. P. 1687–1693.
- Gokcumen O., Dulik M.C., Pai A.A. *et al.* Genetic variation in the enigmatic Altaian Kazakhs of South-Central Russia: insights into Turkic population history // Am. J. Phys. Anthropol. 2008. V. 136. P. 278–293.
- Haak W., Forster P., Bramanti B. *et al*. Ancient DNA from the first European farmers in 7500-year-old neolithic sites // Science. 2005. V. 305. P. 1016–1018.
- Keyser-Tracqui C., Crubezy E., Ludes B. Nuclear and mitochondrial DNA analysis of a 2,000 year-old necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia // Am. J. Hum. Genet. 2003. V. 73. P. 247–260.
- Kolman C.J., Sambuughin M., Bermingham E. Mitochondrial DNA analysis of Mongolian population and implications for the origin of New World founders // Genetics. 1996. V. 142. N 4. P. 1321–1334.
- Krause J., Fu Q., Good J.M. *et al.* The complete mitochondrial DNA genome of an unknown hominin from southern Siberia // Nature. 2010. V. 464. P. 894–897.
- Metspalu M., Kivisild T., Metspalu E. *et al.* Most of the extant mtDNA boundaries in South and Southwest Asia were likely shaped during the initial settlement of Eurasia by anatomically modern humans // BMC Genet. 2004. V. 5. P. 26.
- Pilipenko A.S., Romaschenko A.G., Molodin V.I. *et al.* Mitochondrial DNA Studies of the Pazyryk people (4th to 3rd centuries BC) from northwestern Mongolia // Archaeol. Anthropol. Sci. 2010. V. 2. P. 231–236.
- Pakendorf B., Novgorodov I.N., Osakovskij V.L. *et al.* Investigating the effects of prehistoric migrations in Siberia: genetic variations and the origins of Yakuts // Hum. Genet. 2006. V. 120. P. 334–353.
- Pimenoff V.N., Comas D., Palo J.U. *et al.* Northwest Siberian Khanty and Mansi in the junction of West and East Eurasian gene pools as revealed by uniparental markers // Eur. J. Hum. Genet. 2008. V. 16. P. 1254–1264.
- Starikovskaya E.B., Sukernik R.I., Derbeneva O.A. et al. Mitochondrial DNA diversity in indigenous popula-

tions of the southern extent of Siberia, and the origin of native American haplogroups // Ann. Hum. Genet. 2005. V. 69. P. 67–89.

- van Oven M., Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation // Hum. Mutat. 2009. V. 30. P. 386–394.
- Volodko N.V., Starikovskaya E.B., Mazunin I.O. *et al.* Mitochondrial genome diversity in arctic Siberians, with particular reference to the evolutionary history of Beringia and Pleistocenic peopling of the Americas // Am. J. Hum. Genet. 2008. V. 82. P. 1084–1100.

MITOCHONDRIAL DNA OF A LATE NEOLITHIC WOMAN FROM KAMINNAYA CAVE (GORNY ALTAI)

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

 ¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: alexpil@bionet.nsc.ru;
² Institute of Archaeology and Ethnography, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Summary

Molecular analysis of the mitochondrial DNA of a Late Neolithic (middle of the 4th millenium BC) woman from Kaminnaya Cave (Gorny Altai) has been performed. The woman possesses East Eurasian haplogroup A4. Phylogeographical data indicate that A4 variants are useful in the reconstruction of the early ethnogenetic history of southern West and East Siberias.

Key words: molecular genetics, human mitochondrial DNA, haplogroup A, paleogenetics, Neolithic, ethnogenesis, Siberia.

ПОИСК РЕГУЛЯТОРНЫХ SNPs, СВЯЗАННЫХ С РАЗВИТИЕМ РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ, В ГЕНАХ *АРС* И *MLH1*

Е.В. Антонцева¹, Л.О. Брызгалов¹, М.Ю. Матвеева¹, Е.В. Кашина¹, Н.В. Чердынцева², Т.И. Меркулова¹

¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: schly@mail.ru; ² НИИ онкологии СО РАМН, Томск, Россия

С использованием экспериментальных данных проекта ENCODE по распределению в геноме человека областей связывания различных транскрипционных факторов (ChIP-seq) был проведен отбор полиморфизмов, попадающих в регуляторные области генов *APC* и *MLH1*. Регуляторную значимость таких полиморфизмов тестировали в экспериментах по задержке ДНК-зонда в геле белками ядерного экстракта клеточных линий человека. Оказалось, что более половины полиморфизмов, попадающих в область перекрывания более 8 пиков ChIP-seq, являются регуляторно значимыми.

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм, иммунопреципитация хроматина, регуляция экспрессии генов, рак толстой кишки.

Введение

Колоректальный рак занимает четвертое место в структуре онкологической заболеваемости в мире и третье место в России (Тимофеев, 2004). Основная проблема при терапии этого заболевания – обращение пациентов уже на поздних стадиях, когда выживаемость после оперативного вмешательства составляет 5%, в то время как своевременная постановка диагноза на ранних этапах увеличивает этот показатель до 80%. В этой связи нельзя переоценить значение работ по поиску молекулярных маркеров предрасположенности к этому заболеванию, что позволит выделить группу риска среди населения для более частого обследования и проводить раннюю диагностику. Одним из генетических факторов предрасположенности к развитию рака является наличие однонуклеотидных полиморфизмов (Single nucleotide polymorphisms, SNPs) в генах, ассоциированных с тем или иным онкологическим заболеванием.

Большинство известных на сегодняшний день SNPs было обнаружено благодаря секвенированию генома человека с последующим сравнением гомологичных последовательностей ДНК среди людей разных популяций. В результате такого подхода успешно выявлялись полиморфизмы с частотой встречаемости более 1-5%. В среднем один SNP приходится на 300 нуклеотидов (Seeb et al., 2011). В последние годы в связи с развитием высокопроизводительных методов секвенирования ДНК резко возрос объем информации о насыщенности геномов однонуклеотидными полиморфизмами. Так, если в 2005 г. в базе NCBI dbSNP было зарегистрировано чуть больше 10 млн SNPs в человеческих геномах (Miller et al., 2005), то сейчас их насчитывается более 48 млн. Стремительно увеличивается и объем информации о клинически ассоциированных SNPs, к настоящему времени в базе ОМІМ их насчитывается уже более 25 тыс. (http://www.ncbi.nlm.nih. gov/SNP/). Использование новых технологий генотипирования совместно с базой данных гаплотипов человека (International HapMap Project) (Frazer, 2007; Altshuler et al., 2010) позволяет анализировать значительно большее количество выборок «случай»--«контроль» без какой-либо предварительной гипотезы о связи аллеля с предрасположенностью к заболеванию. В связи с этим активно развиваются и геномассоциированные исследования (genome-wide association studies, GWAS), выявляющие на

основе встречаемости SNP-маркеров регионы генома, полиморфные варианты которых ответственны за ассоциацию с фенотипическим проявлением (Casto, Feldman, 2011; Chung, Chanock, 2011).

Большинство SNPs являются нейтральными и не оказывают заметного влияния на фенотип, и только малая доля замен характеризуется фенотипическим проявлением посредством изменения функции гена или уровня его экспрессии (Chung, Chanock, 2011; Matsuzaki, 2011; Zhao, Bracken, 2011). В современной литературе выделяют три функционально значимые группы полиморфизмов: SNPs в кодирующих последовательностях (cSNP, изменяют аминокислотную последовательность белка, влияют на процессинг РНК и белка); SNPs в регуляторных последовательностях (rSNP, влияют на регуляцию экспрессии гена на уровне как транскрипции, так и постранскрипционном) и SNPs в сайтах сплайсинга (sSNP) (Ponomarenko et al., 2002; Wray, 2007). cSNP изучаются особенно интенсивно в связи с относительной простотой их интерпретации, в особенности в тех случаях, когда они приводят к заменам аминокислот (несинонимичные замены). Несинонимичные замены могут изменять функцию белка, либо совершенно разрушая его пространственную организацию, либо тонко корректируя его функциональные домены (Balasubramanian et al., 2005). SNPs, модифицирующие сайты сплайсинга (sSNP), занимают второе по степени изученности место. Большая часть этих замен выявлена в экзонах и существенно меньшая - в интронах (Fairbrother et al., 2004). Все известные случаи sSNP отражены в базе данных ASD, посвященной альтернативному сплайсингу (Stamm et al., 2006).

Явное преобладание информации о cSNP и sSNP над сведениями о rSNP в базах данных показывает, что основные усилия по выявлению и изучению SNPs сосредоточены на вариантах, приводящих к изменению структуры, а следовательно, и функции белка. SNPs, способные хотя бы потенциально влиять на интенсивность экспрессии того же белка на уровне транскрипции, остаются мало исследованными (Chorley *et al.*, 2008; Ponomarenko *et al.*, 2002). Так, на сегодняшний день в базе PubMed NCBI зарегистрировано более 50 000 публикаций по SNPs, из них по rSNP - менее сотни. Хотя именно эта группа SNPs представляет наибольший интерес как с фундаментальной, так и с прикладной точек зрения. Прежде всего, изучение регуляторных SNPs дает уникальную информацию о регуляторных районах различных генов и функциональной значимости отдельных регуляторных элементов. В последние годы интенсивно развивается также направление, посвященное изучению роли rSNP в адаптивных процессах и процессе эволюции (Wray, 2007; Yokoyama et al., 2011). Регуляторные SNPs могут играть также роль в развитии различных патологических состояний, изменяя уровень экспрессии кандидатных генов. При этом потенциально регуляторными, как правило, считаются SNPs, расположенные в промоторных районах генов (Walitza et al., 2005; Armelin-Correa et al., 2005). Интроны в плане содержания rSNP практически не рассматриваются. Однако хорошо известно, что они также могут содержать регуляторные участки, и к настоящему времени в интронах найдено значительное количество связанных с фенотипическими проявлениями SNPs, не поддающихся интерпретации в качестве повреждающих сайты сплайсинга (Горшкова и др., 2006; Sribudiani et al., 2011). Интересно заметить, что значительная часть таких SNPs располагается в высококонсервативных между видами районах внутри некодирующих последовательностей (Donfack et al., 2005).

До сих пор выявление и изучение rSNP проводилось только в индивидуальных генах. Развитие современных методов массового анализа геномов, накопление информации об однонуклеотидных полиморфизмах и появление методов масштабного поиска мест связывания регуляторных белков поставило задачу разработки подходов к полногеномному варианту поиска регуляторных SNPs с учетом доступных геномных ресурсов и репозитариев данных, таких, как NCBI и проект ENCODE. В данной статье предложен один из вариантов такого подхода для поиска rSNP в генах АРС (adenomatous polyposis coli, ген аденоматозного полипоза толстой кишки) (Miyoshi et al., 1992; Fearnhead et al., 2002) u MLH1(MutL homolog 1, ген неполипозного рака толстой кишки) (Stoffel, 2010), ассоциированных с развитием рака толстой кишки.

Материалы и методы

Базы данных и компьютерная программа

База данных dbSNP NCBI (http://www.ncbi. nlm.nih.gov/SNP/) содержит информацию обо всех известных на сегодняшний день полиморфизмах в различных геномах.

В базе данных ChIP-seq проекта ENCODE (http://genome.ucsc.edu/ENCODE/) отражено распределение сайтов связывания транскрипционных факторов в геномах различных клеточных линий человека, выявленных с помощью экспериментов по массовой иммунопреципитации хроматина (ChIP-seq, chromatin immunoprecipitation sequencing).

Разработанная нами компьютерная программа SNPChIPTools для поиска потенциально регуляторных полиморфизмов в геноме человека на основе данных профилей связывания ChIP-seq реализована на языке Perl и доступна через интернет (http://lungry.bionet.nsc.ru/cgibin/SNPProject/SNPChIPTools.cgi).

Клеточные линии

Культивирование клеточных линий осуществлялось на базе Центра клеточных технологий ИЦиГ СО РАН. Для проведения экспериментов использовали культуру клеток гепатомы человека НерG2, эпителиальные человеческие клеточные линии аденокарциномы шейки матки HelaS3 и колоректальной карциномы НСТ-116, клетки миелоидной лейкемии человека К562. Прикрепленные культуры клеток HepG2, HelaS3, HCT-116 и суспензионную культуру К562 культивировали в пластиковых культуральных флаконах «Greiner» в увлажненной атмосфере 5 % СО2 и 95 % воздуха при 37 °C в среде DMEM/F12 « GIBCO», содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки «Thermo Scientific HYCLONE», пенициллин (100 ЕД/мл) и стрептомицин (100 мг/мл) производства «Sigma». Жизнеспособность клеток оценивали как после размораживания, так и в процессе культивирования по включению в цитозоль трипанового синего. Она была выше 95 % в течение всего процесса культивирования. Смену питательной среды осуществляли 2 раза в неделю.

Метод задержки ДНК-зонда в геле белками ядерного экстракта

Получение белкового экстракта ядер из клеточных линий человека проводили следующим методом: 10⁷ клеток инкубировали с 1 мл лизирующего буфера (10 mM Hepes, 10 mM KCl, 1 mM ДТТ, 0,5 mM спермидин, 0,15 mM спермин, 0,1 mM ЭДТА, 0,1 mM ЭГТА, 0,5 mM ПМСФ, коктейль ингибиторов протеаз «Pirce») в течение 15 мин на льду, затем добавляли 62 мкл 10% NP-40 и центрифугировали в течение 5 мин при 4°С, 400 g. Осадок ядер лизировали в буфере (20 mM Hepes, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl., 0,2 mM ЭДТА, 1 mM ДТТ, 25% глицерин, коктейль ингибиторов протеаз «Pirce») в течении 20 мин на льду, после чего центрифугировали в течение 10 мин при 4°С, 10000 g. Супернатант, содержащий суммарный белок ядер, отбирали в чистую пробирку, измеряли концентрацию на спектрофотометре по методу Бредфорд, фасовали на аликвоты и хранили при -72 °С.

В качестве ДНК-зондов использовали двуцепочечные олигонуклеотиды, соответствующие различным полиморфным вариантам для каждого SNP (табл. 1, 2). Введение метки в ДНК-зонд осуществляли с помощью достройки укороченных З'-концов фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I. Реакцию вели 5 мин при комнатной температуре в 10 мкл реакционной смеси, содержавшей 0,01 мМ олигонуклеотида, 1 мкл 10× буфера для мечения (500 мМ Трис-HCl, pH = 8,0, 100 мМ NaCl, 100 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, 2 мМ dГТФ, 2 мМ $dTT\Phi$, 2 мM $dCT\Phi$), 2 единицы активности фрагмента Кленова, 10 мкКи (α-32Р)dATΦ. Для очистки олигонуклеотидов от невключившейся метки реакционную смесь наносили на ионообменную бумагу ДЕАЕ-81 и промывали 0,25 M KH₂PO₄.

Анализ связывания фрагментов ДНК с белками ядерных экстрактов проводили по следующей методике: белковый ядерный экстракт инкубировали с обработанной ультразвуком ДНК спермы лосося (из расчета 1 мкг ДНК на 7 мкг суммарного белка) в течение 10 мин на льду для предотвращения неспецифического связывания белков с ДНК-зондом. После этого добавляли 4 мкг экстракта к пробам, содержащим 50 рМ

Таблица 1

Результаты компьютерно-теоретического поиска и экспериментальной проверки регуляторных полиморфизмов в гене АРС

Идентификацион- ный № SNP в базе dbSNP NCBI	Число пиков ChIP-seq	Последовательности олигонуклеотидов, соответствующие разным полиморфным вариантам	Влияние SNPs на связывание с белками
rs113017087	27	GTGTAATCCGCTGGA C GCGGACCAGGGCGCT GTGTAATCCGCTGGA T GCGGACCAGGGCGCT	нет
rs115242894	27	GTATTGGTGCAGCCC <u>C</u> CCAGGGTGTCACTGG GTATTGGTGCAGCCC <u>C</u> CCAGGGTGTCACTGG	нет
rs115658307	23	CAAGATGGCGGAGGG <u>C</u> AAGTAGCAAGGGGGC CAAGATGGCGGAGGG <u>T</u> AAGTAGCAAGGGGGGC	нет
rs138386816	21	GCGGGGTGTGGCCGC <u>C</u> GGAAGCCTAGCCGCT GCGGGGTGTGGCCGC <u>T</u> GGAAGCCTAGCCGCT	нет
rs35417795	16	GTGCGGTTGGGCGGG <u>-</u> CCCTGTGCCCCACTG GTGCGGTTGGGCGGG <u>G</u> CCCTGTGCCCCACTG	да
rs75996864	26	ACCGACATGTGGCTG <u>G</u> ATTGGTGCAGCCCGC ACCGACATGTGGCTG <u>T</u> ATTGGTGCAGCCCGC	да
rs76241113	20	GCGGGGGGGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	да
rs77733015	15	GGGCTAGGCAGGCTG <u>G</u> GCGGTTGGGCGGGGC GGGCTAGGCAGGCTG <u>T</u> GCGGTTGGGCGGGGC	нет
rs78037487	26	CCATTCCCGTCGGGA <u>C</u> CCCGCCGATTGGCTG CCATTCCCGTCGGGA <u>G</u> CCCGCCGATTGGCTG	да
rs78429131	17	AGGAAGGTGAAGCAC <u>G</u> CAGTTGCCTTCTCGG AGGAAGGTGAAGCAC <u>T</u> CAGTTGCCTTCTCGG	нет
rs78597499	16	AGGCAGGCTGTGCGG <u>G</u> TGGGCGGGGCCCTGT AGGCAGGCTGTGCGG <u>T</u> TGGGCGGGGCCCTGT	нет
rs79896135	21	AGCCTAGCCGCTGCT <u>C</u> GGGGGGGGACCTGCGG AGCCTAGCCGCTGCT <u>C</u> GGGGGGGGACCTGCGG	да
rs80112297	19	$\begin{array}{l} GCTTGCTGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG$	да
rs80313086	20	GGGGAGGGGGGGAAGG <u>C</u> GGTTTTCCCTCGCAC GGGGAGGGGGGGAAGG <u>G</u> GGTTTTCCCTCGCAC GGGGAGGGGGGGAAGG <u>T</u> GGTTTTCCCTCGCAC	да

ДНК-пробы, меченной (³²P), и доводили общий объем реакционной смеси до 15 мкл 0,8×PBS. После инкубации при комнатной температуре в течение 15 мин смесь подвергали электрофорезу в 4,5% ПААГ в 0,5×ТВЕ при 4 °С, затем гель выдерживали в фиксирующем растворе, высушивали и экспонировали с рентгеновской пленкой.

Выделение ДНК из крови

Формирование коллекции образцов крови больных раком толстой кишки было проведено на базе клиники НИИ онкологии СО РАМН, г. Томск. Для выделения ДНК использовали 2 мл крови, содержащей 0,5 мМ ЭДТА. К 2 мл крови добавляли 12 мл буфера 1 (320 мМ сахароза, 1%

Таблица 2

Идентифика- ционный № SNP в базе dbSNP NCBI	Число пиков ChIP-seq	Последовательности олигонуклеотидов, соответствующие разным полиморфным вариантам	Влияние SNP на связыва- ние с белками
rs112765329	15	AGGAAGAGCGGACAG <u>A</u> GATCTCTAACGCGCA AGGAAGAGCGGACAG <u>C</u> GATCTCTAACGCGCA	нет
rs114683294	25	GGCGGAGGCCGCCGG <u>A</u> TTCCCTGACGTGCCA GGCGGAGGCCGCCGG <u>G</u> TTCCCTGACGTGCCA	нет
rs34566456	28	GATGAGGCGGCGACA <u>C</u> ACCAGGCACAGGGCC GATGAGGCGGCGACA <u>G</u> ACCAGGCACAGGGCC	нет
rs35032294	16	AACCAATAGGAAGAG C GGACAGCGATCTCTA AACCAATAGGAAGAG G GGACAGCGATCTCTA	да
rs4647205	14	ACCTTTTAAGGGTTG <u>G</u> TTGGAGTGTAAGTGG ACCTTTTAAGGGTTG <u>T</u> TTGGAGTGTAAGTGG	нет
rs55927901	25	ACGACTTAACGGGCC <u>C</u> CGTCACTCAATGGCG ACGACTTAACGGGCC <u>G</u> CGTCACTCAATGGCG	нет
rs1800734	28	GCGTAAGCTACAGCT <u>A</u> AAGGAAGAACGTGA GCGTAAGCTACAGCT <u>G</u> AAGGAAGAACGTGAG	да

Результаты компьютерно-теоретического поиска и экспериментальной проверки регуляторных полиморфизмов в гене *MLH1*

Triton X-100, 5 мМ Трис Cl, pH 7,6, 5 мМ MgCl₂), инкубировали 2 часа на льду, центрифугировали в течение 15 мин при 4°С, 1500 g. Осадок ядер суспендировали в 1,6 мл буфера 2 (25 мМ ЭДТА, pH 8, 75 мM NaCl) и затем центрифугировали в течение 4 мин при 4 °C, 700 g. Осадок суспендировали в 1 мл буфера 2, добавляли ДДС до 1 % и протеиназу К до концентрации 50 мкг/мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 18 ч при перемешивании. После этого добавляли AcNa, pH 7,5, до концентрации 0,3 M, а затем равный объем фенола, pH 8,0, смесь инкубировали 10 мин при 0°С и центрифугировали в течение 10 мин при 4°С, 15000 g. Водную фазу отбирали в новые пробирки и добавляли равный объем смеси фенола и хлороформа в отношении 1:1. Перемешивали и инкубировали 5 мин при 0°С, после чего центрифугировали в течение 10 мин при 4°C, 15000 g. Снова отбирали водную фазу и добавляли к ней равный объем хлороформа, перемешивали и инкубировали 5 мин при 0°С. После центрифугирования образцов в течение 10 мин при 4°С, 15000 g водную фазу отбирали и добавляли к ней равный объем изопропанола. Инкубировали 10 мин при комнатной темпера-

туре и центрифугировали в течение 15 мин при 15000 g. Осадок промывали 70%-м спиртом и растворяли в бидистиллированной воде.

Секвенирование ДНК

Реакцию Сэнгера проводили в амплификаторе GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкг ДНК-матрицы, 2 пмоля праймера, 3 мкл BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1 (Applied Biosystems), 2 мкл BigDye-буфера (Applied Biosystems). Образцы ДНК после реакции Сэнгера очищали с помощью гель-фильтрации на Sephadex G100. Очищенные образцы подсушивали на концентраторе Eppendorf 5301 и сдавали в Межинститутский центр секвенирования ДНК для анализа на секвенаторе ABI 3100 (Applied Biosystems).

Последовательности праймеров для секвенирования:

APC1-U 5'-AGAACAGCGAAGCAGTGCCCG-3', APC1-R 5'-CGGTGCTCCAGGACCCGAGA-3', APC2-U 5'-GCTTCAACTCAGGCAACCCAGACT-3', APC2-R 5'-TCTACCCCTCCCCCTTCTTCCTCT-3', MLH1-U 5'-GAAGGAGGCCACGGGCAAGTC-3', MLH1-R 5'-CACCTCAGTGCCTCGTGCTCA-3', MLH2-U 5'-CGTGAGCACGAGGCACTGAGG-3', MLH2-R 5'-GCGTCCTCCGAAATAAAGGACAGG-3'.

Результаты

Компьютерная программа SNPChIPTools для поиска потенциально регуляторных полиморфизмов в геноме человека на основе данных профилей связывания ChIP-seq

В настоящее время в области анализа данных высокопроизводительного секвенирования сложилась ситуация, когда экспериментальные технологии в своем развитии значительно опережают биоинформационные средства их поддержки, анализа и интерпретации результатов экспериментов. В связи с появлением огромного массива экспериментальных данных по распределению участков связывания транскрипционных факторов в геноме человека (проект ENCODE) появилась возможность предсказывать регуляторные районы генов в масштабе целого генома.

В основу разработанной нами компьютерной программы SNPChIPTools (http://lungry. bionet.nsc.ru/cgi-bin/SNPProject/SNPChIPTools. cgi) легли экспериментальные данные проекта ENCODE по распределению областей связывания различных транскрипционных факторов методом ChIP-seq. Эти данные представляют собой сведения, полученные с помощью метода массового параллельного секвенирования, о расположении пиков ChIP-seq, соответствующих местам связывания различных факторов транскрипции, во всем геноме. Нами была выдвинута гипотеза о том, что области, обогащенные пиками ChIP-seq, с большой вероятностью являются регуляторными, и расположенные в них полиморфизмы могут влиять на регуляцию экспрессии генов, разрушая или создавая сайты связывания регуляторных белков.

Данная компьютерная программа осуществляет поиск пиков ChIP-seq в месте расположения конкретного полиморфизма. Поиск осуществляется путем сравнения хромосомных координат участков полиморфизмов и групп пиков ChIP-seq по геномному релизу hg19.

Поиск регуляторных полиморфизмов в генах *АРС* и *MLH1*

Из базы данных dbSNP NCBI были отобраны полиморфизмы, располагающиеся в генах АРС (связанном с развитием семейного полипозного рака толстой кишки) и MLH1 (связанном с неполипозным типом рака толстой кишки), 2366 и 1023 полиморфизмов соответственно. С помощью разработанной нами программы SNPChIPTools эти SNP были проанализированы и выбраны те из них, что попадали в область перекрывания более 8 пиков ChIP-seq. В результате этого были отобраны потенциально регуляторные полиморфизмы – 14 для гена APC (rs113017087, rs115242894, rs115658307, rs138386816, rs35417795, rs75996864, rs76241113, rs77733015, rs78037487, rs78429131, rs78597499, rs79896135, rs80112297, rs80313086) (табл. 1) и 7 для гена MLH1 (rs112765329, rs114683294, rs34566456, rs35032294, rs4647205, rs55927901, rs1800734) (табл. 2). Для функционального анализа этих полиморфизмов были синтезированы олигонуклеотиды (табл. 1, 2), которые использовали в качестве ДНК-зондов в экспериментах по задержке их в геле белками ядерного экстракта.

В результате из 14 потенциально регуляторных полиморфизмов в гене APC (rs113017087, rs115242894, rs115658307, rs138386816, rs35417795, rs75996864, rs76241113, rs77733015, rs78037487, rs78429131, rs78597499, rs79896135, rs80112297, rs80313086) после экспериментальной проверки с помощью метода задержки ДНК-зонда в геле белками ядерного экстракта функционально значимыми были признаны 7 (rs75996864, rs76241113, rs78037487, rs80112297, rs80313086, rs79896135, rs35417795) (табл. 1), поскольку они влияли на формирование комплексов с белками. На рис. 1 представлены типичные примеры результатов таких экспериментов. На основе полученных данных можно предполагать, что эти полиморфизмы способны нарушать регуляторный код гена АРС, разрушая сайты связывания одних факторов транскрипции и/или создавая сайты для других, и таким образом, вносить свой вклад в регуляцию экспрессии гена на транскрипционном уровне.

Для гена *MLH1* из 7 отобранных по результатам компьютерного поиска полиморфизмов в



Рис. 1. Влияние полиморфизма на связывание ДНК-зонда белками ядерного экстракта.

Олигонуклеотиды, соответствующие разным вариантам участка ДНК, использовались в эксперименте в качестве ДНК-зондов. а, б – наличие полиморфизма приводит к появлению новых комплексов – полос задержки и ослаблению старых; в – перераспределение интенсивности полос задержки комплексов ДНК-белок; г – наличие полиморфизма не вызывает изменений в картине связывания.

двух случаях (rs35032294, rs1800734) (табл. 2) олигонуклеотиды, соответствующие разным вариантам SNP, формируют разные картины связывания с белками ядерного экстракта. Это свидетельствует о том, что данные полиморфизмы обладают регуляторным потенциалом и способны приводить к изменениям в экспрессии гена *MLH1* на уровне транскрипции.

Генотипирование больных раком толстой кишки

Для проверки связи выявленных нами регуляторных полиморфизмов в генах *MLH1* и *APC* с предрасположенностью к развитию рака толстой кишки были начаты работы по генотипированию больных колоректальным раком. Была создана начальная выборка из 10 образцов ДНК. Методом прямого секвенирования по Сенгеру были проанализированы районы ДНК, содержащие выявленные программой SNPChIPTools полиморфизмы в генах *APC* и *MLH1*.

Так, из анализируемых 14 полиморфизмов в гене *АРС* в нашей выборке больных только у одного человека было найдено сразу два (rs79896135, rs78429131), причем один из них (rs79896135) менял спектр связывания транскрипционных факторов в экспериментах по задержке ДНК-зонда в геле. При поиске предсказанных компьютерной программой регуляторных полиморфизмов в гене *MLH1* была выявлена ранее неаннотированная делеция продолжительностью 26 нуклеотидов, удаляющая два из проанализированных нами полиморфизмов (rs35032294, rs112765329). Причем один из них (rs35032294) значительно влиял на связывание факторов транскрипции с данным районом в экспериментах по задержке ДНК-зонда в геле. Примечательно, что данная делеция обнаружена у всех 10 пациентов, что может являться свидетельством ее причастности к развитию этого заболевания.

Однако на данном этапе для оценки эффективности использования предложенного нами подхода поиска потенциально регуляторных полиморфизмов как кандидатных для выявления их клинических ассоциаций наша выборка больных колоректальным раком мала. В связи с этим был проведен анализ клинически ассоциированных полиморфизмов, аннотированных в базе данных ОМІМ. Оказалось, из 14 полиморфизмов, предсказанных нашей программой SNPChIPTools в гене APC, 7 уже идентифицированы как ассоциированные с предрасположенностью к развитию колоректального рака, причем в их число не входят SNP, выявленные нами в ходе генотипирования. В гене MLH1 всего 1 полиморфизм из 7 предсказанных оказался ассоциированным с этим заболеванием, согласно данным базы OMIM.

Заключение

Выяснение молекулярных механизмов генетической предрасположенности к наиболее распространенным заболеваниям, таким, как сердечно-сосудистые, психоневрологические и онкологические, является одной из основных проблем современной медицинской генетики, молекулярной физиологии и патологии. В рамках этой проблемы в настоящее время во всем мире проводятся широкомасштабные исследования, посвященные выявлению кандидатных генов, изучению полиморфизмов в нуклеотидных последовательностях этих генов и установлению связей между тем или иным вариантом последовательности и изучаемой патологией (Hata, Onouchi, 2009; Toyoda, Ishikawa, 2010;
Kingsley, 2011; Chung, Chanock, 2011). Однако объектом большинства таких работ являются некие конкретные полиморфизмы в отдельных генах-кандидатах, что не дает полного представления о генетически обусловленных причинах развития многофакторных заболеваний.

В связи с развитием методов полногеномного секвенирования появились принципиально новые возможности для поиска различных молекулярных маркеров предрасположенности к развитию таких заболеваний (Shiraishi *et al.*, 2010). В частности, результаты экспериментов по массовой иммунопреципитации хроматина позволяют искать в геноме регуляторные районы и, следовательно, говорить о регуляторном потенциале полиморфизмов, попадающих в эти районы.

В нашей работе описан один из таких подходов. Путем сравнения хромосомных координат с помощью разработанной нами программы SNPChIPTools был осуществлен поиск полиморфизмов в потенциально регуляторных районах, т. е. в местах, обогащенных пиками ChIP-seq, в генах *АРС* и *MLH1*, ассоциированных с развитием колоректального рака. Экспериментальными методами мы подтвердили эффективность теоретического предсказания регуляторных полиморфизмов.

Работа была поддержана Госконтрактом № 16.512.11.2274 Минобрнауки РФ и частично программой президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» № 23.

Литература

- Горшкова Е.В., Каледин В.И., Кобзев В.Ф., Меркулова Т.И. SNP в начале интрона 2 гена К-гаѕ мыши, ассоциированные сразвитием рака легких, влияют на связывание с факторами транскрипции // Бюлл. эксп. биол. медицины. 2006. № 6. С. 681–684.
- Тимофеев Ю.М. Колоректальный рак: современные аспекты диагностики и лечения // Рус. мед. журнал. 2004. № 11. С. 653–656.
- Altshuler D.M., Gibbs R.A., Peltonen L. *et al.* Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations // Nature. 2010. V. 467 (7311). P. 52–58. doi:10.1038/nature09298.
- Armelin-Correa L.M., Lin C.J., Barbosa A. *et al.* Characterization of human collagen XVIII promoter 2: interaction of Sp1, Sp3 and YY1 with the regulatory

region and a SNP that increases transcription in hepatocytes // Matrix Biol. 2005. V. 24. P. 550–559.

- Balasubramanian S., Xia Y., Freinkman E., Gerstein M. Sequence variation in G-protein-coupled receptors: analysis of single nucleotide polymorphisms // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. P. 1710–1721.
- Casto A.M., Feldman M.W. Genome-wide association study SNPs in the human genome diversity project populations: does selection affect unlinked SNPs with shared trait associations? // PLoS Genet. 2011. V. 7(1). e1001266.
- Chorley B.N., Wang X., Campbell M.R. *et al.* Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: current and developing technologies // Mutat. Res. 2008. 659(1/2). P. 147–157. Epub. 2008. May 4.
- Chung C.C., Chanock S.J. Current status of genomewide association studies in cancer // Hum. Genet. 2011. 130(1). P. 59–78. Epub. 2011. Jun 16.
- Donfack J., Schneider D.H., Tan Z. *et al.* Variation in conserved non-coding sequences on chromosome 5q and susceptibility to asthma and atopy // Respir. Res. 2005. V. 6. P. 145.
- Fairbrother W.G., Holste D., Burge C.B., Sharp P.A. Single nucleotide polymorphism-based validation of exonic splicing enhancers // PLoS Biol. 2004. V. 2. P. 1388–1395.
- Fearnhead N.S., Wilding J.L., Bodmer W.F. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis // Br. Med. Bull. 2002. V. 64. P. 27–43.
- Frazer K.A., Ballinger D.G., Cox D.R. *et al.* A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs // Nature. 2007. V. 449 (7164). P. 851–861. doi:10.1038/nature06258.
- Hata A., Onouchi Y. Susceptibility genes for Kawasaki disease: toward implementation of personalized medicine // J. Hum. Genet. 2009. V. 54(2). P. 67–73.
- Kingsley C.B. Identification of causal sequence variants of disease in the next generation sequencing era // Methods Mol. Biol. 2011. V. 700. P. 37–46.
- Matsuzaki S. DNA microarray analysis in endometriosis for development of more effective targeted therapies // Front. Biosci. (Elite Ed). 2011. V. 3. P. 1139–1153.
- Miller R.D., Phillips M.S., Jo I. *et al.* The SNP Consortium Allele Frequency Project. High-density single-nucleotide polymorphism maps of the human genome // Genomics. 2005. V. 86. P. 117–126.
- Miyoshi Y., Nagase H., Ando H. *et al.* Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene // Hum. Mol. Genet. 1992. V. 1. P. 229–233.
- Ponomarenko J.V., Orlova G.V., Merkulova T.I. *et al.* rSNP_Guide: an integrated database-tools system for studying SNPs and site-directed mutations in

transcription factor binding sites // Hum. Mutat. 2002. 20(4). P. 239–248.

- Seeb J.E., Carvalho G., Hauser L. *et al.* Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery and applications of SNP genotyping in nonmodel organisms // Mol. Ecol. Resour. 2011. V. 11. Suppl 1. P. 1–8. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02979.x.
- Shiraishi T., Matsuyama S., Kitano H. Large-scale analysis of network bistability for human cancers // PLoS Comput. Biol. 2010. V. 6(7). e1000851.
- Sribudiani Y., Metzger M., Osinga J. *et al.* Variants in RET associated with Hirschsprung's disease affect binding of transcription factors and gene expression // Gastroenterology. 2011. V. 20. N 2. P. 572–582.
- Stamm S., Riethoven J.J., Le Texier V. *et al.* ASD: a bioinformatics resource on alternative splicing // Nucl. Acids Res. 2006. V. 34. P. D46–55.
- Stoffel E.M. Lynch Syndrome/Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer (HNPCC) // Minerva Gastroenterol. Dietol. 2010. V. 56(1). P. 45–53.

- Toyoda Y., Ishikawa T. Pharmacogenomics of human ABC transporter ABCC11 (MRP8): potential risk of breast cancer and chemotherapy failure. Anticancer Agents // Med. Chem. 2010. V. 10(8). P. 617–624.
- Walitza S., Renner T.J., Dempfle A. *et al.* Transmission disequilibrium of polymorphic variants in the tryptophan hydroxylase-2 gene in attention-deficit/hyperactivity disorder // Mol. Psychiatry. 2005. V. 10. P. 1126–1132.
- Wray G.A. The evolutionary significance of cis-regulatory mutations // Nat. Rev. Genet. 2007. V. 8(3). P. 206–216.
- Yokoyama K.D., Thorne J.L., Wray G.A. Coordinated genome-wide modifications within proximal promoter cis-regulatory elements during vertebrate evolution // Genome Biol. Evol. 2011. V. 3. P. 66–74.
- Zhao L., Bracken M.B. Association of CD14 -260 (-159) C>T and asthma: a systematic review and meta-analysis // BMC Med. Genet. 2011. 12:93. doi:10.1186/1471-2350-12-93.

SEARCH FOR REGULATORY SNPs ASSOCIATED WITH COLON CANCER IN THE APC AND MLH1 GENES

E.V. Antontseva¹, L.O. Bryzgalov¹, M.Yu. Matveeva¹, E.V. Kashina¹, N.V. Cherdyntseva², T.I. Merkulova¹

 Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: Antonseva@bionet.nsc.ru;
² Tomsk Cancer Research Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, Russia

Summary

Polymorphisms belonging to the regulatory regions of the *APC* and *MLH1* genes were detected by invoking ChIP Seq data obtained in the ENCODE project. The significance of these polymorphisms for gene regulation was confirmed by gel retardation of DNA probes by nuclear proteins. More than half of the polymorphisms in the overlapping region of more than eight ChIP-seq peaks were found to be significant for regulation.

Key words: single-nucleotide polymorphism, chromatin immunoprecipitation, gene regulation, colon cancer.

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *РЕАNUT* НА ДЕЛЕНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ И ГЕНЕРАТИВНЫХ КЛЕТОК *DROSOPHILA MELANOGASTER*

К.А. Ахметова, С.А. Федорова

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

Исследовано влияние мутаций в гене *peanut* на деления соматических и генеративных клеток *Drosophila melanogaster*. Показано, что мутации в гене *peanut* вызывают нарушения цитокинеза и сегрегации хромосом в соматических клетках, что приводит к аномалиям плоидности. Напротив, пролиферация генеративных клеток у мутантов остается незатронутой.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, септины, *peanut*, митоз, соматические клетки, генеративные клетки, цитокинез.

Введение

В 1971 г. Хартвелл и Нёрс проводили генетический скрининг у дрожжей и обнаружили множество генов, мутации в которых приводили к нарушениям в клеточном делении. Среди этих Cdc-генов (cell division cycle) были такие, мутации в которых приводили к нарушениям цитокинеза (Hartwel, 1971). Данная группа генов была названа септинами, что отражает роль их продуктов в разделении материнской и дочерней клеток. Септины известны для большинства животных и грибов, однако не встречаются у высших растений (Pan et al., 2007). Активные исследования структуры и функций септинов, выполняемые с момента их открытия, подтвердили их существенную роль в цитокинезе (Longtine et al., 1996; Kinoshita, 2003). Септины также участвуют и в других процессах, таких, как установление полярности клетки, образование диффузного барьера, сегрегация хромосом, везикулярный трафик, экзоцитоз (Gladfelter et al., 2001; Dobbelaere, Barral, 2004; Martinez et al., 2004; Spiliotis et al., 2005; Spiliotis, Nelson, 2006).

У дрозофилы известно 5 представителей семейства септинов. Первым был открыт септин, кодируемый геном *peanut* (*pnut*). Личинки, гомозиготные по нуль-аллельной мутации

pnut^{XP}, погибают вскоре после окукливания, и их ткани содержат многоядерные клетки. У мутантных по *peanut* личинок редуцированы все имагинальные диски, кроме половых (Neufeld, Rubin, 1994).

В работе мы провели сравнение эффектов мутаций в гене *peanut* на деления соматических и половых клеток.

Материалы и методы

В работе использовалась линия *Drosophila melanogaster* дикого типа *Hikone AW* из фонда лаборатории генетики клеточного цикла, а также следующие линии, полученные из Центра поддержания линий дрозофилы в Блумингтоне:

№ 5687: $pnut^{XP}/T(2;3)SM6a-TM6B, Tb^{1};$ № 21071: $y^{1} w^{67c23}; P\{wHy\}pnut^{DG05807};$ № 11194: $cn^{1} P\{PZ\}pnut^{02502}/CyO; ry^{506}.$

Мутация pnut^{XP} представляет собой нульаллель гена pnut, полученный в результате неточной эксцизии P-элемента P{PZ}pnut^{rN498}. В соответствующей линии № 5687 делетировано по крайней мере 17 т.п.н. включая почти всю кодирующую часть гена pnut (начиная с 854-й позиции гена). Гомозиготы по мутации pnut^{XP} не доживают до стадии имаго.

*Мутация pnut*⁰²⁵⁰² обусловлена инсерцией *P*-элемента *P*{*PZ*}-типа в прямой ориентации в некодирующую область гена *pnut* (в позицию 638 гена). Особи, гомозиготные по мутации *pnut*⁰²⁵⁰², не доживают до стадии имаго.

Мутация *pnut*^{DG05807} представляет собой инсерцию *P*-элемента $P\{wHy\}$ -типа в обратной ориентации в некодирующую область гена (в позицию 482 от старта транскрипции гена). Особи, гомозиготные по мутации *pnut*^{DG05807}, доживают до стадии имаго и фертильны.

Методы приготовления препаратов митозов, а также определение стадий митоза клеток нервных ганглиев описаны в работе Л.П. Лебедевой с соавт. (2000). Приготовление давленых препаратов нервных ганглиев и личиночных семенников проводилось по Bonaccorsi с соавт. (2000). Окраска антителами на альфа-тубулин, гамма-тубулин, альфа-спектрин и НЗ гистон проводилась согласно стандартной методике (Dorogova *et al.*, 2008).

Микроскопический анализ проводился в центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН на микроскопе Axioscope 2 plus (Zeiss).

Результаты

Цитологический анализ митозов в клетках нервных ганглиев

В качестве модели соматической ткани использовали нервные ганглии личинок третьего возраста. Нервный ганглий – это личиночный орган дрозофилы, состоящий из активно делящихся мелких ганглиозных клеток и крупных нейробластов. Мы провели цитологический анализ митозов в клетках нервных ганглиев личинок дрозофилы, несущих различные аллельные комбинации гена *pnut*, результаты представлены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что у личинок с сильными аллельными комбинациями ($pnut^{XP}/pnut^{XP}$, $pnut^{02502}/pnut^{02502}$ и $pnut^{02502}/pnut^{XP}$) стадия прометафазы значительно удлинена по сравнению с диким типом, а стадия метафазы укорочена. Кроме того, у гомозигот по нуль-аллельной мутации $pnut^{XP}$ на стадии анафазы находилось почти в 2 раза меньше клеток, чем у дикого типа.

Помимо различий в длительности стадий у мутантов по гену *pnut* наблюдались аномалии плоидности (табл. 2, puc. 1): полиплоидия (количество хромосом в ядре больше диплоидного набора и кратно гаплоидному набору) и анеуплодия (количество хромосом в ядре не кратно гаплоидному набору).

Максимальная частота полиплоидии наблюдается у гомозигот по нуль-аллельной мутации *pnut*^{XP} (23,1% проанализированных ядер были полиплоидны, встречались ядра с набором 4*n*, 8*n* и более). У гомозигот по другой сильной мутации – *pnut*⁰²⁵⁰² – полиплоидия встречается гораздо реже, чем у мутантов *pnut*^{XP}/*pnut*^{XP} (4,5%), при этом анеуплоидия встречается достоверно чаще по сравнению с диким типом (10,3% против 2,6%).

Аномалии сегрегации хромосом свидетельствуют о том, что у мутантов может быть затронут митотический аппарат. Для подтверждения этого мы провели иммунохимическое окрашивание клеток нервных ганглиев антителами, специфичными к микротрубочкам веретена, а также антителами, связывающимися с белками

Таблица 1

Линия	Суммарное количество ядер	Прометафаза, %	Метафаза, %	Начало анафазы, %	Анафаза, %
Hikone-AW (дикий тип)	379	23,74	56,99	6,33	12,94
pnut ^{XP/} pnut ^{XP}	216	43,52*	44,91*	4,17	7,40*
pnut ⁰²⁵⁰² / pnut ⁰²⁵⁰²	155	37,41*	45,16*	4,52	12,91
pnut ⁰²⁵⁰² / pnut ^{XP}	208	37,02*	41,35*	3,84	17,79
pnut ^{XP} / pnut ⁵⁸⁰⁷	148	26,36	46,62*	7,43	19,59

Распределение клеток нервных ганглиев личинок *D. melanogaster* дикого типа и с различными аллельными комбинациями гена *pnut* по стадиям митоза

* Достоверное отличие от дикого типа (*Hikone-AW*). *P* > 0,95 по критерию Стьюдента.

Таблица 2

Аномалии митоза в клетках нервных ганглиев личинок дикого типа, а также личинок с различными аллельными комбинациями гена *pnut*

Линия	Количество проанализиро- ванных ядер	Поли- плоидия, %	Анеу- плоидия, %
<i>Hikone-AW</i> (дикий тип)	379	0	2,64
pnut ^{XP} / pnut ^{XP}	216	23,15*	4,63
pnut ⁰²⁵⁰² / pnut ⁰²⁵⁰²	155	4,52*	10,31*
pnut ⁰²⁵⁰² / pnut ^{XP}	208	3,85*	8,17*
pnut ^{XP} / pnut ⁵⁸⁰⁷	148	0	6,08

* Достоверное отличие от дикого типа, P > 0,99.

центросом. В большинстве случаев веретено деления, а также расположение и количество центросом были нормальными. Однако встречались такие нарушения, как монополярное веретено деления, мультиполярное веретено деления, а также хромосомные мосты (рис. 2).

Цитологический анализ делений генеративных клеток у мутантов по гену *peanut*

Поскольку часть гомозигот по «сильным» мутациям *pnut*^{XP} и *pnut*⁰²⁵⁰² доживает до стадии ранней куколки, нами был проведен анализ делений в семенниках мутантных личинок и ранних куколок.

В яичниках и семенниках дрозофилы при делениях половых клеток образуется специфическая органелла – фузома, необходимая для правильного формирования фолликула в оогенезе и цист в сперматогенезе. Из литературных данных известно, что фузома тесно связана с предмейотическими делениями: если деления идут аномально, то морфология и структура фузомы нарушены и, наоборот, в случае аномалий фузомы предмейотические деления также нарушаются (Lighthouse *et al.*, 2008). Мы показали, что фузома имеет нормальную структуру у гомозигот как по нульаллельной мутации *pnut^{XP}*, так и по мутации *pnut*⁰²⁵⁰².

Дополнительно деления половых клеток анализировались при помощи иммуннохими-



Рис. 1. Аномалии митоза в клетках нервных ганглиев личинок, мутантных по гену pnut.

а, д – нормальные метафаза и анафаза соответственно; б – полиплоидная метафаза; в – анеуплоидная метафаза, отсутствует одна аутосома; г – анеуплоидная метафаза, содержащая 4 Х-хромосомы и всего 5 аутосом; е – полиплоидная анафаза. Окраска по Гимза, масштаб – 10 мкм.



Рис. 2. Аномалии сегрегации хромосом в клетках нервных ганглиев личинок *pnut^{XP}/pnut^{XP}*.

Стрелки указывают на центросомы. а – нормальная метафаза; б – нормальная анафаза; в – мультиполярная анафаза, в клетке 2 лишние центросомы; г – монополярная поздняя анафаза, центросомы не разошлись, все хромосомы движутся к одному полюсу. Окраска антителами на гамма-тубулин (белки центросом) и DAPI (ДНК). Масштаб 10 мкм.

ческого окрашивания на микротрубочки веретена. Мы показали, что мейотическое веретено в делящихся сперматоцитах у обоих мутантов (гомозигот по *pnut*^{XP} и *pnut*⁰²⁵⁰²) формируется нормально (рис. 3).

В клетках семенников личинок, гомозиготных по мутации *pnut^{XP}*, в некоторых случаях наблюдались нарушения расхождения хромосом в анафазе: хромосомные мосты и запаздывающие хромосомы (рис. 3, д, е). Однако телофазные клетки выглядели нормально и полиплоидии или анеуплоидии в последующих метафазах и анафазах обнаружено не было, что свидетельствует об исправлении наблюдаемых аномалий в течение анафазы.

Для выявления эффекта мутаций в гене *pnut* на деления в генеративных органах дрозофилы на стадии имаго мы использовали для анализа



Рис. 3. Деления мейоцитов в семенниках личинок дрозофилы (а-в – стадия метафазы, г-е – стадия анафазы).

а, г – дикий тип; б, в – нормальные метафазные веретена гомозигот по мутациям *pnut*²²⁹⁰ и *pnut*⁰²⁵⁰² соответственно; д – анафаза с запаздывающими хромосомами у гомозигот по *pnut*^{XP}; е – анафаза с хромосомным мостом у гомозигот по *pnut*^{XP}. Окраска антителами на α -тубулин (микротрубочки) и DAPI (ДНК). Масштаб 10 мкм. особей, несущих комбинации сильных аллелей *pnut*^{XP} или *pnut*⁰²⁵⁰² с гипоморфной мутацией *pnut*^{DG05807}. Фузома как в яичниках, так и в семенниках мух с аллельной комбинацией *pnut*^{XP}/ *pnut*^{DG05807} не отличается от нормы, что свидетельствует о нормальном ходе предмейотических делений генеративных клеток у мутантов.

Дополнительно, для того чтобы оценить предмейотические деления цистобластов, мы проводили анализ количества питающих клеток (трофоцитов) в яйцевых камерах дрозофилы у мутантов по гену *pnut* (табл. 3). В норме каждый цистобласт, являющийся клеткой зародышевого пути, делится 4 раза, давая начало цисте из 16 клеток, одна из которых затем становится ооцитом, а остальные 15 – трофоцитами. Если деления цистобластов нарушены, то в результате появляются фолликулы с числом трофоцитов, отличающимся от нормы. Из табл. 3 видно, что у мутантов по гену *pnut* большинство яйцевых камер содержат 15 трофоцитов и один ооцит, так же, как в норме.

Обсуждение

pnut в делениях генеративных клеток

Влияние септинов на цитокинез в генеративных клетках исследовалось на моделях оогенеза и сперматогенеза дрозофилы. Для анализа использовались мухи, несущие различные аллельные комбинации гена *pnut*, доживающие до стадии имаго, а также личинки, гомозиготные по сильным мутациям *pnut*^{XP} и *pnut*⁰²⁵⁰².

Мы показали, что фузома – специфическая органелла, необходимая для правильных предмейотических делений цистобластов, имеет нормальную структуру в личиночных семенниках гомозигот по сильным мутациям *pnut*^{XP} и *pnut*⁰²⁵⁰², а также в семенниках и яичниках взрослых мух с аллельной комбинацией *pnut^{XP}/pnut^{DG05807}*. Нарушений плоидности не было обнаружено ни в предмейотических, ни в мейотических делениях половых клеток как самцов, так и самок.

В семенниках личинок и куколок, гомозиготных по мутации *pnut^{XP}*, в некоторых случаях наблюдались нарушения расхождения хромосом (рис. 3). Однако телофазные клетки выглядели нормально, и полиплоидии или анеуплоидии в последующих делениях обнаружено не было. Вероятно, наблюдаемые нарушения исправлялись по ходу деления и не приводили к аномалиям плоидности. Это свидетельствует о том, что роль белка Pnut в сегрегации хромосом не является его основной функцией в половых клетках и/или что существуют белки, действие которых перекрывается с действием Pnut в данной ткани, например, другие септины.

Подсчет количества трофоцитов в яйцевых камерах мутантных самок, а также анализ морфологии фузомы в предмейотических делениях цистобластов также свидетельствуют о нормальном протекании цитокинеза в половых клетках мутантов по гену *pnut*.

Помимо половых клеток, в состав гонад входят клетки соматического происхождения. В семенниках это кэп-клетки, располагающиеся апикально на дистальном конце семенника, а также цистные клетки, образующие оболочку цисты. В яичниках это фолликулярные клетки, покрывающие яйцевую камеру. Известны данные о полиплоидизации фолликулярных клеток яичников у мух *pnut*⁻, несущих *P*-элементную конструкцию с геном *pnut* под контролем hsp70 промотора, помещенных в условия теплового шока (Neufeld, Rubin, 1994). Кроме того, нами были обнаружены более крупные по размеру, возможно, полиплоидные цистные клетки в семенниках мутантных самцов.

Таким образом, мутации по гену *pnut* не затрагивают сегрегацию хромосом при делениях

Таблица 3

Генотип	Число	Количество трофоцитов				
	проанализированных камер	16	15	14	13	8
Hikone-AW	58	5 %	91 %	3 %	0 %	0 %
pnut ^{XP} / pnut ^{DG05807}	180	0,5 %	90 %	8 %	1 %	0,5 %

Анализ количества трофоцитов в яйцевых камерах самок дрозофилы

половых клеток, однако нарушают деления соматических клеток, входящих в состав гонад.

pnut в делениях соматических клеток

В качестве модели соматической ткани мы использовали нервные ганглии у личинок третьего возраста. Был проведен цитологический анализ митозов в клетках нервных ганглиев личинок *D. melanogaster*, гомозиготных по сильным мутациям *pnut*^{XP} и *pnut*⁰²⁵⁰². У мутантов наблюдались аномалии плоидности: полиплоидия и анеуплоидия. Частота встречаемости описанных аномалий различается у разных аллельных комбинаций (табл. 2). Помимо полиплоидии, у мутантов также наблюдались аномалии сегрегации хромосом: монополярные и мультиполярные анафазы, а также хромосомные мосты (рис. 2).

Полиплоидия. Около четверти (23,1%) всех проанализированных ядер у гомозигот по *pnut*^{XP} были полиплоидными (табл. 2). К такой аномалии могут приводить три возможные причины: нарушение цитокинеза, монополярное веретено, а также выход из митоза со стадии метафазы без разделения хромосом. Согласно литературным данным, в случае мутаций по септинам следовало бы ожидать в первую очередь нарушения цитокинеза. В таком случае должна обнаруживаться высокая частота двуядерных клеток (Neufeld, Rubin, 1994). Однако в наших экспериментах в нервных ганглиях мутантов многоядерные клетки встречались редко, с частотой, которая не соответствовала числу полиплоидных метафазных пластинок. Поэтому мы заключили, что нарушения цитокинеза – не единственная причина, приводящая к полиплоидии.

Следующая возможная причина полиплоидии – выход части клеток из митоза со стадии метафазы без разделения хромосом. При переходе из метафазы в анафазу в норме активируется анафазный checkpoint, который проверяет выстраивание всех хромосом в метафазную пластинку и прикрепление нитей веретена к каждой центромере. При невыполнении этих условий движение клетки по митозу блокируется контролирующей системой checkpoint, предоставляя тем самым время для преодоления проблем. Если бы у мутантов происходил блок митоза без сегрегации хромосом, то клетки останавливались бы в checkpoint перехода метафаза–анафаза. В таком случае клетки накапливались бы в метафазе и стадия метафазы была бы удлинена. Для оценки длительности различных стадий митоза у мутантов и дикого типа мы провели подсчет частоты встречаемости данных стадий (табл. 1), который показал, что у мутантов по гену *pnut* стадия метафазы укорочена по сравнению с диким типом. Это свидетельствует о том, что у мутантов не происходит выход из митоза без сегрегации хромосом.

Третья возможная причина полиплоидии – нарушение митотического аппарата. Окрашивание антителами на α-тубулин и γ-тубулин, маркирующими разные компоненты митотического веретена, показало, что у мутантов микротрубочки имеют нормальную морфологию, однако встречается такая аномалия митотического аппарата, как монополярное веретено (рис. 2, г). Следовательно, в соматических клетках полиплоидия вызвана не только нарушением цитокинеза, как это было показано ранее, но и аномалиями построения веретена. Следует отметить, что монополярное веретено у мутантов, по-видимому, является следствием нерасхождения центросом.

Анеуплоидия. В нервных ганглиях гомозигот по *pnut*⁰²⁵⁰² с достаточной частотой (10,3 %) наблюдались анеуплоидные клетки (табл. 2). Наиболее вероятные причины этой аномалии – потеря хромосом вследствие их неприкрепления к веретену, а также мультиполярное веретено деления (King, 2008).

Известно, что даже небольшое снижение экспрессии человеческого септина SEPT2 в MDCKи HeLa-клетках приводит к серьезным дефектам сегрегации хромосом, в частности, нарушается прикрепление микротрубочек к кинетохорам и происходит потеря хромосом из метафазной пластинки (Spiliotis et al., 2005). Кроме того, для белка млекопитающих SEPT7 было показано взаимодействие с моторным белком CENP-E, стабилизирующим прикрепление кинетохоров к веретену (Zhu et al., 2008). Отсутствие CENP-E в культуре клеток мышиных эмбриональных фибробластов MEF вызывает нарушение функционирования метафазного checkpoint, что приводит к преждевременному вхождению клеток в анафазу. В результате в 25% делений происходила потеря/добавление 1-2 лишних хромосом (Weaver *et al.*, 2003). Эти данные говорят в пользу того, что одной из причин анеуплоидии у мутантов по гену *pnut* может являться нарушение прикрепления хромосом к веретену.

Мультиполярное веретено (рис. 2, в) также может приводить к образованию анеуплоидных ядер. Наиболее вероятной причиной появления мультиполярного веретена у мутантов по гену *pnut* является нарушение цитокинеза в предшествующих делениях.

Другие хромосомные аномалии. Помимо нарушений плоидности, к хромосомным аномалиям, наблюдаемым нами у мутантов, относятся также хромосомыв мосты в телофазе и запаздывающие хромосомы в анафазе в клетках нервных ганглиев, а также в генеративных клетках у самцов (рис. 3, д, е). Запаздывание хромосом не является критичным нарушением, оно встречается у дикого типа и относится к числу исправляемых (Лебедева и др., 2008). Однако в ряде случаев телофазные мосты могут приводить к нарушениям плоидности (Chang *et al.*, 2003; Coelho *et al.*, 2008).

Таким образом, было показано, что ген *pnut* имеет различные функции в соматических и генеративных клетках: в клетках соматического пути продукт этого гена участвует в цитокинезе, сегрегации хромосом и расхождении центросом, тогда как в делении генеративных клеток Pnut важных функций не имеет.

Работа поддержана грантом РФФИ 10-04-00075-а.

Литература

- Лебедева Л.И., Трунова С.А., Омельянчук Л.В. Генетический контроль митоза. Адаптивные модификации проявления мутации *v158* // Генетика. 2000. Т. 36. № 10. С. 1348–1354.
- Лебедева Л.И., Федорова С.А., Омельянчук Л.В. Особенности расхождения хроматид в анафазе у митотических мутантов *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2008. Т. 44. С. 1056–1065.
- Bonaccorsi S., Giansanti M.G., Gatti M. Spindle assembly in *Drosophila* neuroblasts and ganglion mother cells // Nat. Cell Biol. 2000. V. 2. P. 54–56.
- Chang C.J., Goulding S., Earnshaw W.C., Carmena M. RNAi analysis reveals an unexpected role for topoisomerase II in chromosome arm congression to a metaphase plate // J. Cell. Sci. 2003. V. 116. P. 4715–4726.

- Coelho P.A., Queiroz-Machado J., Carmo A.M. *et al.* Dual role of topoisomerase II in centromere resolution and aurora B activity // PLoS Biol. 2008. V. 6. P. 1758–1777.
- Dobbelaere J., Barral Y. Spatial coordination of cytokinetic events by compartmentalization of the cell cortex // Science. 2004. V. 305. P. 393–396.
- Dorogova N.V., Akhmametyeva E.M., Kopyl S.A. *et al.* The role of Drosophila Merlin in spermatogenesis // BMC Cell Biol. 2008. V. 10. P. 1–18.
- Gladfelter A.S., Pringle J.R., Lew D.J. The septin cortex at the yeast mother-bud neck // Curr. Opin. Microbiol. 2001. V. 4. P. 681–689.
- Hartwell L.H. Genetic control of cell division cycle in yeast. 4. Genes controlling bud emergence and cytokinesis // Exp. Cell. Res. 1971. V. 69. P. 265–276.
- King R.W. When 2+2+5: The origins and fates of aneuploid and tetraploid cells // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1786. P. 4–14.
- Kinoshita M. The septins // Genome Biol. 2003. V. 4. P. 236.
- Lighthouse D.V., Buszczak M., Spradling A.C. New components of the *Drosophila* fusome suggest it plays novel roles in signaling and transport // Dev. Biol. 2008. V. 317. P. 59–71.
- Longtine M.S., DeMarini D.J., Valencik M.L. *et al.* The septins: roles in cytokinesis and other processes // Curr. Opin. Cell. Biol. 1996. V. 8. P. 106–119.
- Martinez C., Ware J. Mammalian septin function in hemostasis and beyond // Exp. Biol. Med. 2004. V. 229. P. 1111–1119.
- Neufeld T.P., Rubin G.M. The Drosophila *peanut* gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins // Cell. 1994. V. 77. P. 371–379.
- Pan F.F., Malmberg R.L., Momany M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs // BMC Evol. Biol. 2007. V. 7. P. 103–120.
- Spiliotis E.T., Kinoshita M., Nelson W.J. A mitotic septin scaffold required for mammalian chromosome congression and segregation // Science. 2005. V. 307. P. 1781–1785.
- Spiliotis E.T., Nelson W.J. Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization // J. Cell Sci. 2006. V. 119. P. 4–10.
- Weaver B.A., Bonday Z.Q., Putkey F.R. *et al.* Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss // J. Cell Biol. 2003. V. 162. P. 551–563.
- Zhu M., Wang F., Yan F. *et al.* Septin 7 interacts with centromere-associated protein E and is required for its kinetochore localization // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 18916–18925.

EFFECT OF MUTATIONS IN THE *PEANUT* GENE ON SOMATIC AND GERM LINE CELL DIVISION IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

K.A. Akhmetova, S.A. Fedorova

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

Summary

We have investigated the effect of mutations in the *peanut* gene on somatic and germ line cell division. The mutations cause abnormal cytokinesis and chromosome segregation in somatic cells and result in different types of ploidy abnormalities. In contrast, germ cell division is not affected in these mutants. We conclude that *peanut* has different functions in somatic and germ line cell division.

Key words: Drosophila melanogaster, septins, mitosis, somatic cells, germ cells, cytokinesis.

ОСОБЕННОСТИ СБОРКИ ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКИ В ПРОЦЕССЕ МИТОЗА В РАННИХ ЭМБРИОНАХ DROSOPHILA MELANOGASTER

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

¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: elka@bionet.nsc.ru; ² Лаборатория молекулярной и клеточной биологии, Калифорнийский университет, Беркли, Калифорния, США

В настоящей работе проведено ультраструктурное исследование ядерной оболочки делящихся ядер эмбрионов дрозофилы на стадии синцитиальной бластодермы. Ранее было показано, что митоз в ранних эмбрионах Drosophila melanogaster является полузакрытым и ядерная оболочка разбирается полностью только на полюсах веретена деления, а в остальных участках формируется двойная (spindle) оболочка (Stafstrom, Staehelin, 1984). Нами установлено, что на стадии метафазы ядерная оболочка разбирается полностью на пузырьки/везикулы и короткие мембраны, формирующие широкий слой вокруг нуклеоплазмы. Сборка ядерной оболочки дочерних ядер начинается на стадии поздней анафазы и сопровождается формированием протяженных стопок мембран шероховатого эндоплазматического ретикулума при участии компонентов предшествующей оболочки. Везикулы и стопки двухслойных мембран располагаются сначала радиально по периферии ядра, а затем перемещаются в нуклеоплазму и тесно контактируют с компактизованными хромосомами. Впервые обнаружено, что новые фрагменты ядерной оболочки могут формироваться с участием везикул и двухслойных мембран вокруг индивидуальных хромосом. Предполагается, что этот процесс наряду с действием других факторов способствует декомпактизации хромосом подобно тому, как это наблюдалось в условиях in vitro. На стадии телофазы происходит полная декомпактизация хромосом, слияние окружающих их мембранных фрагментов и формирование целостных ядерных оболочек вокруг нуклеоплазмы каждого из дочерних ядер.

Ключевые слова: ядерная оболочка, эмбрионы дрозофилы, синцитиальная бластодерма, митоз, хромосомы, электронная микроскопия.

Введение

Ядерная оболочка (ЯдО) выполняет барьерную функцию, пространственно отделяя аппараты транскрипции и репликации от аппарата трансляции (Губанова, Киселева, 2007). Морфологически она представляет собой две концентрические мембраны (наружную и внутреннюю), ограничивающие перинуклеарное пространство, связанное с полостью эндоплазматического ретикулума (ЭПР). У высших эукариот внутренняя ядерная мембрана контактирует с ламиной, образующей вместе с ядерным матриксом каркас ядра. В ЯдО встроены ядерные поровые комплексы (ЯПК), обеспечивающие связь между ядром и цитоплазмой. Ионы и мелкие макромолекулы размером менее 9 нм могут диффундировать через ассоциированные с ЯПК мелкие каналы, в то время как молекулы весом больше 40 кДа и некоторые более легкие кариофильные белки транспортируются через центральный канал ядерной поры при помощи активных механизмов, требующих потребления энергии. Интегральные белки LAP1, LAP2 и LBR обеспечивают связь внутренней ядерной мембраны с ламиной (Grant *et al.*, 1997).

Одной из основных особенностей ЯдО высших эукариот является ее динамичность, проявляющаяся в клеточном цикле. В начале митоза, на стадии профазы, ядерная мембрана распадается на пузырьки, а большинство белков ЯПК и ламины переходят в растворимую форму в виде мономеров или небольших комплексов (Grant et al., 1997; Marshal et al., 1997). В конце митоза, на стадии телофазы, ЯдО восстанавливается вновь. Процессами разрушения и сборки ЯдО управляет сложная последовательность реакций фосфорилирования-дефосфорилирования, главными эффекторами которой являются белки семейства циклин-зависимых киназ (Wurzenberger, Gerlich, 2011). Разборка ЯдО начинается в конце профазы-начале прометафазы и заканчивается высвобождением цитозоль-мембранных пузырьков. Весь этот процесс можно разделить на три перекрывающихся во времени разборки: ЯПК, ламины и ядерной мембраны. Разборка ЯПК предположительно происходит вследствие фосфорилирования некоторых его белков (gp210, Nup358 и некоторых других нуклеопоринов) (Marshal et al., 1997). Ламина деполимеризуется под действием прямого фосфорилирования киназой cdk1 ламинов A, B и C в нескольких сайтах. При этом ламины А и С почти полностью переводятся в растворимую мономерную или димерную форму, а ламин В остается в мембранно-связанном состоянии с трансмембранным белком LBR (Marshal et al., 1997; Chu et al., 1998). Разборка ядерной мембраны, судя по всему, не зависит напрямую от cdk1, а вызывается какими-то другими, пока не известными киназами (Gallant et al., 1995). Процесс разборки ЯдО начинается в профазе митоза с ЯПК. В первую очередь исчезают периферические структуры ЯПК, а затем уже электронно-плотная центральная часть, представляющая транспортер. В конечном итоге в мембране остается пустое отверстие (Zatsepina et al., 1977; Kiseleva et al., 2000). За разборкой ядерных пор следует процесс разрушения ядерной мембраны, для которого предполагаются три возможных механизма (Marshal et al., 1997).

Согласно данным, полученным в экспериментах по сборке ЯдО *in vitro* с использованием экстрактов из ооцитов амфибий (Lohka, Masin, 1983), формирование ЯдО включает три последовательных процесса: восстановление ядерной мембраны, сборку ЯПК и восстановление ядерной мембраны, сборку ЯПК и восстановление ламины (Marshal *et al.*, 1997; Goldberg *et al.*, 1997). Прикрепление различных мембранных пузырьков к хроматину и слияние их друг с другом приводит к образованию мембранных островков, в которых начинают формироваться ЯПК. Этот процесс идет параллельно со слиянием с островками новых пузырьков и образованием целостной ядерной мембраны. Показано, что прикрепление пузырьков к хроматину происходит без потребления энергии, и необходимы только белки, связанные с хроматином и с этими пузырьками. В этом процессе трансмембранные белки либо непосредственно связываются с хроматином, либо посредником между ними выступают белки ламины (Hetzer, Wente, 2009). В отличие от предыдущего этапа слияние пузырьков – энергозависимый процесс, требующий наличия цитозоля. Показано, что слияние ингибируется добавлением ГТФүЅ, алкилирующего агента NEM и хелаторов ионов кальция и цинка ВАРТА. Предполагается, что слияние пузырьков при формировании ядерных мембран во многом идентично слиянию пузырьков (ЭПР). Так, например, на дрожжах было показано, что тот и другой процессы ингибируются ГТФуS, NEM и отсутствием АТФ (Marshal et al., 1997). Сборка ЯПК идет через промежуточные формы (интермедиаты) (Goldberg et al., 1997). Предполагается, что ламина собирается уже после того, как восстановилась ядерная мембрана. Процесс сборки ламины требует наличия активного транспорта через мембранный компонент уже сформировавшихся ЯПК (Weise et al., 1997).

Ранее было высказано предположение (Stafstrom et al., 1984) о том, что из-за быстрого протекания клеточного цикла (9-10 мин) митоз в ранних эмбрионах дрозофилы не открытый, как у большинства высших эукариот, а полузакрытый, т. е. в митозе ЯдО разрушается только с полюсов веретена деления и остается целой по бокам веретена деления. ЯПК на этой стадии полностью разбираются, оставляя в двойной ядерной мембране лишь бесформенные отверстия. При исследовании эмбрионов дрозофилы с использованием флюоресцентной микроскопии было описано формирование в митозе так называемой «оболочки веретена», которая располагалась над ЯдО и, возможно, состояла из мембранных пузырьков, высвободившихся в результате частичной разборки ЯдО (Paddy et al., 1996). Ранее нами была исследована сборка-разборка ЯПК в ядрах, изолированных из эмбрионов дрозофилы на стадии синцитиальной бластодермы с использованием высокоразрешающей сканирующей электронной микроскопии (Kiseleva *et al.*, 2001).

В настоящей работе проведен детальный ультраструктурный анализ динамики ЯдО в митозе в эмбрионах *Drosophila melanogaster* на стадии синцитиальной бластодермы, позволивший выявить новые особенности сборки оболочек дочерних ядер на стадии анафазы.

Материалы и методы

В работе использовали лабораторную линию мух *D. melanogaster* Canton S из коллекции лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН.

Получение ранних эмбрионов дрозофил

200–300 мух в возрасте 2–7 дней помещались в цилиндрический коллектор, который сверху накрывался чашкой Петри с кормом. Коллектор помещался в термостат с температурой 25 °С, и чашки менялись с периодичностью – 1 час. При таком способе получения ранних эмбрионов большинство свежеснесенных яиц находилось на стадии 1–5 делений дробления.

Микроинъекции в ранние эмбрионы

Ранние эмбрионы очищали от хориона и покрывали фторуглеродным маслом для предотвращения высыхания. Для остановки сборки ядерной оболочки на стадии метафазы агглютинин из проростков пшеницы (WGA производства Sigma, США), 1%-й раствор в фосфатном буфере, pH 7,2, в объеме 0,5 нл, инъецировали в цитоплазму эмбрионов под инвертированным микроскопом (Carl Zeiss) с помощью микроманипулятора. После проведения инъекций стекло с эмбрионами помещалось во влажную камеру в термостат на 25 °С, где эмбрионы инкубировали от 30 мин до 1 часа. Контролем служили эмбрионы после инъекции такого же объема 1 %-го раствора BSA (Sigma, США) на том же буфере.

Фиксация и заливка эмбрионов для ультраструктурного анализа

Очищенные от хориона эмбрионы накапливали на поверхности дистиллированной воды, а затем переносили в 2 мл фиксатора. Для его приготовления к 1 мл 15%-го глутарового альдегида (Fluka, Швейцария) на 0,1М Na-какодилатном буфере (Fluka, Швейцария), pH = 7,2, добавляли 1 мл гептана, и эту смесь интенсивно встряхивали 3-5 мин. Инъецированные эмбрионы промывали гептаном для удаления масла, а затем переносили в фиксатор. Далее нормальные и инъецированные эмбрионы встряхивали в течение 5 мин и переносили на 2,5 ч в 2,5%-й глутаровый альдегид на 0,05 М Na-какодилатном буфере (буфер А). Во время фиксации вителлиновую оболочку убирали при помощи тонкого пинцета. Фиксированные эмбрионы отмывали в 3 сменах буфера А и дофиксировали в течение 1 ч в 1 %-м растворе OsO₄ (ОАО Аурат, Россия) на том же буфере. После контрастирования в 1 %-м водном растворе уранилацетата (Serva, Германия) в течение 8 ч при 4 °С эмбрионы быстро промывали в воде, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, затем в ацетоне и заключали в эпон 812 (Serva, Германия) по стандартному протоколу. Полутонкие срезы случайно ориентированных эмбрионов окрашивали метиленовым синим, анализировали в световом микроскопе, а затем получали ультратонкие срезы, которые исследовали в просвечивающем электронном микроскопе JEM-100SX (JEOL, Япония).

Результаты и обсуждение

Анализ ультраструктурной организации ядерной оболочки проводился в интерфазе, когда происходит рост ядра, в прометафазе, когда начинаются процессы разборки ЯПК и ядерной оболочки, в метафазе, соответствующей полному разрушению ЯдО, и телофазе, когда ЯдО вновь восстанавливается. Рис. 1, а демонстрирует типичную картину интерфазного ядра, имеющего округлую форму и деконденсированный хроматин. Оболочка ядра содержит электронно-плотные 110 нм ЯПК, имеющие типичную форму и распределенные в виде отдельных пор, а также их кластеров (Kiseleva *et al.*, 2000).

Ядерная оболочка на стадии прометафазы (рис. 1, б) образует инвагинации с широкими отверстиями в области формирования микротрубочек веретена деления, а ее мембраны



Рис. 1. Ультраструктура ядер из синцитиальных эмбрионов *D. melanogaster* на разных стадиях клеточного цикла.

а – интерфазное ядро (стрелки указывают на кластеры ядерных пор); б – ядро на стадии профазы, содержащее компактные хромосомы (черная стрелка) и ядерную оболочку с разобранными порами (белые стрелки) и инвагинациями в области проникновения микротрубочек веретена деления в нуклеоплазму (двойные стрелки). Ядро окружено слоем коротких пузырьков и цистерн (обозначено пунктиром).

приобретают прерывистый характер вследствие разборки ядерных пор. Это в определенной степени напоминает поведение ядерной оболочки в прометафазе открытого митоза (Zatsepina *et al.*, 1977). Существенное отличие состоит в том, что ядро в ранних эмбрионах дрозофилы уже на стадии прометафазы окружается большим количеством коротких цистерн и пузырьков ЭПР, образующих четко выраженную прослойку в виде «шубы» вокруг ядра, свободную от митохондрий и жировых гранул (рис. 1, б). Толщина этой зоны составляет 0,5–2 мкм. Очевидно, что такое количество мембран не могло образоваться в результате фрагментарного разрушения ядерной оболочки, и, скорее всего, они транспортируются из окружающей цитоплазмы. Наше исследование показало, что размер «шубы» вокруг каждого ядра имеет тенденцию уменьшаться с увеличением количества ядер в эмбрионе.

В метафазе митоза хроматин конденсируется и приобретает вид метафазных пластинок, ориентированных по-разному внутри эмбриона (рис. 2, а). Ядерная мембрана полностью разрушается и уже ничем не отличается от мембранных цистерн и пузырьков, составляющих «шубу». Мембраны, окружающие метафазное ядро, представляют собой смесь пузырьков ЭПР и стопок прерывистых мембран. Стопки располагаются преимущественно в центральных участках бывшей ядерной оболочки, в то время как пузырьки занимают зоны полюсов веретена. Толщина «шубы» на стадии метафазы достигает максимальной величины и составляет до 5–6 мкм в участках, близких к полюсам веретена деления. Размер метафазной «шубы» уменьшается при переходе к более поздним циклам. Метафазные хромосомы располагаются в середине нуклеоплазмы и окружены большим количеством мелких пузырьков, а также контактирующих с ними микротрубочек (рис. 2, б).

При переходе к анафазе характер строения околоядерной зоны изменяется. Ядро удлиняется в направлении расходящихся дочерних



Рис. 2. Тонкое строение ядер из синцитиальных эмбрионов *D. melanogaster* на стадиях метафазы и анафазы.

а – общий вид метафазного ядра и околоядерной зоны на малом увеличении. Нуклеоплазма окружена широким слоем, состоящим из пузырьков и скоплений коротких мембран; б – фрагмент того же ядра на большом увеличении. В нуклеоплазме видны пузырьки и микротрубочки; в – ядро на стадии поздней анафазы. По краям нуклеоплазмы располагаются протяженные пучки длинных мембран шероховатого эндоплазматического ретикулума (стрелки); г – увеличенный фрагмент того же ядра. На периферии компактной хромосомы видны фрагменты формирующейся *de novo* ядерной оболочки. Я – ядро; Х – хроматин.

хромосом, а «шуба» сильно истончается, особенно в центральной части ядра на стадии поздней анафазы (рис. 2, в). Наиболее интересным представляется формирование на этом этапе стопок длинных мембран шероховатого эндоплазматического ретикулума, располагающихся по периферии нуклеоплазмы, радиально по отношению к центру ядра. Они часто контактируют с компактными хромосомами, на поверхности которых обнаруживаются двухслойные мембранные фрагменты, отличающиеся по строению от центросом и сходные с ЯдО (рис. 2, г). Вблизи хромосом на этой стадии уже не наблюдается микротрубочек, а наружная мембрана формирующейся вокруг них ЯдО содержит большое количество рибосом. Можно предположить, что фрагменты новой ЯдО формируются в результате слияния наблюдаемых вблизи хромосом мембранных компонентов ЭПР и пузырьков. Впоследствии стопки мембран изменяют направление и располагаются по периметру нуклеоплазмы (рис. 3, а), а число хромосом, окруженных мембранами, увеличивается (рис. 3, б-г). Наблюдаются частичная деконденсация хромосом, а также появление пузырьков внутри хромосом (рис. 3, г).

На стадии телофазы происходит быстрая деконденсация хроматина дочерних ядер, и вокруг них, вероятно, за счет слияния мембранных фрагментов и пузырьков, формируется сплошная ЯдО, в которую затем встраиваются ЯПК (рис. 4, а). Интересно отметить, что пузырьки встречаются как снаружи, так и внутри ядра в контакте с внутренней мембраной ЯдО. Сначала число зрелых пор в оболочке невелико, однако наблюдаются ядра с большим количеством пор, очевидно, на более поздней стадии телофазы (рис. 4, б, в). Следует отметить присутствие в оболочке ядер не полностью сформированных ядерных пор (рис. 4, б, в), сходных с теми, что были описаны paнee в опытах in vitro (Goldberg et al., 1997). Слой пузырьков вокруг ЯдО дочерних ядер существенно уменьшается, и вблизи ядра появляются митохондрии и жировые гранулы. Ядро начинает активно расти, и параллельно должна увеличиваться площадь поверхности оболочки дочерних ядер. Согласно ранее проведенным исследованиям, это происходит за счет слияния пузырьков из околоядерной зоны с наружной мембраной ядра (Kiseleva *et al.*, 2001).

Согласно данным, полученным из экспериментов in vitro с использованием грубых экстрактов из ооцитов Xenopus laevis, WGA в концентрации 200-500 мкг/мл вызывает полное блокирование сборки ЯПК (Wiese et al., 1997). В наших исследованиях мы использовали эту концентрацию для того, чтобы проверить, будет ли блокироваться сборка ЯдО и ядерных пор. Ультраструктурный анализ ранних эмбрионов D. melanogaster показал, что после введения WGA в них происходит остановка деления ядер в месте инъекции. В контроле, после инъекции BSA, все остается без существенных изменений, и наблюдаются как равномерно расположенные по периферии соматические ядра, так и центральные желточные ядра. Электронно-микроскопическое исследование 30 эмбрионов, инъецированных WGA, показало, что митоз во всех эмбрионах останавливается приблизительно на стадии метафазы, о чем свидетельствует наличие конденсированного хроматина внутри ядер и пучков микротрубочек (рис. 5, а). «Шубы» вокруг ядер были сильно увеличены в отличие от таковых в метафазе в нормальных эмбрионах и представляли зоны диаметром до 30 мкм, свободные от митохондрий и жировых гранул. На большом увеличении видно, что эти зоны так же, как и на стадии метафазы в нормальных эмбрионах, заполнены пузырьками и стопками прерывистых мембран (рис. 5, б). Иногда стопки мембран напоминали по организации окончатые мембраны, часто встречающиеся в цитоплазме эмбрионов на стадии синцитиальной бластодермы (Губанова, Киселева, 2008), однако поровые комплексы в них не наблюдались. Принимая во внимание, что как минимум 1/3-я часть митотического цикла приходится на интерфазу (когда поры собраны), можно заключить, что WGA как in vitro, так и in vivo препятствует сборке пор, но, судя по всему, не влияет на их разборку.

Таким образом, наши исследования показали, что отличительной особенностью полузакрытого митоза является то, что ядерная оболочка распадается на большое количество мембран и пузырьков, которые формируют широкий слой вокруг ядра в метафазе, соответствующий, вероятно, «оболочке веретена» (spindle envelope), описанной ранее (Paddy *et al.*, 1996). При проведении более детального ультраструктурного исследования раннего развития дрозофилы (авторами предыдущих работ были изучены только последние митотические циклы (12–14) перед формированием клеток) мы установили, что морфология ядерной мембраны и прилежащей к ядру цитоплазмы может

значительно варьировать в процессе полузакрытого митоза. В первых синцитиальных циклах деления (1–7), когда ядер в эмбрионе еще мало, оболочка веретена, по нашим данным, представляет собой четко очерченную зону вокруг ядра, заполненную большим количеством цистерн ЭПР, которой мы присвоили название «шуба». Диаметр «шубы» в районе центросом



Рис. 3. Особенности организации ядер из синцитиальных эмбрионов *D. melanogaster* на стадии поздней анафазы.

а – пучки длинных и коротких линейно расположенных мембран лежат по периметру нуклеоплазмы и часто контактируют с компактными хромосомами (стрелки); б, в – фрагменты того же ядра на большом увеличении. На поверхности хромосом видны фрагменты формирующейся ядерной оболочки; г – контакт двух хромосом, содержащих фрагменты формирующейся ядерной оболочки. Два пучка мембран гладкого и шероховатого эндоплазматического ретикулума располагаются вблизи хромосом. Х – хроматин. может достигать 5–6 мкм. В то же время при переходе к более поздним циклам мы наблюдаем истончение «шубы» и плавный переход к ранее описанной морфологии полузакрытого митоза с формированием оболочки веретена. Полузакрытый митоз был обнаружен также в некоторых других типах митотически активных клеток у дрозофилы, таких, как фолликулярные клетки яичников, стволовые клетки, клетки мозга (Stafstrom *et al.*, 1984). Это свидетельствует о том, что у дрозофилы такой тип митоза не является уникальным для состояния синцития. Возможно, распространенность полузакрытого митоза не ограничивается только дрозофилой, поскольку подобный митоз наблюдался также при ультраструктурном анализе эмбрионов *Heteropeza pygmaea* (Fux, 1974).

Обнаруженный нами постепенный переход между разными формами полузакрытого митоза позволяет предположить, что все его известные морфологические варианты являются, вероятно, одним типом процесса перестройки ЯдО, в ходе которого ядро окружается морфологически различимой прослойкой цитоплазмы,



Рис. 4. Ультраструктура ядер из синцитиальных эмбрионов *D. melanogaster* на стадии телофазы.

а – фрагмент оболочки ядра на стадии ранней телофазы содержит интермедиаты пор (двойные стрелки) и небольшое количество полностью собранных пор (стрелки). Пузырьки присутствуют как внутри, так и снаружи ядерной оболочки; б, в – фрагменты оболочки ядер на стадии средней телофазы на малом и большом увеличении соответственно. Количество зрелых пор в ядерной оболочке увеличено по сравнению с ядром на верхнем рисунке.

несущей какую-то функцию. Эта функция может быть связана как с особенностями тех клеток, в которых наблюдается такой митоз (многоядерность, быстрота протекания митоза), так и с особенностями регуляции митоза у дрозофилы (и, возможно, других насекомых) (Gallant *et al.*, 1995). Одной из качественных характеристик в строении околоядерной зоны является ее четкая структурированность. Из этой зоны исключаются все крупные клеточные органеллы, такие, как митохондрии и жировые гранулы, и накапливаются мембраны ЭПР. Четкую компартментализацию цитоплазмы около ядра подчеркивают также наши эксперименты с микроинъекцией WGA, при которых деление останавливалось в метафазе, и ядра были окружены «шубой» толщиной до 15 мкм (или диаметром до 30 мкм). При суммировании наших результатов и ранее полученных данных, можно сформулировать две точки зрения относительно функциональной роли оболочки веретена (околоядерной зоны).

Оболочка веретена представляет собой ЯдО, которая не успевает разобраться по причине



Рис. 5. Ультраструктура ядер и околоядерной цитоплазмы в синцитиальных эмбрионах *D. melanogaster* после инъекции WGA.

а – общий вид ядра и окружающей цитоплазмы (ядро и граница околоядерной зоны, состоящей из пузырьков и коротких мембран, обведены пунктиром); б – фрагмент околоядерной зоны на большом увеличении. Видно концентрическое расположение коротких мембран в околоядерной зоне. Я – ядро.

быстрого митоза и вследствие этого не имеет какой-либо определенной функции (Harel *et al.*, 1989). Оболочка выполняет какую-то определенную функцию в митозе (или имеет несколько функций) (Stafstrom *et al.*, 1984; Harel *et al.*, 1989).

Первая точка зрения вряд ли имеет под собой основания, о чем свидетельствуют как наши наблюдения, так и данные других авторов. Во-первых, оболочку веретена наблюдают не только в ранних эмбрионах, где митоз очень быстрый, но и в тканях дрозофилы более поздних стадий развития, таких, как эпителий, нервная ткань и т. д., где скорость митоза намного ниже (Stafstrom et al., 1984, Lenz-Bohme et al., 1997). Во-вторых, наши эксперименты с остановкой митоза WGA и наблюдения нормального митоза на ранних циклах указывают на то, что происходит скорее накопление мембран вокруг ядра, нежели их рассредоточение. Более того, эти мембраны, возможно, имеют специфический состав, так как их количество вокруг метафазных ядер уменьшается с ростом числа ядер. Мы полагаем, что одна из возможных функций оболочки веретена заключается в регуляции обмена ионов Са²⁺ вблизи ядра. Концентрация Са²⁺ является важным фактором, влияющим на скорость протекания митоза (Izant, 1983). Возможная функция цистерн ЭПР, окружающих ядро, как регуляторов обмена этого катиона исследовалась при помощи гистохимических методов (Stafstrom et al., 1984), но четко эту функцию показать не удалось.

Следующей возможной функцией перинуклеарного пространства является депонирование белков ЯдО, необходимых для быстрого ее формирования в конце митоза. Иммуногистохимические исследования свидетельствуют о том, что, по крайней мере, некоторые белки ЯдО способны концентрироваться в околоядерной зоне, соответствующей оболочке веретена, в то время как другие из нее исключаются. Это было показано для отефина – интегрального белка внутренней ядерной мембраны, gp210 -N-гликозилированного интегрального белка ЯПК и одного из белков ламины. При изучении локализации отефина концентрация его около ядра была показана во всех фазах митоза (Harel et al., 1989). Исследования in vivo с инъекцией меченых Fab-фрагментов антител к ламине дали промежуточный результат: ламина оставалась связанной с оболочкой ядра вплоть до метафазы, а затем диспергировалась (Paddy *et al.*, 1996). В то же время изучение локализации интегрального белка ЯПК gp188 (аналог gp210 у дрозофилы) показало, что к метафазе он равномерно распределяется по цитоплазме (Harel *et al.*, 1989).

На основании этих данных можно предположить, что около ядра концентрируются мембраны, содержащие специфический набор белков, необходимых при сборке ЯдО. Одна из возможностей их использования может быть связана с недавно обнаруженным у ранних эмбрионов дрозофилы новым механизмом формирования ЯПК, при котором множество мелких пузырьков ЭПР сливаются в телофазе с ЯдО и индуцируют при этом формирование пор вдоль линии слияния (Kiseleva *et al.*, 2000).

Интересно отметить, что остановка митоза при инъекции WGA происходит в метафазе. Если следовать тому, что WGA блокирует сборку ЯПК, то он должен оказывать влияние на тот период митоза, когда необходимы функциональные ЯПК, т. е. как минимум в телофазе. Именно такие результаты были получены при микроинъекции WGA в культуру эпителиальных клеток (Yoneda *et al.*, 1987; Benavente *et al.*, 1989). Однако, согласно нашим данным, митоз после введения WGA останавливался на стадии метафазы.

Возможное объяснение всех этих противоречий состоит в том, что белки ЯПК у дрозофилы, кроме участия в ядерно-цитоплазматическом транспорте, могут дополнительно оказывать влияние на цитоплазматический клеточный цикл. Альтернативная возможность заключается в том, что, кроме нуклеопоринов, у дрозофилы существуют какие-то дополнительные белки-мишени, связанные с регуляцией клеточного цикла. Эти регуляторы (с которыми может взаимодействовать WGA), возможно, либо прямо, либо опосредованно изменяют организацию цитоскелета и таким образом оказывают влияние на структуру околоядерной зоны цитоплазмы. Для проверки этих гипотез необходимы дополнительные эксперименты с другими ингибиторами сборки ЯПК, такими, как антитела к различным нуклеопоринам.

Таким образом, нами было проведено комплексное исследование динамической пере-



Рис. 6. Схема реорганизации ядерной оболочки на разных стадиях митоза в синцитиальных эмбрионах *D. melanogaster*.

Интерфаза: ядро имеет округлую форму, и ядерная оболочка содержит зрелые поровые комплексы; профаза: ядерная оболочка деформируется в области расположения центриолей, ядерные поры начинают разбираться; прометафаза: хромосомы компактизуются, ядерная оболочка начинает распадаться в области полюсов веретена деления на пузырьки и короткие мембраны, формирующие дополнительный слой вокруг нераспавшихся участков оболочки ядра. Ядерные поры полностью разобраны, и пучки микротрубочек, контактирующих с хромосомами, выявляются в нуклеоплазме; *метафаза*: ядерная оболочка распадается полностью, формируя широкий слой мембран и пузырьков вокруг нуклеоплазмы; *ранняя анафаза*: хромосомы начинают перемещаться к полюсам веретена деления, слой мембранных и пузырьковидных компонентов вокруг нуклеоплазмы уменьшается; *поздняя анафаза I*: по периферии нуклеоплазмы собираются пучки мембран, располагающиеся радиально по отношению к центру ядра, микротрубочки исчезают и начинается формирование новых фрагментов ЯдО вокруг индивидуальных хромосом; *поздняя анафаза II*: пучки мембран меняют направление и располагаются по периметру нуклеоплазмы, наблюдается частичная деконденсация хромосом, окруженных двойными мембранами и пузырьками; *телофаза:* фрагменты новой ЯдО сливаются, формируется целостная оболочка ядра, в которой начинают собираться ядерные поры, и видно большое количество интермедиатов пор. К концу телофазы процесс сборки зрелой ядерной оболочки завершается и начинается рост ядер.

стройки ЯдО и окружающей ядро цитоплазмы в процессе быстрого митотического деления у ранних эмбрионов дрозофилы, позволившее представить более детальную схему митоза в ранних эмбрионах дрозофилы (рис. 6). Впервые подробно исследованы этапы сборки ЯдО на стадии поздней анафазы митоза и продемонстрировано формирование новых ее фрагментов вокруг индивидуальных хромосом. Полученные новые данные важны для понимания механизмов динамики и функции ядра и ЯдО в митозе. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ: 10-04-01426 и 10-04-01469 и гранта Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (6.12).

Литература

- Губанова Н.В., Киселева Е.В. Структурная организация и функция ядерной оболочки // Цитология. 2007. Т. 49. № 4. С. 257–269.
- Губанова Н.В., Киселева Е.В. Особенности дина-

мики пористых пластинок в синцитиальных эмбрионах дрозофилы // Цитология. 2008. Т. 50. № 8. С. 681–691.

- Benavente R., Scheer U., Chaly N. Nucleoplasmic sorting of macromolecules following mitosis: fate of nuclear constituents after inhibition of pore complex function // Eur. J. Cell Biol. 1989. V. 50. P. 209–219.
- Chu A., Roozbeh R., Stochaj U. Velcro in the nuclear envelope: LBR and LAPs // FEBS. 1998. V. 441. P. 165–169.
- Fux T. Chromosome elimination in *Heteropeza pyg-maea*. II. Ultrastructure of spindle apparatus // Chromosoma. 1974. V. 49. P. 157–160.
- Gallant P., Fry A.M., Nigg A.E. Protein kinases in the control of mitosis: focus on nucleocytoplasmic traffic // J. Cell Sci. Suppl. 1995. V. 19. P. 21–28.
- Goldberg M.W., Weise C., Allen T.D., Wilson K. Dimples, pores, star-rings and thin rings on growing nuclear envelopes: evidence for structural intermediates in nuclear pore complex assembly // J. Cell Sci. 1997. V. 110. P. 409–420.
- Grant T.M., Wilson K.L. Nuclear assembly // Annu. Rev. Dev. Biol. 1997. V. 13. P. 669–695.
- Harel A., Zlotkin E., Nainudel-Epzteyn S. *et al.* Persistence of major nuclear envelope antigens in an envelope-like structure during mitosis in *Drosophila melanogaster* embryos // J. Cell Sci. 1989. V. 94. P. 463–470.
- Hetzer M.W., Wente S.R. Border control at the nucleus: biogenesis and organization of the nuclear membrane and pore complexes // Dev. Cell. 2009. V. 5. P. 606–616.
- Izant J.G. The role of calcium ions during mitosis: calcium participates in the anaphase trigger // Chromosoma. 1983. V. 88. P. 1–10.
- Kiseleva E., Goldberg M.W., Cronshaw J., Allen T.D. The nuclear pore complex: structure, function, and dynamics // Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 2000. V. 10. N 1. P. 101–112.
- Kiseleva E., Rutherford S., Cotter L.M. *et al.* Steps of nuclear pore complex disassembly and reassembly during mitosis in early Drosophila embryos // J. Cell

Sci. 2001. V. 114. P. 3607-3618.

- Lenz-Bohme B., Wismar J., Fuchs S. *et al.* Insertional mutation of the Drosophila nuclear lamin *Dm0* gene results in defective nuclear envelopes, clastering of nuclear pore complexes and accumulation of annulate lamellae // J. Cell Biol. 1997. V. 137. P. 1001–1016.
- Lohka L.J., Masui J. Formation *in vitro* of sperm pronuclei and mitotic chromosomes induced by amphibian ooplasmic components // Science. 1983. V. 220. P. 719–721.
- Marshal I.C.B., Wilson K.L. Nuclear envelope assembly after mitosis // Trends Cell Biol. 1997. V. 7. P. 20–29.
- Paddy M.R., Saumweber H., Agard D.A., Sedat J.W. Time-resolved? *In vitro* studies of mitotic spindle formation and nuclear lamina breakdown in Drosophila early embryos // J. Cell Sci. 1996. V. 109. P. 595–607.
- Stafstrom J.P., Stahelin L.A. Are annulate lamellae in the Drosophila embryo the result of overproduction of nuclear pore components // J. Cell Biol. 1984. V. 98. P. 699–708.
- Stafstrom J.P., Staehelin L.A. Dynamics of the nuclear envelope and of the nuclear pore complexes during mitosis in the Drosophila embryo // Eur. J. Cell Biol. 1984. V. 34. P. 179–189.
- Wiese C., Goldberg M.W., Allen T.D., Wilson K.L. Nuclear envelope assembly in Xenopus extracts visualized by scanning EM reveals a transportdependent envelope smoothing event // J. Cell Sci. 1997. V. 110. P. 1489–1502.
- Wurzenberger C, Gerlich D.W. Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2011. V. 12. N 8. P. 469–482.
- Yoneda Y., Imamoto-Sonobe N., Yamizumi M., Uchida T. Reversible inhibition of protein import into the nucleus by wheat germ agglutinin injected into cultured cells // Exp. Cell Res. 1987. V. 173. P. 586–595.
- Zatsepina O.V., Polyakov V.Y., Chentsov Y.S. Some structural aspects of the fate of the nuclear envelope during mitosis // Cytobiology. 1977. V. 16. P. 130–144.

A FEATURE OF NUCLEAR ENVELOPE FORMATION DURING MITOSIS IN EARLY DROSOPHILA MELANOGASTER EMBRYOS

A.A. Strunov¹, E.A. Onischenko², E.V. Kiseleva¹

 ¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: elka@bionet.nsc.ru
² Division of Cell and Developmental Biology, University of California, Berkeley, CA 94720

Summary

The ultrastructure of the nuclear envelope of dividing nuclei in Drosophila embryos at the syncytial blastoderm stage has been studied. It was previously shown that mitosis in early Drosophila embryos is semi-closed and the nuclear envelope completely disassembled only at the spindle poles, whereas a double (spindle) envelope formed in other areas (Stafstrom, Staehelin, 1984). We have found that the nuclear envelope completely disassembles and short membranes at the metaphase stage to form a thick layer around the nucleoplasm. The nuclear envelope assembly around daughter nuclei starts at the late anaphase stage. It is accompanied by prior formation of long stacks of rough endoplasmic reticulum membranes, involving components of the old envelope. First, the vesicles and stacks of bilayer membranes are radially located at the nucleoplasm periphery and then move to the nucleoplasm, where they come to a close contact with condensed chromosomes. It is shown that new fragments of the nuclear envelope can form around individual chromosomes with participation of vesicles and bilayer membranes. It is assumed that the vesicles and membranes together with some other factors contribute to chromosome decondensation, as was previously demonstrated *in vitro*. During the telophase, chromosomes decondense completely, nuclear envelope fragments fuse, and whole nuclear envelopes form around each daughter nucleus.

Key words: nuclear envelope, drosophila embryos, syncytial blastoderm, electron microscopy, mitosis, chromosomes.

ХАРАКТЕРИСТИКА ВРЕМЕННЫХ ПАРАМЕТРОВ ПРОЯВЛЕНИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ИНЪЕКЦИЙ ЭКЗОГЕННОЙ ДНК НА ФОНЕ ПРЕДОБРАБОТКИ ЦИТОСТАТИКОМ ЦИКЛОФОСФАНОМ

Е.В. Долгова¹, А.С. Проскурина¹, В.П. Николин¹, Н.А. Попова¹, Е.А. Алямкина¹, К.Е. Орищенко¹, А.Г. Шилов¹, Я.Р. Ефремов¹, Е.Р. Черных², А.А. Останин², С.С. Богачев¹, А.В. Прокопенко¹, Е.М. Малкова⁴, О.С. Таранов⁴, Т.С. Гвоздева⁵, В.А. Рогачев¹, С.Н. Загребельный³, М.А. Шурдов⁶

 ¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: gorbi@bionet.nsc.ru;
² Институт клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, Россия;
³ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;
⁴ ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирск, Россия;
⁵ Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия;
⁶ ООО «Панаген»

Инъекции экзогенной ДНК в дозе 0,1–1,0 мг на фоне предобработки кросслинкирующим цитостатиком циклофосфаном (ЦФ) в дозе 200 мг/кг приводят к появлению характерного симптомокомплекса и гибели экспериментальных мышей – эффект «отсроченной смерти». Обнаруженный эффект проявляется при непрерывных с промежутком 1-2 ч инъекциях экзогенной ДНК двумя волнами: в 6-часовой отрезок времени 18-24 ч и следующим за ним добавочным 6-часовым промежутком времени 24-30 или 42-48 ч, «окно смерти», после инъекции ЦФ. Промежуток времени 18-24 ч представляет собой конечную фазу репарации двуцепочечных разрывов (ДЦР) в клетках костного мозга (ККМ), существующих как промежуточный интермедиат репарации межцепочечных сшивок (МЦС), индуцированных ЦФ. Начало инъекций экзогенной ДНК уже через 10 мин после первого введения приводит к исчезновению из пространства ядер ККМ свидетелей ДЦР – модифицированного гистона уН2АХ. Обнаруженная корреляция между фазой репарации ДЦР в ККМ, появлением в ядерном пространстве фрагментов экзогенной ДНК и гибелью опытных мышей предполагает участие экзогенной ДНК в репаративном процессе при репарации ДЦР. При этом предполагаемое участие осуществляется таким образом, что нарушаются основные принципы гомеостаза определенного типа активно пролиферирующих клеток, что приводит к их полной необратимой элиминации и, как следствие, к разрушению определенной функции организма и летальному исходу.

Ключевые слова: циклофосфан, двуцепочечные разрывы, межцепочечные сшивки, клетки костного мозга, экзогенная ДНК, репарация ДНК.

Введение

Циклофосфан (ЦФ) относится к алкилирующим противоопухолевым препаратам, широко используемым в онкологической клинике. При воздействии ЦФ на живой организм в первую очередь и в наибольшей степени страдают активно пролиферирующие клетки организма: клетки эпителия, клетки волосяных фолликул и стволовые клетки крови (СКК), входящие в состав клеток костного мозга (ККМ) (Magaña-Schwencke *et al.*, 1982; Mazur, Czyzewska, 2001; Salem *et al.*, 2010). Основным механизмом, обеспечивающим противораковый эффект действия цитостатика, является индукция его метаболитом фосфорамид мустардом в активно делящихся клетках, таких, как раковые клетки, костномозговые предшественники, стволовые клетки различного генеза межцепочечных сшивок (МЦС). Дефекты в системах, обеспечивающих удаление такого повреждения, приводят к аберрантному митозу клеток, получивших МЦС, и их апоптотической гибели (Fleming, 1997; Magaña-Schwencke *et al.*, 1982).

Существует несколько путей репарации МЦС. Конкретный механизм, выбираемый клеткой, зависит от ее свойств, стадии клеточного цикла, в котором она находилась в момент получения повреждения, наличия тех или иных факторов репарации (Долгова и др., 2010). В рамках настоящего исследования наиболее актуальным является характеристика молекулярных событий репарации МЦС, начинающейся в момент репликации клеток, когда при столкновении репликативной вилки с повреждением возникают двуцепочечные разрывы (ДЦР) как необходимые интермедиаты репарации (Niedernhofer *et al.*, 2004; Akkari *et al.*, 2000).

Существуют факты, свидетельствующие о том, что инъекции экзогенной фрагментированной геномной ДНК связаны с эффектами, при которых затрагивается функциональная целостность СКК. Так, в экспериментах, выполненных в работе A.S. Likhacheva с соавт. (2007а), отмечалось появление селезеночных колоний у смертельно облученных мышей после своевременных инъекций экзогенной ДНК. Это наблюдение свидетельствовало о том, что экзогенная ДНК при внутрибрюшинном введении достигает ККМ и воздействует на CD34+, сохраняя их жизнеспособность. Также многократно показано, что инъекции экзогенной ДНК экспериментальным животным стимулируют гемо- и лейкопоэз, что свидетельствует об активации пролиферации покоящихся CD34+ (Николин и др., 2006; Долгова и др., 2009). Эти факты говорят о том, что экзогенная ДНК достигает ККМ и в частности СКК и их потомков разной степени зрелости, и становится равноправным участником определенных общеклеточных событий или непосредственно индуцирует эти события в указанном типе клеток. Другой важный вывод из имеющихся экспериментальных фактов заключается в том, что, по-видимому, ККМ (СКК) являются первыми и наиболее легкодоступными клетками-мишенями, на которые как химические агенты и радиация,

так и экзогенная ДНК, интродуцированная в организм, действуют в первую очередь.

Исходя из этого, в общей схеме представлений о действии ЦФ и экзогенной ДНК на ККМ можно выделить два главных события. Во-первых, это образование ДЦР как основных интермедиатов репарации МЦС. Во-вторых, это присутствие фрагментов экзогенной ДНК во внутриядерном пространстве в момент репарации этих разрывов в клетке.

В настоящем исследовании установлено, что инъекции экзогенной ДНК в промежуток времени 18-30 ч после введения ЦФ приводят к появлению характерного симптомокомплекса и гибели экспериментальных животных. Отрезок времени 18-24 ч после введения цитостатика является завершающим этапом репарации всей массы ДЦР, сформированных к 12 ч после введения ЦФ. Предполагается, что фрагменты экзогенной ДНК достигают ККМ и принимают участие в репаративных процессах, индуцированных МЦС, внося деструктивные изменения в молекулярные клеточные системы, что приводит к непоправимым изменениям в организме мышей, сопровождающимся характерным симптомокомплексом и гибелью.

Материалы и методы

Разведение экспериментальных животных

В экспериментах использовали 2–3-месячных мышей линии CBA/Lac разведения вивария Института цитологии и генетики CO PAH. Животных содержали в пластиковых клетках по 10 особей в каждой со свободным доступом к пище и воде. Мыши получали гранулированный корм ПК120-1 (Лабораторснаб, Москва).

Препарат ДНК человека

Препарат человеческой ДНК получали из плацент здоровых рожениц. Для выделения ДНК использовали бесфенольный метод, который позволяет получить полноценный геном, сохраняя фрагменты ДНК, прочно ассоциированные с белками ядерного матрикса. Фрагментация ДНК осуществлялась ультразвуком с использованием ультразвукового дезинтегратора при частоте 22 КГц, в результате чего получали смесь фрагментов ДНК размером от 300 до 6000 п.н. Полученный препарат ДНК хранили в физиологическом растворе при –20°С. Данный препарат является фармакопейным препаратом (Регистрационное удостоверение ЛСР-004429/08) и в качестве объекта промышленной собственности принадлежит компании ООО «Панаген».

Введение мышам ЦФ и ДНК человека

ЦФ вводился мышам внутрибрюшинно (в/б) из расчета 200 мг/кг веса. Затем через определенные интервалы времени мышам в/б вводили по 0,5–1 мг препарата фрагментированной человеческой ДНК. Схемы введения мышам ЦФ и ДНК человека представлены в Приложении, табл.

Приготовление препаратов из ККМ мышей и иммунофлюоресцентный анализ фокусов репарации ДЦР

Из трубчатых костей фосфатно-солевым буфером (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 8 мМ Na₂HPO₄, 1,5 мМ KH₂PO₄) вымывали красный костный мозг. Клетки центрифугировали 5 мин (настольная центрифуга Eppendorf 5414), осадок клеток ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере. Каплю полученной взвеси клеток наносили на предметное стекло, препарат высушивали и фиксировали 2%-м параформальдегидом в фосфатно-солевом буфере, pH 7,4, в течение 15 мин. Проницаемость мембран нарушали 0,1% Triton X-100 в этом же буфере. Затем препараты обрабатывали кроличьими антителами к модифицированному гистону (anti-phospho-histone Sigma, CIIIA) yH2AX в разведении 1:1000 в фосфатно-солевом буфере, рН 7,4, с 0,15%-ным глицином (Sigma, США) и 0,5%-ным бычьим сывороточным альбумином (BSA) в течение часа при комнатной температуре (100 мкл на препарат). Обработка проводилась во влажной камере в темноте. Препарат промывался фосфатно-солевым буфером с 0,5%-ным BSA и обрабатывался меченными FITC козьими антителами против IgG кролика (goat anti rabbit IgG FITC-conjugate Sigma, США) в течение часа при комнатной температуре в разведении 1:500 в таком же растворе, что и предыдущие антитела, условия обработки аналогичные. Затем препарат

еще раз промывался фосфатно-солевым буфером с 0,5%-ным BSA. После отмывки на препарат наносили ~10 мкл Antifade DABCO, покрывали покровным стеклом. Препараты хранили в холодильнике в плотно закрывающихся коробках.

Анализ распределения ККМ по клеточному циклу

Из трубчатых костей фосфатно-солевым буфером вымывали красный костный мозг. ~400 тыс. клеток фиксировали в 60%-ном метаноле при 4°C в течение часа. Клетки осаждали центрифугированием при 4°C, 400 g (центрифуга Eppendorf 5810 R, США), 5 мин. Осадок ресуспендировали в 400 мкл фосфатно-солевого буфера, обрабатывали РНКазой 200 мкг/мл, 30 мин, 37°C. Добавляли 20 мкл пропидиума йодида (5 мг/мл) и окрашивали клетки 10 мин при комнатной температуре.

Распределение клеток по клеточному циклу определяли при помощи проточного цитофлюориметра BD FACSAria (Becton Dickinson, США) в центре коллективного пользования проточной цитофлюорометрии ИЦиГ СО РАН.

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных по выживаемости мышей в проведенных экспериментах по совместному введению ЦФ и экзогенной ДНК, выявляющая достоверные различия между группами мышей, проводилась при помощи однофакторного дисперсионного анализа с использованием критерия Фишера.

Доверительные интервалы в графике, показывающем процент ККМ мышей с ДЦР и процент клеток, находящихся под воздействием ЦФ в каждый момент времени, подсчитаны для P = 0.95.

Результаты

Временные параметры проявления эффекта «отсроченной смерти» в группе экспериментальных мышей

При исследовании лейкостимулирующей активности инъекций препаратов экзогенной ДНК в группе экспериментальных животных неожиданно была отмечена массовая гибель мышей, достигавшая 80% (Likhacheva *et al.*, 2007b). Основные симптомы заболевания были следующие: общее угнетение двигательной активности, обильное потение, лихорадка, отек морды, выпадение волос на затылке и морде, неоткрывание глаз, редко судороги, параличи. Иногда мыши погибали сразу, без наличия видимых признаков заболевания. В редких случаях мыши выздоравливали после характерных симптомов.

Эффект был обнаружен как следствие трехкратного введения экзогенной ДНК в дозе 0,5 мг на инъекцию на мышь на фоне действия цитостатика ЦФ. Первая инъекция была проведена непосредственно перед введением ЦФ, вторая через сутки и третья инъекция через двое суток после введения ЦФ (рис. 1, группа 4). Мыши погибали на протяжении длительного промежутка времени, порядка 45 суток, начиная с 6-х суток после введения ЦФ. Было проведено несколько повторов аналогичных обработок, однако ожидаемого эффекта получено не было. Мы предположили, что эффект «отсроченной смерти» связан с неким состоянием определенных систем клеток, возникшим после инъекции ЦФ, при котором появление в организме животного больших количеств экзогенной ДНК приводит к гибели этих клеток. Причем это состояние восприимчивости к действию препаратов экзогенной ДНК растянуто во времени. Если клетки составляют функциональную систему(ы) организма, то их гибель приводит к разрушению этой (этих) системы и, как следствие, к летальному исходу. В связи с этим мы провели серию экспериментов, необходимых для определения временного отрезка «окна смерти», когда проявляется эффект гибели мышей. Для того чтобы с большой долей вероятности попасть во временную точку после введения ЦФ, когда экзогенная ДНК действует на соответствующие клеточные системы, мы выбрали подход массированного



Рис. 1. Гибель мышей при различных схемах введения экзогенной ДНК после ЦФ.

Прямые отрезки обозначают различные группы мышей, числа рядом – условные номера групп. Точками на отрезках обозначено введение мышам ДНК. Нулевая точка – момент введения ЦФ. Проекция на ось У показывает процент смертности мышей в каждой группе. Группы 9 и 10 получали инъекции ДНК мышей линии СВА и ДНК спермы лосося. Все остальные группы получали инъекции ДНК человека. Группа 11 представляет собой совокупность 6 групп, каждая из которых каждый час получала инъекции ДНК человека в разные периоды времени, а именно: 1–6, 7–12, 13–18, 19–24, 25–30 и 31–36 ч после ЦФ.

воздействия препаратом экзогенной ДНК в фиксированные промежутки времени после введения ЦФ. При использовании варьирования 6- и 12-часовыми промежутками времени введения экзогенной ДНК после инъекции ЦФ у разных групп мышей (Приложение, табл.), был определен период времени, когда гибель мышей достигала 60–90% (рис. 1).

В ходе проведенных экспериментов было обнаружено, что введение мышам экзогенной ДНК в промежуток времени 18–30 ч (каждые 1–2 ч) после введения ЦФ приводит к быстрой гибели мышей в течение недели после инъекции ЦФ (группы 8, 9, 10, 14 и 15). Если вводить ДНК в два разнесенных во времени промежутка, как для групп 4 и 13, также наблюдается гибель мышей, но растянутая во времени – гибель мышей начиналась только с 9-х суток после инъекции ЦФ и продолжалась до 45 суток. При введении ДНК в период 0–11 ч после введения ЦФ (группа 5) наблюдалась гибель 25 % животных.

Введение ЦФ (200 мг/кг) в виде монопрепарата мышам, а также введение ЦФ в сочетании с ДНК человека в другие временные промежутки (группы 7, 11, 12) не оказывало никакого видимого эффекта на животных.

Исходя из экспериментальных данных следует, что наблюдаемый эффект не является случайным, не связан с токсичностью ЦФ, которую данный препарат проявляет при метаболизме в организме животного, не связан с присутствием в организме препарата экзогенной ДНК, а зависит от совместного действия ЦФ и препарата ДНК. Причинными параметрами такого действия являются время введения препарата ДНК после инъекции ЦФ и определенная повторность введения препарата ДНК. «Окно смерти» представляет собой два 6-часовых промежутка времени после введения ЦФ. Отрезок 18-24 ч является обязательным для возникновения эффекта гибели. После него должен в обязательном порядке следовать второй 6-часовой промежуток времени, в который проводятся инъекции экзогенной ДНК. Этот 6-часовой промежуток времени или следует непосредственно за первым (24-30 ч), или отнесен к концу вторых суток (42-48 ч).

Следует отметить некоторые особенности проявления эффекта «отсроченной смерти». Во-первых, такое действие оказывает как ксе-

ногенная, так и аллогенная ДНК. Во-вторых, на положение «окна смерти» относительно момента инъекции цитостатика оказывает время года в регионе, где проводились исследования (г. Новосибирск, Россия). В летний промежуток времени (высокая температура, продолжительный световой день) нам в результате 3 повторов не удалось повторить обнаруженный эффект. При этом проведение экспериментов в любое другое время года (сентябрь-апрель) всегда приводило к проявлению эффекта. Ввиду длительности каждого эксперимента, а также по этико-гуманным соображениям, поскольку каждый эксперимент требует обязательного присутствия большого количества контрольных групп, мы не стали исследовать эффект смещения «окна смерти» в летний период. Все эксперименты, описанные в настоящей работе, проводились в адекватное эмпирически выбранное время года, и применялась максимально эффективная схема введения препарата экзогенной ДНК в промежуток времени 18-30 ч после инъекции ЦФ.

Анализ динамики возникновения и репарации ДЦР

Инъекции как ЦФ, так и экзогенной ДНК в виде монопрепаратов не приводят к видимым изменениям в физиологии мышей. Феномен появления характерного симптомокомплекса и гибели экспериментальных животных наблюдался только при совместном использовании двух препаратов в строго определенные промежутки времени.

Как уже было сказано, систему ККМ можно рассматривать как модельную систему клеток, с которой можно сравнивать все другие системы клеток организма, находящихся в непрерывном делении. В таком случае возникшие нарушения в клетках этой клеточной системы можно корректно экстраполировать на любые другие активно пролиферирующие клетки организма. Это предполагает, что если ККМ погибают под синергичным воздействием ЦФ и экзогенной ДНК, то вероятность гибели других активно делящихся клеток высока, и что если разрушается система ККМ, то разрушаются любые другие системы пролиферирующих клеток, создающих функциональную целостность организма. На основе общеизвестного факта, что ЦФ воздействует на ККМ, а фрагменты экзогенной ДНК интернализуются во внутриядерном пространстве данных клеток (Likhacheva *et al.*, 2007а; Долгова и др., 2011а), нами были выявлены определенные закономерности в молекулярных событиях, протекающих в ККМ при воздействии ЦФ и экзогенной ДНК.

Для того чтобы привязать установленные промежутки времени, когда наблюдается видимый эффект воздействия экзогенной ДНК на мышиный организм, к молекулярным процессам, происходящим в выбранной к рассмотрению системе клеток, были проведены эксперименты, в которых при помощи антител к фосфорилированному гистону уН2АХ анализировалось количество ДЦР в ядрах данных клеток. Гистон уН2АХ фосфорилируется на участке в несколько миллионов пар нуклеотидов по разные стороны от ДЦР, возникающего после столкновения репликативной вилки с МЦС в молекуле ДНК хромосомы. При этом формируется фокус репарации, который выявляется специфическими к модифицированному гистону антителами, и, следовательно, количество фокусов репарации коррелирует с количеством ДЦР (рис. 2) (Niedernhofer et al., 2004; Rothfus, Grompe, 2004).

В процессе приготовления цитологических препаратов ККМ использовался метод вымывания ККМ из бедренных костей опытных животных, поэтому при анализе полученных данных рассматривался весь ряд клеток (гемопоэтических элементов, из которых происходит развитие эритроцитов, зернистых лейкоцитов, кровяных пластинок, а также костномозговых лимфоцитов), входящих в состав данной структуры. В результате проведенного анализа количества ДЦР в ККМ, находящихся под действием ЦФ, был получен следующий график (рис. 3).

Как известно, в норме ДЦР могут спонтанно образовываться в клетке в процессе репликации, где они быстро репарируются без включения в клетке ареста клеточного цикла и остановки цикла деления (Rothfus, Grompe, 2004). Поэтому в нулевой (контрольной) точке кривая не находится строго в нуле. Данные, полученные в проведенных экспериментах, свидетельствуют о том, что $3.7 \pm 0.9\%$ клеток имеют спонтанные ДЦР, и среднее количество таких ДЦР на клетку составляет $7,4 \pm 1,7$. Интересен тот факт, что количество клеток, на которые происходит воздействие цитостатика, имеет два пика: в 12 и в 36 ч. При этом на 12 ч приходится максимум клеток с ДЦР (48,9%), которые возникли в результате репарации МЦС, а в 36 ч пик составляют всего 10% клеток.

Закономерность появления ДЦР мы связываем с клеточным циклом ККМ, которые в силу своей гетерогенности доходят до S-фазы и определяют повреждение не в одно время, а как две разные популяции. Согласно такому механизму



Рис. 2. Окрашенные FITC-мечеными антителами к гистону γH2AX ядра ККМ интактной мыши (а) и экспериментальной мыши после воздействия ЦФ (б).

Яркие светящиеся точки в ядрах представляют собой фокусы репарации ДЦР.



Рис. 3. Прерывистая кривая показывает процент ККМ, в которых количество ДЦР выше фона (> 10 ДЦР на клетку) – среднего количества ДЦР на клетку в контроле, т. е. процент клеток, которые достоверно находятся под воздействием цитостатика ЦФ. Горизонтальные сплошные линии отображают процент погибших животных в различных сериях экспериментов.

образования ДЦР, мы должны обнаружить два пика: первый отражает начало репаративного процесса в клетках, получивших ЦФ в поздней G1- и S-фазах клеточного цикла; второй пик отражает начало репаративного процесса в клетках, которые в момент получения сшивки находились в G2-фазе и прошли клеточный цикл до S-фазы, прежде чем у них активировалась репарационная система. Небольшой процент клеток, составляющих второй пик, сопоставим с тем, что доля клеток, находящихся в G2-фазе в каждый данный момент времени в гетерогенной популяции, пропорциональна длине данной фазы клеточного цикла. Самыми длинными являются G1- и S-фазы, а G2 непродолжительна. Время клеточного цикла у таких популяций быстро делящихся клеток, как ККМ, составляет около 24 ч (Молекулярная биология клетки, 1994; Mondal et al., 2001).

В проведенных экспериментах по анализу распределения ККМ по клеточному циклу показано, что 73,9% клеток находятся в G1-фазе, 9,2% клеток находятся в S-фазе, 11,5% клеток находятся в G2/М-фазе клеточного цикла (рис. 4). Процент клеток, находящихся в G2-фазе клеточного цикла, сопоставим с процентом ККМ, которые составляют второй пик репарации ДЦР (10%).



Рис. 4. Распределение популяции ККМ интактной мыши по клеточному циклу.

Анализ проводился с использованием красителя пропидий йодида (PI) и проточного цитофлюориметра BD FACSAria (Becton Dickinson, США).

Сопоставление гибели экспериментальных животных при введении экзогенной ДНК в определенные интервалы времени после воздействия ЦФ с количеством ДЦР в ККМ

Из сопоставления графиков гибели мышей и количества ДЦР (рис. 3) можно сделать заключение о том, что мыши заболевают и гибнут только в том случае если введение ДНК затрагивает процесс репарации ДЦР основного количества ККМ, происходящий в промежуток времени 18–24 (12–26) ч после инъекции ЦФ.

Если же введение экзогенной ДНК захватывает любой другой промежуток времени, то мыши выживают. Инъекции экзогенной ДНК мышам и доставка фрагментов экзогенной ДНК в ККМ в момент, когда в клетке активирована репаративная система в связи с переходом клетки в S-фазу и обнаружением клеткой МЦС, индуцируют некие события, приводящие к гибели экспериментальных животных. При этом ни нахождение экзогенной ДНК в ККМ, не находящихся под воздействием ЦФ, ни цитостатик как монопрепарат не приводят к каким-либо нарушениям в организме мышей. Повторные промежутки времени инъекций экзогенной ДНК необходимы для воздействия на клетки, находившиеся в критический промежуток времени 18-24 ч в G2/М-фазе.

Анализ количества ДЦР в ККМ мышей после воздействия только ЦФ и ЦФ в комбинации с экзогенной ДНК

Наиболее интригующим из вопросов, возникших в процессе работы, был вопрос о возможных вариантах завершения репарации ДЦР хромосом при интернализации фрагментов экзогенной ДНК в ядерном пространстве клетки. Одним из рассматриваемых вариантов предполагалась возможность появления аномального интермедиата репаративной гомологичной рекомбинации: процессированного двуцепочечного конца хромосомы, при котором одноцепочечный хвост инвазирует во внешнюю матрицу, представляющую собой эписомоподобную структуру, сформированную ковалентным объединением экзогенных фрагментов, доставленных в ядерное пространство из окружающей среды (Branzei, Foiani, 2007, Hashizume, Shimizu, 2007). Сохранение такой структуры длительное время без завершения процесса рекомбинации могло бы индуцировать активацию апоптотического каскада. Стабильное длительное присутствие в ядре таких структур можно было бы визуализировать, поскольку при этом предполагалось, что ДЦР сохраняются в нерепарированной форме, и, следовательно, в клетках присутствует фосфорилированная форма гистона γH2AX.

Для проверки этого предположения был дополнительно снят профиль ДЦР в ККМ мышей после совместного воздействия цитостатика ЦФ и экзогенной ДНК человека (рис. 5). Мыши получали инъекции 0,5 мг экзогенной ДНК каждый час в период 18–28 ч после введения ЦФ.

Известно, что экзогенная ДНК достигает ККМ и интернализируется в клеточных компартментах уже через несколько минут после интраперитонеальной инъекции (Долгова и др., 2011а). Результаты проведенного анализа демонстрируют, что в точке 18 ч сразу же после первой инъекции экзогенной ДНК мышам наблюдается резкое снижение количества ККМ с ДЦР, т. е. происходит практически мгновенная репарация ДЦР. И следовательно, предполагаемое длительное существование незавершенного интермедиата репарации, по-видимому, маловероятно. Результаты проведенного анализа демонстрируют, что в обеих группах мышей основная масса ДЦР репарируется к 28 ч после введения ЦФ.

Обсуждение

Возможные события при репарации МЦС в присутствии фрагментов экзогенной ДНК

В работе A.S. Likhacheva с соавт. (2007b) впервые было описано явление, связанное с совместным введением в организм экспериментальных мышей кросслинкирующего цитостатика ЦФ и фрагментированной двуцепочечной экзогенной ДНК. При такой обработке наблюдались появление характерного симптомокомплекса и гибель экспериментальных животных. Результаты работы свидетельствовали



Рис. 5. Процент клеток ККМ, находящихся под воздействием цитостатика ЦФ, у мышей после введения только цитостатика ЦФ и в комбинации с экзогенной ДНК человека.

В точке 18 ч наблюдается схождение до базового уровня количества клеток с ДЦР в группе мышей, получавших инъекции экзогенной ДНК.

о том, что в геномной фракции ДНК клеток соматических тканей заболевших и погибших животных присутствуют последовательности ДНК, гомологичные человеческому *Alu* повтору, в виде стабильно существующих структурнофункциональных единиц. Совокупность фактов говорила о том, что произошел соматический трансгенез, и что чужеродный генетический материал, определяемый в геномной фракции ДНК клеток соматических тканей мышей, токсичен для подопытных животных. В проведенных исследованиях настоящей работы мы попытались охарактеризовать данное явление, используя различные подходы.

На первом этапе были проанализированы временные параметры введения экзогенной ДНК после инъекции ЦФ, приводящего к заболеванию и последующей гибели экспериментальных животных. Предполагается, что обнаруженное токсическое действие связано с нарушением молекулярных процессов в ККМ (СКК), вызванным присутствием в этих клетках чужеродной ДНК (Долгова и др., 2012а). В результате происходит гибель трансгенных клеток и, как следствие, разрушение кроветворной и иммунной систем организма. При этом были определены промежутки времени после инъекции ЦФ, когда введение ДНК приводит к гибели мышей, достигающей 60–90%.

Действие ЦФ в первую очередь затрагивает активно пролиферирующие клетки организма, к которым относятся ККМ. При воздействии ЦФ в дозе 200 мг/кг индуцируются множественные МЦС в молекулах ДНК (2000-2500 МЦС на ядро) и активируются репарационнорекомбинационные процессы (Akkari et al., 2000; Niedernhofer et al., 2004; Rothfus, Grompe, 2004; Лихачева и др., 2008; Bhagwat et al., 2009). В этих условиях в ядре клеток формируются ДЦР, представляющие собой наиболее рекомбиногенные интермедиаты репарации МЦС. Если одновременно с ДЦР во внехромосомном пространстве ядра появляются фрагменты экзогенной ДНК, доставленные из окружающей клетку среды, то такие фрагменты ДНК становятся равноправными участниками репарационно-рекомбинационного процесса, связанного с репарацией индуцированных ДЦР (Лихачева и др., 2008). Предполагается, что в результате этого процесса либо могут формироваться стабильно присутствующие в ряду клеточных делений эписомоподобные молекулы внехромосомной локализации, либо чужеродная генетическая информация может проявляться в реципиентном геноме, либо происходит истинная интеграция фрагментов чужеродной ДНК в геном реципиентной клетки. Такое присутствие чужеродной генетической

информации в реципиентном ядре токсично для клетки и может приводить к ее гибели. Другая возможность действия фрагментов экзогенной ДНК – это индукция хаотичного ковалентного объединения двуцепочечных концов хромосом, локализованных в ядре в этот момент времени. Если в момент появления экзогенных фрагментов в ядре присутствуют двуцепочечные концы, индуцированные процессом репарации МЦС, то они попадают под действие молекулярной машины, которая стремится аварийно удалить экзогенные двуцепочечные концы из пространства ядра, сшивая их друг с другом. В этом случае двуцепочечные концы хромосом могут сшиваться в хаотическом порядке, что с неизбежностью приведет к аберрантному митозу и гибели клетки.

Активация факторов репарации и принципиальная возможность участия экзогенных фрагментов ДНК в репаративном процессе связаны с формированием и залечиванием ДЦР-интермедиатов, образующихся при репарации МЦС. В этой связи мы попытались определить следующий факт: существуют ли в ядре клеток в момент инъекций экзогенной ДНК, когда проявляется эффект ее губительного воздействия на мышиный организм, интермедиаты репарации МЦС, дальнейший процессинг которых может идти с участием фрагментов экзогенной ДНК. Для этого была проанализирована динамика образования ДЦР в ККМ мышей после воздействия ЦФ с использованием специфических антител к гистону уН2АХ, который является основным маркером ДЦР.

Проведя анализ полученных результатов, мы обнаружили следующий факт. Инъекции экзогенной ДНК в промежуток времени 18-24 ч. во время, когда происходит завершающий этап репарации основной массы ДЦР с максимумом формирования к 12 ч после введения ЦФ, и следующие затем инъекции, затрагивающие клетки, первоначально находившиеся в G2 и достигшие S-фазы к 24-40 ч после введения цитостатика, приводят к заболеванию и гибели животных. Из этого наблюдения следовало, что заключительный этап репарации ДЦР и присутствие в этот момент времени в ядре фрагментов экзогенной ДНК индуцируют некие новые репарационно-рекомбинационные отношения между участниками молекулярных

взаимодействий, и что эти новые молекулярные взаимодействия приводят к функциональным нарушениям в клетке, итогом чего становятся деструктивные изменения. Более того, показано (рис. 5, точка 18 ч), что инъекция экзогенной ДНК в момент времени, когда идет завершающий этап репарации ДЦР, практически мгновенно завершает этот процесс.

Известно, что основным событием в клетках мышей, находящихся под воздействием ЦФ в рассматриваемый промежуток времени, является репарация ДЦР. Показано, что существуют два основных пути репарации ДЦР (рис. 6).

Первый путь – это негомологичное объединение концов (Nonhomologous End Joining, NHEJ) (Derbyshire *et al.*, 1994; Lees-Miller, Meek, 2003; Wang *et al.*, 2005). Второй путь – восстановление репликативной вилки, благодаря инвазии процессированного 3'-конца в гомологичный участок сестринской хроматиды (De Silva *et al.*, 2000; Niedernhofer *et al.*, 2004; Branzei, Foiani, 2007; Bhagwat *et al.*, 2009).

Мы предлагаем следующие возможные объяснения полученным экспериментальным результатам.

Известно, что фрагменты экзогенной ДНК, доставленные во внутренние компартменты клетки, активируют надзирающую систему клетки (MacDougall et al., 2007; Zou, 2007; Лихачева и др., 2008). При этом активируются системы «скорой помощи», которые призваны удалить из пространства клетки крайне нежелательную структуру – ДЦР. Известны несколько таких систем высших эукариот, сшивающих в экстренном порядке присутствующие в ядре двуцепочечные концы друг с другом. Это комплекс Ки70/80-лигаза IV, лигаза III, фактор Mentas, NHR лигазная активность (Derbyshire et al., 1994; Lees-Miller, Meek, 2003; Lee et al., 2005; Wang et al., 2005). Для процесса лигирования с участием этих систем специфичность последовательности сшиваемых фрагментов не имеет значения.

При условиях обработки экзогенной ДНК, ведущей к появлению описываемого феномена, через 18 ч после введения ЦФ уже идет активная репарация индуцированных действием цитостатика двуцепочечных концов хромосом. Попавшие в ядра клеток, находящихся под воздействием ЦФ, экзогенные фрагменты могут



Рис. 6. Два основных пути репарации ДЦР.

1 – гомологическая рекомбинация, при которой происходит процессирование 3'-конца ДЦР с последующей инвазией в гомологичный участок ДНК. В конечном счете происходит восстановление репликативной вилки, при этом лидирующая и отстающая цепи меняются местами; 2 – негомологичное объединение концов (NHEJ). В этом случае происходит сшивание концов двух ДЦР вне зависимости от наличия гомологии.

индуцировать наработку факторов аварийной репарации. Как было отмечено выше, к таким факторам относятся системы экстренного лигирования Ku70/80-лигаза IV, лигаза III, фактор Mentas, NHR лигазная активность.

С учетом указанных выше объяснений можно предположить несколько сценариев репарационно-рекомбинационных событий с участием ДЦР хромосом и фрагментов экзогенной ДНК, доставленных в ядро реципиентной клетки.

1. Происходит встройка экзогенных фрагментов в места разрывов между двумя двуцепочечными концами хромосом. Если именно встройка чужеродной ДНК является причиной гибели клетки, то возможно следующее объяснение. Установлено, что для максимального проявления эффекта гибели необходимы частые введения экзогенной ДНК в больших количествах. Мы полагаем, что фрагменты, попав внутрь ядра, вступают в два конкурентных процесса: сшиваются между собой (или замыкаются в кольцо) и вшиваются между двумя ДЦР хромосом. Если равновесие реакции сдвинуто в сторону образования кольца, то произойдет быстрое объединение основной массы фрагментов в кольцо (Долгова и др., 2011а), и только незначительное количество этих фрагментов может интегрировать в хроматин. Если такая интеграция не деструктивна для клетки (например, встройка произошла в любой блок повторяющихся последовательностей), то потребуются многократные попытки для того, чтобы чужеродный фрагмент интегрировал в причинную (значимую, функциональную) часть хромосомы и клетка вступила в аберрантный митоз.

Второй сценарий предполагает стохастическое объединение различных близко расположенных двуцепочечных концов включая концы хромосом и концы фрагментов. В этом случае сшитые в стохастическом порядке двуцепочечные концы хромосом, во-первых, нарушат функциональный континуум хромосом, а вовторых, делают репликацию невозможной, так как остановившиеся репликативные вилки уже никогда не будут восстановлены в исходном функциональном виде. Тогда встраивание чужеродной ДНК в реципиентный геном является незначительным и, наверное, редким следстви-

ем появления в ядре агрессивной лигирующей системы. Тот факт, что практически сразу при инъекциях экзогенной ДНК происходит восстановление ДЦР, детектируемых антителами к гистону уН2АХ, может свидетельствовать о такого рода активации ядерных лигаз. Также в пользу этого варианта событий может свидетельствовать обнаруженный нами феномен сохранения количества умеренных повторов генома при инъекциях экзогенной ДНК (Долгова и др., 2012б). В этом случае предполагается, что соседние ДЦР, несущие блоки гомологичных повторов, не успевают осуществить гомологичное спаривание и следующую за этим репарацию, а сшиваются по тупым концам активированной системой.

Возможны другие объяснения протекающих в ядре событий. При наличии фрагментов экзогенной ДНК в непосредственной близости от процессированного и готового к рекомбинации двуцепочечного конца хромосомы обнаруженная гомология во внешней матрице может оттягивать инвазию З'-конца на себя (рис. 7). В результате этого происходит переключение репликативной вилки со сменой матриц. Такой процесс описан в работе D. Branzei, M. Foiani, (2007) и может быть подтвержден результатами работ V.J. Cannistraro, J.S. Taylor (2007), P.J. Hastings с соавт. (2009), где показано, что для спаривания и старта полимеризации достаточно нескольких нуклеотидов. При таком завершении процесса, если предположить, что фрагменты экзогенной ДНК сшиваются в протяженные кольцевые структуры, должна формироваться аберрантная хромосома, объединенная с эписомой своим двуцепочечным концом.

И последней, на наш взгляд, возможностью из экспериментально показанных типов поведения фрагментов экзогенной ДНК, доставленных в ядро, является возможность формирования этими фрагментами кольцевой эписомоподобной структуры (Hashizume, Shimizu, 2007). В таких структурах могут присутствовать многочисленные функциональные и регуляторные последовательности, приводящие к деструктивным проявлениям в функционировании клетки.

Описанные предположительные варианты процессов и возникающие при этом структуры могут приводить к нарушениям в последовательности генетического материала и организации хроматина и, как следствие, к индукции или аберрантного митоза, или других нарушений в метаболизме клетки, следствием чего является гибель большинства ККМ. Если подобная картина событий присуща всем активно пролиферирующим клеткам организма, то будут разрушены многие функциональные системы, и гибель организма станет просто делом времени.

Благодарности

Авторы выражают огромную благодарность за помощь в проделанной работе О.В. Воробьевой и Н.А. Сердюковой за постановку FISH.



Рис. 7. Схемы восстановления репликативной вилки после обнаружения повреждения в молекуле ДНК.

a – восстановление репликативной вилки с использованием сестринской хроматиды; б – восстановление репликативной вилки со сменой матриц, приводящее к нарушениям в генетическом материале и последующей гибели клетки (Branzei, Foiani, 2007).

Работа финансировалась при участии федеральной целевой программы «Научные и научно-технические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (государственный контракт № 14.740.11.0922) и ООО «Панаген».

Литература

- Долгова Е.В., Лихачева А.С., Орищенко К.Е. и др. Репарация межцепочечных сшивок молекулы ДНК // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 2. С. 332–356.
- Долгова Е.В., Николин В.П., Попова Н.А. и др. Интернализация экзогенной ДНК во внутренние компартменты клеток костного мозга мышей // 2012a (готовится к изданию).
- Долгова Е.В., Прокопенко А.В., Николин В.П. и др. Характеристика изменения количества умеренных повторов в геноме клеток костного мозга экспериментальных мышей на фоне инъекции циклофосфана и экзогенной ДНК человека // 2012б (готовится к изданию).
- Долгова Е.В., Рогачев В.А., Николин В.П. и др. Лейкостимулирующее действие фрагментов экзогенной ДНК, защищенных протамином, при вызванной циклофосфаном миелосупрессии мышей // Вопр. онкологии. 2009. Т. 55. № 6. С. 761–764.
- Лихачева А.С., Рогачев В.А., Николин В.П. и др. Участие экзогенной ДНК в молекулярных процессах, протекающих в соматической клетке // Информ. вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 3. С. 426–473.
- Молекулярная биология клетки: В 3 т. / Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюис. Пер. с англ. М.: Мир, 1994. Т. 3. 506 с.
- Николин В.П., Попова Н.А., Себелева Т.Е. и др. Влияние экзогенной ДНК на восстановление лейкопоэза и противоопухолевый эффект циклофосфана // Вопр. онкологии. 2006. Т. 52. № 3. С. 336–340.
- Akkari Y.M., Bateman R.L., Reifsteck C.A. *et al.* DNA replication is required to elicit cellular responses to psoralen-induced DNA interstrand cross-links // Mol. Cell Biol. 2000. V. 20. N 21. P. 8283–8289.
- Bhagwat N., Olsen A.L., Wang A.T. *et al.* XPF-ERCC1 participates in the Fanconi anemia pathway of crosslink repair // Mol. Cell Biol. 2009. V. 29. N 24. P. 6427–6437.
- Branzei D., Foiani M. Template switching: from replication fork repair to genome rearrangements // Cell. 2007. V. 131. N 7. P. 1228–1230.
- Cannistraro V.J., Taylor J.S. Ability of polymerase eta and T7 DNA polymerase to bypass bulge structures // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. N 15. P. 11188–11196.
- De Silva I.U., McHugh P.J., Clingen P.H., Hartley J.A. Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-

links in mammalian cells // Mol. Cell Biol. 2000. V. 20. N 21. P. 7980–7990.

- Derbyshire M.K., Epstein L.H., Young C.S.H. *et al.* Nonhomologous recombination in human cells // Mol. Cell Biol. 1994. V. 14. N 1. P. 156–169.
- Fleming R.A. An overview of cyclophosphamide and ifosfamide pharmacology // Pharmacotherapy. 1997. V. 17. P. 146–154.
- Hashizume T., Shimizu N. Dissection of mammalian replicators by a novel plasmid stability assay // J. Cell Biochem. 2007. V. 101. N 3. P. 552–565.
- Hastings P.J., Ira G., Lupski J.R. A microhomologymediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation // PLoS Genet. 2009. V. 5. N 1. e1000327.
- Lee S., Oshige M., Durant S.T. *et al.* The SET domain protein Metnase mediates foreign DNA integration and links integration to nonhomologous end-joining repair // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. N 50. P. 18075–18080.
- Lees-Miller S.P., Meek K. Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining // Biochimie. 2003. V. 85. N 11. P. 1161–1173.
- Likhacheva A.S., Nikolin V.P., Popova N.A. *et al.* Exogenous DNA can be captured by stem cells and be involved in their rescue from death after lethal-dose γ-radiation // Gene Ther. Mol. Biol. 2007a. V. 11. P. 305–314.
- Likhacheva A.S., Nikolin V.P., Popova N.A. *et al.* Integration of human DNA fragments into the cell genomes of certain tissues from adult mice treated with cytostatic cyclophosphamide in combination with human DNA // Gene Ther. Mol. Biol. 2007b. V. 11. P. 185–202.
- MacDougall C.A., Byun T.S., Van C. *et al.* The structural determinants of checkpoint activation // Genes Dev. 2007. V. 21. N 8. P. 898–903.
- Magaña-Schwencke N., Henriques J.A., Chanet R., Moustacchi E. The fate of 8-methoxypsoralen photoinduced crosslinks in nuclear and mitochondrial yeast DNA: comparison of wild-type and repairdeficient strains // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. N 6. P. 1722–1726.
- Mazur L., Czyzewska A. Immunocytochemical analysis of apoptotic bone marrow cells after treatment of mice with WR-2721 and chemotherapeutic drugs // Folia Histochem. Cytobiol. 2001. V. 39. N 2. P. 63–66.
- Mondal T.K., Bhatta D., Ray P.K., Pal P. Synergistic immunopotentiating effects induced by T-cell and B-cell superantigen in mice // Immunol. Invest. 2001. V. 30. N 3. P. 169–180.
- Niedernhofer L.J., Odijk H., Budzowska M. *et al.* The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks // Mol. Cell Biol. 2004. V. 24.
N 13. P. 5776–5787.

- Rothfuss A., Grompe M. Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway // Mol. Cell Biol. 2004. V. 24. N 1. P. 123–134.
- Salem M.L., El-Naggar S.A., Cole D.J. Cyclophosphamide induces bone marrow to yield higher numbers of precursor dendritic cells *in vitro* capable of

functional antigen presentation to T cells *in vivo //* Cell Immunol. 2010. V. 261. N 2. P. 134–143.

- Wang H., Rosidi B., Perrault R. *et al.* DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining//Cancer Res. 2005. V. 65. N 10. P. 4020–4030.
- Zou L. Single- and double-stranded DNA: building a trigger of ATR-mediated DNA damage response // Genes Dev. 2007. V. 21. N 8. P. 879–885.

Приложение

Таблица

уппы		Воздействие	Коли мь	ічество лшей	ибших тных	Дни гибели (забоя)
M≙ rp	ЦФ в∕б	ДНК в/б	всего	павших	% пог живо	животных
1	200 мг/кг	-	10	0	0	
2	_	ДНК человека 1 мг, 0,5 мг след. двое суток	10	0	0	
3	_	ДНК мышей СВА 1 мг, 0,5 мг след. двое суток	10	0	0	
4	200 мг/кг	ДНК человека 1 мг за 30 мин до ЦФ, 0,5 мг через 30 мин после ЦФ и след. двое суток	10	8	80	На 6-е сутки пали 2 мыши (№ 7 и 9), на 7-е – 1 (№ 5). На 18-е сутки ввиду болезни заби- ты 2 мыши (№ 1 и 8). 2 мыши (№ 2 и 10) пали на 24-е и на 45-е сутки. Оставшихся трех мышей (№ 3, 4 и 6) забили на 56-й день. При этом одна из них уже была больна
5	200 мг/кг	ДНК человека через 15 мин после ЦФ вводи- ли по 1 мг с интервалом в 1 ч в течение 11 ч (всего 12 мг)	8	2	25	На 2-е сутки 1 мышь забита в пресмертном состоянии, на 13-е – 1 пала
6	200 мг/кг	ДНК человека каждая мышь получала только одну инъекцию 1 мг ДНК, но в разное время после ЦФ – через 15 мин, через 1 ч, через 2 ч и т. д. в течение 11 ч	12	0	0	
7	200 мг/кг	ДНК человека через 12 ч после ЦФ вводи- ли по 1 мг с интервалом в 1 ч в течение 11 ч (всего 12 мг)	10	0	0	
8	200 мг/кг	ДНК человека через 18 ч после ЦФ вводи- ли по 1 мг с интервалом в 1 ч в течение 11 ч (всего 12 мг)	10	9	90	На 5-е сутки пала 1 мышь (№ 8). На 6-е 1 мышь пала (№ 9) и 5 были забиты (№ 3–7). На 7-е сутки забиты 2 мыши (№ 1 и 2) в плохом состоянии

Схемы введения разным группам мышей ЦФ и экзогенной ДНК

Окончание таблицы

уппы		Воздействие	Колич мы	иество шей	ибших отных	Дни гибели (забоя)
Nº rp	ЦФ в/б	ДНК в/б	всего	павших	% ПОГ ЖИВ(животных
9	200 мг/кг	ДНК мышей СВА через 18чпосле ЦФвводили по 1 мг с интервалом в 1 ч в течение 11 ч (всего 12 мг)	6	5	83	Мыши погибли или были
10	200 мг/кг	ДНК лосося через 18чпосле ЦФ вводили по 1 мг с интервалом в 1 ч в течение 11 ч (всего 12 мг)	6	5	83	забиты на 8–9-е сутки
11	200 мг/кг	ДНК человека в период времени 1–6, 7–12, 13– 18, 19–24, 25–30, 31–36 ч после ЦФ по 1 мг каждый час	6 групп по 6 мышей	0	0	
12	200 мг/кг	ДНК человека в период времени 15 мин – 5 ч и 30–35 ч после ЦФ по 0,5 мг каждый час	8	0	0	
13	200 мг/кг	ДНК человека в период времени 18–23 ч и 42– 47 ч после ЦФ по 0,5 мг каждый час	8	6	75	На 9-е, 12-е, 14-е и 26-е сутки пало по 1 мыши. На 29-е сутки 2 мыши забиты в плохом состоянии
14	200 мг/кг	ДНК человека через 18 ч после ЦФ вводили по 0,5 мг с интервалом в два часа в течение 12 ч (всего 3,5 мг)	8	5	63	На 6-е сутки 2 мыши пали и 2 забиты в плохом состоянии. На 7-е сутки 1 мышь забита
15	200 мг/кг	ДНК человека через 18 ч после ЦФ вводили по 0,5 мг каждый час в течение 12 ч (всего 6 мг)	14	12	86	Мышей забивали в плохом состоянии: на 6-е сутки – 3 мыши, на 9-е, 15-е, 21-е, 27-е сутки – по одной мыши, на 10-е, 47-е сутки – по 2 мыши. На 36-е сутки одна мышь пала
16	200 мг/кг	ДНК СВА через 18 ч после ЦФ вводили по 10 мкг каждый час в течение 12 ч (всего 120 мкг)	7	0	0	
17	200 мг/кг	ДНК СВА через 18 ч после ЦФ вводили по 100 мкг каждый час в течение 12 ч (всего 120 мкг)	7	2	29	Мыши пали на 8-е и 12-е сутки

TIME-COURSE ANALYSIS OF THE TOXIC ACTION OF EXOGENOUS DNA ADMINISTERED UPON CYCLOPHOSPHAMIDE PRETREATMENT

E.V. Dolgova¹, A.S. Proskurina¹, V.P. Nicolin¹, N.A. Popova¹, E.A. Alyamkina¹,
K.E. Orishchenko¹, A.G. Shilov¹, Y.R. Efremov¹, E.R. Chernykh², A.A. Ostanin²,
S.S. Bogachev¹, A.V. Procopenko¹, E.M. Malkova⁴, O.S. Taranov⁴, T.S. Gvozdeva⁵,
V.A. Rogachev¹, S.N. Zagrebelniy³, M.A. Shurdov⁶

¹ Inctitute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,

e-mail: gorbi@bionet.nsc.ru;

² Institute of Clinical Immunology, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences,

Novosibirsk, Russia;

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;

⁴ State Research Center for Virology and Biotechnology «Vector», Novosibirsk, Russia;

⁵ Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia;

⁶ OOO Panagen

Summary

Mice were observed to get sick and die upon administration of exogenous DNA (0,1-1,0 mg) following their pretreatment with a crosslinking cytostatic cyclophosphamide (CP) at 200 mg/kg. This phenomenon is called delayed death. It was observed when exogenous DNA was administered at 1–2-h intervals in two separate time spans. The first was within the 18–24 h period, and an additional period, called by us the «death window», was recorded within 24–30 or 42–48 h after CP injection. The period from 18 to 24 h after CP injection corresponds to the final step in the repair of majority of interstrand cross-link (ICL)induced double-stranded breaks (DSBs) in bone marrow cells (BMCs). As early as 10 min after the first adiministrqation of exogenous DNA, the modified γ H2AX histone, the indicator of DSBs, disappears from BMC nuclei, as demonstrated by anti-H2AX staining. The facts that fragments of exogenous DNA become internalized to the BMCs nuclei when DSBs are being repaired in such cells and that the experimental mice die upon the treatment, suggests that exogenous DNA participates in ICL-induced DSBs repair. We speculate that such influence results in critical disturbances in a certain type of intensely proliferating cells and their total elimination. This, in turn, causes irreversible pathological changes in mice, resulting in extensive mortality.

Key words: cyclophosphamide, double-stranded breaks, interstrand cross-links, bone marrow cells, exogenous DNA, DNA repair.

ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ЭКСТЕРЬЕРНЫХ И ИНТЕРЬЕРНЫХ ПРИЗНАКОВ ХОРЬКОВ (*MUSTELA PUTORIUS* LINNAEUS, 1758) В ХОДЕ ИХ ПРОМЫШЛЕННОЙ ДОМЕСТИКАЦИИ

О.И. Федорова, Е.А. Тюрина

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, Москва, Россия, e-mail: ox fed@mail.ru

Хорек (*Mustela putorius* L.) занимает особое место в доместикационном процессе пушного звероводства. История одомашнивания хорька началась намного раньше, чем его промышленное разведение. Отбор на улучшение хозяйственно полезных признаков хорьков в фермерских популяциях привел к увеличению размера тела, повышению воспроизводительной способности, улучшению качества опушения и разнообразию окраски волосяного покрова. С увеличением общего размера тела коррелятивно изменились размеры и пропорции отдельных частей тела хорьков и их внутренних органов. В июне 2011 г. зарегистрировано новое селекционное достижение – хорек Тверской.

Ключевые слова: хорьки, *Mustela putorius*, доместикация, размер тела, изменчивость, экстерьерные и интерьерные признаки.

Введение

Одомашнивание хорьков началось более 2 тыс. лет назад: по одним данным в Египте – для борьбы с грызунами, по другим – на югозападе Европы, на Пиренейском полуострове для истребления кроликов, нашествие которых порой приводило к всеобщему голоду. При этом часто упоминают картину Леонардо да Винчи «Дама с горностаем» (XV в.), где на самом деле изображен не горностай, а одомашненный хорек фуро (Герасимова, 2008). В XIII в. хорьков активно использовали для борьбы с крысами на торговых и военных судах. При этом называли их по-разному: «африканским хорьком», «фуро», «фреткой» (Прелль, 1934; Новиков, 1971; Терновский, 1977).

Со временем хорьки стали объектом любительского разведения в домашних условиях, о чем свидетельствуют многочисленные выставки, организуемые любителями-хорьководами. В ходе такого любительского разведения у хорьков зарегистрирована повышенная изменчивость окраски волосяного покрова (Пыльник, 2010). Промышленная доместикация хорьков как объекта клеточного пушного звероводства началась в первой половине XX в. Для этого использовались два вида хорьков – *Putorius putorius* и *Putorius eversmanni* (Терновский, 1977; Кузнецов и др., 1985).

В настоящее время в специализированных звероводческих хозяйствах разводят хорьков, полученных в результате скрещивания: *лесной* (черный) *хорек* × *альбинос-фуро* (рецессивная мутантная форма). У них одинаковый набор хромосом: 2n = 40 (у третьего вида – *светлого хорька* 2n = 38), одинаковый срок беременности (40–42 дня), в то время как у *светлого* – 37–38 дней. Есть мнение, что гетерозиготы от *черного хорька* унаследовали окраску волосяного покрова, а от *фуро* – «прирученность» и высокую плодовитость (Терновский, 1977).

В нашу страну хорьки были импортированы в 1977 г. с польских звероферм под названием «фретка», «фредка», «ферретка» «тхорзофретка» (от польского «fretka»).

В ходе промышленной доместикации созданы два типа окраски хорьков – золотистый и перламутровый. На их основе в 2004 г. в «Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию», были внесены две породы: *хорьки золотистые* и *хорьки Тверские*.

Материалы и методы

Изучение эффектов промышленной доместикации на интерьерные и экстерьерные признаки хорьков проводили в специализированных звероводческих хозяйствах: «Новые меха» Тверской области – хорьки Тверские и «Пушное» Тульской области – хорьки золотистые. Размер и телосложение хорьков оценивали согласно бонитировочному ключу ОСТ 10 10-86 (Кузнецов и др., 1975).

Результаты

Изменчивость массы и длины тела хорьков разных типов

В ходе промышленной доместикации у хорьков зафиксировано увеличение массы тела. Так, у самцов *Тверских хорьков* по сравнению с исходными формами – *хорьки черные* и *хорьки фуро* – соответственно на 823,2 и 860,6 г (*P* > 0,999). У самок укрупнение по живой массе произошло в 1,8 раза по сравнению с *черными хорьками* и в 1,5 по сравнению с *хорьками фуро* (*P* > 0,999) (рис. 1).

Половой коэффициент (отношение массы тела самцов к массе тела самок) у фермерских

2500 2200 L 2000 1779.6 Масса тела, 1500 1376,8 1339,4 1161,4 942.2 1000 785.5 646.8 500 0 хорек черный фуро хорек хорек золотистый Тверской Типы хорьков 🔲 самки; 🗀 самцы

Рис. 1. Абсолютная масса тела у *Тверских хорьков* в сравнении с хорьками *фуро*, *хорек золотистый* и *хорек черный*.

хорьков двух пород (*Тверских* и *золотистых*) составляет 1,9, у *черного хорька* – 2,1, у *фуро* – 1,7 (табл. 1).

Длина тела самцов *Тверских хорьков* за период промышленного разведения увеличилась на 57,9 мм (в 1,14 раза) по сравнению *с черными хорьками* и на 32,4 мм по сравнению с *фуро* (*P* > 0,999). У самок этой породы по сравнению с *черными* хорьками длина тела увеличилась на 52,2 мм (в 1,15 раза) по сравнению с *фуро* – на 27,2 мм (*P* > 0,999) (рис. 2).

Коэффициент изменчивости по массе тела у самцов составил: Cv = 44,4 (хорек черный), Cv = 37,7 (фуро); Cv = 10,7 (хорек золотистый) и Cv = 9,8 (хорек Тверской). Уменьшение вариабельности данного признака у золотистых и Тверских хорьков можно объяснить результатами селекции на консолидацию стада по живой массе тела.

Как показала селекционная практика, селекция по длине тела у норок, лисиц, песцов и соболей более эффективна, чем по массе тела (Колдаева, Колдаев, 2007). Такая же тенденция наблюдается и у хорьков.

Изменчивость отдельных морфометрических показателей хорьков в ходе промышленной доместикации

Процесс доместикации характеризуется быстрым возникновением крупных наследственных перестроек, которые сопровождаются резкими морфологическими изменениями. С увеличени-



Рис. 2. Абсолютная длина тела у *Тверских хорьков* в сравнении с хорьками *фуро*, *хорек золотистый* и *хорек черный*.

Таблица 1

Показатели	Группа животных	Пол	п	M ± m	Lim	δ	Cv
	Хорек черный (дикий)	3	8	1376,8 ± 216,2	524-2290	611,5	44,4
	(Терновский, 1977)		8	$646,8 \pm 86,1$	266-1003	243,6	37,7
	<i>Фите</i> (Териораций 1077)	3	11	$1339,4 \pm 82,2$	1058–1924	272,5	20,3
Маасалалал	Φypo (терновский, 1977)	4	6	$785,5 \pm 61,4$	586-1017	150,3	19,1
Масса тела, Г	Vom og po po po mu om už (2010)	3	40	1779,6 ± 30,2	1327-2287	190,8	10,7
	хорек золотистый (2010)	4	40	$942,2 \pm 21,5$	640-1286	135,9	14,4
	Van an Taan anaŭ (2000)	3	35	2200,0 ± 36,6	1436-2556	216,4	9,8
	хорек Тверской (2009)	4	35	$1161,4 \pm 26,1$	842-1450	154,4	13,3
	Хорек черный (дикий)	3	8	$410,9 \pm 13,1$	350-460	37,1	9,0
	(Терновский, 1977)	9	8	$338,8 \pm 6,6$	320-360	18,7	5,5
	Фила (Тариаракий 1077)	3	11	$436,4 \pm 6,0$	410-475	20,1	4,6
	Φ <i>уро</i> (Терновский, 1977)	9	6	$363,8\pm3,9$	347-372	9,6	2,6
длина тела, мм	Vom on pop om u om už (2010)	3	40	$437,5 \pm 2,3$	400–460	14,3	3,3
	хорек золотистый (2010)	4	40	$368,1 \pm 2,2$	340-400	14,2	3,8
	Vanay Taanayor (2000)	3	35	$468,8 \pm 2,2$	440–490	12,7	2,7
	лорек Тверской (2009)	9	35	391,0 ± 2,1	370-420	12,6	3,2
	Vopak 2020muanu vi (2010)	3	40	$216,6 \pm 2,7$	185-260	18,9	8,7
Обхват груди за	лорек золотистыи (2010)	9	40	$174,0 \pm 1,8$	150-200	11,4	6,6
лопатками, мм	V T (2000)	8	35	$215,2 \pm 3,0$	163-250	17,5	8,1
	лорек Тверской (2009)	4	35	$173,2 \pm 2,2$	150-210	13,0	7,5

Изменчивость массы и длины тела диких и фермерских хорьков

ем общего размера тела коррелятивно изменились размеры и пропорции отдельных частей тела животного, хотя при отборе эти признаки не учитывались.

Высота уха – признак, который не относится к хозяйственно полезным, искусственный отбор по нему не производится. В процессе доместикации высота уха уменьшилась, что связано с клеточными условиями содержания зверей, когда у них ограничена двигательная активность, исчезла необходимость в слуховом ориентировании, поиске пищи, защите от врагов, образовании гнезда и т. д. Изменчивость этого показателя составила 7,8–10,1.

Хвост – необходимый локомоторный орган для быстрого передвижения и маневрирования. Он помогает поддерживать равновесие на бегу, при крутых поворотах, планирующих прыжках и служит опорой при стоянии на задних лапах (Терновский, 1977). В ходе промышленной доместикации длина хвоста как у самок, так и у самцов хорьков фермерских популяций увеличилась. Но по этому показателю нет достоверной разницы между дикими особями и животными промышленного разведения. Увеличение произошло пропорционально длине тела, о чем свидетельствует относительная длина хвоста.

Длина ладони у самцов черных диких хорьков составляет в среднем 45,5 мм, у самок – 36,9, у фуро 49,1 и 40,0 соответственно (Терновский, 1977). За период промышленной доместикации абсолютная длина ладони у самцов хорьков Тверских увеличилась незначительно по сравнению с дикими черными (на 3,8 мм) и не изменилась по сравнению с фуро, у самок Тверских хорьков этот признак не изменился по отношению к черному хорьку и уменьшилась по сравнению с фуро на 2,4 мм (P > 0,99). Хорьки золотистые (самки и самцы) уступают по абсолютной длине ладони диким черным хорькам и фуро.

Абсолютная длина ступни у фермерских хорьков изменилась незначительно – у *Тверских*

Таблица 2

			~	т (т					~
	Пол	Хорь черный		Фуро (Терн	OB-	Хорек золо	mu-	Хорек Тверскои	
Показатели		(Терновский, 1977)		ский, 197	/)	стый (20)	10)	(2009)	
Hokasaresin		<i>n</i> = 8		$o n = 11, \varphi n$	i = 6	n = 40		<i>n</i> = 40	
		$M \pm m$	Cv	$M\pm m$	Cv	$M \pm m$	Cv	$M\pm m$	Cv
	8	$410,9 \pm 13,10$	9,0	$436{,}4\pm{6{,}05}$	4,6	$437,5 \pm 2,3$	3,3	$468,9\pm2,2$	2,7
длина тела, мм	Ŷ	$338,8 \pm 6,60$	5,5	$363,8\pm3,94$	2,6	368,1 ± 2,2	3,9	391,0 ± 2,1	3,2
BLICOTA VYA MM	3	$27,0 \pm 1,10$	11,1	$28{,}3\pm0{,}45$	5,3	$12,0 \pm 0,2$	8,3	$14{,}9\pm0{,}35$	10,1
	Ŷ	$22,2 \pm 0,45$	5,9	$23,7\pm0,61$	6,3	$10,3 \pm 0,1$	7,8	$11,9\pm0,20$	10,1
	3	$145,5 \pm 7,10$	13,7	$155,1 \pm 2,31$	5,0	$158,7 \pm 1,5$	5,8	$166,7\pm1,88$	6,5
длина хвоста, мм	Ŷ	$108,4 \pm 18,1$	4,7	$116,7 \pm 2,78$	5,8	$130,3 \pm 1,6$	7,5	$140,2 \pm 1,86$	7,6
Относительная	3	$35,5 \pm 1,50$	11,8	$35{,}6\pm0{,}65$	6,2	36,6±0,5	8,0	33,5 ± 1,45	5,4
(в % к длине тела)	9	$32,0 \pm 0,40$	3,1	$32,0\pm0,60$	4,4	$35,5 \pm 0,4$	7,0	$33,9\pm1,\!48$	6,8
П	3	$45,5 \pm 1,20$	7,2	49,1 ± 0,62	4,3	$43,9 \pm 0,5$	7,7	$49,3\pm0,73$	8,7
длина ладони, мм	Ŷ	$36{,}9\pm0{,}80$	6,0	$40,0\pm0,60$	3,5	$35{,}8\pm0{,}5$	9,2	$37{,}6\pm0{,}62$	9,7
Относительная	3	$11,1 \pm 0,23$	5,4	$11,2 \pm 0,12$	3,6	$10,0 \pm 0,1$	7,7	$10,5 \pm 0,16$	8,8
(в % к длине тела)	Ŷ	$10{,}9\pm0{,}20$	4,6	$11,\!0\pm0,\!10$	1,8	$9,7 \pm 0,1$	8,7	9,6 ± 0,16	9,8
Π	3	$59,2 \pm 1,84$	8,8	$64,0 \pm 0,63$	3,3	$58,0\pm0,8$	8,3	$63,4 \pm 0,62$	5,8
длина ступни, мм	9	$47,4 \pm 0,65$	3,8	$51,\!2\pm0,\!80$	3,7	$48{,}2\pm0{,}7$	9,0	$52,\!2\pm0,\!48$	5,6
Относительная	3	$14,5 \pm 0,40$	6,9	$14,7\pm0,22$	4,8	$13,2 \pm 0,2$	9,2	$13,5 \pm 0,15$	6,4
(в % к длине тела)	Ŷ	$14,0 \pm 0,21$	4,3	$14,1 \pm 0,11$	2,1	$13,1 \pm 0,2$	9,1	$13,\!4\pm0,\!13$	5,5
П	3					81,4 ± 0,6	4,9	$84,8 \pm 0,8$	5,2
длина черепа, мм	9					$69,8\pm0,5$	4,9	$73,3 \pm 0,4$	3,4
Ширина	3					$49,8 \pm 0,5$	6,0	52,6 ± 0,6	6,5
черепа, мм	P					$42,4 \pm 0,4$	6,4	$44,6 \pm 0,3$	4,3

Изменчивость морфометрических показателей диких и фермерских хорьков

хорьков увеличилась, у золотистого уменьшилась по сравнению с дикими формами. В передвижении по мягкому снегу у диких особей имеет значение относительная длина ладони и ступни (% от общей длины тела). Следует заметить, что по этим параметрам разница между самцами и самками незначительна и не превышает 1–4 %. В ходе промышленной доместикации хорьков относительная длина ладони и ступни у них достоверно уменьшилась по сравнению с таковой у диких особей (P > 0,99). Одновременно у хорьков промышленных популяций выше и коэффициенты изменчивости относительной длины ладони и ступни.

С увеличением живой массы промышленных хорьков увеличились краниологические

параметры, в частности длина и ширина черепа. Коэффициент изменчивости (Cv) ширины черепа у *Тверских хорьков* составляет у самцов 6,5, у самок – 4,3%, длины черепа соответственно 5,2 и 3,4%.

Изменение интерьерных признаков хорьков в ходе промышленной доместикации

Укрупнение массы и длины тела хорьков привело к увеличению абсолютной величины внутренних органов.

Абсолютная масса печени увеличилась у хорьков в процессе доместикации непропорционально увеличению массы тела. Особенно это заметно у самок в сравнении с самками диких *черных хорьков*. Средняя масса тела самок *Тверских хорьков* увеличилась в 1,8 раза по отношению к дикому хорьку, а печень – в 2,2 раза. У *хорьков фуро* таких различий не обнаружено. По-видимому, происхождение *фуро* как одомашненной формы служит ключом к пониманию общего направления приспособления вида к изменившимся условиям существования.

Относительная масса печени у диких хорьков составляет 4,1–5,1% от массы тела, у хорьков клеточного разведения – 4,6–5,1% (табл. 3).

Одомашнивание диких животных приводит к сокращению нагрузки на органы, связанные с двигательной активностью. При увеличении средней массы тела самцов *Тверских хорьков* в 1,6 раза по сравнению с исходными формами абсолютная масса сердца увеличилась в 1,9 раза (у *золотистых* 1,3 против 1,6). Индекс легких значительно уменьшился у хорьков клеточных пород, однако относительная масса сердца увеличилась у хорьков клеточного содержания, причем в большей степени у самок – 6,4 против 5,7 у *черных* и 5,1 у *фуро*, чем у самцов

Таблица 3

Фуро (Тернов-Хорек золоти-Хорек Тверской Хорь черный (Терновский, 1977) ский, 1977) стый (2010) (2009)n = 11, n = 6*n* = 40 *n* = 8 *n* = 40 Показатели Пол Cv, Cv, Cv, Cv, $M \pm m$ $M \pm m$ $M \pm m$ $M \pm m$ % % % % 3 $1376,8 \pm 216,2$ 44,4 | 1339,4 ± 82,2 $1779,6 \pm 30,2$ 10,7 $2200,0 \pm 36,6$ 20,3 9,8 Масса тела ç $785,5 \pm 61,4$ 19,1 $646,8 \pm 86,1$ 37,7 $942,2 \pm 21,5$ 14,4 $1161,4 \pm 26,1$ 13,3 3 10,4 $54,2 \pm 6,2$ 32,5 $67,8 \pm 3,9$ $86,5 \pm 1,7$ 12,2 $101,4 \pm 1,8$ 18,1 Масса печени, г ç $25,9 \pm 2,8$ 30,1 $34,8 \pm 1,8$ 12,9 $47,4 \pm 0,9$ 15,6 12,1 $56,1 \pm 1,5$ Относительная 3 42.1 ± 0.3 2.4 $51,7 \pm 0,3$ 1,9 $48,7 \pm 0,7$ 9.1 $46,2 \pm 0,8$ 10.1 масса печени ç $41,1 \pm 0,2$ 1,4 $45,7 \pm 0,4$ 2,4 $50,7 \pm 0,9$ 11,2 $48,7 \pm 1,4$ 16,5 (в ‰ к массе тела) 3 $6,8 \pm 0,8$ 35,3 $6,4 \pm 0,3$ 14,1 $10,7 \pm 0,2$ 13,7 $12,3 \pm 0,3$ 15.9 Масса сердца, г Q $3,8 \pm 0,3$ 21.0 $3,9 \pm 0,2$ 10.5 5.9 ± 0.1 19.3 $7,4 \pm 0,2$ 20,0 Относительная 3 14,5 16,2 1,9 $4,9 \pm 0,01$ $6,1 \pm 0,2$ $5,6 \pm 0,2$ $5,3 \pm 0,1$ 2,0 масса сердца ç $5,7 \pm 0,1$ 2,0 $6,4 \pm 0,2$ 18,4 $6,4 \pm 0,2$ 23,1 1.8 5,1 ±0,03 (в ‰ к массе тела) 3 14,6 38,2 $23,7 \pm 1,6$ 21,9 $16,3 \pm 0,4$ 14,5 $20,5 \pm 0,5$ $15,2 \pm 2,2$ Масса легких, г ç $7,3 \pm 0,5$ 19.2 $8,7 \pm 1,0$ 37,6 $8,9 \pm 0,3$ 22,7 $11,1 \pm 0,3$ 13,9 Относительная 3 13,1 $12,8 \pm 0,2$ 3,1 $18,5 \pm 0,2$ 2,7 $9,2 \pm 0,2$ 19,4 $9,4 \pm 0,2$ масса легких q $12,9 \pm 0,2$ $11,8 \pm 0,2$ $9,8 \pm 0,3$ 17,3 16,2 4,6 4,2 $9,7 \pm 0,3$ (в ‰ к массе тела) 3 28.7 $5,3 \pm 1,0$ 54,7 $8,4\pm 0,6$ 22,6 $9,3 \pm 0,4$ 29.9 9.4 ± 0.5 Macca селезенки. г ç $2,9\pm0,4$ 32,6 47,1 34,5 $4,3 \pm 0,6$ $3,4 \pm 0,1$ 27,0 $4,3 \pm 0,3$ Относительная 3 5,0 27,6 $4,0 \pm 0,1$ $6,3 \pm 0,1$ 1,6 $5,2 \pm 0,2$ 26,8 $4,2 \pm 0,2$ масса селезенки ç 62,7 $4,4 \pm 0,1$ 4,5 $5,6 \pm 0,1$ $3,6 \pm 0,2$ 30,6 $3,8 \pm 0,4$ 3,6 (в ‰ к массе тела) 3 22,2 $4,2 \pm 0,1$ 9,5 $4,4 \pm 0,1$ 20,4 11,1 $3,6 \pm 0,3$ $5,4 \pm 0,1$ Macca почки левой, г ç $1,9 \pm 0,2$ 21,0 $2,4 \pm 0,1$ 8,3 $2,1 \pm 0,1$ 18,1 $2,7 \pm 0,1$ 21,5 Относительная 3 $3,1 \pm 0,03$ 3,2 $3,2 \pm 0,02$ 3,1 21,6 11,8 $2,5 \pm 0,1$ $2,5 \pm 0,1$ масса почки левой ç 20,9 3.2 ± 0.03 3.1 $3,2 \pm 0,02$ 3.1 2.2 ± 0.1 2.3 ± 0.1 26,5 (в ‰ к массе тела)

Абсолютная и относительная величина внутренних органов диких и фермерских хорьков

5,6 *Тверских*, 6,1 *золотистых* против 5,3 *черных* и 4,9 *фуро*.

Почки являются важнейшими органами выделения. Образуя и выделяя мочу, они удаляют из организма воду и растворенные в ней продукты обмена веществ. Средний уровень интенсивности метаболизма в условиях неволи ниже, чем в природе, и количество подлежащих удалению продуктов обмена меньше. Почки парный орган, индекс проводится по левой почке, так как индивидуальная вариация их незначительна. Относительная масса левой почки за годы одомашнивания хорьков уменьшилась с 3,2 до 2,5 ‰ у самцов и с 3,2 до 2,2 ‰ у самок. Изменчивость относительной массы левой почки у хорьков клеточного разведения значительно преобладает над таковой у хорьков исходных форм.

Заключение

У хорьков промышленного разведения произошли изменения, существенно отличающие их от диких предков, но не столь значительные, как у других (основных) объектов клеточного звероводства. Предварительное изучение доместикационных преобразований экстерьерных и интерьерных признаков у хорьков промышленного разведения выявило изменения в морфологическом и функциональном состоянии внутренних органов и отдельных частей тела. Искусственный отбор имел в этом только косвенное значение, поскольку селекция велась по другим признакам. Однако увеличение живой массы тела требовало от соответствующих систем пропорционального усиления снабжения питательными веществами и энергией. Наблюдаемые у современных клеточных хорьков отклонения в абсолютной и относительной величине органов имеют явное адаптивное происхождение. Отбор по размеру тела ведется одновременно с отбором по улучшению окраски и качества опушения, поэтому укрупнение хорьков пока не достигло таких эффективных результатов, как в норководстве, где целенаправленная селекция по укрупнению ведется более 40 лет.

Литература

- Герасимова Л.В. Биологические и хозяйственно полезные признаки хорьков в условиях клеточного разнообразия. Дрофа «Гилем», 2008. 386 с.
- Колдаева Е.М., Колдаев Н.А. Доместикация и хозяйственно полезные признаки у пушных зверей // Информ. вестник ВОГиС. 2007. Т. 11. № 1. С. 62–75.
- Кузнецов Г.А., Казакова Г.П., Федосеева Г.А. О генетике окраски хорьков // Кролиководство и звероводство. 1985. № 3. С. 6–7.
- Кузнецов Г.А., Цепков Н.М., Евреинов А.Г. Практические рекомендации по селекции норок на укрупнение. М.: Россельхозиздат, 1975. 46 с.
- Новиков Г.А. Жизнь животных. М., 1971. Т. 6. С. 332–349.
- Прелль Г. О происхождении африканского хорька. М., 1934. С. 5–11.
- Пыльник Т.О. О любительском разведении хорьков // Кролиководство и звероводство. 2010. № 6. С. 14–16.
- Терновский Д.В. Биология куницеобразных. Новосибирск: Наука, 1977. 280 с.

REORGANIZATION OF EXTERNAL AND INTERNAL FEATURES IN FERRETS (MUSTELA PUTORIUS LINNAEUS, 1758) UNDER FARMING DOMESTICATION

O.I. Fedorova, E.A. Tyurina

Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia, e-mail: ox fed@mail.ru

Summary

Ferrets (Mustela putorius) are a special object in the domestication for fur farming. Their domestication started long before their husbandry, more than 40 years ago. The selection for body size, coat color and fur quality entailed changes in external and internal traits of these animals. A new selection invention, Tverskoi ferret breed, was registered in June, 2011.

Key words: ferrets, Mustela putorius, domestication, body size, variability, external and internal traits.

ПЕРВЫЕ ЭТАПЫ ПРОМЫШЛЕННОЙ ДОМЕСТИКАЦИИ СТЕПНОГО СУРКА (*MARMOTA BOBAK* MULLER, 1776)

О.И. Федорова

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, Москва, Россия, e-mail: ox_fed@mail.ru

Введение в зоокультуру нового объекта клеточного разведения сурка степного продолжает доместикационный процесс в пушном звероводстве. Разработаны и утверждены «Правила бонитировки степных сурков клеточного разведения (*Marmota bobak*) (1998 г.), «Рекомендации по селекции сурков на укрупнение» (2005 г.) и «Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность сурка степного (*Marmota bobak* M)» (2010 г.).

Ключевые слова: степной сурок, доместикация.

Введение

Прародина сурков – Северная Америка. Наиболее древние формы рода *Marmota* известны из среднего миоцена северной Небраски (*Marmota vetus*) и позднего миоцена Невады (*Marmota minor*) (Ербаева, 2010). По суше, некогда соединявшей Азию и Америку, многие животные (как и люди) перебрались в Новый Свет, сурки же (вместе с лошадьми и верблюдами) двигались во встречном направлении.

Выделяются сурки равнинные (байбаки) и горные, живущие в особо трудных условиях, на границе альпийских лугов, куда летнее тепло приходит поздно, а зима наступает рано. Обособившись в разных географических зонах и сохранив внешнее сходство (а также необходимость зимою спать), они имеют по-прежнему немало общего – травоядны, живут в норах, «тепло одеты», всегда обитают колониями.

Род сурков (*Marmota*) состоит из широко распространенных и наиболее крупных грызунов семейства беличьих (*Sciuridae*), которые образуют весьма компактную группу экологически близких видов и подвидов. Большинство териологов (Громов, 1963; Капитонов, 1969; Шубин, 1969; Машкин, 1997; Соколов, 1997) считают, что на земном шаре обитает 14 видов сурков, в России описано 5 видов.

В Евразии большинство исследователей выделяют 8 видов сурков. Европейский сурок (Marmota marmota L.) распространен в Западной и Центральной Европе. Ареалы степного сурка (M. bobak Müll.), серого сурка (M. baibacina Kastsch.), монгольского сурка (M. sibirica Radde) и недавно выделенного в отдельный вид лесостепного сурка (M. kastschenko Brandler), объединяемых в группу «bobak», соприкасаясь, протянулись от Украины до Западного Китая по степной, лесостепной зонам и горам Средней Азии. Черношапочный сурок (M. camtschatica Pall.) распространен от северо-западного побережья Байкала до Камчатки. Ареалы длиннохвостого сурка (М. саиdata Geoffr.) и сурка Мензбира (М. menzbieri Kashc.) ограничены высокогорьями Памира и Тянь-Шаня; гималайский сурок (M. himalayana Hodgs.) обитает в Гималаях, Куньлуне и Нань-Шане, и, по-видимому, в Тибете. Выделяют три подвида степного сурка: западный, или европейский (M. b. bobak Müll., 1776), восточный, или казахстанский (M. b. schaganensis Baschanov, 1930), и приволжский подвид (M. b. kozlovi Fok., 1966) (Машкин, 1997, 2010).

Сурки – типичные норники и не способны существовать без убежищ. До 85 % времени зверьки проводят в норе. Продолжительная зимняя спячка (от 6 до 9 месяцев в году) – основная биологическая особенность сурков. Температура тела зверьков снижается до температуры окружающего воздуха в норе и составляет +3...+10 °С (в норме температура тела сурков +36 °C). У них замедляются дыхание (один вдох в 2-3 минуты) и сердцебиение (3-6 ударов в минуту). Кровь приобретает свойство не свертываться (сезонная гемофилия). Организм зверьков становится невосприимчив к заражению болезнетворными микроорганизмами. Спят сурки до весны, периодически просыпаясь, чтобы опорожнить мочевой пузырь от продуктов метаболизма. Температура тела при этом повышается до 24 °C. Пробуждение от глубокой спячки обусловлено эндогенными факторами и уровнем расходования жировых запасов в течение зимовки (Машкин, 1997).

Половое созревание и вступление в размножение сурков обычно происходит в возрасте 2–4 года. Среди отечественных видов сурков байбак европейский самый скороспелый. У него более половины двухгодовалых самок вступает в размножение. Спаривание, щенение и часть лактации проходят в норе до выхода после спячки на поверхность. Беременность продолжается 32–35 дней (Рымалов, 1995; Шевлюк, 1996). Сурчата рождаются голыми и слепыми. Лактация длится 35–50 дней. Реальная величина выводка составляет 1–15 особей.

Самый крупный представитель рода сурков – байбак европейский (максимальный вес среди отловленных составил 10,3 кг) (рис.). Имеет массивное, приземистое, обтекаемое и очень гибкое туловище. На относительно коротких и сильных четырехпалых (пятый палец редуцирован) передних лапах крупные когти, приспособленные к рытью земли (на задних лапах по пять пальцев). Подошвы лап голые, с хорошо развитым слоем ороговевшего эпидермиса. У самок пять пар молочных желез. Умеренной длины хорошо опушенный хвост.

В последние десятилетия проявился заметный интерес к разведению различных подвидов сурков в условиях неволи. С начала 1980-х гг. успешно ведутся работы по разведению степного сурка на Северо-Донецкой станции Харьковского университета. В 1988 г. впервые был получен приплод у *красного* и *степного* (казахстанский подвид) сурков на ферме Казахстанского отделения ВНИИОЗ. Здесь же содержались несколько пар *серого сурка* (Токарский, Валенцев, 1994).

Наиболее перспективный подвид для разведения в условиях неволи – *байбак европейский*.



Рис. Сурок в условиях промышленной доместикации.

Материалы и методы

Работа проводилась с 1995 по 2010 гг. на поголовье экспериментального стада сурков клеточного разведения в специализированном звероводческом хозяйстве «Пушкинский» Московской области. Поскольку в природе сурки моногамны, этот принцип сохраняется и при клеточном разведении – взрослых сурков (старше 2 лет) содержали в клетках разнополыми парами. Растущий молодняк содержали по 2–3 головы в клетке. В сентябре сурки укладываются в спячку.

Изменчивость размера и телосложения, качества и окраски опушения изучали у сурков-однолеток в период полного созревания волосяного покрова (сентябрь). Каждый признак – согласно ОСТ 10 10-86 (Казакова и др., 1998).

Признаки качества опушения: густота волос на спине, уравненность волосяного покрова по высоте оценивали визуально в диапазоне: 5 баллов – признак хорошо развит, 1 балл – признак не развит.

Признаки общей окраски сурков: цвет вершин и осветленного кольца кроющих волос, цвет вершин и основания пуховых волос, выраженность вуали оценивали по 5-балльной шкале визуально: окраска вершин ости – от иссиня-черной (5 баллов) до бурой (1 балл); окраска светлой зоны остевых и вершин пуховых волос – от яркожелтой (5 баллов) до светло-пепельной, почти белой (1 балл); окраска основания пуховых волос – от иссиня-черной (5 баллов) до светло-серой (1 балл); выраженность вуали – от ярко выраженной (5 балов) до невыраженной (1 балл).

Разработка инструкции по бонитировке и определение желательного типа сурков клеточного разведения

Бонитировка (от лат. *bonitas* – доброкачественность) – комплексная оценка зверей по происхождению, экстерьеру, продуктивности, воспроизводительной способности и качеству потомства. Бонитировка проводится для отбора лучших и выбраковки животных с низкими хозяйственными качествами. На основании бонитировки животных разделяют на производственные группы: племенное ядро, пользовательная группа, ремонтный и племенной молодняк. Бонитировку сурков проводят один раз в первый год их жизни в период зрелости волосяного покрова (август–сентябрь), перед спячкой.

По тону окраски сурков разделяли по аналогии с другими видами на три типа – темный, средний и светлый. Тон окраски у сурков зависит от цвета пигментированных верхушек кроющих волос и интенсивности окраски осветленного кольца остевых и вершин пуховых волос. Чем сильнее выражена пигментация вершин и осветленной зоны остевых волос, а также вершин пуха, тем темнее общий тон окраски. В популяции сеголеток сурков зверосовхоза «Пушкинский» большая часть животных среднего тона окраски (62,7%). Зверей с темным и светлым тоном одинаковое количество: 18,3% светлых и 19,0% темных (табл. 1).

Размер и телосложение сурков оценивали по 10-балльной шкале. Звери желательного типа должны иметь крепкое телосложение: вес тела самцов не менее 4 кг при длине тела 45 см; по самкам – не менее 3,4 кг при длине тела 42 см (табл. 2). Половой диморфизм хорошо выражен: самки уступают самцам как по живой массе (P < 0,99), так и по длине тела (P < 0,999).

Качество опушения сурков складывается из показателей густоты ости и пуха на спине и боках, упругости, длины и шелковистости волосяного покрова, соотношения этих признаков на разных участках тела, наличия или отсутствия дефектов опушения (табл. 3).

Густоту ости и пуха оценивали по 5-балльной шкале от очень густой (5 баллов) до очень редкой (1 балл). Средний балл за густоту ости и пуха на спине и боках как у самок, так и самцов составил $4,1 \pm 0,07$. В среднем за 1995–1997 гг. 33,9% животных имели очень густое (5 баллов) и 46,3% густое опушение (4 балла).

По годам удельный вес самок с оценкой 5 баллов колебался от 62,9 до 70,0 % и составил в среднем за три года 66,2 %. Количество самцов с 5 баллами за этот показатель колебалось от 59,0 до 67,3 % (в среднем за три года 63,0 %). Средний балл по стаду за уравненность волосяного покрова по высоте составил $4,5 \pm 0,04$ балла.

У животных желательного типа волосяной покров на спине и боках должен быть шелковистый, очень густой, уравненный по высоте и без дефектов. Ость полностью должна прикрывать пух на спине и боках. Количество волос на 1 см²

Таблица 1

Распределение сурков по интенсивности (тону) общей окраски (1995–1997 гг.)

D		Тон окраски								
Возраст,	Пол	светлый		сред	ний	темный				
MCC.		количество	%	количество	%	количество	%			
6	Ŷ	12	20,7	31	53,4	15	25,9			
0	3	11	16,7	46	69,7	9	13,6			
Всего		23	18,3	77	62,7	24	19,0			

Таблица 2

Показатели	Пол	п	M±m	lim	δ	Cv
Малаа тата	Ŷ	39	$4201,3 \pm 107,8$	2500-5650	673,2	16,0
Масса тела	3	55	$4615,5 \pm 93,8$	3350-6650	695,8	15,1
П	Ŷ	39	$45,0 \pm 0,3$	41–50	1,8	4,0
длина тела	6	55	$46,9\pm0,3$	42–54	2,1	4,5

Изменчивость массы и длины тела сурков-сеголеток в период осенней бонитировки в сентябре (возраст 5 мес.)

Таблица З

Шкала оценки густоты волосяного покрова у сурков

Балл	Количество волос, тыс. шт./1 см ²	Площадь дна розетки, мм ²
5	2,5 и более	0,5
4	2,0-2,49	1,0
3	1,5–1,99	1,5
2	1,0–1,49	2,0
1	Менее 1,0	Более 2,0

должно быть не менее 2,5 тыс. штук. Площадь дна розетки при раздувании волос должна быть не более 0,5 мм².

Наличие незначительных дефектов опушения (недоразвитость ости, плешины, закрученность, редковолосость) снизило общую оценку за качество волосяного покрова. К примеру, в 1996 г. дефекты опушения отмечались у 9,8% самок и 2,3% самцов. В целом за три учетных года по всему исследованному массиву животных дефектность опушения составила 4,0 \pm 0,05.

За три года селекции в стаде сурков 47,7% имели чисто черный цвет пигментированных кончиков кроющих волос, что соответствова-

ло желательному признаку в 5 баллов. 32,1% сурков имели черный цвет (4 балла) и только у 4,5% – вершины волос коричневые и бурые.

В распределении молодняка сурков по окраске светлой зоны остевых волос (4 и 3 балла) самый большой удельный вес (31,3 и 29,9%) приходится на животных с желтой и светложелтой окраской. 5 баллов (за ярко-желтую окраску светлой зоны остевых волос) получили 8,6 % молодняка в стаде.

В окраске вершин пуховых волос за три года селекции только 3 % животных имели желательную ярко-желтую окраску верхней части подпуши. У основной массы зверей верхушки пуховых волос были светло-желтые и желтые (2–4 балла). В целом изучение изменчивости сурков по окраске основания подпуши показало, что этот признак не подвержен большому разнообразию и мало влияет на общее впечатление об окраске. Большинство молодняка имело иссиня-черную (43,7%) и черную (44%) окраску основания подпуши.

Изучение изменчивости окраски волосяного покрова молодняка сурков 1995–1997 гг. рождения позволило оценить все разнообразие этого признака и наметить направление селекции в сторону желательного типа. Сурки желательного типа должны иметь иссиня-черного цвета вершины остевого волоса, образующие хорошо развитую вуаль в виде темного ремня на спине. Окраска осветленного кольца остевых волос должна соответствовать окраске вершин пуховых волос. Основание пуха темно-серое.

Для того чтобы можно было отделить зверей золотистого типа от перламутрового и использовать эти данные для подбора пар родителей, была введена оценка окраски осветленной зоны остевых волос и вершин подпуши в качестве дополнительного признака. Градации шкалы построены таким образом, чтобы по оценке дополнительных признаков можно было выделить наиболее желательный тон окраски как в золотистом, так и в перламутровом типах. Так, 5 баллов за дополнительный признак должны получать звери, имеющие ярко-оранжевую окраску светлой зоны остевых и вершин пуховых волос.

Такой подход к оценке общей окраски сурков позволит выделять в стаде наиболее ценных животных, определить их класс и провести отбор на племенные цели. Оценка дополнительных признаков позволит определить желательный тип среди золотистых и перламутровых особей и использовать эту оценку для подбора родительских пар.

Закономерности роста и развития сурков в постнатальном онтогенезе

В 2001–2002 гг. изучали рост сурков в постнатальный период. Для этого в 2001 г. всех полученных сурчат (32 головы) взвешивали со дня рождения до отсадки, а также измеряли длину тела с периодичностью, указанной в табл. 4.

Измерения новорожденных сурчат показали, что при рождении длина тела их составляет в среднем 9–10 см, а живая масса 29–30 г. К месячному возрасту живая масса сурчат увеличивается более чем в 10 раз и составляет у самок в среднем 383,6 г, а у самцов – 432 г. Длина тела увеличивается к этому возрасту в 2,5 раза. У самок она составляет в среднем 22,9 см, у самцов – 24,7 см. У самок за 100 дней после отсадки от матерей (в 1,5-месячном возрасте) живая масса увеличилась в 5,2 раза, у самцов – в 5,8 раза и составила к 145-дневному возрасту 4580 г у самок и 4642 г у самцов.

После зимней спячки зверей взвешивали и измеряли у них длину тела и обхвата груди за лопатками. Результаты исследований указаны в табл. 5. Первая строка таблицы показывает данные измерений перед спячкой, остальные – после нее.

Таблица 4

Roopoor JUL	Сам	ки	Самцы			
Бозраст, дни	живая масса, г	длина тела, см	живая масса, г	длина тела, см		
1	$30{,}8\pm0{,}8$	$9,3 \pm 0,3$	$29,1 \pm 1,0$	$9,7 \pm 0,2$		
10	$65,0 \pm 2,0$	$13,1 \pm 0,9$	$65,\!4 \pm 5,\!4$	$12{,}6\pm0{,}7$		
20	$261,4 \pm 15,3$	$20,1 \pm 0,2$	$248,7\pm17,0$	$19,0\pm0,5$		
30	$383,6 \pm 30,4$	$22{,}9\pm0{,}8$	$432,0\pm28,0$	$24{,}7\pm0{,}8$		
40	$644,0 \pm 33,5$	$29{,}0\pm0{,}8$	$670,0\pm32,8$	$28{,}2\pm0{,}6$		
45	$883,3\pm55,5$	$29,2 \pm 1,0$	$782,5\pm57,2$	$29,5 \pm 0,6$		
50	$1208,0 \pm 110,8$	$32,\!2 \pm 0,\!7$	$1256,4 \pm 39,6$	$33,2 \pm 0,4$		
60	$1772,0 \pm 214,8$	$36,7 \pm 1,5$	$1442,0 \pm 211,1$	$35,2 \pm 2,0$		
70	$2627,1 \pm 180,6$	$40{,}8\pm0{,}6$	$2187,2 \pm 105$	$38{,}4\pm0{,}5$		
80	$3363,3 \pm 212,7$	$43,2 \pm 0,6$	$2810,1 \pm 128$	$41,5 \pm 0,6$		
100	$3932,1\pm 226,0$	$44,3\pm0,5$	$3695,0 \pm 202$	$44{,}4\pm0{,}7$		
110	$4363,2 \pm 250,1$	$46{,}8\pm0{,}4$	$4148,0 \pm 163$	$46,1\pm0,7$		
130	$4523,0 \pm 270,1$	$46{,}8\pm0{,}8$	$4616, 1 \pm 276$	$46{,}9\pm0{,}7$		
145	$4580,0 \pm 230,2$	$47,3 \pm 0,8$	$4642,0\pm290$	$47{,}8\pm0{,}5$		

Динамика роста сурков-сеголеток от рождения до первой спячки (M ± m)

		Самки		Самцы			
Период,		Дли	на, см	Масса тела	Длина, см		
даты	Масса тела, г	тепа	обхвата	масса тела, г	тепа	обхвата	
		ТСЛА	за лопатками	1	ТСла	за лопатками	
08.08.01	4580 ± 230	$47{,}3\pm0{,}8$	$41,3 \pm 2,0$	4642 ± 290	$47,8\pm0,5$	$41,4 \pm 1,1$	
31.03.02	3465 ± 105	$48,3\pm0,5$	$35,3 \pm 0,6$	3610 ± 97	$49,3\pm0,5$	$36,1 \pm 0,6$	
21.04.02	4100 ± 77	$49{,}7\pm0{,}5$	$37,4 \pm 0,5$	4290 ± 94	$51,\!6 \pm 0,\!4$	$36,9 \pm 0,3$	
07.05.02	4770 ± 140	$50{,}8\pm0{,}5$	$38,8 \pm 0,7$	4962 ± 130	$52,\!4 \pm 0,\!4$	$38,7 \pm 0,7$	
03.06.02	5105 ± 155	$52{,}3\pm0{,}6$	$41,9 \pm 0,6$	5218 ± 156	$53{,}9\pm0{,}5$	$41,0 \pm 0,6$	
09.07.02	5910 ± 121	$52{,}6\pm0{,}5$	$46,4 \pm 0,7$	6284 ± 163	$54,6\pm0,4$	$46,5\pm0,9$	
23.08.02	6200 ± 132	$53{,}4\pm0{,}7$	$46,9 \pm 0,8$	6450 ± 148	$55,2\pm0,5$	$47,5 \pm 0,8$	

Динамика роста сурков-двухлеток от первой до второй спячки (M ± m)

За время спячки длина тела у самцов увеличилась в среднем на 1,5 см, у самок на 1 см, а живая масса уменьшилась в среднем на 1032 и 1115 г соответственно (P > 0,999). Средняя величина обхвата туловища за лопатками уменьшилась на 5,3 см у самцов и на 6 см у самок.

Ко второй зимней спячке живая масса у самок сурков составила в среднем 6200 г, у самцов – 6450 г; длина тела – 53,4 и 55,2 см соответственно. На втором году жизни от конца первой спячки (февраль) до начала второй (август) не наблюдалось полового диморфизма по длине обхвата груди за лопатками и живой массе сурков. Ко второй спячке длина тела самцов оказалась на 1,8 см больше, чем у самок (P > 0,95).

Таким образом, в 2001–2002 гг. выявлены основные закономерности линейного роста сурков от рождения до 18-месячного возраста. Более интенсивный рост отмечен в первый год жизни, особенно до 45-дневного возраста.

Сурки клеточного разведения зверосовхоза «Пушкинской» превосходят диких сурков по размеру только в однолетнем возрасте. Взрослые и двухлетние сурки не отличаются от диких как по живой массе, так и по длине тела (табл. 6). Исследования изменчивости размера тела у сурков позволили создать технологию селекции животных крупного размера (Федорова, 2005).

При изучении наследования размера тела сурков при разном подборе пар родителей было выяснено, что крупные родители дают 50 % крупных (48 см и более) дочерей и 40 % крупных (47 см и более) сыновей.

Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность сурка степного (Marmota bobak)

В 2010 г. была утверждена «Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность *сурка степного (Marmota bobak)*» (Колдаева и др., 2010). Этот документ необходим для утверждения и внесения в «Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию» пород и породных типов сурков клеточного разведения.

Методика состоит из разделов:

1. Общие рекомендации. В них указано, какими документами следует руководствоваться одновременно с методикой.

2. Проведение испытаний. Испытания проводит заявитель на поголовье не менее чем у 30 самцов и 30 самок молодняка в возрасте 5 месяцев, полученного за один цикл воспроизводства, отобранного методом случайной выборки.

3. Признаки и обозначения. Разъясняется, какие признаки должны быть включены в описание селекционного достижения и признаки, сопровождающиеся дополнительными объяснениями. Здесь же указано, что порода признается однородной и стабильной в том случае, если количество нетипичных животных по качественным признакам составляет не более 5% от исследуемого поголовья, а по количественным признакам коэффициенты вариации оцениваемой породы не превышают коэффициент ва-

Показатели	Возраст	Пол	Дикие сурки Воронежская обл. (Машкин, 1997)		Зверосовхоз «Пушкинский»					
			n	$M \pm m$	п	$M \pm m$	lim	δ	Cv	
	Сарадатич	Ŷ	66	2729 ± 636	39	$4201,3 \pm 107,8$	2500-5650	673,2	16,0	
	Сеголетки	3	63	2954 ± 966	55	$4615,5 \pm 93,8$	3350-6650	695,8	15,1	
	Второгодки	Ŷ	23	5451 ± 714	9	5917,8 ± 139,5	5240-6390	418,4	7,1	
Масса тела		3	24	5880 ± 1063	12	$5698,3 \pm 139,5$	4940–6340	421,0	7,4	
	Взрослые	Ŷ	48	6025 ± 1064	45	$6797,3 \pm 131,7$	5190-9000	883,3	13,0	
		8	66	6791 ± 1232	31	6618,1 ± 112,6	5090–7640	626,9	9,5	
	Сарадатич	Ŷ	66	$43,6 \pm 3,2$	39	$45,0 \pm 0,3$	41–50	1,8	4,0	
	Сеголетки	8	63	$44,4 \pm 6,3$	55	$46{,}9\pm0{,}3$	42–54	2,1	4,5	
Πητικό ποπο	Dramanaruu	Ŷ	23	$54,0 \pm 2,1$	9	$52,8\pm0,5$	51–56	1,6	3,0	
длина тела	Бторогодки	3	24	$55,6 \pm 2,7$	12	$53,7\pm0,5$	51–57	1,7	3,2	
	Взрослые	Ŷ	48	$64,8 \pm 2,4$	45	53,1 ± 0,2	50–58	1,6	3,0	
		8	66	$68,8 \pm 3,4$	31	$54,2 \pm 0,4$	50–60	2,2	4,1	

Масса и размер тела диких сурков и сурков клеточного разведения

риации у сравниваемой общеизвестной породы более чем в 1,5 раза.

4. Таблица признаков. В ней записано 16 признаков, выражающих породные отличия, в том числе и хозяйственно полезные: признаки окраски волосяного покрова, качества опушения и размера, а также индексы степени выраженности и порядок учета этих признаков.

5. Объяснения и методы. В разделе описаны методики оценки признаков, отмеченных в таблице знаком «+», такие, как: определение густоты и высоты волосяного покрова, уравненность длины остевых волос, измерение длины зверя и определение живой массы.

К «Методике проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность *сурка степного* (*Marmota bobak*)» прилагается анкета породы и 6 таблиц формы РТА, которые должен заполнить заявитель на селекционное достижение, допущенное к использованию.

Литература

- Громов И.Н. Млекопитающие фауны СССР. Ч. 1. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1963. 639 с.
- Ербаева М.А. Сурки Голарктики, прошлое и настоящее: видовой состав и распространение // Прошлое, настоящее и будущее сурков Евразии и экологические аспекты расселения сурков в

Байкальском регионе: Тез. докл. X Междунар. совещания по суркам стран СНГ. Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2010. С. 17–18.

- Капитонов В.И. Серый, или алтайский, сурок (*Marmota baibacina* Kastsch.) // Млекопитающие Казахстана. Грызуны (сурки и суслики). Алма-Ата: Наука, 1969. Т. 1. Ч. 1. С. 267–336.
- Колдаева Е.М., Балакирев Н.А., Федорова О.И. Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность сурка степного (*Marmota bobak*). RTA/0029/1. Официальный бюллетень. 17-й год выпуска. № 5 (165). ФГУ «Гос. комиссия РФ по испытанию и охране селекционных достижений». 2010. С. 455–460.
- Машкин В.И. Европейский байбак: экология, сохранение и использование // Пособие для специалистов по природопользованию. Киров, 1997. 156 с.
- Машкин В.И. Прошлое, настоящее и будущее сурков России // Прошлое, настоящее и будущее сурков Евразии и экологические аспекты расселения сурков в Байкальском регионе: Тез. докл. Х Междунар. совещания по суркам стран СНГ. Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2010. С. 28–30.
- Казакова Т.И., Федосеева Г.А., Федорова О.И. Правила бонитировки (оценки) степных сурков клеточного разведения (*Marmota bobak*): СНП плем. Р – 37-98 НИИПЗК. М., 1998. 15 с.
- Рымалов И.В. Эколого-физиологические основы зоокультуры степных сурков: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1995. 23 с.
- Соколов В.Е. Систематика млекопитающих (зайцеобразные и грызуны). М.: Высш. шк., 1977. 494 с.

Таблица 6

- Токарский В.А., Валенцев В.А. Размещение, биология и разведение в неволе черношапочного сурка *Marmota camtschatica* (Rodentia, Sciuridae) // Зоол. журнал. 1994. Т. 73. Вып. 7/8. С. 209–222.
- Федорова О.И. Рекомендации по селекции сурков на укрупнение. Родники Моск. обл.: ГНУ НИИПЗК им. В.А. Афанасьева, 2005. 8 с.

Шевлюк Н.Н. Морфофункциональная характери-

стика эндокринных и герминативных структур семенников байбака перед залеганием в спячку // Сурки Северной Евразии: сохранение биологического разнообразия: Тез. докл. М.: Изд-во ABF, 1996. С. 89–90.

Шубин И.Г. Степной сурок, или байбак // Млекопитающие Казахстана. Грызуны (сурки и суслики). Т. 1. Ч. 1. Алма-Ата: Наука, 1969. С. 233–267.

INITIAL STEPS OF FARM DOMESTICATION OF THE STEPPE MARMOT (MARMOTA BOBAK MULLER, 1776)

O.I. Fedorova

Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia, e-mail: ox fed@mail.ru

Summary

The husbandry of the steppe marmot is a continuation of the domestication process in fur farming. Guidelines for valuation of cage-kept steppe marmots (1998), Guidelines for marmot breeding for large size (2005), and Methods of tests for distinguishability, uniformity, and stability of steppe marmots (*Marmota bobak* M) (2010), have been developed and approved.

Key words: steppe marmot, Marmota bobak, domestication.

О РАЗВЕДЕНИИ, МЕЖВИДОВОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ И СОХРАНЕНИИ ГЕНОФОНДОВ ПУШНЫХ ЗВЕРЕЙ, ИМЕЮЩИХ ОБЛИГАТНУЮ ЭМБРИОНАЛЬНУЮ ДИАПАУЗУ

Г.К. Исакова

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

Цитогенетические исследования облигатной эмбриональной диапаузы (задержанной имплантации) у норки, соболя и западного пятнистого скунса показали, что во время диапаузы в зародышах идет активный процесс роста и дифференцировки клеток трофобласта. Это означает, что стадия задержанной имплантации важна для успешного течения беременности в ее природном проявлении. Этот факт следует учитывать при разработке программ по разведению, межвидовой гибридизации и сохранению генофондов животных, имеющих облигатную диапаузу.

Ключевые слова: куньи, разведение, сохранение генофондов, облигатная эмбриональная диапауза, задержанная имплантация, трофобласт, плацента.

Разведение пушных зверей в условиях ферм в течение нескольких десятков лет дало возможность хорошо изучить физиологию их репродукции. Однако некоторые важные аспекты репродукции, и в том числе облигатная эмбриональная диапауза, присущая некоторым видам куньих, все еще остаются открытыми для исследований (Murphy, 1992).

Облигатная эмбриональная диапауза (обязательная задержка имплантации зародышей в матку на определенный для данного вида срок) является наследуемым свойством вида, и она широко распространена у млекопитающих. Больше всего видов с диапаузой обнаружено в семействе куньих Mustelidae. Свойства диапаузы (продолжительность, гормональный статус и контроль и др.) видоспецифичны и отличаются у видов в пределах семейств, подсемейств и родов (обзоры: Sandell, 1900; Mead, 1989; Renfree, Shaw, 2000).

Некоторые виды куньих, разводимые на фермах (американская норка, соболь, куница, выдра), имеют облигатную диапаузу. Поскольку задержанную имплантацию принято считать стадией эмбрионального покоя, то полагается, что при воздействии на беременных самок специальными внешними факторами (фотопериод, гормоны) можно вызвать досрочную имплантацию и тем самым сократить срок беременности и затраты на содержание животных. Полагается также, что путем межвидовой гибридизации животных, имеющих облигатную диапаузу, можно получить особей с новой интересной окраской меха и улучшенным качеством шкурки. Однако до сих пор не было получено четкого ответа на вопросы: 1) возможно ли сократить период диапаузы с помощью внешних индуцирующих факторов, не причинив при этом ущерб репродуктивной функции животного; 2) возможен ли успех в гибридизации видов животных, если один из них или оба имеют облигатную диапаузу. Очевидно, что для ответа на эти вопросы необходимо иметь более полное представление о природе этого загадочного явления.

Сигналом к окончанию диапаузы и началу имплантации предположительно является сезонное изменение фотопериода, воздействующее на зародыш через нейрогормональную систему матери (Hansson, 1947; Mead, 1989, 1995; Desmarais *et al.*, 2004; Lopes *et al.*, 2004). Однако многочисленные эксперименты по содержанию норок, соболей и куниц при различных фотопериодических режимах показали, что, хотя щенение может произойти несколькими днями раньше, при этом увеличивается эмбриональная и (или) постнатальная смертность потомков (Pearson, Enders, 1944; Hansson, 1947; Старков, 1947; Enders, 1952; Aulerich et al., 1963; Беляев и др., 1961, 1963). В то же время в опытах И.Д. Старкова (1947) и Д.К. Беляева с соавт. (1961) было замечено, что запуск имплантации определяется не только фотопериодом, но и биологическим ритмом материнского организма. Б.Д. Мёрфи полагает, что для возобновления развития диапаузных зародышей необходим специальный сигнал из матки (Murphy, 1992). Более того, исследования периимплантационного периода у косули (Lambert et al., 2001) и норки (Desmarais et al., 2004) показали, что в инициации имплантации участвует геном зародыша. Таким образом, механизм запуска имплантации после диапаузы все еще остается открытым для изучения. Ясно, что для его полного понимания и (если удастся) контроля потребуется еще много усилий и времени.

К настоящему времени накоплено довольно много данных об активности репродуктивной системы матери во время задержки имплантации (Mead, 1989, 1995; Renfree, Shaw, 2000). Что касается развития зародышей, то таких сведений крайне мало. В середине прошлого века были проведены исследования нескольких зародышей норки, соболя, морского котика и алтайского крота. На гистологических срезах или давленых препаратах ранних бластоцист было обнаружено угнетение митоза и синтеза нуклеиновых кислот. На основании этих не вполне убедительных данных было принято рассматривать облигатную диапаузу как стадию эмбрионального покоя.

Для того чтобы уточнить существующее представление о состоянии эмбриогенеза во время диапаузы, мы применили цитогенетический подход. На монослойных суспензионных цитологических препаратах было проведено изучение активности эмбрионального генома в клетках диапаузных бластоцист у трех видов животных из семейства куньих: американской норки (Исакова, Жоголева, 1997; Исакова, Шилова, 2000, 2003; Исакова и др., 2001), соболя (Исакова, 2004) и западного пятнистого скунса (Isakova, Mead, 2004). Как оказалось, у всех трех видов во время диапаузы подавлены митотическая активность и синтез нуклеиновых кислот в клетках собственно зародыша (внутренней клеточной массы (ВКМ)). В то же время в клетках трофобласта идут синтез нуклеиновых кислот, образование эндополиплоидных клеток, прямое (амитотическое) деление некоторых из них и увеличение числа клеток. К началу имплантации число клеток в бластоцисте составляет приблизительно 20 тыс. По мере роста бластоцист увеличивается разнообразие по диаметру ядер клеток трофобласта от 6 до 35 мкм, идет увеличение доли гигантских ядер, а также увеличение доли ядер с резко повышенной активностью синтеза рРНК. Эти данные свидетельствуют об активном росте и дифференцировке клеток трофобласта. У животных без облигатной диапаузы начинающие имплантироваться бластоцисты содержат 50-100 клеток. Из этих данных следует, что у животных с облигатной диапаузой трофобласт, который вносит основной вклад в образование плаценты, развивается по другой генетически заданной временной программе, и именно эта программа обеспечивает успешную имплантацию. Поэтому воздействия на беременных самок специальными факторами с целью вызвать досрочную имплантацию должны вести к неполному развитию трофобласта, нарушению образования плаценты и срыву беременности.

Что касается прогнозов в отношении успеха межвидовых скрещиваний, в которые вовлекаются животные с облигатной диапаузой, то данные классической и современной экспериментальной эмбриологии позволяют делать такие прогнозы (обзоры: Корочкин, 1999, 2002). Из этих данных следует, что фактором успешного развития межвидовых гибридных зародышей выступает совпадение в хронологии событий эмбриогенеза у животных скрещиваемых видов. Несовпадение же этих хронологий ведет к аномалиям развития или гибели потомков в эмбриональном и (или) постнатальном периоде. Этот тезис подтверждается фактом существования в природе гибридов соболя и куницы, так называемых «кидусов» (Терновский, Терновская, 1994). Оба вида имеют облигатную диапаузу, причем сезон спаривания и длительность диапаузы почти совпадают. То же можно сказать об успешной гибридизации хорька с европейской норкой (Терновский, Терновская, 1994). У обоих видов нет диапаузы, а сезоны спаривания и продолжительность беременности перекрываются. Однако во всех вариантах экспериментов по перекрестным пересадкам яиц в матку между американской норкой и хорьком зародыши дегенерировали до или после имплантации (Chang, 1968). Возможной причиной этого является различие в хронологиях их эмбриогенезов. У норки беременность длится от 43 до 74 дней (в среднем 50 дней), а диапауза в среднем две недели (Hansson, 1947). У хорька же срок беременности длится 42–44 дня и нет диапаузы (Daniel, 1970; Исакова, 2010). Безуспешными оказались также попытки получить гибридов между европейской норкой и американской норкой (Терновский, Терновская, 1994).

Таким образом, наши цитогенетические исследования показали, что стадия задержанной имплантации необходима для успешного течения беременности в ее природном проявлении. Этот факт следует учитывать при разработке программ по содержанию, разведению и сохранению генофондов животных, имеющих облигатную эмбриональную диапаузу. Во-первых, в зоопарках и на фермах не следует снижать пищевой рацион животных во время диапаузы. Во-вторых, в природопользовании следует определять сезон охоты с учетом хронологии эмбриогенеза у данного вида животных. Например, так называемый ложный гон у соболя – важный период, так как он связан с началом имплантации. Было замечено, что при низкой сексуальной активности самцов в этот период снижается плодовитость самок. Поэтому отлов самцов во время ложного гона может быть причиной снижения численности популяции соболей. В-третьих, при консервации гамет и эмбрионов следует учитывать возможность влияния облигатной диапаузы на успех консервации. В-четвертых, скрещивания двух видов животных, при которых только один из них имеет облигатную диапаузу или если каждый вид имеет период диапаузы, но эти периоды значительно отличаются по продолжительности, не могут быть успешными из-за генетически обусловленных различий в хронологии их эмбриогенезов. И наконец, воздействия на самок гормонами или измененным фотопериодом не следует использовать в звероводстве, так как они влияют на генетически заданную хронологию эмбриогенеза и могут привести к гибели эмбрионов или появлению потомков с аномалиями развития. Кроме того, нет оснований исключать возможность вредного воздействия этих факторов на жизнеспособность и репродуктивную функцию потомков обработанных животных.

Литература

- Беляев Д.К., Клочков Д.В., Железова А.И. Влияние световых условий на воспроизводительную функцию и плодовитость норок (*Mustela vison*, Schreb.) // Бюл. МОИП. 1963. Т. 27. С. 107–125.
- Беляев Д.К., Перельдик Н.Ш., Портнова Н.Т. Экспериментальное сокращение периода эмбрионального развития у соболей // Журн. общ. биологии. 1961. Т. 12. С. 260–265.
- Исакова Г.К. Об активности эмбрионального генома соболя на стадии задержанной имплантации (цитогенетическое исследование) // Докл. РАН. 2004. Т. 397. № 1. С. 128–130.
- Исакова Г.К. Цитогенетическое исследование активности эмбрионального генома хоря перед имплантацией // Онтогенез. 2010. Т. 41. № 3. С. 228–231.
- Исакова Г.К., Жоголева Н.Н. Активность эмбрионального генома норки во время диапаузы (цитогенетический анализ). Число клеток и размер клеточных ядер в бластоцистах разного размера и возраста // Генетика. 1997. Т. 33. № 6. С. 822–830.
- Исакова Г.К., Захаренко Л.П., Абрамова М.П. Активность эмбрионального генома норки во время диапаузы (цитогенетический анализ). Ядрышковый и внеядрышковый синтез РНК // Онтогенез. 2001. Т. 32. № 4. С. 302–308.
- Исакова Г.К., Шилова И.Э. Размножение «почкованием» клеток трофобласта в имплантирующихся бластоцистах норки // Докл. АН. 2000. Т. 371. № 1. С. 129–131.
- Исакова Г.К., Шилова И.Э. Соотношение частот двух форм амитотического деления ядер клеток трофобласта в бластоцистах норки в течение периода задержанной имплантации // Изв. РАН. 2003. Сер. биол. № 4. С. 395–398.
- Корочкин Л.И. Введение в генетику развития. М.: Наука, 1999. 253 с.
- Корочкин Л.И. Связь онто- и филогенеза в генетическом освещении. Проблема макромутаций (морфологический и молекулярный аспекты) // Генетика. 2002. Т. 38. С. 727–738.
- Старков И.Д. Биология и разведение соболей и куниц. М.: Междунар. кн., 1947. 97 с.
- Терновский Д.В., Терновская Ю.Г. Экология куницеобразных. Новосибирск: Наука, 1994. 222 с.
- Aulerich R.J., Holcomb L., Ringer R.K., Schaible J.

Influence of photoperiod on reproduction in mink // Quart. Bul. East Lansing: Michigan State Univ. Press. 1963. V. 46. P. 32–138.

- Chang M.C. Reciprocal insemination and egg transfer between ferrets and mink // J. Exp. Zool. 1968. V. 168. P. 49–60.
- Daniel J.C., Jr. Coincidence of embryonic growth and uterine protein in the ferret // J. Embryol. Exp. Morph. 1970. V. 24. P. 305–312.
- Desmarais J., Lopes F.L., Bordingnon V., Murphy B.D. Diapause, implantation and placentation in the mink: A critical role for embryonic signaling // Scientifur. 2004. V. 28. P. 211–217.
- Enders R.K. Reproduction in the mink (*Mustela vison*) // Proc. Am. Phil. Soc. 1952. V. 96. P. 691–755.
- Hansson A. The physiology of reproduction in mink (*Mustela vison*, Schreb.) with special reference to delayed implantation // Acta Zool. 1947. V. 28. P. 1–136.
- Isakova G.K., Mead R.A. Occurrence of amitotic division of trophoblast cell nuclei in blastocysts of the western spotted skunk (*Spilogale putorius latifrons*) // Hereditas. 2004. V. 104. P. 177–184.
- Lambert R.T., Ashworth C.J., Beattie L.Z. et al. Temporal changes in reproductive hormones and conceptus-

endometrial interactions during embryonic diapause and reactivation of the blastocysts in European roe deer (*Capreolus capreolus*) // Reproduction. 2001. V. 121. P. 863–871.

- Lopes F.L., Desmarais J.A., Murphy B.D. Embryonic diapause and its regulation // Reproduction. 2004. V. 128. P. 669–678.
- Mead R.A. The physiology and evolution of delayed implantation in carnivores // Carnivore Behavior, Ecology, and Evolution / Ed. J.L. Gittleman. N.Y.: Cornell Univ. Press, 1989. P. 437–464.
- Mead R.A. Hormonal control of implantation in some carnivores // Molecular and Cellular Aspects of Periimplantation Processes / Ed. S.K. Dey. N.Y.: Springer-Verlag, 1995. P. 168–182.
- Murphy B.D. Progress and challenges in the physiology of reproduction in furbearing carnivores // Norveg. J. Agric. Sci. 1992. Suppl. 9. P. 17–29.
- Pearson O.P., Enders R.K. Duration of pregnancy in certain mustelids // J. Exp. Zool. 1944. V. 95. P. 21–35.
- Renfree M.B., Shaw G. Diapause // Annu. Rev. Physiol. 2000. V. 62. P. 353–375.
- Sandell M. The evolution of seasonal delayed implantation // Quart. Rev. Biol. 1990. V. 65. P. 23–42.

ON BREEDING, INTERSPECIES HYBRIDIZATION, AND PRESERVATION OF THE GENE POOLS OF FURBEARING CARNIVORES THAT HAVE AN OBLIGATE EMBRYONIC DIAPAUSE

G.K. Isakova

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

Summary

Our cytogenetic studies on obligate embryonic diapause (delayed implantation) in the mink, sable, and western spotted skunk have shown that the active process of growth and differentiation of trophoblast takes place during diapause. This indicates that the stage of delayed implantation in its native appearance is important for the successful course of pregnancy. This finding should be taken into consideration in developing programs for breeding, interspecies hybridization, and preservation of the gene pools of furbearing carnivores that have an obligate embryonic diapause.

Key words: Mustelides, breeding, gene pools preservation, obligate embryonic diapause, delayed implantation, trophoblast, placenta.

АБЕРРАНТНАЯ ОКРАСКА «ЧЕРНЫЙ ОГУЗОК» У КРАСНОЙ ПОЛЕВКИ (*MYODES RUTILUS*) ИЗ ОКРЕСТНОСТЕЙ НОВОСИБИРСКОГО АКАДЕМГОРОДКА

М.А. Потапов¹, П.М. Бородин², Т.И. Аксенович², В.В. Панов¹, О.Ф. Потапова¹, Л.А. Прасолова², В.И. Евсиков¹

¹ Учреждение Российской академии наук Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: map@ngs.ru; ² Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

В ходе многолетнего мониторинга популяций мелких млекопитающих в окрестностях новосибирского Академгородка в 1996 г. впервые были отмечены особи красной полевки (*Myodes rutilus*) с необычной черной окраской огузка. Встречаемость аберрантной формы вскоре выросла, достигая в отдельные годы 10-15% от численности популяции, и коррелировала с динамикой численности популяции. Анализ морфологической структуры волос с разных топографических участков спины полевок стандартной и аберрантной форм показал, что с признаком «черный огузок» сопряжена также более интенсивная окраска чепрака. Комплексный сегрегационный анализ наследования признака «черный огузок» в условиях лабораторного разведения выявил моногенный аутосомный рецессивный контроль данного признака.

Ключевые слова: красная полевка (*Myodes rutilus*), окраска шерстного покрова, окрасочный полиморфизм, морфология волос, моногенное наследование.

Введение

В лесопарковой зоне Новосибирского научного центра (ННЦ), расположенного в южных пределах города, исследования мелких млекопитающих проводились с 1960-х гг. (Юдин, 1969; Телегин, 1971–1973). Свидетельств отклонения от стандартной окраски у красной полевки (*Myodes rutilus*) из данной местности в литературе не содержится.

С начала 1990-х гг. сотрудниками ИСиЭЖ СО РАН на базе полевой биостанции института, расположенной вблизи ННЦ, проводятся планомерные мониторинговые работы, предполагающие слежение за популяционными процессами у мелких млекопитающих (Мошкин и др., 1995; Панов, 2011). За время наблюдений у разных видов грызунов отмечены единичные случаи таких окрасочных аберраций, как светло-кремовая окраска шерсти в сочетании с красными глазами и белая пегость (наличие депигментированных участков на теле: белые «звездочки», «носочки», «галстуки», «кисточки» и т. п.).

В 1996 г. в районе биостанции впервые зарегистрированы две особи красной полевки с темной, практически черной окраской огузка. Зона черной окраски, переходящей от хвоста на спину, достигала 1/3 длины туловища (рис. 1). В дальнейшем в районе исследований доля особей с аберрантной окраской существенно возросла.

Целью нашей работы стало: наблюдение за изменением доли особей красной полевки с признаком «черный огузок» в изучаемой популяции; сравнительный анализ морфологической структуры волос стандартной и аберрантной форм; выяснение модели наследования аберрантного признака по данным расщепления в потомстве при разведении животных в контролируемых условиях.



Рис. 1. Типичные представители красной полевки из окрестностей новосибирского Академгородка со стандартной и аберрантной («черный огузок») окраской шерсти.

Материал и методы

Регистрация поимок в природе. Красных полевок (M. rutilus) отлавливали в ходе многолетнего мониторинга мелких млекопитающих в окрестностях ННЦ (в районе расположения биостанции) стандартными методами отлова с изъятием (White et al., 1982). Отловы проводили с помощью расположенных в типичных биотопах обитания красной полевки ловчих канавок, длиной 50 м каждая, с цилиндрами, вкопанными на регулярном расстоянии (10 м) друг от друга, а также линий живоловок (по 20 ловушек, расставленных с интервалом в 10 м). Для целей данного исследования относительную численность (число зверьков на 100 ловушко-суток) определяли по данным отлова в живоловки. Среди всех отловленных разными методами красных полевок регистрировали долю особей с признаком «черный огузок». За период 1991–2010 гг. зарегистрирована окраска шерстного покрова около 5,5 тыс. зверьков (от 143 до 429 особей в год).

Морфология волос. Для морфологического анализа волос у типичных представителей стандартно окрашенной и аберрантной форм взяты образцы с двух топографически различных участков дорсальной стороны тела («мантии») с загривка (межлопаточной области), где отличия в окраске шерсти выражены в наименьшей степени, и с огузка (район над крестцом), где отличия очевидны (рис. 1). Образцы волос для удаления из них воздуха обрабатывали 3%-м раствором трипсина при температуре 37 °С в течение 5 ч, промывали в дистиллированной воде, проводили через этиловый спирт и ксилол, заключали в канадский бальзам или глицерин. Гистологические препараты фотографировали на световом микроскопе Olympia при окуляре ×15 и объективе × 40. Диаметр волос измеряли с помощью окуляр-микрометра на микроскопе Karl Zeiss, а длину – миллиметровой линейкой на лупе МБС-10. Поскольку визуально воспринимаемая окраска шерстного покрова животных определяется в основном цветом волос верхнего яруса (наиболее длинных), а именно-направляющих и остевых, особенно их верхних частей, то морфоструктуру именно этих фракций волос исследовали более подробно.

Наследование аберрантного признака «черный огузок». На части животных, доставленных в лабораторию, и их потомках, полученных в контролируемых условиях разведения, проведена серия скрещиваний в различных сочетаниях окрасочных форм производителей. Животных содержали репродуктивными парами в стандартных условиях (постоянный фотопериод 14 C : 10 T, температура воздуха 21 ± 2 °C) в сетчатых клетках с пластиковыми поддонами с предоставлением подстилочного (опилки) и гнездового (вата) материала и неограниченного количества воды (в автопоилках) и композитного корма (Петрухин И.В., Петрухин Н.И., 1992). Дополнительно в соответствии с природным рационом (Юдин и др., 1979; Громов, Ербаева, 1995) давали прикорм в виде различных ягод, съедобных грибов, еловых шишек и т. д. У родителей и потомков с возраста 21 день (отсадка) регистрировали окраску: стандартную

или аберрантную («черный огузок»). Наследование стандартной и аберрантной окрасок проанализировано в 17 родословных (от 4 до 279 особей).

Для выяснения модели наследования использовали комплексный сегрегационный анализ, позволяющий работать с аутбредными родословными произвольной структуры (Elston, Stewart, 1971; Elston, 1981). Предполагали, что наследование признака обусловлено как генетическими, так и средовыми факторами, причем один аутосомный локус с аллелями А и В оказывает наибольший эффект. Модель наследования признака описывали в терминах частоты аллеля $A(q_A)$ и пенетрантностей трех генотипов (w_{AA} , w_{AB} , w_{BB}), отражающих вероятности появления аберрантной окраски у особей с различными генотипами. Для проверки наличия гена главного эффекта использовали критерий Эльстона-Стьюарта, сравнивающий различные генетические гипотезы (Elston, Stewart, 1971; Аксенович и др., 2001).

Для подготовки данных и проведения анализа использовали разработанные нами пакеты программ Recode_ped, Loop_edge, Pre_dat и MAN_A (Belonogova, Axenovich, 2007; Axenovich *et al.*, 2008), открытых для свободного доступа на сайте http://mga.bionet.nsc.ru/soft/index.html.

На основании полученных оценок частот аллелей и пенетрантностей генотипов рассчитывали ожидаемые частоты фенотипов потомков при известных фенотипах родителей.

Результаты

Морфология волос стандартной и аберрантной форм красной полевки

Общая окраска меха дорсальной поверхности тела («мантии») красных полевок стандартной формы: желто-оранжевая или яркооранжевая от головы до хвоста (рис. 1). На боках волосы более светлые – желто-серые, а на животе – светло-серые. На общем оранжевом фоне спины встречаются небольшие вкрапления черных волос. Хвост у основания покрыт волосами оранжевого цвета, а дистальный кончик его более темный.

Визуально у красных полевок аберрантной формы вся дорсальная поверхность тела окрашена темнее, чем у полевок стандартной формы. На голове и передней половине тела аберрантных особей шерсть темно-оранжевого цвета, а в районе крестца (на огузке) – практически полностью черная (рис. 1). Бока, вентральная сторона тела и хвост по всей длине у аберрантной формы окрашены темнее, чем у стандартной.

Самые длинные и толстые волосы у полевок обеих форм – направляющие, окрашенные в черный цвет от вершины до корня (рис. 2, а), при этом их верхние, расширенные («ланцетовидные») концы содержат заметно больше эумеланина, чем узкие стержни, вплоть до корня. Диаметр направляющих волос варьирует в верхней расширенной части от 60 до 70 мкм, а длина - от 11 до 14 мм. В целом волос этой категории у аберрантной формы заметно больше, чем у стандартной. Хотя направляющие волосы вносят свой вклад в восприятие окраски шерсти, их значительно меньше, чем остевых волос, поэтому в определении цвета покрова наибольшая роль принадлежит последним. При этом воспринимаемый визуально общий тон окраски зависит от соотношения длин черного кончика и ниже расположенного феомеланинового участка ости.

Остевые волосы с образцов, взятых на загривке у обеих форм, представлены двумя видами. Так, «ость-1» имеет строение, характерное для волос типа «агути»: за верхним узким кончиком волоса, содержащим черный эумеланин, следует расширенный участок с переходом от черного в желто-оранжевый цвет разной интенсивности в зависимости от количественного содержания феомеланина. В переходной зоне от черной к желто-оранжевой частям гранны (верхняя, расширенная часть волоса) происходит постепенная замена эумеланинового пигмента на феомеланиновый (рис. 2, б). Такое строение характерно для верхней, «ланцетовидной», части волоса, тогда как в нижней узкой части стержне - вновь содержится лишь эумеланин, однако темная окраска в этой части волоса менее интенсивна, чем на кончике.

При равной у обеих форм общей длине ости и длине гранны черные вершины «ости-1» у аберрантной формы в 1,7 раза длиннее, а феомеланиновые участки, напротив, в 1,2 раза короче, чем у стандартной (табл. 1). При этом обращает на себя внимание тот факт, что интен-





а – верхняя и средняя части направляющего волоса, полностью черного от корня до вершины; б – нижняя часть гранны остевого волоса типа «агути» («ости-1») – переходная зона от черной к желто-оранжевой окраске; в – полностью желто-оранжевый остевой волос («ость-2») полевки стандартной окраски; г – более интенсивно окрашенный остевой волос («ость-2») полевки аберрантной окраски. Увеличение: окуляр × 15, объектив × 40.

Таблица 1

Окрасочная форма	Длина ости,	Длина	Длина эу- и феомеланиновой частей гранны, мм			
	ММ	гранны, мм	эумеланин	феомеланин		
Стандартная форма	9,7 ± 0,15	$3,3 \pm 0,12$	$0,\!39\pm0,\!015$	$2,91 \pm 0,13$	20	
«Черный огузок»	$9,5 \pm 0,16$	$3,1 \pm 0,17$	$0,\!65\pm0,\!015$	$2,\!40 \pm 0,\!16$	20	
Достоверность отличий (критерий Стьюдента)	n.s.	n.s.	P < 0,001	P < 0,05		

Морфометрические показатели остевых волос типа «агути» («ость-1») на загривке стандартной и аберрантной форм красной полевки (М ± SEM)

сивность желто-оранжевой окраски «ости-1» у аберрантной формы выше за счет большей концентрации феомеланиновых пигментных гранул в сердцевине гранны и корковом слое.

Таким образом, у аберрантных полевок шерстный покров передней части чепрака («мантии») существенно темнее, чем у стандартных. Это достигается, в том числе за счет большего содержания черных направляющих волос и большей длины эумеланиновых участков остевых («ость-1») волос.

В шерстном покрове на загривке как стандартной, так и аберрантной форм присутствует также «ость-2», которая не имеет характерного для волос типа «агути» распределения пигмента по их длине. Эти волосы от вершины до корня содержат лишь феомеланин, они желто-оранжевого цвета. Следует отметить также, что в желто-оранжевый цвет остевых волос, определяемый в основном пигментными гранулами, содержащими феомеланиновый (желто-оранжевый) пигмент, вносит свой вклад и желтый цвет белкового вещества, из которого состоят корковый и сердцевинный слои самого волоса (Чернова, Целикова, 2004).

«Ость-2» у аберрантных полевок окрашена в желто-оранжевый цвет большей интенсивности (до оранжево-красного), чем у стандартных (рис. 2, в, г). Кроме того, в сердцевине их волос наряду с феомеланиновыми гранулами имеются черные эумеланиновые, поэтому волосы этой категории у них существенно темнее, чем у стандартной формы.

Состав категорий волос на огузке стандартной формы красной полевки не отличается существенно от таковой на загривке: имеются и черные направляющие, и остевые волосы двух видов – «ость-1» (типа «агути») и «ость-2» (полностью желто-оранжевые). На огузке же аберрантной формы не только направляющие, но и остевые волосы полностью черные – эумеланиновые.

Пуховые волосы – наиболее короткие и тонкие, окрашенные по типу «агути»: короткие верхние кончики темные, за ними следуют очень осветленные участки стержня, а нижняя часть

волоса вновь темная. Пуховые волосы не играют существенной роли в визуально воспринимаемой окраске покрова, однако надо отметить, что они у аберрантных особей на загривке более темноокрашенные (содержат больше эумеланиновых гранул), чем у стандартной формы.

Наследование признака «черный огузок» у красной полевки

Результаты комплексного сегрегационного анализа свидетельствуют о майоргенном контроле аберрантной окраски ($\chi^2_3 = 3, 14$). Согласно этой модели, основной вклад в изучаемый полиморфизм по окраске вносит один аутосомный локус, частота аллеля А в лабораторной колонии равна 0,499, а пенетрантности генотипов АА, АВ и ВВ равны 0, 0 и 0,99 соответственно. Другими словами, полученная модель предполагает, что аберрантная окраска никогда не возникает у носителей генотипов АА и АВ, но проявляется практически у всех гомозигот по аллелю В, т. е. аберрантная окраска наследуется как аутосомный рецессивный признак. Для того чтобы наглядно продемонстрировать справедливость полученной модели, мы рассчитали ожидаемые частоты стандартных и аберрантных потомков при разных вариантах скрещиваний.

Обозначим фенотип, соответствующий стандартной окраске, x = 0, а аберрантной -x = 1. Частота различных генотипов у особей разной окраски определяется по формулам:

P(AA | x) = $= \frac{P(AA)P(x | AA)}{P(AA)P(x | AA) + P(AB)P(x | AB) + P(BB)P(x | BB)},$

P(AB | x) = $= \frac{P(AB)P(x | AB)}{P(AA)P(x | AA) + P(AB)P(x | AB) + P(BB)P(x | BB)},$ P(BB | x) =

 $=\frac{P(BB)P(x|BB)}{P(AA)P(x|AA) + P(AB)P(x|AB) + P(BB)P(x|BB)},$

где P(AA), P(AB) и P(BB) – частоты соответствующих генотипов в популяции, а P(x|AA), P(x|AB) и P(x|BB) – вероятности фенотипа x у особей с различными генотипами. Для x = 1 эти вероятности равны пенетрантностям генотипов w_g, а для x = 1 величинам, равным $(1 - w_g)$. Легко показать, что вероятность фенотипа x у потомка родительской пары с фенотипами x_1 и x_2 равна:

$$P(x|x_1x_2) = \sum_{g_1 = AA,AB,BB} P(g_1|x_1) \sum_{g_2 = AA,AB,BB} P(g_2|x_2) \sum_{g = AA,AB,BB} P(g|g_1|g_2) P(x|g).$$

Здесь суммирование проводится по всем возможным генотипам родителей и потомка. Расчеты, выполненные по приведенным формулам, показали, что ожидаемая частота аберрантных потомков составляет: у пары родителей со стандартной окраской 0,112, у пары, в которой один родитель имеет стандартную, а другой аберрантную окраску, – 0,332, а у пары родителей с аберрантной окраской – 0,985.

Сравнение числа потомков разной окраски, наблюдаемого в родословных, с ожидаемым при условии справедливости гипотезы о моногенном рецессивном контроле аберрантной окраски однозначно свидетельствует в пользу данной гипотезы (табл. 2). Видно, что для всех типов скрещиваний наблюдаемые численности потомков с разной окраской хорошо совпадают с ожидаемыми.

Частота встречаемости аберрантной окрасочной формы «черный огузок» в популяции красной полевки

В течение нескольких лет (1991–1995 гг.) после начала мониторинговых исследований аберрантно окрашенных красных полевок отмечено не было. Впервые два зверька с нетипичной окраской (темный, практически черный, цвет огузка) были зарегистрированы в 1996 г. после депрессии численности популяции 1995 г. В 1997 г. была обнаружена только одна такая аберрантная особь. И лишь начиная с 1999 г. после минимума (депрессии) численности 1998 г. подобные зверьки стали отмечаться в заметном количестве, достигнув более 15% от общего числа исследованных особей в 2002 г. (рис. 3). Через несколько лет после появления (обнаружения) аберрантного признака изменение доли в популяции «частичных меланистов» синхронизировалось с динамикой относительной численности вида. Так, за период 1999-2010 гг. корреляция Спирмена между этими показателями составила $r_{\rm S} = +0,60, n = 12; p < 0,04.$

Таблица 2

	II	Фенотип	потомков			
Фенотип родителей	потомков	стандартная форма	«черный огузок»	п	χ^2_1	
Crowner horizon y array commercial	наблюдаемая	146	27	172	3,38	
Стандартная форма < стандартная форма	ожидаемая	153,6	19,4	1/3		
Crowner honey y warm i organ	наблюдаемая	26	8	24	1 42	
Стандартная форма < «черный огузок»	ожидаемая	22,7	11,3	54	1,43	
П	наблюдаемая	0	119	110	1,81	
«черный огузок» × «черный огузок»	ожидаемая	1,8	117,2	119		

Расщепление по признаку «черный огузок» в потомстве красных полевок



□ Относительная численность

□ Доля аберрантных особей

Рис. 3. Относительная численность красной полевки и частота встречаемости аберрантно окрашенных («черный огузок») особей в окрестностях новосибирского Академгородка.

Л.-с. – ловушко-суток.

Следует отметить, что частота встречаемости аберрантных особей неравномерно распределена в пределах исследуемой территории. Наибольшая доля «частичных меланистов» (около 14% среди зверьков, отловленных за период с 1996 по 2010 гг.) отмечается в узкой зоне западнее Бердского шоссе, вблизи берега Обского моря. По направлению к востоку от шоссе их доля снижается (до 6% в районе биостанции и 2% на территории Центрального Сибирского ботанического сада СО РАН). В 2003 г. единичные аберрантные особи были зарегистрированы в выборке из окрестностей с. Нижний Коён (около 30 км к юго-востоку от Академгородка).

Обсуждение

Полиморфизм по окраске шерстного покрова встречается во многих природных популяциях мелких грызунов (Гершензон, 1946, 1974; Lidicker, 1963; Gill, 1976; Большаков и др., 1982, 1989; Евсиков и др., 1997, 1999а, б, 2001; Потапов и др., 1998; Axenovich *et al.*, 2004).

У красной полевки и близких видов – рыжей (*M. glareolus*) и красно-серой (*M. rufocanus*) – известна возрастная, сезонная, географическая, биотопическая и локальная изменчивость окраски шерстного покрова (Громов, Ербаева, 1995; Емельянова, 2006, 2007, 2009), иногда затрудняющая их видовую идентификацию. Эта изменчивость касается, в первую очередь, интенсивности основного тона окраски спины – от светло-песочного до темно-коричневого. Однако при этом в некоторых популяциях видов рода *Myodes* обнаружен полиморфизм по окраске шерсти, т. е. присутствие дискретных окрасочных форм (Кошкина и др., 1982; Григорьев, 1989; Iwasa, 2004; Малышев, 2011).

Так, на о. Зеленый Малой Курильской гряды Е.М. Григорьевым (1989) отмечены особи красно-серой полевки с практически черной окраской верхней стороны тела. Возможно, об этой же форме с «очень темной, почти черной, окраской верха», обитающей на о. Кунашир, упоминают И.М. Громов и М.А. Ербаева (1995).

Среди красных полевок, обитающих у северной границы средней приенисейской тайги, наряду с типичной окрасочной формой с широкой яркой мантией, отмечена форма с узкой «чернобурой» мантией (Кошкина и др., 1982).

Нами впервые в истории популяционных исследований зарегистрирован феномен появления и дальнейшего закрепления окрасочного полиморфизма (по признаку «черный огузок») в популяции красной полевки, обитающей в окрестностях новосибирского Академгородка.

Нами показано моногенное наследование аберрантного признака, выявлены различия в особенностях морфоструктуры и в распределении типов волос у стандартной и аберрантной форм. Показано, что хотя цвет передней части чепрака обеих форм находится в пределах видового варьирования оттенка основного тона окраски спины, аберрантные зверьки отличаются большей интенсивностью окраски.

В литературе упоминание о сходной, «мутантной» по происхождению окраске шерстного покрова («темное пятно на крестце») у красных полевок, обитающих на восточной границе ареала вида в чукотской тундре, имеется лишь в сводке И.М. Громова и М.А. Ербаевой (1995). К сожалению, ни ссылок на первоисточник информации, ни указаний на коллекционные сборы авторы не приводят.

Показано, что признак «черный огузок» у красной полевки по аналогии с другими исследованными окрасочными признаками мелких грызунов (Наследова и др., 1980; Прасолова и др., 1991; Евсиков и др., 1997; Брагин и др., 2002; Чепраков и др., 2005) генетически детерминирован по типу моногенного аутосомного рецессивного наследования.

Иногда в качестве механизма поддержания окрасочного полиморфизма у грызунов предполагается адаптивность самого тона окраски в конкретных условиях существования (Данилов, 1976; Николаева, 1978; Hoekstra et al., 2004). Однако часто поддержанию полиморфизма могут способствовать плейотропия и взаимные эффекты генетических систем, ответственных за окраску покровов, с одной стороны, и физиологических, репродуктивных, поведенческих и других приспособительно-значимых характеристик животных – с другой (Гершензон, 1946, 1974; Фолитарек, Апенкина, 1959; Беляев, Евсиков, 1961; Большаков и др., 1982, 1989; Мошкин и др., 1991; Duhl et al., 1994; Manne et al., 1995; Евсиков и др., 1997, 1999а, б, 2001; Потапов и др., 1998; Bazhan et al., 1999; Вагин, 2001; Брагин и др., 2002; Beermann et al., 2004; Колдаева, Колдаев, 2007; Трапезов, 2008; Трапезов, Трапезова, 2009; Gulevich et al., 2010). В значительной мере множественная плейотропия генов окраски у млекопитающих связана с общностью эмбрионального происхождения из нервного гребня как меланоцитов, так и значительного пула клеток нервной системы, мезенхимных клеток сердца и др. (Сосунов, 1999).

Популяционный полиморфизм по конкретным локусам может быть разделен на «переходный» (замещение ранее обычного аллеля другим, дающим его носителям более высокую приспособленность) и «устойчивый», или «стабилизированный», поддерживаемый одной из форм уравновешивающего отбора.

Судя по нашим данным, в своем становлении и закреплении в окрестностях новосибирского Академгородка полиморфизм по гену «черный огузок» прошел как «переходную» стадию, сопровождавшуюся быстрым ростом частоты аберрантной формы от момента ее появления и дальнейшим распространением из «кубла», так и последовавшую затем стадию «стабилизации», когда динамика частоты встречаемости аберрантных особей пришла в соответствие с изменениями относительной численности вида на исследуемой территории.

Обращает на себя внимание тот факт, что резкий рост встречаемости признака в 1999 г. следует за годом наименьшей за весь период наблюдений численности популяции, когда в условиях «бутылочного горлышка» возрастает вероятность инбридинга и, соответственно, выхода рецессивного признака в гомозиготное состояние.

Можно предположить, что в предшествующий этому событию период на фоне высокой численности популяции признак «черный огузок» не проявлялся, поскольку ответственный за него рецессивный аллель, появившись здесь *de novo* (либо будучи занесенным откуда-либо), пребывал в гетерозиготном состоянии. Последующее же закрепление признака могло быть опосредовано выходом уклоняющегося в своем проявлении гена в гомозиготное состояние и дифференциальной – в изменчивых внутрипопуляционных условиях – приспособленностью окрасочных форм, связанной с действием механизмов плейотропии.

Подобную связь движения частот окрасочных фенотипов с динамикой внутрипопуляционных процессов и внешнесредовых условий мы наблюдали ранее на примере популяции водяной полевки (Евсиков и др., 1997, 1999а, б, 2001; Потапов и др., 1998). Дальнейшие исследования помогут ответить на вопрос о том, какие именно адаптивные преимущества приобретают окрасочные формы красной полевки в изменчивых условиях существования.

В достаточно жестких условиях антропогенного воздействия природа окрестностей новосибирского Академгородка преобразуется, предоставляя при этом исследователям удачные модели для изучения микроэволюционных событий и трансформации генофондов популяций обитающих здесь видов.

Благодарности

Авторы выражают искреннюю благодарность В.Н. Бахваловой за предоставленную возможность проведения работ по разведению животных в надлежащих условиях и Б.И. Шефтелю за возможность ознакомиться с малодоступной литературой. Исследования поддержаны РФФИ (гранты № 09-04-01712, 11-04-00653, 11-04-01690), программами Президиума РАН «Биологическое разнообразие» (грант 26.6) и Президиума СО РАН совместных исследований со сторонними организациями (грант 112).

Литература

- Аксенович Т.И., Зоркольцева И.В., Кириченко А.В. и др. Анализ родословных при оценке частот аллелей в популяциях коренных жителей Сибири // Генетика. 2001. Т. 37. № 11. С. 1538–1544.
- Беляев Д.К., Евсиков В.И. Влияние мутаций окраски меха у норок на их воспроизводительную функцию и жизнеспособность // Межвуз. конф. по эксперим. генетике: Тез. докл. Ч. 1. Л., 1961. С. 18.
- Большаков В.Н., Евдокимов Н.Г., Мошкин М.П., Позмогова В.П. Окрасочный полиморфизм и его связь со стресс-реактивностью у обыкновенной слепушонки (*Ellobius talpinus* Pallas) // Докл. АН СССР. 1989. Т. 308. № 2. С. 500–502.
- Большаков В.Н., Мазина Н.К., Евдокимов Н.Г. Особенности интерьерных показателей и энергетики тканевого окислительного обмена у черной и бурой морф слепушонки обыкновенной // Докл. АН СССР. 1982. Т. 263. № 1. С. 244–246.
- Брагин А.В., Рогов В.Г., Потапов М.А., Евсиков В.И. Самцы водяной полевки с белой пятнистостью меняют свой социальный ранг в присутствии самок // Докл. АН. 2002. Т. 387. № 1. С. 125–127.
- Вагин Ю.В. Роль гена *aleutian* в онтогенезе *Mustela vison*. 3. Анализ плодовитости норок генотипов *ppAA* и *ppAa* // Біополімери и клітина. 2001. Т. 17. № 3. С. 249–252.
- Гершензон С.М. Роль естественного отбора в распространении и динамике меланизма у хомяков *Cricetus cricetus* // Журн. общ. биологии. 1946. Т. 7. Вып. 2. С. 97–130.
- Гершензон С.М. Генетический полиморфизм в популяциях животных и его эволюционное значение // Журн. общ. биологии. 1974. Т. 35. Вып. 5. С. 678–684.
- Григорьев Е.М. Мелкие млекопитающие Малой Курильской гряды. Темная форма красно-серой полевки с острова Зеленый // Докл. МОИП. Сер. «Зоология и ботаника». М.: Изд-во Наука, 1989. С. 7–11.
- Громов И.М., Ербаева М.А. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. СПб: Изд-во ЗИН РАН, 1995. 522 с.
- Данилов О.Н. Хищные птицы и совы Барабы и Северной Кулунды. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1976. 105 с.
- Евсиков В.И., Герлинская Л.А., Мошкин М.П. и др. Генетико-физиологические основы популяционного гомеостаза // Водяная полевка: образ вида. М.: Наука, 2001. С. 386–411.
- Евсиков В.И., Назарова Г.Г., Потапов М.А. Генетикоэкологический мониторинг циклирующей популяции водяной полевки (*Arvicola terrestris* L.) на

юге Западной Сибири // Генетика. 1997. Т. 33. № 8. С. 1133–1143.

- Евсиков В.И., Назарова Г.Г., Рогов В.Г. Популяционная экология водяной полевки (*Arvicola terrestris* L.) в Западной Сибири. Сообщение І. Репродуктивная способность самок, полиморфных по окраске шерстного покрова, на разных фазах динамики численности популяции // Сиб. экол. журнал. 1999а. Т. 6. № 1. С. 59–68.
- Евсиков В.И., Потапов М.А., Музыка В.Ю. Популяционная экология водяной полевки (*Arvicola terrestris* L.) в Западной Сибири. Сообщение II. Пространственно-этологическая структура популяции // Сиб. экол. журнал. 1999б. Т. б. № 1. С. 69–77.
- Емельянова А.А. Возрастная и сезонная изменчивость окраски меха европейской рыжей полевки // Вестник ТвГУ. Сер. «Биология и экология». 2006. Вып. 2. С. 68–74.
- Емельянова А.А. О некоторых аспектах физиологобиохимических процессов, обусловливающих изменчивость признаков окраски меха европейской рыжей полевки // Вестник ТвГУ. Сер. «Биология и экология». 2007. Вып. 5. С. 93–100.
- Емельянова А.А. Изменчивость окраски меха европейской рыжей полевки (*Clerthrionomys glareolus* Schreber) в верховьях Волги и на сопредельных территориях // Вестник ТвГУ. Сер. «Биология и экология». 2009. Вып. 12. С. 49–57.
- Колдаева Е.М., Колдаев Н.А. Доместикация и хозяйственно полезные признаки у пушных зверей // Информ. вестник ВОГиС. 2007. Т. 11. № 1. С. 62–75.
- Кошкина Т.В., Зацепин Т.С., Шефтель Б.И. Цветовые формы красной полевки на Среднем Енисее (как пример внутривидовой дифференциации) // Докл. МОИП. Сер. «Зоология и ботаника». М.: Изд-во Наука, 1982. С. 16–18.
- Малышев Ю.С. Обнаружение меланизма в популяции красной полевки (*Clethrionomys rutilus* Pallas) долины реки Верхней Ангары (Северное Забайкалье)// Териофауна России и сопредельных территорий. Междунар. совещ. (IX Съезд Териол. общ. при РАН). М.: Тов-во науч. изданий КМК, 2011. С. 297.
- Мошкин М.П., Добротворский А.К., Мак В.В. и др. Иммунореактивность полевок рода *Clethrionomys* на разных фазах популяционного цикла // Докл. АН. 1995. Т. 345. № 2. С. 280–282.
- Мошкин М.П., Евдокимов Н.Г., Мирошниченко В.А. и др. Изменчивость кортикостероидной функции в популяциях обыкновенной слепушонки (*Ellobius talpinus*) // Усп. соврем. биологии. 1991. Т. 111. Вып. 1. С. 95–100.
- Наследова Н.И., Печуркина Н.И., Рувинский А.О. и др.

Наследование окраски меха у водяной полевки *Arvicola terrestris* L. // Генетика. 1980. Т. 16. Вып. 2. С. 347–349.

- Николаева А.И. Адаптивная изменчивость окраски меха водяной полевки в ландшафтах юга Западной Сибири // Зоол. журнал. 1978. Т. 56. Вып. 11. С. 1720–1726.
- Панов В.В. Мелкие млекопитающие лесопарковой зоны ННЦ – прокормители преимагинальных фаз таежного клеща // Инфекции, передаваемые клещами в Сибирском регионе. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2011. С. 35–38.
- Петрухин И.В., Петрухин Н.И. Кормление домашних и декоративных животных: справочная книга. М.: Нива России, 1992. 336 с.
- Потапов М.А., Рогов В.Г., Евсиков В.И. Влияние популяционного стресса на встречаемость водяных полевок (*Arvicola terrestris* L.) с белыми отметинами // Докл. АН. 1998. Т. 358. № 5. С. 713–715.
- Прасолова Л.А., Бажан Н.М., Всеволодов Э.Б., Латыпов И.Ф. Уточнение генотипа окраски на основе морфологического анализа пигментации меха бурых и черных водяных полевок // Генетика. 1991. Т. 27. № 8. С. 1423–1430.
- Сосунов А.А. Нервный гребень и его нейральные производные // Сорос. образоват. журнал. 1999. № 5. С. 14–21.
- Телегин В.И. Фауна лесопарка и влияние на ее формирование антропогенного фактора // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук. 1971. № 5. Вып. 1. С. 58–66.
- Телегин В.И. Териофауна лесопарка Новосибирского научного центра // Вопросы лесопаркового хозяйства и озеленения Новосибирского научного центра. Новосибирск: ЦСБС СО АН СССР, 1972. С. 24–41.
- Телегин В.И. Мелкие млекопитающие Приобских сосновых боров окрестностей Новосибирска // Тр. Биол. ин-та. Вып. 16. Фауна Сибири. Ч. 2. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1973. С. 310–319.
- Трапезов О.В. Регуляторные эффекты генов поведения и управление окрасочным формообразованием у американских норок (*Mustela vison* Schreber, 1777) // Информ. вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 1/2. С. 63–83.
- Трапезов О.В., Трапезова Л.И. Воспроизводящаяся коллекция окрасочных генотипов американской норки (*Mustela vison* Schreber, 1777) на экспериментальной звероферме Института цитологии и генетики СО РАН // Информ. вестник ВОГиС. 2009. Т. 13. № 3. С. 554–570.
- Фолитарек С.С., Апенкина Н.Н. О способности водяной крысы и некоторых других видов плавать в условиях эксперимента // Водяная крыса и

борьба с ней в Западной Сибири. Новосибирск: Кн. изд-во, 1959. С. 172–196.

- Чепраков М.И., Евдокимов Н.Г., Глотов Н.В. Наследование окраски меха у обыкновенной слепушонки (*Ellobius talpinus* Pall.) // Генетика. 2005. Т. 41. № 11. С. 1552–1558.
- Чернова О.Ф., Целикова Т.Н. Атлас волос млекопитающих. М.: Тов-во науч. изданий КМК, 2004. 428 с.
- Юдин Б.С. Комплексы насекомоядных млекопитающих в ландшафтах Новосибирской области // Биологическое районирование Новосибирской области. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1969. С. 131–143.
- Юдин Б.С., Галкина Л.И., Потапкина А.Ф. Млекопитающие Алтае-Саянской горной страны. Новосибирск: Наука, 1979. 296 с.
- Axenovich T.I., D'Andrea P.S., Fernandes F. et al. Inheritance of white head spotting in natural populations of South American water rat (*Nectomys squamipes* Rodentia: Sigmodontinae) // J. Hered. 2004. V. 95. N 1. P. 76–80.
- Axenovich T.I., Zorkoltseva I.V., Liu F. *et al.* Breaking loops in large complex pedigrees // Hum. Hered. 2008. V. 65. P. 57–65.
- Bazhan N.M., Yakovleva T.V., Makarova E.N. Agouti locus may influence reproduction under food deprivation in the water vole (*Arvicola terrestris*) // J. Exp. Zool. 1999. V. 283. N 6. P. 573–579.
- Beermann F., Orlow S.J., Lamoreux M.L. The *Tyr* (*albino*) locus of the laboratory mouse // Mamm. Genome. 2004. V. 15. N 10. P. 749–758.
- Belonogova N.M., Axenovich T.I. Optimal peeling order for pedigrees with incomplete genotypic information // Comput. Biol. Chem. 2007. V. 31. P. 173–177.

- Duhl D.M.J., Stevens M.E., Vrieling H. *et al.* Pleiotropic effects of the mouse *lethal yellow (Ay)* mutation explained by deletion of a maternally expressed gene and the simultaneous production of *agouti* fusion RNAs // Development. 1994. V. 120. P. 1695–1708.
- Elston R.C. Segregation analysis // Adv. Hum. Genet. 1981. V. 11. P. 63–120, 372–373.
- Elston R.C., Stewart J. A general model for the genetic analysis of pedigree data // Hum. Hered. 1971. V. 21. P. 523–542.
- Gill A.E. White spotting in the California vole // Heredity. 1976. V. 37. P. 113–128.
- Gulevich R.G., Plyusnina I.Z., Prasolova L.A. *et al.* White spotting in Norway rats selected for tame behavior // J. Zool. 2010. V. 280. Iss. 3. P. 264–270.
- Hoekstra H.E., Drumm K.E., Nachman M.W. Ecological genetics of adaptive color polymorphism in pocket mice: Geographic variation in selected and neutral genes // Evolution. 2004. V. 58. N 6. P. 1329–1341.
- Iwasa M.A. A note on aberrant pelage colors in a wild population of the gray red-backed vole *Clethrionomys rufocanus bedfordiae* in Hokkaido // Mammal Study. 2004. V. 29. P. 93–95.
- Lidicker W.Z., Jr. The genetics of a naturally occurring coat-color mutation in the California vole // Evolution. 1963. V. 17. P. 340–346.
- Manne J., Argeson A.C., Siracusa L.D. Mechanisms for the pleiotropic effects of the agouti gene // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 4721–4724.
- White G.C., Anderson D.R., Burnham K.P., Otis D.L. Capture-recapture and removal methods for sampling closed populations. Los Alamos: U.S. Government Printing Office, 1982. 236 p.

THE ABERRANT «BLACK RUMP» COAT COLORATION IN NORTHERN RED-BACKED VOLES (*MYODES RUTILUS*) CAUGHT IN THE VICINITY OF THE NOVOSIBIRSK ACADEMGORODOK

M.A. Potapov¹, P.M. Borodin², T.I. Axenovich², V.V. Panov¹, O.F. Potapova¹, L.A. Prasolova², V.I. Evsikov¹

¹ Institute of Systematics and Ecology of Animals, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: map@ngs.ru;
² Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

Summary

Long-term monitoring of populations of small mammals in the vicinity of the Novosibirsk Academgorodok revealed individuals of red-backed voles (*Myodes rutilus*) with an aberrant black coloration of the rump, first recorded in 1996. Subsequently, the occurrence of the aberrant form varied from year to year and reached 10–15 %. It correlated with the time course of population density. Analysis of the morphological structure of hairs from different topographical sites of the shabrack of voles of standard and aberrant forms shows that the «black rump» trait is also accompanied with more intense shabrack coloration. Complex segregation analysis of inheritance of the black rump in laboratory breeding has shown monogenic autosomal recessive control of this trait.

Key words: red-backed vole (*Myodes rutilus*), coat coloration, coat-color polymorphism, hair morphology, monogenic inheritance.

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА СЕМЕЙСТВА Альфа-Макроглобулинов свиньи В Связи с некоторыми проблемами селекции

В.И. Ермолаев¹, М.А. Савина¹, С.П. Князев², Н.С. Юдин¹, Р.Б. Айтназаров¹, В.А. Бекенев³, В.С. Деева³, С.В. Никитин¹

¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: ermolaev@bionet.nsc.ru; ² ΦΓΟУ ВПО Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия, e-mail: knyser@rambler.ru;

³ ГНУ Сибирский научно-исследовательский институт животноводства Российской академии сельскохозяйственных наук, Краснообск, Новосибирская область, e-mail:sibniij@ngs.ru

На основе данных многолетнего скрининга находящихся в Новосибирской области популяций свиней крупной белой породы по комплексу аллотипических маркеров альфа-макроглобулинов (AM) сыворотки крови установлено влияние дифференцирующего отбора на отдельные гаплотипы AM-семейства. Оно проявляется в разной представленности гаплотипа AM1.2, контролирующего полиморфизм двух тесно сцепленных генов, A2M и A1M, у животных разных производственных групп. Предполагается, что в этот процесс могут быть вовлечены и другие гены, как тесно сцепленные физически в составе хромосомы 5 с AM, так и связанные с ним структурно-функциональной коадаптированностью, к множеству которых можно отнести следующие.

1. Кластер из 8 генов рецепторов вкуса (TASTE), располагающийся непосредственно между генами *AMR6-A2M*.

2. Четыре кластера генов рецепторов запаховых сигналов (OLFACTORY) общим числом более 100, коадаптированных, по-видимому, с генами рецепторов вкуса (TASTE).

3. Два функционально полиморфных гена (*APOBEC3–APOBEC3F*), фланкирующих участок *A1M-AMR1* и предопределяющих устойчивость к ретровирусным инфекциям.

4. Два QTL-локуса (21DWT, BF60K), определяющих однотипные морфометрические показатели роста, развития, набора массы, но в разные периоды онтогенеза, и имеющих привязку к генам гомеобокса (*HOX*) и геркулина (*MYF6*) соответственно, но находящихся на разных концах хромосомы. Гаплоблоки частично перекрываются друг с другом в разных сочетаниях, особенно плотно в районе локализации AM-семейства. Можно предположить, что векторы отбора на каждый гаплоблок разнонаправлены. Отбору же подвергаются не отдельные гены и семейства генов, а довольно большие участки хромосомы, состав и аллелокомпозиция которых сбалансированы естественным отбором и многолетней селекцией.

Ключевые слова: семейство альфа-макроглобулинов АМ свиньи, комплекс генов *A1M-AM2-PZP-OVO-TASTE-AMR6-*.

Введение

В настоящее время установлено, что гены, контролирующие белки семейства альфа-макроглобулинов (АМ), находятся в длинном плече хромосомы 5. Длина хромосомы 5 составляет 110 542 536 п.н., длина отрезка, содержащего гены семейства альфа-макроглобулинов, – 430797 п.н. Этот участок занимает позиции 63447471–63878268, т. е. расположен поблизости от середины хромосомы 5 (NCBI Sus scrofa 9.2, 2010; PGSP Sus scrofa 10, 2011). Согласно версии NCBI Sus scrofa 9.2 (2010), на данном участке хромосомы 5 лежат четыре полноценных гена семейства: овостатин (овариальный макроглобулин – *OVO*); макроглобулин зоны беременности (PZP - PregnacyZone Protein); альфа-2-макроглобулин (A2M); альфа-1-макроглобулин (A1M) и несколько псевдогенов. В непосредственной близости располагается семейство генов рецепторов AM, AMR. Каждый из генов семейства AM имеет протяженность около 50 000 п.н. (46726-46564-46378-59186), примерно десятикратно уменьшенную кодирующую часть и предопределяет синтез полипептидной цепи длиной около 1450 (1425-1489-1477-1396) аминокислотных остатков.

У взрослых свиней А2М синтезируется главным образом в печени. В проявлении паралогов имеет место как стадиоспецифичность, так и тканеспецифичность (Petersen, 1993; Bijttebier *et al.*, 2009). В кровоток зрелые молекулы секретируются в виде тетрамеров (4 × 180 кДа) с молекулярной массой ≈ 720 кДа. Они являются ингибиторами протеаз, транспортируют некоторые цитокины, мелкие лиганды и пр. (Sottrup-Jensen, 1989), а также участвуют в процессах, связанных с поддержанием стабилизации систем крови (Tortorella *et al.*, 2004), выполняя множество функций (Ireland *et al.*, 2004), в том числе внеклеточных шаперонов (French *et al.*, 2008; Ozawa *et al.*, 2011).

Иммуногенетическое изучение семейства генов альфа-макроглобулинов началось более 30 лет назад (Janik et al., 1983). Установлено, что каждый из пяти аллотипов (AM1, AM2, AM3, AM4, AM5) проявляется кодоминантно (Ермолаев и др., 1990, 1991; Yermolaev et al., 1992). Гены пар AM2-AM4 и AM3-AM5 находятся в аллельных отношениях. У аллотипа АМ1, гена А2М, аллельного варианта не обнаружено. Перечисленные аллотипы наследуются в виде шести устойчивых сочетаний – аллогрупп, три из которых (AM1.2.3, AM3.4, AM4.5) с высокой частотой встречаются у большинства культурных пород свиней, а три другие (АМ-2.3, AM3.4.5, AM1.3) являются редкими (Ермолаев и др., 1991).

Цель настоящей статьи заключается в сопоставлении наиболее интересных результатов, полученных авторами за последние 20 лет, касающихся связи полиморфизма белков альфа-макроглобулинов с особенностями селекции свиней, с опубликованными результатами секвенирования генома свиньи.

Материал и методы

Материалом для исследования послужили результаты тестирования поголовья племенных свиней крупной белой породы из 4 хозяйств Новосибирской области: племзавода «Большевик», ЗАО АПК «Иня», ЗАО «Чебулинское» и ЗАО «Кудряшовское». В анализ вошло 17 выборок животных, что в сумме составляет 1202 головы (табл. 1). Аллотипирование проводили методом двойной иммунодиффузии в агаровом геле с использованием набора иммуногенетических реагентов, аллоантисывороток, прошедших сертификацию ISAG (Ермолаев и др., 1990, 1991; Yermolaev et al., 1992). Оно позволяет точно идентифицировать аллогруппу АМ1.2 на фоне аллогрупп АМЗ.4 и АМ4.5 и определять генотип отдельной особи и, соответственно, частоты генотипов в выборках животных. Так как аллотипы АМ1 и АМ2 маркируют продукты разных генов (A2M и A1M), то аллогруппа AM1.2 является более информативной, чем AM3.4 и AM4.5, имеющие отношение только к гену АМІ. Статистическая обработка материала проводилась стандартными методами (Животовский, 1991). Частота носителей аллогрупы АМ1.2 определялась как сумма частот носителей аллогрупп AM1.2 и AM-.2 (Князев и др., 2000).

Результаты и обсуждение

Все представленные в настоящей работе выборки относятся к генеральной совокупности, именуемой «крупная белая порода Новосибирской области», а вариация частоты аллогруппы АМ1.2 и соответствующего ей гаплотипа обусловлена дрейфом генов (хозяйства) и деятельностью человека (формирование выборок по полу, возрасту и производственному назначению). Данное утверждение позволяет рассмотреть динамику изменения частоты гаплотипа АМІ.2 в совокупности свиней крупной белой породы Новосибирской области за последние годы (с 1988 по 2009 гг.) (табл. 2). Коэффициент корреляции между годом исследования выборки животных и частотой носителей гаплотипа АМІ.2 составляет 0,13 (корреляция недостоверна, число пар сравнения равно 17). Следовательно, отбор, направленный на изменение частоты

Материал исследования: описание выборок свиней крупной белой породы

Выборка	Год	Номер выборки	Число особей
Племзавод «Большевик»			
Контрольный откорм. Ферма 1	1988	1	55
Контрольный откорм. Ферма 2	1988	2	113
Хряки	1989	3	95
Всего особей	_	_	263
ЗАО АПК «Иня»			
Свиноматки	2003	4	207
Свиноматки – 10, хряки – 7, поросята – 81	2004	5	98
Контрольный откорм	2005	6	85
Свиноматки	2008	7	49
Ремонтные хряки	2008	8	52
Поросята	2008	9	48
Контрольный откорм	2008	10	31
Свиноматки, продажа в «Чебулинское»	2008	11	37
Свиноматки, хряки, поросята	2009	12	97
Всего особей	_	_	704
ЗАО АПК «Чебулинское»			
Хряки и свиноматки	2006	13	42
Хряки	2007	14	60
Всего особей	_	_	102
ЗАО АПК «Кудряшовское»			
Основные хряки	1998	15	34
Хряки	1999	16	33
Хряки	2000	17	66
Всего особей	_	_	133
Всего		_	1202

данного гаплотипа, либо отсутствует, либо не эффективен. Наблюдаемая на протяжении двух десятилетий выборочная вариация частоты гаплотипа *AM1.2* формируется в результате действия различных факторов и имеет среднее значение, равное 0,34 (табл. 2).

Среди факторов, которые могут влиять на частоту носителей гаплотипа *AM1.2*, можно выделить принадлежность особи к определенной целевой группе (табл. 3). Это обусловлено

тем, что производственные группы различаются по силе и направлению искусственного отбора. Так, группа «поросята» включает особей, которых искусственный отбор коснулся еще незначительно. В группу контрольного откорма входят особи стандартного возраста и живой массы (≈ 2 месяца, ≈ 30 кг). В группу ремонтных хряков попадают животные, лучшие по показателям роста живой массы и развития. Животные основного стада (репродуктивного ядра) уже прошли отбор по интенсивности роста, поэтому для них существенно большее значение приобретает отбор по воспроизводительным качествам.

Оценка принадлежности производственных групп свиней к единой генеральной совокупности по частоте носителей гаплотипа АМ1.2 показала статистически значимую неоднородность $(\chi^2 = 16,90, d.f. = 4, p < 0,01)$, т. е. группы различаются. При сопоставлении производственных групп по частоте носителей гаплотипа AM1.2 нельзя не заметить следующую зависимость. Доля особей с гаплотипом AM1.2 возрастает по направлению от значения в группе «поросята» к значению в группе контрольного откорма и далее к значению в группе ремонтных хряков. Затем у животных основного стада (хряков и свиноматок) частота носителей гаплотипа АМ1.2 падает до уровня, наблюдаемого в группе поросят (табл. 3). Приняв, что белки семейства альфа-макроглобулинов способны влиять на рост живой массы свиней, обнаруженную зависимость можно интерпретировать следующим образом. В целом изменения частоты носителей гаплотипа АМІ.2 полностью совпадают с изменениями интенсивности отбора по росту живой массы. Поросята представляют исходный для популяции уровень, у них отбор по живой массе еще не успел проявить себя в достаточной мере, частота гаплотипа АМ1.2 минимальна. У молодняка контрольного откорма прошел отбор по живой массе в подсосный период и в период доращивания, частота носителей гаплотипа АМ1.2 увеличилась. У ремонтных хрячков прошел более жесткий отбор по интенсивности роста живой массы как в подсосный, так и в послеотъемный периоды; отбор по росту живой массы в период после отъема, частота носителей гаплотипа АМ1.2 опять увеличилась. Основные хряки и свиноматки: отбор по росту
Таблица 2

Встречаемость аллогрупп AM1.2 и AM-.2 среди групп свиней крупной белой породы

Номер	Число	Носители аллогруппы AM1.2		Носители аллогруппы АМ2		Носители гаплотипа АМ1.2	
выборки*	особей	Число	Частота	Число	Частота	Число	Частота
1	55	17	0,31	0	0,00	17	0,31
2	113	31	0,27	1	0,01	32	0,28
3	95	34	0,36	1	0,01	35	0,36
«Большевик»	263	82	0,31	2	0,01	84	0,32
4	207	43	0,21	18	0,09	61	0,29
5	98	60	0,61	1	0,01	61	0,62
6	85	41	0,48	2	0,02	43	0,51
7	49	21	0,43	0	0,00	21	0,43
8	52	27	0,52	0	0,00	27	0,52
9	48	14	0,29	0	0,00	14	0,29
10	31	5	0,16	5	0,16	10	0,32
11	37	9	0,24	0	0,00	9	0,24
12	97	15	0,15	0	0,00	15	0,15
«Иня»	704	235	0,33	26	0,04	261	0,37
13	42	12	0,29	0	0,00	12	0,29
14	60	15	0,25	4	0,07	19	0,32
«Чебулинское»	102	27	0,26	4	0,04	31	0,30
15	34	6	0,18	0	0,00	6	0,18
16	33	9	0,27	0	0,00	9	0,27
17	66	12	0,18	2	0,03	14	0,21
«Кудряшовское»	133	27	0,20	2	0,02	29	0,22
Всего	1202	371	0,31	34	0,03	405	0,34

* Описание выборки см. в табл. 1.

Таблица 3

Частота носителей гаплотипа *AM1.2* в производственных группах свиней крупной белой породы

Производственная	Число	Носители гаплотипа <i>AM1.2</i>		
группа	осооеи	число	частота	
Поросята	48	14	0,29	
Контрольный откорм	171	70	0,41	
Хряки ремонтные	52	27	0,52	
Хряки основные	288	83	0,29	
Свиноматки основные	293	91	0,31	

живой массы окончен, начался интенсивный отбор по воспроизводительным признакам и качеству потомства, частота носителей гаплотипа *AM1.2* снизилась до таковой в группе поросят (табл. 3). Селекционный и производственный циклы замкнулись.

Приняв, что семейство альфа-макроглобулинов связано с ростом живой массы свиней, обнаруженную зависимость можно интерпретировать следующим образом. В период от рождения особи до попадания ее в группу ремонта отбор по показателям роста живой массы является превалирующим. Собственно говоря, если в этот период живая масса особи не будет удовлетворять стандартным требованиям, прописанным в «Инструкции по бонитировке

свиней» (1976), остальные ее признаки могут даже и не рассматриваться. В этот период уровень отобранности животных по интенсивности роста живой массы увеличивается, соответственно, увеличиваются и частоты генетических маркеров, связанных с этим признаком (гаплотипа АМ1.2). После того как особь была переведена в репродуктивное ядро, давление отбора по росту живой массы снижается практически до нуля, так как масса особей основного стада соответствует стандарту племенных свиней. Однако уровень, достигнутый частотами генетических маркеров, в частности гаплотипов альфа-макроглобулинов, при отборе по живой массе в основном стаде, не фиксируется. Причина в том, что меняется вектор отбора, первостепенное значение приобретают признаки воспроизводства и качество потомства. Соответственно, значение приобретает другой набор маркеров (гаплотипов альфа-макроглобулинов). Это приводит к снижению частоты гаплотипа АМ1.2, очевидно, связанного с интенсивностью роста живой массы до уровня, типичного для данной совокупности, который имеет место у поросят. Таким образом, в совокупности свиней крупной белой породы в Новосибирской области на протяжении 20 лет по гаплотипам альфа-макроглобулинов имеет место равновесие Харди-Вайнберга, при котором их частоты у родителей (основные хряки и матки) и потомков (поросята) равны (табл. 3) и, очевидно, являются оптимальными в данном регионе для данной породы. Увеличение частоты гаплотипа АМІ.2 в промежуточных группах особей (контрольный откорм и ремонтный молодняк) - результат селекционной деятельности человека, отбирающего в этот период наиболее интенсивно растущих животных. Однако интенсивный рост особи, ее репродуктивные признаки и качество ее потомства являются показателями в значительной степени независимыми. Поэтому, когда на смену искусственному отбору по интенсивности роста приходит отбор по репродуктивным признакам и качеству потомства (табл. 3), около половины носителей гаплотипа АМІ.2 не переходит из группы ремонта в репродуктивное ядро (основные хряки и свиноматки).

Результаты изучения АМ-полиморфизма двух десятков пород свиней и четырех подвидов дикого кабана (Ермолаев и др., 1991, 2001; Yermolaev *et al.*, 1992; Князев и др., 1999, 2004, 2005; Никитин и др., 2006) дают основания полагать, что в его основе лежит гибридное происхождение современных заводских пород свиней. Зафиксировано документально, что практически все современные породы свиней являются продуктом проводившихся в конце XVIII-начале XIX вв. скрещиваний английских маршевых свиней сначала со средиземноморскими (романскими, неаполитанскими и португальскими), а затем с китайскими, сиамскими свиньями (Кузьмин, 1934). Полученные в результате этой гибридизации английские породы (главным образом беркширская и йоркширская крупная белая) в дальнейшем широко использовались при выведении и совершенствовании европейских континентальных и американских заводских пород (Jones, 1998; The genetics of the pig, 1998). Следует отметить, что участие свиней Юго-Восточной Азии при выведении и совершенствовании крупной белой породы было весьма ограниченным. Основой для нее послужила группа свиней неясного происхождения. С уверенностью можно сказать только, что среди исходных для этой группы форм присутствовали английские и средиземноморские свиньи (Кузьмин, 1934). Участие же свиней Юго-Восточной Азии долгое время находилось под вопросом. Во всяком случае, предпринятое для повышения скороспелости скрещивание свиней исходного для крупной белой породы типа с юго-восточными свиньями привело к неудовлетворительным результатам. Полученные помеси были выделены в отдельную мелкую белую породу и в дальнейшем опять скрещивались с исходным типом крупной белой породы. Результатом этих повторных скрещиваний стала средняя белая порода, которая, как и мелкая белая, не получила широкого распространения (Кузьмин, 1934). Таким образом, вклад свиней Юго-Восточной Азии в генофонд крупной белой породы можно считать минимальным. Однако обращает на себя внимание тот факт, что в аллелофонде крупной белой породы широко представлены АМ-гаплотипы, происходящие из трех географически удаленных регионов, в том числе из Юго-Восточной Азии. Так, АМЗ.4 происходит из Европы; АМ4.5, АМ3.4.5 – из Средней Азии; АМ1.2-из Юго-Восточной Азии и Дальнего Востока (Ермолаев и др., 1991, 2001; Yermolaev et al., 1992; Князев и др., 1999, 2005;

Никитин и др., 2006). Следует особо отметить, что южноазиатская аллогруппа AM1.2, триста лет назад интродуцированная английским свиньям, в течение этого срока, находясь большей частью в гетерозиготном состоянии, не только сохранила целостность, но и с достаточно высокой частотой встречается практически во всех современных породах.

Для домашних свиней характерно существование в локальных популяциях ограниченной, относительно малой численности (хозяйства или племенные заводы), каждая из которых при своем возникновении прошла «бутылочное горлышко» фактически хряков. В такой ситуации длительное поддержание нейтрального полиморфизма весьма сомнительно или практически невозможно (Ли, 1978). Даже при условии ограниченного обмена производителями между хозяйствами чисто случайно в одних локальных популяциях должны были фиксироваться одни гаплотипы, в других – другие. Тем не менее в популяциях домашних свиней и (возвращаясь к теме настоящего исследования) в популяциях свиней крупной белой породы (Новосибирского типа) Новосибирской области полиморфизм по аллогруппе АМ1.2 поддерживается на постоянном уровне.

Для объяснения этого факта можно использовать несколько гипотез. Полиморфизм альфамакроглобулинов (АМ) в форме аллотипии сам по себе имеет адаптивное значение. Молекулы альфа-макроглобулинов имеют множество функций и участвуют во многих физиологических процессах. Учитывая их множественность (OVO-PZP-A2M-A1M), многофункциональность и возможную взаимозависимость, можно предположить, что влияние альфа-макроглобулинов на приспособленность, в том числе и на приспособленность к селекционным требованиям человека, если и есть, то очень расплывчатое и трудно учитываемое. Во всяком случае, наши и не только наши исследования связи АМ-полиморфизма с приспособительными и (или) хозяйственно полезными признаками взаимодействия не выявили.

1. Возможно, что адаптивный селекционный эффект оказывают не гены *A1M* и *A2M*, а тесно сцепленные с ними гены того же семейства, но имеющие более узкую функциональную специализацию (OVO-PZP-AMR). Более того,

для белков семейства альфа-макроглобулинов имеет особый смысл рассуждать о функциональной значимости отдельных генов и белков только при их полном ассортименте, поскольку их конечный функциональный эффект может проявиться только после прохождения всего цикла существования начиная с момента синтеза, через ряд промежуточных этапов, вплоть до полной утилизации того (Shibata *et al.*, 2003).

2. Физиологически важными и объяснимыми ключевыми этапами этого процесса являются специфическое взаимодействие комплекса протеаза-АМ (Sottrup-Jensen, 1989) с рецепторами клеток ретикуло-эндотелиальной системы (Jenner et al., 1998), эндоцитоз этого комплекса (фагосомой), перевод его в лизосомы и последующее разрушение их катепсинами (Shibata et al., 2003). Как минимум два белка и контролирующих их гена этого ключевого этапа – LDLRP6 (Low density lipoprotein receptor-related protein 6-like) и LDLRP1 (Low density lipoprotein receptor-related protein 1-like) участвуют в этом процессе. В контексте данной статьи их правильнее называть AMP – рецепторы AMR. Соответствующие гены (A2M-AMR6), например, находятся на расстоянии 1464606 п.н. от гена А2М, а от гена OVO находятся еще ближе (табл. 4). Частота рекомбинационного разделения генов на расстоянии 1,5 сМ (Rohrer et al., 1996; Коряков, Жимулев, 2009) есть событие довольно редкое. Поэтому можно предположить, что потомкам от родителей передается совместно не только комплекс генов семейства АМ, фиксируемый нами в виде гаплотипов, но и рядом расположенные, функционально связанные с ними гены AMR. Такая объединенная конструкция представляет собой расширенный гаплотип или гаплоблок. Мутации, вызывающие изменения в С-концевом домене белковой части молекул АМ, могут влиять на их конформацию, что может мешать распознаванию молекулы АМ соответствующим белком-рецептором AMP (Jenner et al., 1998). Соответственно, молекула АМ не утилизируется, баланс в крови нарушается. Изменения в рецептивном домене АМ-рецептора может нарушать его взаимодействие с АМ, что также может приводить к нарушению кровяного гомеостаза. Изменения в разных генах могут давать одинаковый физиологический эффект. Несоответствие одного другому может резко

Таблица 4

Монн	IIIudop	Knotkog upppgung	Поколизония	Corroquia OTI
1	100027020			
	10003/939	APOBEC3F	6139943=6147251	PKV
2	100518/82	Hox-C12	20290694=20292313	BF17W
	100518969	13	20401064=20408476	WT
	100519145	13	17521650=17525089	BF40K
	100154759	C4	20828233=20831105	BF60K
	100152207	<u>C5</u>	20849424=20850792	
3	100524142	OLF6C2 (≈ 100 генов)	20004544=21754841	ADG1
	100523604			ADG2
4	100519255	LDLR 1(AMR1)	21407020=21414084	
	100519427		21414586=21428033	
	100519774		21532192=21545626	
	100514839		24833814=24957373	
5	100515609	LDLR-6 (AMR6)	61661586=61714395	ADG
	100515436	LDLR-6(AMR6)	57276301=57344044	LUMBBF
	100515777	LDLR-4(AMR4)	61839282=61982865	WT
6	100156946	Taste 2-42	62124059=62125009	ADG
	100154902	2-20	62161108=62162022	LUMBBF
	100517944	2-10	62197132=62198064	WT
	100522490	2-7	62207593=62208510	ADG
	100522317	2-9	62213188=62213748	
	100522867	2-8	62233708=62234643	
	100523063	2-7	62236822=62237755	
	100523246	2-8	62242111=62243049	
7	100524679	OVO	63447471=63494196	
8	100153288	PZP	63586394=63632958	
9	ID 303166	A2M	63674312=63719791	
10	100155344	hPH1	63742873=63765807	
11	100152492	A1M	63790176-63878286	ADG
				LUMBBF
				WT
				ADG
12	100526050	APOBEC-1	64068213=64065578	PRV
13	100516195	OLF 8S1-like	73786964=73787893	ADG
	100519092		74366603=74367538	LUMBBF
				WT
				ADG
14	100519257	OLF 8S1-like	81140635=81141585	
	100516735		80846729=80847688	
15	100153269	МҮF6 (геркулин)	103338282=103340139	LRIBBF WT
				21DWT
				BFT

Локализация структурных генов и некоторых QTL-локусов в хромосоме 5 свиньи по номенклатуре NCBI Sus scrofa 10

Примечание. Сокращения, терминология и смысл QTL (quantitative trait loci) генов, оказывающих влияние на проявление полиморфизма количественных признаков хромосомы 5 (Lee *et al.*, 2003): 21DWT – вес тела в 21 день, фактически при отъеме и переходе на смешанный тип питания. Вес особи 8 кг. Молочность самки. Молочный потенциал самки.

PRV – устойчивость – воспримчивость к вирусу псевдобешенства. APOBEC – комплекс ферментов цитидил деаминазы – APOBEC (редактор длинных последовательностей PHK). BF17W – backfat 17 weeks of age – толщина шпика в 119 дней. Однозначно коррелирует с понятием «достижение веса 100 кг». Учитываемый признак. ADG – average daily gain – средний прирост веса в разные периоды. Имеет смысл дифференцировать при необходимости: ADG1, ADG 2 – от отъема до 25 кг; ADG 3 – прирост от рождения до 21 дня; ADG 4 – прирост от 70 до 154 дня; ADG 6 – от отъема до 20 кг. WT – body weight – вес тела в разном возрасте. BF – back fat – толщина шпика. Оценивается в разном возрасте и на разных позвонках. LUMBBFF – толщина шпика на пояснице. BFT – average back fat thickness – средняя толщина шпика.

влиять и на соотношение некоторых вариантов в крови. Разобраться, в чем причина, можно, только при анализе системы AM-AMP как единого целого. Генетически многократная повторяемость тех и других в форме мультигенных семейств, а также неизбежная гетерозиготность могут нивелировать эффекты уклонений, сводя все к нулю, т. е. к мягкому эффекту, не учитываемому в селекции. Структурный полиморфизм есть, но понять, как он реализуется на физиологическом уровне, невозможно. В то же время благоприятными могут быть только изменения, коадаптированые друг к другу.

Можно предположить, что между генами АМ и генами-рецепторами белков АМ есть два вида взаимосвязей. Во-первых, это физически близкое расположение. Во-вторых, между отдельными членами двух семейств может осуществляться жесткая структурнофункциональная зависимость по типу эффектор-рецептор, ключ-замок, когда изменение в одном звене ведет к изменению всей системы. Если комплементарность нарушается, вся система не функционирует. Понятно, что такие комбинации должны отметаться отбором, как естественным, так и искусственным. И не имеет значения, где именно в системе произошел сбойпара элиминируется совместно, выживают только совместимые мутации генов. Консервативность затрагивает не только участки генов, но и хромосомные районы. Это может быть одной из основ неравновесия по сцеплению и может объяснять различие между физической и рекомбинационной картой отдельных участков хромосом. В данном случае уменьшать рекомбинационное расстояние между АМ-АМР, т. е. создавать видимость того, что они находятся ближе друг к другу, чем это есть на самом деле. В случае пары AM–LDLRP1 (ProLow density lipoprotein receptor-*related* protein 1-like), третий тип AMR, такая связь может распространяться почти на 40 000 000 п.н. (табл. 4), т. е. соответствующий гаплоблок охватывает более трети хромосомы.

Весьма вероятно, что АМ-гаплотипы могут подвергаться селекции за счет эффектов расположенных рядом генов (табл. 4). Так, непосредственно между генами А1М и А2М располагается ген, определяющий особенности ранних этапов роста и развития (Early development regulatory protein - Polyhomeotic-like protein 1 (*hPH1*). Рядом с АМ-генами находится функционально полиморфный ген цитидил деаминазы, АРОВЕС, обеспечивающий защиту от эндогенных ретровирусов (Dorrschuck *et al.*, 2011). Селективное значение имеют еще два локуса, находящиеся на разных концах хромосомы 5. Это QTL, определяющий основные параметры прироста живой массы в ранний постнатальный период (геркулин), привязываемый к гену MYF6 (Miogenic Factor), и QTL (HOX), определяющий фактически те же параметры, но в более поздний период, который находится на другом конце хромосомы. Таким образом, оказывается, что АМ-комплекс расположен между двумя QTL, отвечающими за рост живой массы, и при этом содержит внутри себя ген *hPH1*, отвечающий за рост и развитие.

Кроме уже перечисленных, представляют интерес и другие комплексы генов. Среди селекционно значимых комплексы генов хромосомы 5 выглядят следующим образом (табл. 4): на разных концах хромосомы на расстоянии 76000000 п.н. друг от друга находятся гены, эффект которых явно учитывается при селекции и которые по своей функции относятся к транскрипционным факторам (HOX-MYF). На расстоянии 30 000 000 п.н. от гена геркулина (MYF), в сторону центромеры, находится еще один кластер генов, влияющих на ранние этапы дифференцировки и развития *hPH1*. На расстоянии 20 000 000 п.н. от геркулина и 10 000 000 п.н. от АМ находится семейство рецепторов запаха родопсинового типа, т. е. имеющих родство

с рецепторами зрительного восприятия. В непосредственной близости от семейства АМ находятся гены LDLR6-1464606-AM-189 945-АРОВЕС-1, которые связаны с ним функционально. Между A2M и LDLR6 располагается семейство генов рецепторов вкуса, определяющих, в частности у животных, восприятие горького вкуса и, как следствие этого - рвотный рефлекс. Еще одно подсемейство генов рецепторов АМ и LDLR1(AMP1) располагается рядом с семейством рецепторов запаха (OLFACTORY), а именно с тем из них, которое предопределяет адаптацию животных к смене типа питания и социальной среды (ADG1, ADG2). Рецепторы вкуса и запаха, несомненно, имеют общее эволюционное происхождение и представляют собой довольно сходные белки размером около 300 аминокислотных остатков. В хромосоме 5 свиньи эти последовательности представлены минимум четырьмя кластерами, что вряд ли является случайным (табл. 4). Возможно, что между генами и белками этого надсемейства существует функциональная коадаптация. Запах еды и ее вкус могут влиять на процессы пищеварения и усвояемости пищи. Феромоны, вернее, их восприятие, могут оказывать явный эффект на поведение животных, а особенности поведения косвенно могут сказываться на селекционно значимых признаках.

Так как современные заводские породы, в том числе крупная белая, имеют гибридное происхождение, в генофонде 5-й хромосомы могло сохраниться разнообразие предковых генов не только АМ-семейства, но и других локусов. Коадаптированность некоторых генов должна была препятствовать их рекомбинационному разделению. Поэтому наблюдаемая в АМ-семействе в форме гаплотипов передача в ряду поколений определенных сочетаний могла охватывать более крупные отрезки хромосомы гаплоблоки, размер которых, вероятно, может достигать 3/4 длины хромосомы, если судить по генам QTL гомеобокса и миогенному гену геркулина. Причем целостность на разных участках может поддерживаться за счет коадаптации генов разных семейств. АМ-АМ-рецептор являет собой пример достаточно правдоподобной и вполне доказуемой связи и механизма поддержания рекомбинационной целостности гаплоблока. Очевидно, что между тесно сцепленными генами и их комплексами существует чисто генетическая связь, определяемая их физической близостью. Чем меньше расстояние между генами, тем вероятнее их совместная передача в следующее поколение. В некоторых случаях наблюдаемое рекомбинационное расстояние может уменьшаться по отношению к физическому расстоянию (Lee et al., 2003). Происходит это за счет либо существования структурно-функционального соответствия типа AM-AMR-рецептор, либо участия в общем процессе, например, защите от вирусных инфекций. Видно также, что функциональная связь АМ-АМ-рецептор может распространяться иногда на очень большое расстояние, почти на 40 000 000 п.н., что является фактическим пределом, который может быть зафиксирован гибридологическим анализом. Взаимоотношения между вкусовыми и запаховыми генами рецепторов также могут быть коадаптированы. Запах и вкус пищи могут однозначно соотноситься в нервной системе с ее приятностью и полезностью, создавать или не создавать хороший аппетит, определять усвояемость еды. Соответствующее благоприятное сочетание аллелей в разных генах может закрепляться отбором и передаваться по наследству в виде гаплоблоков, которые могут охватывать участок хромосомы почти в 40 000 000 п.н.

Для того чтобы понять, как работает этот механизм в принципе, необходимо вновь вернуться к генезису заводских пород свиней, и в частности к крупной белой породе. Как уже отмечалось, в ее генофонде четко проявляется присутствие АМ-гаплотипов из трех географически удаленных источников. Можно полагать, что это относится не только к генам семейства АМ, но и другим генам 5-й хромосомы. У каждого основного подвида кабана (европейского, среднеазиатского, восточноазиатского), за время их раздельного существования наверняка должен был сформироваться свой аллелофонд по каждому из селективно значимых генов хромосомы 5 (табл. 4) наряду с исходно общим. Естественно, у европейских кабанов он был одним, а у азиатских форм, обитающих в других условиях, мог быть другим. При выведении и совершенствовании крупной белой породы селекционеры отбирали животных с определенным набором качеств. Скорость роста и полового созревания, многоплодие и интенсивность жироотложения, очевидно, заимствованы от азиатских предков. Крупные размеры, особенности телосложения, качество сала и мяса, приспособленность к условиям европейского климата, кормовые предпочтения и т.п. – от английских аборигенных свиней. Вероятно, некоторые присущие исходным формам аллельные сочетания различных генов сохраняются в генофонде крупной белой породы в результате естественного и искусственного отбора. Например, естественный отбор должен поддерживать сочетания комплекса генов АРОВЕС, препятствующие ретровирусному распространению. Искусственный отбор, очевидно, играет не менее значительную роль. Принятая для заводских пород стандартизация племенных свиней по весьма обширному комплексу признаков (Инструкция ..., 1976), контролируемых рядом различных генов, коадаптированных в виде гаплоблоков, должна поддерживать гаплоблоки, чье действие проявляется в виде удовлетворяющих стандартам породы комплексов признаков. Систематически возникающие в результате рекомбинации сочетания признаков, не соответствующие стандарту породы, будут жестко отсекаться стандартизирующим отбором (Князев, Никитин, 2011), и подобные рекомбинанты никогда не попадут в репродуктивное ядро популяции. Таким образом, стандартизирующий отбор может поддерживать целостность селективно ценных гаплоблоков неопределенно долгое время не за счет снижения рекомбинации, а за счет исключения рекомбинантов из состава популяции, породы, домашней формы вида Sus scrofa.

А теперь вернемся к хромосоме 5, которая содержит, кроме генов семейства альфа-макроглобулинов, целый ряд генов (табл. 4), чье проявление у особи в виде признака попадает в сферу действия стандартизирующего отбора в силу того обстоятельства, что они прямо или косвенно влияют на хозяйственно ценные признаки. Эти гены расположены как поблизости от концов хромосомы, так и в ее центральной части (табл. 4). В принципе совместное действие естественного и стандартизирующего отборов может поддерживать в породе целостность и константность содержимого нескольких вариантов 5-й хромосомы, происходящих от разных, исходных для данной породы, форм свиней. Так как гены семейства альфа-макроглобулинов расположены в центральной части 5-й хромосомы рядом с селективно значимыми генами, полиморфизм АМ-системы приобретает фиксированный характер и будет совпадать с полиморфизмом по поддерживаемым отбором вариантам хромосомы 5.

Литература

- Ермолаев В.И., Мирцхулава Э.Г., Митичашвили Р.С. и др. О результатах международного сравнительного испытания реагентов к аллотипам сывороточных белков свиньи, проведенного в 1988 г. // Генетика. 1990. Т. 26. № 5. С. 956–957.
- Ермолаев В.И., Мирцхулава Э.Г., Савина М.А. и др. О гомологии Lpm-системы аллотипов американской норки и Gp-системы аллотипов домашней свиньи // Генетика. 1991. Т. 27. № 2. С. 304–315.
- Ермолаев В.И., Савина М.А., Горелов И.Г. и др. Характеристика некоторых пород свиней и популяций дикого кабана Грузии и Западной Сибири по иммуногенетическим системам сывороточных белков крови // Генетика. 2001. Т. 37. № 5. С. 631–637.
- Животовский Л.А. Популяционная биология. М.: Наука, 1991. 272 с.
- Инструкция по бонитировке свиней. М.: Колос, 1976. 17 с.
- Князев С.П., Ермолаев В.И., Горелов И.Г., Савина М.А. Динамика и генетическая обусловленность трансформации аллогрупп, системы альфа-макроглобулинов в разных популяциях домашних свиней // Генетика. 2000. Т. 36. № 4. С. 527–532.
- Князев С.П., Никитин С.В. Стандартизирующий отбор и его последствия для генетической структуры популяции // Генетика. 2011. Т. 47. № 1. С. 103–114.
- Князев С.П., Никитин С.В., Горелов И.Г. и др. Ассоциации генетических маркеров в двух родственных породах свиней // Генетика. 1999. Т. 35. № 5. С. 674–680.
- Князев С.П., Никитин С.В., Кириченко А.В. и др. Дифференциация диких и домашних свиней по аллотипам белков сыворотки крови // С.-х. биология. 2005. № 6. С. 100–105.
- Князев С.П., Никитин С.В., Савина М.А. и др. Дрейф генов как фактор дифференциации внутрипородных популяций свиней // Докл. РАСХН. 2004. № 2. С. 35–38.
- Коряков Д.Е., Жимулев И.Ф. Хромосомы. Структура и функции. Новосибирск: СО РАН, 2009. 256 с.

- Кузьмин С.Л. Разведение и породы свиней с основами генетики. М.; Л.: Гос. изд-во с.-х. и колх. лит-ры, 1934. 226 с.
- Ли Ч. Введение в популяционную генетику. М.: Мир, 1978. 556 с. (Ching Chung Li First course in population genetics. The Boxwood Press Pacific Grove, California. 1976).
- Никитин С.В., Князев С. П., Николаев А.Г. и др. Разнообразие популяций диких и домашних свиней по комплексу аллотипов сыворотки крови // Генетика. 2006. № 3. Т. 42. С 403–413.
- Bijttebier J., Tilerman K., Dhaenens M. *et al.* Comparative proteome analysis of porcine follicular fluid and serum reveals that excessive alpha(2)-macroglobulin in serum hampers successful expansion of cumulusoocyte complexes // Proteomics. 2009. V. 9. N 19. P. 4554–4565.
- Dorrschuck E., Fischer N., Bravo I.G. *et al.* Restriction of porcine endogenous retrovirus by porcine APOBEC3 cytidine deaminases // J. Virol. 2011. V. 85. N 8. P. 3842–3857.
- French K., Yerbury J.J., Wilson R.R. Protease activation of alpha-2-macroglobulin modulates a chaperonelike action with broad specificity // Biochemistry. 2008. V. 47. N 4. P. 1176–1185.
- Ireland J.L., Jimenez-Krassel F., Winn M.E. *et al.* Evidence for autocrine or a paracrine roles of alpa-2macroglobulin in regulation of estradiol production by granulose cells and development of dominant follicles // Endocrinology. 2004. 145. V. 6. N 5. P. 595–604.
- Janik A., Hojny J., Duniec M. Allotype polymorphism of serum globulins (Gp-system) in pigs // Anim. Blood Groups Biochem. Genet. 1983. V. 14. N 2. P. 63–70.
- Jenner L., Husted L., Thirup S. *et al.* Crystal structure of receptor-binding domain of alpha-2-macroglobulin // Structure. 1998. V. 6. N 5. P. 595–604.
- Jones G.F. Genetic aspects of domestication, common breeds and their origin // The Genetic of the Pig / Eds M.F. Rothschild, A. Ruvinsky. Oxon, UK. CAB International, 1998. P. 17–50.

- Lee S.S., Chen Y., Moran C. *et al.* Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 5 // J. Anim. Breed. Genet. 2003. Suppl. 1. 120. P. 38–44.
- NCBI Sus scrofa 9.2. 2010. http://www.sanger.ac.uk/ Projects/S_scrofa/
- Ozawa D., Hasegawa K., Lee YH. *et al.* Inhibition of beta-2-microglobulin amyloid fibril formation by alpha-2-macroglobulin // J. Biol. Chem. 2011. V. 286. N 11. P. 9668–9676.
- Petersen C.M. Alpha-2-macroglobulin and pregnancy zone protein. Serum levels, alpha-2-macroglobulin receptors, cellular synthesis and function in relation to immunology // Dan. Med. Bull. 1993. V. 40. N 4. P. 409–446.
- PGSP (Porcine Genome Sequencing Project). Sus scrofa 10. 2011. http://www.sanger.ac.uk/Projects/ S scrofa/
- The Genetics of the Pig / Eds M. Rotshild, A. Ruvinsky. N.Y., 1998 (The Genetic of the Pig / Eds M. Rotshild, A. Ruvinsky. Oxon, UK. CAB International, 1998).
- Rohrer G.A., Alexander L.J., Hu Z. *et al.* A comprehensive map of the porcine genome // Genome Res. 1996. 6. P. 371–391.
- Shibata M., Sakai H., Oramoto K. *et al.* Disruption of structural and functional integrity of alpha-2-macroglobulin by cathepsine E // Eur. J. Biochem. 2003. 270(6). P. 1189–1196.
- Sottrup-Jensen L. Alpha-2-macroglobulin: structure, shape, and mechanism of protease complex formation // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. N 20. P. 11539–11542.
- Tortorella M.D., Arner E.C., Hills R. *et al.* Alpha-2-macroglobulin is a novel substrate for ADAMTS-4 and ADAMTS-5 and represents an endogenous inhibitor of these enzymes // J. Biol. Chem. 2004. 279(17). P. 17554–17561.
- Yermolaev V.I., Mirtshulava E.G., Savina M.A. *et al.* A comparative study of the homologous Lpm-system allotypes of alpha-macroglobulins in American mink and Gp-system allotypes of alpha-macroglobulin in domestic pig // Anim. Breed. Genet. 1992. V. 109. P. 42–50.

STUDY OF THE SWINE ALPHA-MACROGLOBULIN GENE FAMILY POLYMORPHISM IN THE CONTEXT OF SOME PROBLEMS OF ANIMAL BREEDING

V.I. Yermolaev¹, M.A. Savina¹, S.P. Knyazev², N.S. Yudin¹, R.B. Aitnazarov¹, V.A. Bekenev³, V.S. Deeva³, S.V. Nikitin¹

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: ermolaev@bionet.nsc.ru; ² Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia, e-mail: knyser@rambler.ru; ³ Siberian Research Institute of Animal Husbandry, Russian Academy of Agricultural Sciences, Krasnoobsk, Russia, e-mail:sibniij@ngs.ru

Summary

Long-term screening of Siberian populations of the Large White pig breed has been performed using a set of allotypic markers of the alpha-macroglobulin system (AM). An effect of differentiating selection on AM haplotypes, namely, on the presentation of the AM1.2 haplotype, controlling the polymorphism of closely linked genes (A1M and A2M), was detected in animals of different breeding and producing groups. It is suggested that this process may involve other genes, both present in a short haplotype of pig chromosome 5 and linked to this haplotype by structural and functional coadaptivity:

1. A cluster of eight genes for taste perception receptors (TASTE), located directly between the *AMR6-A2M* genes.

2. Four clusters of more than 100 genes for olfactory signal receptors (OLFACTORY), which appear to be coadapted with TASTE genes.

3. Two functionally polymorphic genes for cytidine deaminase (*APOBEC3 – APOBEC3F*), flanking the *AM-AMR1* region and predetermining the resistance to retroviral infections.

4. At least two QTL-loci (21DWT and BF60K), which define same morphometric parameters at different developmental stages of piglets and are associated with the homeobox and herculin genes (MYF6 - HOX) genes, respectively, at different ends of the chromosome. The haploblocks partially overlap in various combinations, and the tightest overlap is recorded in the region of the AM family. It is assumed that the vectors of selection for each of the haploblocks are differently directed. The selection concerns large tracts of the chromosome rather than individual genes or gene families. The compositions and allele sets of these tracts are balanced by natural selection and long-term animal breeding.

Key words: pig blood alpha-macroglobulin family, the complex of genes, *OLF-A1M-AM2-PZP-OVO-TASTE-AMR-OLF*.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ХРОМАТИНА В ЯДРАХ РАСТУЩИХ ООЦИТОВ *XENOPUS LAEVIS*

К.Н. Морозова, А.А. Струнов, Е.В. Киселева

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

Проведено комплексное ультраструктурное исследование распределения хроматина в ядрах ооцитов *Xenopus laevis* на 3-й стадии роста. С использованием модифицированного метода выделения ядер из ооцитов и высокоразрешающей сканирующей электронной микроскопии установлено, что хроматин в ооцитах амфибий слабо связан с актинсодержащими филаментами и не взаимодействует непосредственно с ядерной оболочкой. С помощью иммуноэлектронной микроскопии выявлено присутствие белка LAP2β на хроматиновых фибриллах, свидетельствующее о возможном временном прикреплении хромосом к ламине ядерной оболочки. Впервые продемонстрировано стабильное и прочное взаимодействие хроматина с тельцами Кахала, содержащими комплекс сплайсосомных белков. Полученные данные свидетельствуют о специфическом распределении и взаимодействии хроматина с внутриядерными структурами в растущих ооцитах амфибий. Предложена схема организации внутриядерного пространства ооцитов амфибий.

Ключевые слова: хроматин, тельца Кахала, ядерная оболочка, ооциты амфибий, сканирующая и просвечивающая электронная микроскопия.

Введение

Особенности организации интерфазного ядра в трехмерном пространстве, взаимодействие и динамика его индивидуальных компартментов, не имеющих, в отличие от цитоплазматических органелл, оболочек, интенсивно исследуются в настоящее время, поскольку это расширяет наши представления о механизмах регуляции экспрессии генов. В ядре различают хромосомные территории и межхромосомное пространство, по которому диффундируют макромолекулярные комплексы, необходимые для репликации, транскрипции, сплайсинга и репарации ДНК (Cremer, Cremer, 2001).

С использованием гибридизации *in situ* и многоцветного бэндинга (Multi Color Banding) показано, что в соматических клетках индивидуальные хромосомы занимают различные участки и радиально распределены во внутриядерном пространстве (Cremer, Cremer, 2010). Хромосомы, обедненные генами, как правило, выявляются на периферии ядра в отличие от центрально расположенных хромосом с большим числом кодирующих последовательностей. Хромосомные территории могут изменять свою организацию как в разных клетках одного организма, так и в ответ на различные внешние воздействия. Продемонстрирована эволюционная консервативность подобного расположения интерфазных хромосом (Tanabe *et al.*, 2002), однако пока точно не установлено, что определяет специфичность их местонахождения (Geyer *et al.*, 2011). Предполагается, что большую роль в этом играют компоненты внутриядерного матрикса, связь с которыми осуществляется с участием так называемых SAR/MAR (Scaffold/ Matrix attachment regions) последовательностей ДНК (Chattopadhyay, Pavithra, 2007).

На срезах интерфазных ядер соматических клеток конденсированный и обедненный генами хроматин располагается, как правило, по периферии ядра и тесно контактирует с внутренней мембраной ядерной оболочки (Кореспу́, Fakan, 1992). При электронно-микроскопическом исследовании глыбок компактного хроматина внутри ядра транскрипционно активные домены определяются преимущественно на его поверхности, а внутри локализуются участки, содержащие молчащие гены (Koberna *et al.*, 2002).

Белковый состав внутриядерного матрикса гетерогенен и сильно зависит от способов и условий его выделения (Zbarsky, Georgiev, 1959; Georgiev, Chentsov, 1962; Bereznev, Coffey, 1977; Nickerson, 2001). В составе ядерного матрикса после удаления из ядер ДНК, РНК и гистонов выявляются ламины, топоизомераза II, остаточные ядрышки, белок В23, а также некоторые РНК-связывающие и негистоновые белки, формирующие сеть микрофиламентов различного диаметра (Berezney et al., 1995). Недавно продемонстрировано наличие специфических белков на поверхности метафазных хромосом, которые, возможно, имеют отношение к белкам внутриядерного матрикса (Мурашева, Ченцов, 2010). К белкам ядерного матрикса относят также ДНК-связывающие белки – матрины, которые в комплексе с ламинами могут определять локализацию хромосом в интерфазном ядре и формировать гранулярно-фибриллярную сеть во внутриядерном пространстве (Erazo et al., 2011). Показано, что в процессе митоза белки ядерного матрикса вместе с белками ядерной оболочки могут принимать участие в регуляции формирования микротрубочек веретена деления и в перемещении метафазных хромосом (Johansen et al., 2011). В ядре также обнаружены актин и миозин, участвующие в регуляции транскрипции и биогенезе прерибосомных субъединиц (Castano et al., 2010; Obrdlik et al., 2010).

Ядерная ламина, входящая в состав ядерного матрикса, формирует сеть промежуточных филаментов, прилегающих к внутренней мембране ядерной оболочки, и через ламинсвязывающие домены ДНК (Guelen et al., 2008) вместе с белками внутренней мембраны ядерной оболочки участвует в регуляции репликации и транскрипции, а также определяет расположение интерфазных хромосом в трехмерном пространстве ядра (Towbin et al., 2009; Kind, van Steensel, 2010). Ядерные поровые комплексы (ЯПК) могут также взаимодействовать с ДНК (Liang, Hetzer, 2011), но это чаще всего регистрируется либо в нуклеоплазме, либо на филаментах, отходящих от баскет-структуры ЯПК, а не на индивидуальных компонентах пор (Arlucea et al., 1998; Capelson et al., 2010; Kalverda et al., 2010).

Характерным свойством ядра является наличие большого количества мобильных сферических телец, представляющих скопления специфических белков, участвующих в регуляции различных внутриядерных процессов (Lamond, Spector, 2003; Hancock, 2004). Среди них наиболее изученными являются ядрышки, представляющие центры синтеза рибосомальных РНК, и тельца Кахала, обеспечивающие процессинг мРНК и содержащие сплайсосомные белки в высокой концентрации, а также РНК-полимеразу II и многие транскрипционные факторы (Gall, 2003; Степанова и др., 2007). Характерным признаком телец Кахала является челночный белок коилин, способный доставлять к ним различные молекулярные комплексы (Cioce, Lamond, 2005).

Ооциты амфибий, благодаря своим крупным размерам, представляют удобный объект для исследования архитектуры ядра и динамической организации внутриядерных компартментов. Они были успешно использованы для изучения функциональной морфологии хромосом типа ламповых щеток (Красикова, Гагинская, 2010), а также анализа структуры хроматина и оценки уровня экспрессии генов (Sommerville, 2010). В огромном ядре ооцита Xenopus laevis содержится несколько тысяч ядрышек и сферических телец, среди которых большое количество телец Кахала (Callan et al., 1991). Показано, что в составе телец Кахала ооцитов амфибий выявляется, помимо сплайсосомных белков и коилина, высокая концентрация U7 мяРНК и других факторов, вовлеченных в процессинг гистоновой пре-мРНК (Wu, Gall, 1993; Abbott et al., 1999).

Использование высокоразрешающей сканирующей электронной микроскопии в сочетании с модифицированными методами изоляции ядер из ранних ооцитов *X. laevis* обеспечило существенный прогресс в изучении структурно-функциональной организации ядра и его индивидуальных компонентов (Kiseleva *et al.*, 1996, 2007; Goldberg *et al.*, 1997; Stick, Goldberg, 2010). В ядрах этих клеток была обнаружена сеть актинсодержащих филаментов, контактирующих с ядерной оболочкой и поровыми комплексами (Parfenov *et al.*, 1995; Kiseleva *et al.*, 2004). В работе с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии было продемонстрировано радиальное распределение хромосом в ядре растущих ооцитов птиц (Маслова, Красикова, 2011). Это свидетельствует о том, что ооциты представляют удобную модель для изучения взаимного распределения индивидуальных компонентов ядра и его трехмерной организации.

В настоящей работе впервые с использованием высокоразрешающей сканирующей электронной микроскопии проведено исследование особенностей расположения и связывания хроматина с ядерной оболочкой, внутриядерными филаментами и тельцами Кахала в ранних ооцитах *X. laevis*.

Материалы и методы

Объектом исследования служили ооциты шпорцевых лягушек *X. laevis*. Амфибий содержали в профильтрованной и аэрированной воде при комнатной температуре. Животных усыпляли хлороформом, яичники с ооцитами выделяли из вскрытой брюшины и переносили в раствор Рингера для амфибий: 17мМ NaCl, 5мМ KCl и 1мМ CaCl₂ (Kiseleva *et al.*, 2004). Ооциты на ранней (2-й) стадии развития идентифицировали по размерам и пигментированности согласно классификации Дьюри (Dumont, 1972). Изолированные ядра выделяли по ранее описанной методике (Kiseleva *et al.*, 2004).

Просвечивающая электронная микроскопия

Для электронно-микроскопического анализа ооциты фиксировали 2,5%-м раствором глутаральдегида в 0,1 М НЕРЕЅ-буфере pH = 7,4 (Sigma, США) в течение 1 ч при комнатной температуре, затем дофиксировали в 1%-м растворе тетраоксида осмия («Аурат», Россия) на буфере НЕРЕЅ в течение 1 ч при 4°С. После фиксации образцы отмывали в дистиллированной воде, обезвоживали, заключали в смолу Агар-100 (Agar Scientific, Англия) и полимеризовали в термостате при 60°С (Морозова, Киселева, 2006).

Для визуализации внутриядерных актиновых филаментов в просвечивающем электронном микроскопе использовали метод фиксации ооцитов по Parfenov с соавт. (1995). Ультратонкие срезы толщиной около 50–70 нм получали с помощью алмазного ножа на ультрамикротоме Ultracut (Reichert, Австрия) и контрастировали растворами уранилацетата и цитрата свинца (Serva, Германия). Окрашенные ультратонкие срезы изучали в электронном микроскопе LEO 910 (Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Сканирующая электронная микроскопия

Яичники удаляли хирургически и помещали в раствор Рингера для амфибий (111 мМ NaCl, 1,9 MM KCl, 1,1 MM CaCl₂, 2,4 MM NaHCO₃ (Kiseleva et al., 2004). Маленькие кусочки яичника помещали в чашку Петри с буфером А (83 мМ KCl, 17 мМ NaCl, 10 мМ Hepes, 250 мМ сахарозы, 3 мМ (или 0,3 мМ) MgCl₂, pH = 7,4). Кремниевые чипы, предварительно покрытые полилизином, размещали в той же чашке рядом с ооцитами. Все растворы держали на льду. Ооциты X. laevis на 2-й стадии развития идентифицировали по диаметру (около 400 мкм) и светло-коричневой окраске. Стадия 2 оогенеза была выбрана по причине высокой активности транскрипции в этот период, и поскольку изоляция ядер происходит легче и быстрее, чем на стадии 6, вероятно, из-за меньшего количества желточных гранул на стадии 2. Ядро каждого ооцита выделяли вручную с помощью стеклянных игл, после чего осторожно и быстро освобождали его от окружающей цитоплазмы. Два или три изолированных ядра переносили на расположенную рядом кремниевую пластинку (чип), а их ядерные оболочки аккуратно открывали с помощью стеклянной иглы. Для получения распластанного содержимого ядра нуклеоплазму слегка прижимали стеклянной иглой и осторожно слегка растягивали по поверхности чипа. Как в случае слегка распластанных, так и «интактных» образцов, чипы фиксировали и проводили в охлажденных на льду растворах: перенос чипов из чашки в чашку осуществляли, не допуская высыхания, каплю предыдущего раствора оставляли на чипе. Образцы фиксировали в течение 10 мин в растворе, содержащем 2%-й глутаральдегид (Sigma, США), 0,2%-ю таниновую (tannic) кислоту, 10 мМ трис HCl (pH = 7,4) и 3 мМ MgCl₂ (фиксатор А). Важно отметить, что время,

проходящее от изоляции ядер до помещения их в фиксатор, не превышало 5-10 с. Фиксированные образцы подвергали постфиксации в 1 %-м растворе OsO₄ в течение 30 мин, промывали в 2 сменах дистиллированной воды, окрашивали 20 мин в 1 %-м уранилацетате, обезвоживали в этиловом спирте и подвергали высушиванию в критической точке, используя ацетон в качестве переходного растворителя. Затем образцы напыляли слоем хрома толщиной 4 нм, используя напылитель Edwards Auto 306 (UK) с криовакуумной системой, и изучали в высокоразрешающем сканирующем микроскопе DS 130F feSEM (Japan) при ускоряющем напряжении 30 кВ. Для подсчета контактов хроматина с ядерной оболочкой, внутриядерными филаментами и сферическими тельцами исследовали случайно выбранные участки периферии открытых ядер со слегка распластанным содержимым на малом увеличении (см. рис. 1, б в качестве примера). Всего было проанализировано по одному участку размером 12×20 мкм для каждого из 10 ядер, выделенных из ранних ооцитов.

Для проверки прочности связывания ДНК с внутриядерными структурами после вырезания большого фрагмента ядерной оболочки стеклянными иголками, покрытыми полилизином, прикасались к хроматиновым фибриллам и через сформированное отверстие вытягивали хроматин из внутреннего объема ядра, после чего ядро раскрывали полностью и быстро фиксировали образец потоком фиксатора А для сохранения нативной конформации внутриядерных структур. Далее образцы обрабатывали и подготавливали согласно вышеописанной методике для сканирующей электронной микроскопии. В электронном микроскопе анализировали контакты остаточных хроматиновых фрагментов с ядерной оболочкой, внутриядерными филаментами и сферическими тельцами.

Иммуногистохимия

Для иммуногистохимических исследований использовали коммерческие антитела к актину (Sigma, CША), антитела Y-12, узнающие эпитопы 6 сплайсосомных белков (Pettersson *et al.*, 1984), а также поликлональные антитела к LAP2 β (Lang, Krohne, 2003). Ядра ооцитов *X. laevis* на 2–3-й стадии выделяли вручную, как описано выше. Затем их фиксировали 15 мин при 22-24 °С в 3,7 %-м формальдегиде, 3 мМ MgCl₂, 0,2%-й таниновой кислоте и 10 мМ трис HCl (pH = 7,0). Зафиксированные образцы отмывали 3 раза (по 1 мин каждый) в солевом фосфатном буфере (PBS), затем инкубировали 30 мин в PBS, содержащем 1 %-й бычий сывороточный альбумин (BSA), отмывали в PBS и инкубировали 1-3 ч с первичными антителами против актина, сплайсосомных белков или LAP2_β (разведение 1:100) в PBS. Затем образцы отмывали 3 раза в PBS, после чего инкубировали 1 час с вторичными антителами, меченными золотом (диаметр частиц – 10 нм) (Amersham, Великобритания). В качестве отрицательного контроля использовали меченые золотом вторичные антитела, разведенные в PBS 1:20. Все образцы затем подготавливали для сканирующей микроскопии по методу, описанному выше.

Результаты и обсуждение

Незрелые ооциты X. laevis с 1-й по 6-ю стадии развития находятся в профазе І мейоза, которая может продолжаться в течение нескольких месяцев (Ferrell, 1999). При этом хроматин остается частично деконденсированным и транскрипционно активным, в то время как Cdc2 еще не функционирует, а ЯдО сохраняет свою целостность. При исследовании в сканирующем микроскопе изолированные ооциты амфибий на 2-й стадии развития содержат растущее ядро, на поверхности которого уже в световом микроскопе видны выпячивания ядерной оболочки, свидетельствующие об активном формировании ее новых фрагментов (рис. 1, а). При частичном удалении ЯдО изолированных ядер на препаратах, анализируемых в сканирующем электронном микроскопе, хорошо различаются наружная и внутренняя мембраны оболочки ядра с пузырьками ЭПР и разветвленная сеть внутриядерных филаментов, контактирующих с большим количеством сферических телец и ядерной оболочкой (рис. 1, б). Подробный анализ морфологии и состава внутриядерных филаментов, проведенный нами ранее с использованием сканирующей иммуноэлектронной микроскопии, показал, что они содержат актин и ряд других белков, обладают



Рис. 1. Визуализация компонентов ядра ооцита *X. laevis* на 2-й стадии роста.

а – общий вид ядра на малом увеличении; б – фрагмент «открытого» ядра, видны ядерная оболочка (ЯдО), внутриядерные филаменты и сферические тельца (СТ); в–д – фрагменты ядер на срезах целого ооцита, компактное ядрышко (ЯД) и хроматин (Х) средней электронной плотности располагаются вблизи мембраны ядерной оболочки; е – раздельное расположение скопления внутриядерных филаментов и хроматиновых фибрилл в изолированном нуклеоиде. а – световая микроскопия; б, в, г, д – просвечивающая электронная микроскопия; е – сканирующая электронная микроскопия.

спиральной скрученностью и имеют средний диаметр около 40 нм (Kiseleva *et al.*, 2004).

При исследовании срезов целых ооцитов в ядрах выявляется большое количество сферических телец, а также ядрышек (рис. 1, в), что свидетельствует о высокой транскрипционной активности в ядре ооцита на этой стадии развития. Известно, что в ооцитах *X. laevis* рибосомные гены (рДНК) селективно амплифицируются в течение поздней зиготены и ранней пахитены в профазе мейоза I, и амплифицированная рДНК распределяется приблизительно в 1,5 тыс. экстрахромосомных ядрышек диаметром 10-15 мкм (Wu, Gall, 1997). Наши исследования показали, что на срезах целых ооцитов компактные ядрышки располагаются по всему ядру, иногда недалеко от ЯдО, но никогда – в контакте с ней. В то же время глыбки хроматина средней электронной плотности могут находиться в непосредственной близости к оболочке ядра (рис. 1, г, д). При исследовании внутреннего содержимого ядер в сканирующем электронном микроскопе хроматин имеет вид крупных скоплений рыхлого материала, отличающегося по структуре от внутриядерных актинсодержащих филаментов (рис. 1, е). После осторожного диспергирования хроматина стеклянными иголками в его составе выявляются расправленные нити транскрипционно активной ДНК с короткими РНП фибриллами диаметром 7-10 нм (рис. 2, а), а также ДНК с регулярно расположенными РНП частицами диаметром от 10 нм до 22 нм (рис. 2, б). Исследование процесса транскрипции генов Колец Бальбиани (КБ2) в клетках слюнных желез хирономуса показало, что формирование РНП частиц происходит в результате упаковки 7 нм мРНК с белками в 10 нм фибриллу, которая увеличивается в размере и реорганизуется затем в зрелую РНП частицу (Daneholt, 1997).

Выявляемый на препаратах неактивный хроматин имеет вид скоплений, состоящих из скрученных 30 нм фибрилл (рис. 2, в). Несмотря на то что упаковка ДНК в 30 нм фибриллы оспаривается некоторыми авторами (Eltsov *et al.*, 2008), наши исследования с использованием как просвечивающей, так и сканирующей электронной микроскопии поддерживают существование подобного уровня организации ДНК.

В ядрах соматических клеток ламины А- и В-типа способны связывать ДНК и хроматин (Taniura *et al.*, 1995). Анализ распределения внутриядерных компонентов в периферических отделах ядра показал, что хроматин в виде диффузных скоплений контактирует с внутриядерными актинсодержащими филаментами и располагается вблизи ЯдО, однако прямой связи его с внутренней мембраной ЯдО или ядерными порами не наблюдается (рис. 3, а, б). Это согласуется с ранее проведенными исследованиями (Gall *et al.*, 1999; Красикова, Гагинская, 2010) и обусловлено, очевидно, необходимостью свободного перемещения хромосом и их бивалентов в нуклеоплазме на стадии профазы I мейоза. В то же время нельзя исключить возможность временного прикрепления хромосом к оболочке ядра через какие-либо белки-посредники, например ламинсвязывающие белки.

В отличие от высших позвоночных, в клетках которых экспрессируются ламины А/С (в дифференцированных клетках) и ламин В, необходимый для жизнедеятельности любых клеток (Hutchison, 2002), в ооцитах амфибий синтезируются 3 специфичных ламина В-типа: LI, LII (ламин В2) и LIII (ламин В3) (Lourim *et al.*, 1996). Ламин В3 участвует в формировании ламины ядра ооцита в виде тонкого слоя промежуточных филаментов, прилежащего к внутренней мембране ЯдО (Goldberg *et al.*, 2008).

Наши иммуно-электронно-микроскопические исследования показали, что антитела к ламину ВЗ слабо связываются с хроматином (рис. 4, а, б), в то время как антитела к ламинсвязывающему белку LAP2 выявляются в составе изолированного из ядра хроматина (рис. 4, в). Присутствие этого белка в ядрах ооцитов амфибий было известно (Lang, Krohne, 2003). Показано, что LAP2β взаимодействует с ламином B3, а также с BAF (хроматин-ремодулирующий фактор) (Shumaker et al., 2001). LAP2-белки относятся к группе трансмембранных белков, связанных с ламиной, однако недавно было продемонстрировано, что один из этих белков (XLAP2β) выявляется также внутри ядра ооцитов в составе кластеров гетерохроматина (Chmielewska et al., 2011). Авторы предполагают, что на стадии профазы I мейоза, когда хроматин частично деконденсируется и активно перемещается внутрь ядра, его взаимодействие с интегральными белками мембран ЯдО нарушается и гидрофобные фрагменты (или изоформы) этих белков остаются ассоциированными с хроматином. Выявленное нами присутствие LAP2β на хроматине из ранних ооцитов амфибий согласуется с этими данными и позволяет предполагать, что LAP2β (или его изоформы) может быть вовлечен в организацию хроматина в профазе I мейоза.

Ранее была обнаружена тесная связь актинсодержащих филаментов со сферическими тельцами внутри ядер ранних ооцитов из *Rana temporaria* и из *X. laevis* (Parfenov *et al.*, 1995;



Рис. 2. Вид хроматина разной степени компактизации в нуклеоиде X. laevis.

а – расправленные нити транскрипционно активной ДНК (белые стрелки) и компактный хроматин (двойные белые стрелки); б – РНП частицы на нитях ДНК; в – фрагмент компактного хроматина, состоящий из скрученных 30 нм фибрилл на большом увеличении. Сканирующая электронная микроскопия.

Kiseleva *et al.*, 2004). Настоящие исследования показали, что многие из этих телец метятся антителами к сплайсосомным белкам (рис. 4, г, д) и являются тельцами Кахала, содержащими РНК-полимеразы и комплекс различных фак-

торов, вовлеченных в транскрипцию и процессинг всех типов РНК (Gall, 2001). С каждым сферическим тельцем обычно контактируют от 2 и более внутриядерных филаментов, что обнаруживается не только внутри изолиро-



Рис. 3. Расположение хроматина вблизи внутренней мембраны ядерной оболочки.

а, б – хроматин имеет вид 30 нм фибрилл (стрелки) и контактирует с внутриядерными филаментами. Ядерные поровые комплексы (ЯПК) отмечены маленькими стрелками.

ванного ядра ооцитов, но и на срезах целых ооцитов в ядрах после удаления ДНК (рис. 5, а). Установлено, что скопления хроматиновых фибрилл часто контактируют со сферическими тельцами Кахала (рис. 5, б–д).

Количественный анализ наблюдаемых в сканирующем микроскопе контактов хроматина

с внутриядерными компонентами в ядрах, изолированных из 10 ооцитов *X. laevis*, подтвердил отсутствие его связи с ядерной оболочкой и незначительное взаимодействие с актинсодержащими филаментами (табл. 1).

Наиболее часто хроматин контактировал с тельцами Кахала и, как показали эксперименты



Рис. 4. Иммуногистохимическое выявление ламинов и сплайсосомных белков на внутриядерных структурах с помощью антител, меченных золотом.

а, б – слабое мечение хроматина антителами к ламину В3 (стрелки); в – интенсивное мечение хроматина антителами к ламинсвязывающему белку LAP2β (стрелки и кружки), г, д – распределение сплайсосомных белков в тельцах Кахала. а, в, г, д – сканирующая электронная микроскопия (позитивное изображение), б – сканирующая электронная микроскопия с использованием бэкскатера (backscatter) (негативное изображение).

по удалению большей части хроматина из ядер, эта связь является наиболее стабильной. Это обусловлено, очевидно, активными процессами транскрипции и сплайсинга РНК в функционально активных участках хроматина. Связь хроматина с внутриядерными филаментами в этом эксперименте практически не была зарегистрирована. На основании полученных результатов предложена гипотетическая схема организации периферических отделов ядра ран-



Рис. 5. Тесные контакты между внутриядерными компонентами.

а – контакты актинсодержащих филаментов со сферическими тельцами на срезах целых ооцитов после удаления ДНК; б–д – тесное взаимодействие между хроматином (X), сферическими тельцами (CT) и актинсодержащими внутриядерными филаментами (ВФ). а – просвечивающая, б–д – сканирующая электронная микроскопия.

Таблица 1

Контакты хроматина с внутриядерными структурами

	Контакты хроматина						
Ядро	с внутри- ядерными филамен- тами	с ядерной оболочкой	со сфери- ческими тельцами				
1	5	3	10				
2	3	0	8				
3	2	0	12				
4	0	2	16				
5	2	0	12				
6	5	0	18				
7	3	2	15				
8	7	3	10				
9	3	0	17				
10 6		3	13				
Суммарное количество 36 контактов		13	131				
Среднее количество контактов	3,6 ± 1,5	1,3 ± 1,0	13,1 ± 2,4				

него ооцита амфибий (рис. 6), согласно которой хроматин имеет специфическое, отличное от интерфазных клеток, распределение во внутриядерном пространстве.

Таким образом, проведенные эксперименты позволили впервые исследовать трехмерную организацию периферических отделов ядра ранних ооцитов X. laevis в сканирующем электронном микроскопе и получить дополнительную информацию о возможных контактах хроматина с внутриядерными компонентами. Несмотря на то что стабильная связь хроматина была выявлена только с тельцами Кахала, следует отметить, что эти тельца тесно взаимодействуют с высокодинамичными филаментами ядерного матрикса, содержащими актин и миозин (Obrdlik, 2010). Известно, что концентрация актина в ядре ооцитов амфибий существенно выше, чем в ядре соматических клеток и составляет 4-6 мг/мл (Clark, Rosenbaum, 1979; Pederson, Aebi, 2002). Совокупность этих данных свидетельствует о том, что компоненты ядерного матрикса могут



Рис. 6. Схема взаимодействия хроматина с внутриядерными структурами.

Хроматин наиболее стабильно контактирует с тельцами Кахала – участками сплайсинга РНК (отмечено кольцами) и слабо – с актинсодержащими филаментами и внутренней мембраной ядерной оболочки (отмечено двойными кольцами).

быть вовлечены в регуляцию активного перемещения и необходимой ориентации хромосом, а также, возможно, их реорганизации на разных стадиях профазы I в ооцитах амфибий.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 10-04-01426 и № 10-04-01469, и гранта Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (6.12).

Литература

- Красикова А.В., Гагинская Е.Р. Организация центромерных районов хромосом на стадии ламповых щеток // Цитология. 2010. Т. 52. № 7. С. 515–533.
- Маслова А.В., Красикова А.В. Пространственное распределение макро-, миди- и минихромосом в транскрипционно активных ядрах растущих ооцитов птиц отряда Calliformes // Цитология. 2011. Т. 53. № 2. С. 116–128.
- Морозова К.Н., Киселева Е.В. Морфометрический анализ динамики эндоплазматического ретику-

лума в растущих ооцитах амфибий // Цитология. 2006. Т. 48. № 12. С. 980–990.

- Мурашева М.И., Ченцов Ю.С. Белки ядерного матрикса с молекулярными массами 38 и 50 кДа, транспортируемые хромосомами в митозе // Цитология. 2010. Т. 52. № 9. С. 760–769.
- Степанова И.С., Боголюбов Д.С., Парфенов В.Н. Тельца Кахала в ооцитах насекомых. П. Новые данные по молекулярному составу телец Кахала ооцитов домового сверчка. К вопросу о взаимосвязи телец Кахала и кластеров интерхроматиновых гранул // Цитология. 2007. Т. 49. № 1. С. 5–20.
- Abbott J., Marzluff W.F., Gall J.G. The stem loop binding protein (SLBP1) is present in coiled bodies of the *Xenopus* germinal vesicle // Mol. Biol. Cell. 1999. V. 10. P. 487–499.
- Arlucea J., Andrade R., Alonso R., Arechaga J. The nuclear basket of the nuclear pore complex is part of a higher-order filamentous network that is related to chromatin // J. Struct. Biol. 1998. V. 124. P. 51–58.
- Berezney R., Coffey D.S. Nuclear matrix. Isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei // J. Cell Biol. 1977. V. 73. N 3. P. 616–637.
- Berezney R., Mortillaro M.J., Ma H. *et al.* The nuclear matrix: a structural milieu for genomic function // Int. Rev. Cytol. 1995. V. 162A. P. 1–65.
- Callan H.G., Gall J.G., Murphy C. Histone genes are located at the sphere loci of *Xenopus* lampbrush chromosomes // Chromosoma. 1991. V. 101. P. 245–251.
- Capelson M., Liang Y., Schulte R. *et al.* Chromatinbound nuclear pore components regulate gene expression in higher eukaryotes // Cell. 2010. V. 140. N 3. P. 372–383.
- Castano E., Philimonenko V.V., Kahle M. *et al.* Actin complexes in the cell nucleus: new stones in an old field // Histochem. Cell Biol. 2010. V. 133. N 6. P. 607–626.
- Chattopadhyay S., Pavithra L. MARs and MARBPs: key modulators of gene regulation and disease manifestation // Subcell. Biochem. 2007. V. 41. P. 213–230.
- Chmielewska M., Dubińska-Magiera M., Sopel M. et al. Embryonic and adult isoforms of XLAP2 form microdomains associated with chromatin and the nuclear envelope // Cell Tissue Res. 2011. V. 344. P. 97–110.
- Cioce M., Lamond A.I. Cajal bodies: a long history of discovery // Annu. Rev. Cell. Develop. Biol. 2005. V. 21. P. 105–131.
- Clark T.G., Rosenbaum J.L. An actin filament matrix in hand-isolated nuclei of *X. laevis* oocytes // Cell. 1979. V. 18. N 4. P. 1101–1108.
- Cremer T., Cremer C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells // Nat. Rev. Genet. 2001. V. 2. N 4. P. 292–301.

- Cremer T., Cremer M. Chromosome territories // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2010. V. 2. N 3. P. 1–22.
- Daneholt B.A. Look at messenger RNP moving through the nuclear pore // Cell. 1997. V. 88. N 5. P. 585–588.
- Dumont J.N. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals // J. Morphol. 1972. V. 136. P. 153–179.
- Eltsov M., Maclellan K.M., Maeshima K. *et al.* Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes *in situ* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. N 50. P. 19732–19737.
- Erazo A., Yee M.B., Banfield B.W., Kinchington P.R. The alphaherpesvirus US3/ORF66 protein kinases direct phosphorylation of the nuclear matrix protein matrin 3 // J. Virol. 2011. V. 85. N 1. P. 568–581.
- Ferrell J.E. Xenopus oocyte maturation: new lessons from a good egg // BioEssays. 1999. V. 21. P. 833–842.
- Gall J.G. A role for Cajal bodies in assembly of the nuclear transcription machinery // FEBS Lett. 2001. V. 498. P. 164–167.
- Gall J.G. The centennial of the Cajal body // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2003. V. 4. P. 975–980.
- Gall J.G., Bellini M., Wu Z., Murphy C. Assembly of the nuclear transcription and processing machinery: Cajal bodies (coiled bodies) and transcriptosomes // Mol. Biol. Cell. 1999. V. 12. P. 4385–4402.
- Georgiev G.P., Chentsov J.S. On the structural organization of nucleolo-chromosomal ribonucleoproteins // Exp. Cell Res. 1962. V. 27. P. 570–572.
- Geyer P.K., Vitalini M.W., Wallrath L.L. Nuclear organization: taking a position on gene expression // Curr. Opin. Cell Biol. 2011. V. 23. N 3. P. 354–359.
- Goldberg M.W., Huttenlauch I., Hutchison C.J., Stick R. Filaments made from A- and B-type lamins differ in structure and organization // J. Cell Sci. 2008. V. 121. P. 215–225.
- Goldberg M.W., Wiese C., Allen T.D., Wilson K.L. Dimples, pores, star-rings, and thin rings on growing nuclear envelopes: evidence for structural intermediates in nuclear pore complex assembly // J. Cell Sci. 1997. V. 110. P. 409–420.
- Guelen L., Pagie L., Brasset E. *et. al.* Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions // Nature. 2008. V. 453. N 7197. P. 948–951.
- Hancock R. Internal organization of the nucleus: assembly of compartments by macromolecular crowding and the nuclear matrix model // Biol. Cell. 2004. V. 96. N 8. P. 595–601.
- Hutchison C.J. Lamins: building blocks or regulators of gene expression? // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2002. V. 3. N 11. P. 848–858.

- Johansen K.M., Forer A., Yao C. *et al.* Do nuclear envelope and intranuclear proteins reorganize during mitosis to form an elastic, hydrogel-like spindle matrix? // Chromosome Res. 2011. V. 19. N 3. P. 345–365.
- Kalverda B., Pickersgill H., Shloma V.V., Fornerod M. Nucleoporins directly stimulate expression of developmental and cell-cycle genes inside the nucleoplasm // Cell. 2010. V. 140. N 3. P. 360–371.
- Kind J., van Steensel B. Genome-nuclear lamina interactions and gene regulation // Curr. Opin. Cell Biol. 2010. V. 22. N 3. P. 320–325.
- Kiseleva E., Drummond S.P., Goldberg M.W. *et al.* Actin- and protein-4.1-containing filaments link nuclear pore complexes to subnuclear organelles in *Xenopus* oocyte nuclei // J. Cell Sci. 2004. V. 117. Pt 12. P. 2481–2490.
- Kiseleva E., Goldberg M.W., Daneholt B., Allen T.D. RNP export is mediated by structural reorganization of the nuclear pore basket // J. Mol. Biol. 1996. V. 260. N 3. P. 304–311.
- Kiseleva E., Morozova K.N., Voeltz G.K. *et al.* Reticulon 4a/NogoA and nuclear envelope growth // J. Struct. Biol. 2007. V. 160. N 2. P. 224–235.
- Koberna K., Malínský J., Pliss A. *et al*. Ribosomal genes in focus: new transcripts label the dense fibrillar components and form clusters indicative of «Christmas trees» *in situ* // J. Cell Biol. 2002. V. 157. N 5. P. 743–748.
- Kopecný V., Fakan S. Extranucleolar genome reactivation: topochemical studies on early bovine embryo. A review // Acta Histochem. Suppl. 1992. V. 42. P. 301–309.
- Lamond A.I., Spector D.L. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2003. V. 4. P. 605–612.
- Lang C., Krohne G. Lamina-associated polypeptide 2beta (LAP2beta) is contained in a protein complex together with A- and B-type lamins // Eur. J. Cell Biol. 2003. V. 82. N 3. P. 143–53.
- Liang Y., Hetzer M.W. Functional interactions between nucleoporins and chromatin // Curr. Opin. Cell Biol. 2011. V. 23. N 1. P. 65–70.
- Lourim D., Kempf A., Krohne G. Characterization and quantitation of three B-type lamins in Xenopus oocytes and eggs: increase of lamin LI protein synthesis during meiotic maturation // J. Cell Sci. 1996. V. 109. P. 1775–1785.
- Nickerson J. Experimental observations of a nuclear matrix // J. Cell Sci. 2001. V. 114. P. 463–474.

- Obrdlik A., Louvet E., Kukalev A. *et al.* Nuclear myosin 1 is in complex with mature rRNA transcripts and associates with the nuclear pore basket // FASEB J. 2010. V. 24. N 1. P. 146–157.
- Parfenov V.N., Davis D.S., Pochukalina G.N. *et al.* Nuclear actin filaments and their topological changes in frog oocytes // Exp. Cell Res. 1995. V. 217. N 2. P. 385–394.
- Pederson T., Aebi U. Actin in the nucleus: what form and what for? // J. Struct. Biol. 2002. V. 140. N 1. P. 3–9.
- Pettersson I., Hinterberger M., Mimori T. *et al.* The structure of mammalian small nuclear ribonucleoproteins. Identification of multiple protein components reactive with anti-(U1)ribonucleoprotein and anti-Sm autoantibodies // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. N 9. P. 5907–5914.
- Shumaker D.K., Lee K.K., Tanhehco Y.C. *et al*. LAP2 binds to BAF-DNA complexes: requirement for the LEM domain and modulation by variable regions // The EMBO J. 2001. V. 20. P. 1754–1764.
- Sommerville J. Using oocyte nuclei for studies on chromatin structure and gene expression // Methods. 2010. V. 51. N 1. P. 157–164.
- Stick R., Goldberg M.W. Oocytes as an experimental system to analyze the ultrastructure of endogenous and ectopically expressed nuclear envelope components by field-emission scanning electron microscopy // Methods. 2010. V. 51. N 1. P. 170–176.
- Tanabe H., Habermann F., Solovei I. *et al.* Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications // Mutat. Res. 2002. V. 504. P. 37–45.
- Taniura H., Glass C., Gerace L. A chromatin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones // J. Cell Biol. 1995. V. 131. P. 33–44.
- Towbin B.D., Meister P., Gasser S.M. The nuclear envelope – a scaffold for silencing? // Curr. Opin. Genet. Dev. 2009. V. 19. N 2. P. 180–186.
- Wu Z., Gall J.G. U7 small nuclear RNA in C snurposomes of the *Xenopus* germinal vesicle // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. N 13. P. 6257–6259.
- Wu Z., Gall J.G. «Micronucleoli» in the *Xenopus* germinal vesicle // Chromosoma. 1997. V. 105. N 7/8. P. 438–443.
- Zbarsky I.B., Georgiev G.P. Cytological characteristics of protein and nucleoprotein fractions of cell nuclei // Biochim. Biophys. Acta. 1959. V. 32. N 1. P. 301–302.

CHROMATIN DISTRIBUTION IN THE NUCLEI OF GROWING *XENOPUS LAEVIS* OOCYTES

K.N. Morozova, A.A. Strunov, E.V. Kiseleva

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

Summary

A comprehensive ultrastructural investigation of chromatin distribution in the nuclei of *Xenopus laevis* oocytes at the 2–3rd growing stages has been made. It has been shown by a modified method of oocyte nuclei isolation and high-resolution scanning electron microscopy that chromatin in amphibian oocytes is weakly linked to actin-related filaments and does not interact directly with the nuclear envelope. Immune-electron microscopy reveals a large amount of LAP2 β but not lamin B and A linked to chromatin. For the first time, a stable and strong interaction of chromatin with Cajal bodies, containing the splicing protein complex, is shown. The results point to a specific actin distribution and interaction with intranuclear structures in growing amphibian oocytes. A scheme of intranuclear space organization in amphibian oocyte nuclei is proposed.

Key words: chromatin, Cajal bodies, nuclear envelope, amphibian oocytes, scanning and transmission electron microscopy.

НОВОЕ ОГРАНИЧЕНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В ПОПУЛЯЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ (НА ПРИМЕРЕ ПАНМИКТИЧЕСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ)

В.В. Горбачев

Институт биологических проблем севера ДВО РАН, Магадан, Россия, e-mail: genetic2@yandex.ru

С применением коалесцентных моделей была показана возможность ошибки I рода при использовании микросателлитов в популяционно-генетических исследованиях. Установлено, что даже для панмиктических популяций величина ошибки может составлять СІ 95% ~ (11–18%), что делает малоубедительным мнение о возможности универсального применения микросателлитных маркеров для оценки популяционной дифференциации. Высказывается мнение, что возможной причиной полученных результатов является высокое аллельное разнообразие, вызванное нестабильностью микросателлитных маркеров.

Ключевые слова: микросателлиты, популяция, коалесцентное моделирование, статистическая ошибка I рода.

Введение

В настоящее время многие авторы высказывают мнение о том, что микросателлитные последовательности (далее STR) являются мощными молекулярными маркерами (Sarri et al., 2006) и наиболее удобным инструментом для использования их в популяционно-генетических исследованиях (Malcolm et al., 1997; Whittakera et al., 2003; Gomes et al., 2011). Подобное мнение основано на возможности STR-маркеров быстро накапливать замены вследствие самых высоких мутационных скоростей среди всех известных к настоящему времени молекулярно-генетических маркеров (Schlötterer et al., 1998; Животовский, 2006). Высокая изменчивость очень часто позволяет получить достоверные различия между выборками, что делает их весьма «удобными молекулярными локусами». Отметим, что практически у всех маркеров рано или поздно выявлялись ограничения, которые не позволяли использовать их в качестве универсальных генетических инструментов (Avise, 2004). Однако в настоящее время в литературных источниках встречается лишь «робкая критика» данного вида маркеров, а выявляемые недостатки в основном относятся к области методических разработок (нуль-алели, трудности разработки новых маркеров и т. д.) (Avise, 2004; Хрусталева и др., 2010). Широкое применение STR-локусов породило уверенность в их абсолютной универсальности, что делает необходимыми исследования, направленные на изучение области применимости микросателлитов и их потенциальных ограничений. Подобную теоретическую проверку достаточно просто провести с применением коалесцентных моделей. Коалесцентное моделирование предполагает использование ретроспективного подхода для оценки популяционных генетических процессов, позволяя прослеживать моделируемые генеалогии аналогично тому, как это делается для дендрограмм. При этом коалесцентные модели могут достаточно полноценно использоваться при статистических проверках различных гипотез.

Одними из основных понятий, связанных со статистическими проверками, являются ошибки I и II рода. Статистические ошибки представляют собой либо неверное отклонение правильной нулевой гипотезы (далее H₀) в первом случае или низкую распознающую способность применяемого метода по отношению к подобной

гипотезе (во втором случае) (Sokal, Rohlf, 1994). Таким образом, если создать модель, для которой заведомо будет выполняться H_0 и только она, то любое значимое от нее отклонение (при p < 0,05) будет, соответственно, расценено как статистическая ошибка I рода. При выявлении достаточно высокой доли статистических ошибок (более 5%) возможно предполагать ограничение применимости метода для тех или иных целей.

Целью нашего исследования является оценка возможности применения микросателлитных маркеров для дифференциации популяций.

Теоретическое обоснование модели

Предположим полностью панмиктическую популяцию достаточно большой постоянной численности, для того чтобы нивелировать любое влияние дрейфа генов. Если по окончании моделирования произвести случайные выборки особей из разных частей этой популяции, то возможно попарно оценить, насколько они генетически дифференцированы друг от друга. В соответствии с теоретическими построениями (панмиктичная популяция) следует ожидать либо полное отсутствие дифференциации, либо такое ее малое значение, которым можно пренебречь (менее 5%). В случае если число ошибок I рода превысит пороговый предел, то возможно говорить о тенденции STR локусов к завышению значений и, как следствие, искажению получаемых результатов.

Описание модели

Моделирование проводилось с применением программы для симулирования коалесцентных процессов SimCoal 2.0 (Laval, Excoffier, 2004). Модель предполагала гаплоидную популяцию из 11 групп, каждая из которых была константной численности по 10 тыс. особей. Для каждой локальности производились самостоятельные коалесцентные процедуры. Общая продолжительность жизни популяции – 250 поколений, в течение 50 первых поколений от начала существования популяции поток мигрантов между группами составлял не более 1 % на поколение (для накопления гетерогенности внутри группы). По истечении указанного числа поколений и на протяжении 200 оставшихся (вплоть до настоящего времени) поток мигрантов резко увеличивался и составлял не менее 99% между каждой группой. Таким образом, формировалась полностью панмиксная популяция, и из каждой группы делались случайные выборки в 11, 21, 51, 101 и 201 особь. Все выборки повторялись для 2, 5, 10, 15 и 25 микросателлитных локусов. Частота мутаций по умолчанию составляла 1,2 × 10⁻³ на локус на поколение (данные темпы находятся в нижнем диапазоне мутационных скоростей микросателлитных локусов) (Malcolm et al., 1997; Животовский, 2006). В среднем для 30 аллелей на локус модель предполагала пошаговые мутации (step-wise mutation model). В целом было проанализировано 25 моделей (при попарном комбинировании размера выборки и числа локусов), каждая из которых повторялась по 110 раз. Суммарно было проверено 2750 моделей. Полученные результаты моделирования использовались для расчета R_{st} по Слаткину – аналога генетических дистанций F_{st} для микросателлитных маркеров (Wright, 1951; Slatkin, 1995), с применением программы Arlequin v.3.0 (Excoffier et al., 2005). Всякое значимое отклонение (p < 0.05) от нулевой гипотезы (H₀ – выборки в панмиктической популяции не отличаются на достоверном уровне) при попарном сравнении выборок между собой использовалось для оценки доли ошибок I рода.

Результаты моделирования

Суммарное число статистических ошибок использовалось для оценки вероятности их появления. Исходя из полученных значений рассчитывался 95%-й доверительный интервал, который находился в диапазоне от 10,9 до 17,5% ошибок I рода, средняя вероятность появления ошибки составляла 14,2% на модель. Результаты моделирования представлены в виде графа (рис.).

Из представленного выше графа легко заметить общую тенденцию к завышению неверных значений. Только в одном случае процент ошибок I рода был незначительно ниже пороговой величины ($\sim 4,9\%$), во всех остальных случаях полученные результаты превышали обозначенный 5%-й предел. Столь высокая вероятность появления статистических ошибок не позво-



Рис. Вероятность появления ошибки І рода в %.

Пунктирной линией, параллельной оси абсцисс, отсечен диапазон значений, не превышающих 5%.

ляет пренебрегать данной тенденцией и если не подвергает сомнению саму возможность применения STR маркеров в популяционногенетических исследованиях, то делает это использование малоубедительным (для объективной оценки дифференциации популяций).

Укажем также на одну особенность полученных результатов – увеличение выборки и количества используемых локусов находится в прямой корреляции с величиной получаемой ошибки. Таким образом, вопреки бытующему мнению увеличение выборки в данном случае само по себе не способствует повышению объективности получаемых результатов.

Мы полагаем, что основной причиной является высокое аллельное разнообразие, в свою очередь, обусловленное нестабильностью аллелей микросателлитных локусов (изменчивостью). Указанная особенность, по нашему мнению, является ключевой для объяснения полученных результатов. Ведь в настоящее время известно, что STR-маркеры являются одними из самых мутабильных локусов, что приводит к достаточно быстрому накоплению изменений. Следует отметить, что весь выявляемый при популяционных исследованиях сигнал разделяется на популяционный (признаки, характерные для популяции) и индивидуальный (Павлинов, 2005).

Если предположить такие признаки, которые способны достаточно быстро изменяться, то по мере существования популяции индивидуальный сигнал станет превышать популяционный, что в конечном итоге приведет к увеличению филогенетического шума. Любая выборка или несколько выборок в конечном счете будут отражать не популяционные особенности, а индивидуальные (все индивидуумы будут различаться между собой). С данным предположением согласуется и тот факт, что увеличение размера выборки, количества анализируемых локусов увеличивает вероятность ошибки І рода, что, по всей видимости, связано с возрастанием общей тенденции к появлению в выборке уникальных аллелей. Таким образом, использование нестабильных (мутабильных) аллелей в популяционных исследованиях, скорее, будет оценивать не популяционную дифференциацию, а изменчивость маркеров. Все указанные особенности во многом справедливы и для микросателлитных последовательностей.

Еще одной возможной причиной, объясняющей полученные результаты, является математический аппарат, оценивающий генетические дистанции (Rst). Как было показано в недавнем исследовании, Gst и аналогичные генетические меры оценивают вовсе не генетические расстояния между популяциями, а их генетическую изменчивость (Jost, 2008).

В целом полученные результаты позволяют говорить о новом ограничении STR-маркеров завышении значений при оценке генетической дифференциации популяций, по всей видимости, связанном с аллельным разнообразием данных последовательностей. С учетом представленных результатов мы склонны считать, что указанный тип локусов подходит более для оценки биологического разнообразия, нежели популяционно-генетической дифференциации. По крайней мере, получаемые результаты всегда оставляют место для сомнения, является ли выявленная дифференциация между выборками следствием реально протекающих генетических процессов или появилась по причине использования нестабильных последовательностей.

Мы не умаляем возможности применения микросателлитов там, где это бесспорно: в криминалистике (при идентификации личностей), в сельском хозяйстве (при типировании сортов), в медицине (при установлении отцовства и материнства). Однако мы полагаем, что применение STR-маркеров в популяционных исследованиях требует осторожности и проверки получаемых результатов с помощью других, более стабильных, последовательностей (яДНК, мтДНК). В случае противоречивости результатов мы рекомендуем исследователям отдавать приоритет «старой доброй» мтДНК или иным, менее изменчивым, маркерам ядерного генома.

Автор выражает благодарность Л.А. Животовскому, А.Н. Татаренкову, а также рецензентам «Вавиловского журнала генетики и селекции» за существенные комментарии на ранние варианты данной рукописи.

Литература

- Животовский Л.А. Микросателлитная изменчивость в популяциях человека и методы ее изучения // Информ. вестник ВОГиС. 2006. Т. 10. № 1. С. 74–96.
- Павлинов И.Я. Введение в современную филогенетику (кладогенетический аспект). М.: Изд-во КМК, 2005. 391 с.
- Хрусталева А.М., Волков А.А., Стоклицкая Д.С. и др. Сравнительный анализ изменчивости STR- и SNP-локусов в популяциях нерки (*Oncorhynchus nerka*) Восточной и Западной Камчатки // Генетика. 2010. Т. 46. № 11. С. 1544–1555.
- Avise J.C. Molecular Markers, Natural History and Evolution. N.Y.; London: Chapman and Hall, 2004. 541 p.
- 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.

- Jost L. Gst and its relatives do not measure differentiation // Mol. Ecol. 2008. V. 17. P. 4015–4026.
- Gomes E.V., Breseguello L., Augusto M. *et al.* Microsatellite markers reveal genetic variation within *Sclerotinia sclerotiorum* populations in irrigated dry bean crops // Brazil J. Phytopathol. 2011. V. 159. I. 2. P. 94–99.
- Sarri V., Baldoni L., Porceddu A. *et al.* Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to geographically defined populations // Genome. 2006. V. 49. P. 1606–1615.
- Malcolm D., Mackay T., Aquadro C.F. Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster* // Nat. Genet. 1997. V. 15. P. 99–102.
- Sokal R.R., Rohlf F.J. Biometry. 3-rd ed. Freeman and Co., San Francisco, 1994. 880 p.
- Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies // Genetics. 1995. V. 139. P. 457–462.
- Whittakera J., Harborda R., Boxall N. *et al.* Likelihood–based estimation of microsatellite mutation rates // Genetics. 2003. V. 164. P. 781–787.
- Schlötterer C., Ritter R., Harr B., Brem G. High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele–specific mutation rates // Mol. Biol. Evol. 1998. V. 15. N 10. P. 1269–1274.
- Wright S. The genetical structure of population // Annu. Eugen. 1951. V. 15. P. 323–354.
- Laval G., Excoffier L. SIMCOAL 2.0: a program to simulate genomic diversity over large recombining regions in a subdivided population with a complex history // Bioinformatics. 2004. V. 20. N 15. P. 2485–2487.

A NEW LIMITATION OF MICROSATELLITE MARKERS FOR THEIR USE IN POPULATION RESEARCH BY THE EXAMPLE OF PANMICTIC POPULATIONS

V.V. Gorbachev

Institute of Biological Problems of the North, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Magadan, Russia, e-mail: genetic2@yandex.ru

Summary

Coalescent models demonstrate that type I statistical errors may occur in population genetics studies using microsattelites. Even in panmictic populations, the frequency of type I errors with 95 % confidence interval was 11–18 %, which calls in question the opinion about the universal applicability of microsattelite markers to the estimation of population differentiation. One of the possible causes of these results is the high allelic diversity due to the instability of microsatellite markers.

Key words: microsatellites, population, coalescent modeling, type I statistic error.

RELATIVELY CONSERVED COMMON SHORT SEQUENCES IN TRANSCRIPTION FACTOR BINDING SITES AND miRNA

P. Putta^{1,3}, Yu.L. Orlov², N.L. Podkolodnyy², C.K. Mitra³

 ¹ Medical and Molecular Genetics, School of Clinical and Experimental Medicine, University of Birmingham, Birmingham, UK;
² Institute of Cytology and Genetic, SB RAS, Novosibirsk, Russia;
³ Department of Biochemistry, University of Hyderabad, Hyderabad 500046, India

Transcription factor binding sites (TFBS) are the specific DNA binding motifs that are recognized by a transcription factor, are typically short and are often degenerate. Sequence-specific binding of TFs to the DNA controls the gene expression regulation at transcription level. High throughput genome sequencing provides abundant data for TF binding profiles. We have developed computer program to study distribution of short motifs in the sequences. We are interested in studying the general features of transcription factor binding site sequences which can help in identifying conserved patterns at nucleotide level. We explored the role of common oligonucleotide patterns in TFBS and in miRNA based on the sequence specific similarity between these two sets.

Key words: genome, transcription factor binding sites, miRNA, oligonucleotides, statistics, sequencing.

Introduction

In eukaryotes, the protein coding genes are transcribed by RNA polymerase II. However, unlike in prokaryotes, only a set of genes are targeted prior to transcription. The selection of genes to be transcribed is carried out by various transcription factors (class of DNA binding proteins; TF) that recognize parts of the promoter region. This enables selective transcription of relevant genes but involves higher overheads. Transcription is a more complex process involving chromatin modifiers, transcription factors, co-factors and RNA polymerase (among others) that tightly regulate the basal transcription. Sequence-specific binding of TFs to short stretches of DNA, i.e., transcription factor binding sites (TFBS) within the vicinity of a gene (the promoter) is one of the critical components in the transcriptional regulation and control. Mutations within these TFBS sequences may result in diseases and are likely to change the phenotype variability within and across the species (Wray, 2007). Transcription factors are proteins and they usually signal transcription for a number of related proteins. When a cell needs a certain protein, the corresponding TF is activated, which produces the

desired TF which in turn activates the transcription of a set of related proteins. The complex regulation mechanism enables the cell to produce desired proteins on demand. Recent progress of high throughput sequencing technologies allow study these processes in greater details in genome scale, but even today much of these processes have not been clearly understood.

Out of ~20,000 genes estimated for the human genome, ~100 TFs have been clearly identified and their binding sites mapped in genome by ChIP-seq technologies, in particular in frames of ENCODE project. It is possible that we have so far found less than 10 % of the TFs present in the whole genome. Based on experimental data available, it is known that the binding sites of the TFs are degenerate, i.e., they recognize several distinct but related binding sites. This is apparently puzzling as biological recognition process is usually highly specific and accurate.

However, we presume that degeneracy is perhaps helpful when one TF need to recognize several different genes (Bulyk *et al.*, 2002; Man, Stormo, 2001). We have attempted to study this behaviour in the present study. We also analyse the miRNA sequences (mature miRNA sequences) for human and look for common oligonucleotide sequences (of 6-nt length) between the TF binding sites and the miRNA. We have chosen to study the 6-nt sequences based on a few common observations: i) the most common representation of promoter elements (TATAAT and TTGACA in prokaryotes) are 6-nt in length; ii) most of the restriction enzymes recognize DNA sequence of 6-nts length with high accuracy; and finally iii) the minimum length of TFBS in JASPAR are about 6-nt sequences. We further assume that an oligonucleotide of 6-nt length can be recognized by standard protein motifs without errors. Longer the sequences, they exhibit degeneracy or redundancy or may be just error-prone (Yamamoto et al., 2007). Based on the presence of the common 6-nt sequences, we can perhaps classify the miRNA and the TFBS and reveal motifs specific only for transcription factors in general. We found common patterns for TFBS and miRNA and compared them to known binding motifs.

Materials and Methods

Human transcription factor binding site sequences were downloaded from the JASPAR database (http://jaspar.cgb.ki.se/). A total of 6496 transcription factor binding site sequences that represent 65 human TFs (the database has reported 75 TFs but 10 of them had no sequence information) were extracted from the database. The 6496 sequences have an average length of 14 nucleotides (mean: 14,2; max: 28; min: 6) and the base composition (A: 22707, 24,54%; C: 20653, 22,32%; G: 21203, 22,91%; T: 21352, 23,08%; N: 6614; Total: 92529) is approximately uniform. Several sequences in the database had also residues that are not part of the binding site (indicated as lower case bases in the database) were ignored (i.e., were not reflected in the above computations). The TFBS sequences were next searched (using a custom-made C program) for all possible 6-nucleotide sequences $(4^6 = 4096 \text{ possible sequences})$ and a count of each were maintained. These 4096 possible 6-nt sequences were assigned numerical values (lexically ordered) for computational convenience (by coding in degrees of 4; we set 0 for A, 1 for C, 2 for G and 3 for T or U). For example, AAAAA = 1, $AAAAAC = 2, \dots, TTTTTTT = 4096$ (Table 1). The number is coding number in degrees of 4 plus 1. In addition, for each 6-mer we have fixed number of

Table 1

6-mer	Numbering of 6-mer	Comple- mentary 6-mer	Numbering of compl. 6-mer	# in TFBS	# in miRNA	Self- compl.?	# in TFBS with comp- lement	# in miRNA with comp- lement	Counted in list of 2016 6-mers
AAAAAA	1	TTTTTT	4096	4	12		5	20	1
AAAAAC	2	GTTTTT	3072	2	13		5	27	1
AAAAAG	3	CTTTTT	2048	10	8		14	17	1
AAAAAT	4	ATTTTT	1024	7	5		22	13	1
AAAACA	5	TGTTTT	3840	26	5		47	22	1
AGGAAA	641	TTTCCT	4056	226	14		426	25	1
AGGAAC	642	GTTCCT	3032	54	9		104	23	1
AGGAAG	643	CTTCCT	2008	294	23		554	44	1
GAGCTC	2206	GAGCTC	2206	5	15	yes	5	15	0
GAGCTG	2207	CAGCTC	1182	3	20		5	30	0
TTTTTG	4095	CAAAAA	1025	2	21		12	35	0
TTTTTT	4096	AAAAAA	1	1	8		5	20	0

Example of the 6-mer sequence enumeration scheme and frequencies in the datasets studied

complementary 6-mer. For example for AAAAAA it is TTTTTT with numbering 4096, for AAAAAC it is GTTTTT with numbering 3072, and so on (see Table 1 for examples).

Next we counted number of hits of each 6-mers in the TF dataset (Table 1, data not shown in full). Since orientation of 6-mer in regulatory regions is not known we used sum of numbers of 6-mer and its complement. In total we have 2080 non-redundant 6-mers. 64 of them are self-complementary, such as GAGCTC (Table 1).

Human mature miRNA sequences were downloaded from the microRNA database (http://microrna.sanger.ac.uk/) for humans. 1733 sequences were found and there were no unknown (unidentified) bases. This database is considerably smaller and has the following base composition (A: 8568, 22,95%; C: 8448, 22,63%; G: 10505, 28,14%; U: 9811, 26,28%; N = 0; Total = 37332) which is also approximately uniform (see above). The mean sequence length in this database is 21 nucleotides which is longer compared to the TFBS mean sequence length. This database was searched as before for the 4096 possible 6-nt sequences and its complements (Table 1). Last column in Table 1 shows selection of non-redundant set of 2080 sequences.

Then the data were sorted by 6-mers frequencies (highest frequency first). We next combine these two sets of results into a combined one: first set has 6-nt sequences that have high frequencies in both TFBS and miRNA; the second set has 6-nt sequences that have high frequencies in TFBS but not in the miRNA and the third set has 6-nt sequences that have high frequencies in the miRNA but not in the TFBS. The final set that has low frequencies in both sets was ignored. In this work, we consider low frequency to be less than 2σ (two times the standard deviation).

Results

We arranged number of 6-mer hits in the databases and presented it as histogram (Fig. 1).

The analysis of the TFBS resulted in 3668 sequences (out of 4096 possible 6-nt sequences). The highest frequency was 393 (for the sequence numbered 1185 corresponding to the sequence CAGGAA (in list of 4096). The same sequence was most frequent in non-redundant list of 2080 6-mers too. Total number of 6-mers is 53463. The frequency distribution of the sequences is shown in Fig 1 a. We note that many sequences were ignored as they contained the unidentified base (N). We consider all 6-nt frequencies greater than 2σ to be significant in this study (i.e. frequencies greater than 140 in TFBS set).

The analysis of the miRNA database was performed in an identical fashion. We found 3893 sequences (out of 4096; slightly more than the TFBS sequences). The highest frequency was 67 (corresponding to the 6-nt sequence AAGTGC) and the sum of the frequencies is 28667 (this is about half of the value for the TFBS). The frequency distribution sequences are seen in Fig. 1 b. We consider all 6-nt frequencies greater than 2σ to be signifi-



Fig. 1. Histogram for distribution of 6-mers (a) for the TFBS (b) for the miRNA database.

The Y-axis (number of 6-mers found) has been plotted on a log scale for ease of comparison. Also the 6-nt sequence order for the two plots are not necessary same (ranked by the 6-mer occurrence number). The distribution of 6-mers in TFBS is clearly more uniform compared to 6-mer distribution in miRNA (see text for details of the statistical parameters for the two distributions).

cant in this study (i.e frequencies greater than 12). The coefficients of variation (σ/μ) for these two distributions (TFBS and miRNA) are 2,18 and 0,72 respectively. This suggests that the 6-nt sequences are relatively more uniformly distributed for the 6-nt sequences in miRNA. We have also calculated skewness of 6-mer distribution in TFBS and in miRNA sets. Skewness characterizes the degree of asymmetry of a distribution around its mean. Higher value of skewness indicates a distribution with an asymmetric tail extending toward larger values. It is ~6,1 for TFBS and only ~1,2 for miRNA set (Fig. 1).

Base Composition

Base composition of the 6496 TFBS were reported below. It was clear that the four bases appear nearly uniform in distribution in the binding sequences. Following are the base frequencies observed in the binding site sequences. A = 22707 (24,54%), C=20653 (22,32%), G=21203 (22,91%) and T = 21352 (23,08%). We therefore consider them to be uniformly distributed at the single nucleotide level. For the miRNA database, there were 1733 sequences and the following base composition was observed: A = 8568 (22,95%); C = 8448 (22,63%); G = 10505 (28,14%); T(U) = 9811 (26,28%). Both these distributions appear to be reasonably uniform. At the same time, distributions of oligonucleotides for TF and miRNA are different.

Joint Frequency distribution of sequences

A casual examination of the two sets of 6-nt sequences revealed some similarities. However, there are also some dissimilarities. We plotted the frequencies for all 6-nt sequences on a graph for both the TFBS and miRNA to observe correlation in terms of frequencies (Fig. 2). Initially we plotted with all 6-nt frequencies in both the sets (Fig. 2). Then we applied the 2σ cutoff to the frequencies. We are interested in the 6-mers with high frequencies in both the sets. 6-mers with high frequencies were labeled. Among them, we can note 3 distinct groups that are common between the TFBS and miRNA datasets.

The purpose of this exercise is to locate 6-nt sequences that are common to both TFBS and miRNA databases. For this exercise, we first removed all 6-nt sequences from the TFBS results that have frequencies less than 60 (this was arbitrarily chosen as the 2σ cutoff value). A large number of 6-nt sequences were therefore removed and we were left with 166 sequences. We also removed from the miRNA results all 6-nt sequences that have frequencies less than 12. As noted earlier,



• Enriched in both sets • Enriched in miRNA • Enriched in TFBS × Not significant

Fig. 2. Correlation between frequencies of 6-nt sequences in TFBS and miRNA.

After applying the 2σ cutoff in both sets i.e. frequencies of 6-mers (in non-redundant list of 2080) above 140 and 34 for TFBS and miRNA respectively all the 6-mers were separated in enriched in both sets, in TFBS only, in miRNA only, and not significantly enriched. 4 groups of 6-mers are clearly visible that are specific for TFBS and miRNA. The most frequent 6-nts are labelled.

the distribution for the miRNA is relatively more uniform and therefore we were left with a larger number of 6-nt sequences (724 sequences). For all the 6-nt sequences the frequencies for the TFBS and the miRNA are multiplied and the sequences were next sorted as per the resulting product. The result was 57 sequences (that are common to both sets with high frequencies). The final results were summarized in Table 2 (partial list).

We have started with 65 human TFs from the JASPAR database but these binding sites are considerably degenerate and we therefore end up with 6496 putative binding sites. We compared these binding sites with the 6-nt sequences from the miRNA database and located 57 sequences that can be considered as mapping these 6496 binding sites back into the TFs. The correlation is significant but we also need to explain the presence of other 6-nt sequences with high frequencies (Table 2).

Finally TFs bind to the same sequence (or very close to it) and this process may be helped by the presence of other 6-nt sequences with high frequencies present in the TFBS database. It may be useful to map the various 6-nt sequences to individual TFBS but this need to be done manually as there is no clear way to relate the 6496 binding sites to the 65 human TFs. It is indeed interesting to find such a strong correlation between the TFBS and the miRNA.

We analysed most common 6-mers in both TFBS and miRNA set by similarity to known PWM (position weight matrices) in JASPAR and TRANSFAC databases using STAMP software (Mahony, Benos, 2007). Common pattern (of top 5 common oligonucleotides) is close to AGGACAG / CTGTCCT (Table 2). Fig. 3 a contains this motif as logo.

Next we compared the consensus sequences found in the present study to known PWM (positional weight matrices). Majority of similar matrices were related to ETS family of transcription factors. Members of the large ETS family of transcription factors (TFs) have highly similar DNA-binding domains and have diverse functions and activities in physiology and oncogenesis. Some differences in DNA-binding preferences within this family have been described, but differences in sequence are minor (Wei et al., 2010).

Fig. 3b shows most similar motif for this common pattern (core region TCCT), as estimated by STAMP program.



Fig 3. a – the logo of common motif for TF and miRNA oligonucleotides; b - ETS binding motif, most close binding matrix from TRANSFAC database for common 6-mer found in both TF and miRNA sets.

6-mers common for TFs and miRNA	No. in numerated list (1-4096)	Number of occurrences in TF set (together with complement)	Number of occurrences in miRNA set (together with complement)
GCTTCC	2550	221	61
CTTCCC	2006	223	52
AGGAAG	643	554	44
CCAGGA	1321	564	42
CTGGGA	1961	338	41
CTGTCC	1974	643	38
CCTGGA	1513	599	38
CCAGGG	1323	143	36
CAGGAA	1185	731	35
CTTCCA	2005	198	35

The sequences that have high frequencies in both TFBS and miRNA datasets

а 2 Contrary, most common pattern of TF, which is not present in miRNA, is AGGTCA (See Table 2). Comparison to the database of binding motifs by STAMP shows that it is similar to ROR α 1motif. Nuclear receptor retinoid-related orphan receptor alpha (ROR α 1) is a member of ROR-family receptors. It is broadly expressed in various tissues and organs during embryonic development (Benderdour *et al.*, 2011).

Overall, the DNA base composition for whole genome, mRNA and regulatory regions are different. It is known that genetic code imposes statistical constraints on protein-coding DNA sequences. Content of miRNA is limited by presence or avoidance hairpin loops in RNA structure. In general, DNA text contains different codes, or information messages that could be superimposed: classical triplet code, DNA shape code, chromatin code, gene splicing code, nucleosome positioning code and other, including those that have not yet been formally described (Trifonov, 2011). Each could be associated to the constraints imposed by information content and reflecting in oligonucleotide frequencies, number of poly-A tracts and text complexity (Orlov et al., 2006). Identifying regions of DNA with extreme statistical characteristics is an important aspect of the structural analysis of genomes and sequenced genome fragments.

Acknowledgement

Authors are grateful to Drs. D. Afonnikov, V. Levitsky and M. Ponomarenko for critical comments. The software was tested on high-throughput computer cluster at ICG. The work is supported in part by RFBR 11-04-01888, 11-04-92712-IND, the Russian Ministry of science and education (projects N 07.514.11.4011, 07.514.11.4023, 857).

References

- Benderdour M., Fahmi H., Beaudet F. *et al*. Nuclear receptor retinoid-related orphan receptor α1 modulates the metabolic activity of human osteoblasts // J. of Cell. Biochem. 2011. V. 112. N 8. P. 2160–2169.
- Bulyk M.L., Johnson P.L.F., Church G.M. Nucleotides of transcription factor binding sites exert interdependent effects on the binding affinities of transcription factors // Nucl. Acids Res. 2002. V. 30. P. 1255–1261.
- Fickett J.W., Hatzigeorgiou A.C. Eukaryotic promoter recognition // Genome Res. 1997. V. 7. P. 861–878.
- Mahony S., Benos P.V. STAMP: a web tool for exploring DNA-binding motif similarities // Nucl. Acids Res. 2007. V. 35 (Web Server issue). P. W253–W258.
- Man T.K., Stormo G.D. Non-independence of Mnt repressor-operator interaction determined by a new quantitative multiple fluorescence relative affinity (QuMFRA) assay // Nucl. Acids Res. 2001. V. 29. P. 2471–2478.
- Orlov Y.L., Te Boekhorst R., Abnizova I.I. Statistical measures of the structure of genomic sequences: entropy, complexity, and position information // J. Bioinform. Comput. Biol. 2006. V. 4. N 2. P. 523–536.
- Putta P., Mitra C.K. Conserved short sequences in promoter regions of human genome // J. Biomol. Struct. Dyn. 2010. V. 27. N 5. P. 599–610.
- Trifonov E.N. Thirty years of multiple sequence codes // Genomics Proteomics Bioinformatics. 2011. V. 9. N 1/2. P. 1–6.
- Wei G.H., Badis G., Berger M.F. *et al.* Genome-wide analysis of ETS-family DNA-binding *in vitro* and *in vivo* // The EMBO J. 2010. V. 29. N 13. P. 2147–2160.
- Wray G.A. The evolutionary significance of cis-regulatory mutations // Nat. Rev. Genetics. 2007. V. 8. P. 206–216.
- Yamamoto Y., Ichida H., Matsui M. *et al.* Identification of plant promoter constituents by analysis of local distribution of short sequences // BMC Genomics. 2007. V. 8. N 67. P. 1–23.

ОТНОСИТЕЛЬНО КОНСЕРВАТИВНЫЕ ОБЩИЕ КОРОТКИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ В САЙТАХ СВЯЗЫВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ И миРНК

П. Путта^{1, 3}, Ю.Л. Орлов², Н.Л. Подколодный², Ч.К. Митра³

 ¹ Медицинская и молекулярная генетика, Школа клинической и экспериментальной медицины, Университет Бирмингема, Бирмингем, Великобритания;
² Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия;
³ Университет Хайдарадаба, Хайдарабад, Индия

Сайты связывания транскрипционных факторов (ССТФ), специфичные ДНК-связывающие мотивы, которые распознаются факторами транскрипции, – это короткие и часто вырожденные последовательности. Специфичное к последовательности связывание транскрипционного фактора к ДНК контролирует регуляцию экспрессии генов на уровне транскрипции. Высокопроизводительное геномное секвенирование дает растущие большие объемы данных по профилям связывания транскрипционных факторов в геноме, требующие разработки новых средств анализа. Мы разработали компьютерную программу для изучения коротких мотивов в последовательностях ДНК. Нас интересовало изучение общих характеристик последовательностей сайтов связывания транскрипционных факторов, которое может помочь в определении консервативных паттернов на нуклеотидном уровне. Была исследовательностей между этими двумя наборами.

Ключевые слова: геном, сайты связывания транскрипционных факторов, миРНК, олигонуклеотиды, статистика, секвенирование.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОВ И ГЕНОМОВ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Е.К. Хлесткина

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

В последние десятилетия с введением в генетику растений молекулярных методов исследования появилось представление о молекулярно-генетических механизмах, лежащих в основе наследования и формирования полезных признаков у растений, были составлены хромосомные карты наиболее важных сельскохозяйственных культур с нанесенными на них молекулярными маркерами и генами, произошло внедрение молекулярных методов в селекционно-генетические исследования, возникло понятие молекулярной паспортизации сортов. Помимо очевидного практического значения применение молекулярных методов позволило существенно расширить и фундаментальные исследования в области генетики и эволюции растений. В настоящем обзоре рассматриваются основные современные методы генетики растений и области их применения.

Ключевые слова: геном высших растений, клонирование генов, молекулярные маркеры, транскрипция генов.

Представления о структуре и функциях генома растений и о механизмах наследования и формирования признаков, сложившиеся к 80-м гг. предыдущего столетия, основывались на результатах исследований методами классического генетического и цитогенетического анализа, что позволяло определять характер наследования качественных признаков, устанавливать хромосомное число у разных видов растений, в отдельных случаях определять, какая хромосома контролирует тот или иной признак, какие гены являются сцепленными между собой, выявлять крупные перестройки в геноме одних видов по сравнению с другими, определять хромосомный состав у межвидовых и межродовых гибридов.

Большой размер и сложная организация генома растений не позволяли с помощью существующих методов исследования составлять насыщенные хромосомные карты, неизученными оставались генетические основы количественных признаков, а для выявленных генов, контролирующих качественные признаки, затруднительным представлялось выяснение функционального назначения данных генов. Существовавшая на тот момент система биохимических маркеров (маркеры на основе анализа белкового полиморфизма) позволила несколько улучшить ситуацию с построением хромосомных карт у растений, однако возможности данного метода ограничивались низким уровнем внутривидового полиморфизма и низкой частотой встречаемости соответствующих локусов в геноме растений.

Внедрение методов клонирования, гибридизации и секвенирования геномной ДНК и кДНК растений и дальнейшее появление метода ПЦР (полимеразная цепная реакция) и ДНК-чипов определили начиная с 1980-х гг. и по настоящее время бурное развитие генетики растений по таким направлениям, как исследование структурно-функциональной организации генов и повторяющихся последовательностей ДНК растений, разработка ДНК-маркеров и применение их для составления насыщенных хромосомных карт, оценки генетического разнообразия и решения филогенетических задач.

¹ Статья написана по материалам публичной лекции, прочитанной в Институте цитологии и генетики СО РАН. Презентация и видеозапись лекции: http://www.bionet.nsc.ru/asp/?page_id=86.

Методы анализа полиморфизма ДНК: основные типы молекулярных маркеров и область их применения

Молекулярные маркеры представляют собой генетические маркеры, анализируемые на уровне ДНК. К ним применимы термины классической генетики, такие, как локус, аллель, доминантный и кодоминантный тип наследования. Аллели маркерных локусов представляют собой различные формы (нуклеотидные последовательности, отличающиеся по длине и/или по нуклеотидным заменам) одного и того же маркера, расположенные в одинаковых участках (локусах) гомологичных хромосом. Если метод анализа маркера позволяет выявлять оба аллеля, говорят о кодоминантном типе наследования данного маркера, если выявляется только один аллель – о доминантном наследовании.

В настоящее время существуют огромное разнообразие методов анализа полиморфизма ДНК и множество комбинаций данных методов, что затрудняет создание единой более или менее подробной классификации ДНК-маркеров. При изучении генома растений наиболее часто используются следующие подходы: RFLP, CAPS, STS, RAPD, SCAR, AFLP, SSAP, SSR, ISSR, DArT и SNP (табл. 1). По основному методу, на котором строится тот или иной подход к анализу полиморфизма ДНК, молекулярные маркеры можно разделить на маркеры, основанные на блот-гибридизации, ПЦР и ДНК-чипах. При этом в каждой из трех групп маркеры разделяются на монолокусные и мультилокусные. Все мультилокусные маркеры объединяют еще и под общим названием «методы геномного фингерпринтинга». Монолокусные маркеры наследуются, как правило, по кодоминантному типу, мультилокусные - по доминантному (табл. 1) (Хлесткина, Салина, 2006; Landjeva et al., 2007).

Для адекватного подбора маркеров с целью решения той или иной генетической задачи необходимо учитывать такие критерии, как цель использования, возможность сопоставления полученных результатов с данными других исследователей, материальные и временные затраты, необходимые для проведения исследования с выбранной группой маркеров, уровень полиморфизма и возможность автоматизации процесса (рис. 1). Основные характеристики маркеров служат для отбора подходящего типа маркеров в зависимости от указанных выше критериев. Так, кодоминантные монолокусные маркеры, характеризующие индивидуальный локус, часто используются для популяционно-генетических исследований, картирования генов и геномов, сравнительного картирования и построения консенсусных карт в пределах одного рода (SSR, RFLP) или более крупных таксономических единиц (RFLP). Геномный фингерпринтинг применяется чаще всего при популяционном анализе видов, геном которых практически не изучен. Кроме того, такие методы геномного фингерпринтинга, как AFLP и DArT, эффективны для насыщения генетических карт локусами молекулярных маркеров (табл. 1) (Хлесткина, Салина, 2006).

Следующий пример иллюстрирует, насколько эффективно применение молекулярных маркеров позволило продвинуться в картировании генома растений: первая молекулярно-генетическая карта, построенная в 1991 г. для пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.), содержала в 1,5 раза больше локусов и была в 1,2 раза длиннее прежней классической генетической карты, которая являлась результатом трудов многих исследователей в течение нескольких десятилетий.

Молекулярные маркеры нашли свое применение и в селекционно-генетических исследованиях, появились понятия «селекция с помо-



Рис. 1. Уровень внутривидового полиморфизма и возможность автоматизации анализа различных типов ДНК-маркеров.
Таблица 1

Классификация и сравнительные характеристики монолокусных и мультилокусных ДНК-маркеров

Классификация	Монолокусные маркеры	Мультилокусные маркеры		
Классификация				
Методы, основанные на блот- гибридизации	RFLP (restriction fragment length poly- morphism) – полиморфизм длины рест- рикционных фрагментов (Botstein <i>et</i> <i>al.</i> , 1980)	Минисателлиты (Jeffreys <i>et al.</i> , 1985)		
Методы, основанные на ПЦР	SSR (simple sequences repeats) – простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты) (Tautz, Renz, 1984) STS (sequences tagged site) – последо- вательности, характеризующие локус (Olson <i>et al.</i> , 1989) SCAR (sequence characterized ampli- fied region) – последовательность, ха- рактеризующая амплифицированную область (Paran, Michelmore, 1993) SSCP (single strand conformation poly- morphism) – полиморфизм конформа- ции одноцепочечной ДНК (Orita <i>et al.</i> , 1989) CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) – расщепленные амплифици- рованные полиморфные последователь- ности (Konieczny, Ausubel, 1993)	 RAPD (random amplified polymorphic DNA) – случайно амплифицированная полиморфная ДНК (Welsh <i>et al.</i>, 1990; Williams <i>et al.</i>, 1990) ISSR (inter simple sequence repeats) – межмикросателлитные последовательности (Zietkiewicz <i>et al.</i>, 1994) IRAP (inter-retrotransposon amplified polymorphism) – полиморфизм амплифицированных последовательностей между ретротранспозонами (Kalendar, Schulman, 2006) AFLP (amplified fragment length poly- morphism) – полиморфизм длины ам- плифицированных фрагментов (Vos <i>et al.</i>, 1995) SSAP (sequence-specific amplification polymorphism) – полиморфизм специ- фично амплифицированных последова- тельностей (Waugh <i>et al.</i>, 1997) 		
Методы, основанные на применении ДНК-чипов	SNP (single-nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм (Wang <i>et al.</i> , 1998)	DArT (diversity array technology) – ДНК- чип технология для изучения разнообра- зия (Jaccoud <i>et al.</i> , 2001)		

Тип наследования и область применения

Наследование	Кодоминантный тип	Доминантный тип
Область применения у растений	 Картирование генов, хромосом и геномов Маркирование генов Выделение нуклеотидных последовательностей генов Селекция с помощью молекулярных маркеров Молекулярная паспортизация сортов Диагностика заболеваний Исследование генетического разнообразия Филогенетические исследования 	 Филогенетические исследования Картирование генов геномов (только AFLP, DArT) Молекулярная паспортизация сортов Исследование генетического разно- образия

щью молекулярных маркеров» (marker-assisted selection – MAS) и «молекулярная паспортизация сортов». Селекция с помощью молекулярных маркеров облегчает и ускоряет направленную передачу сорту-реципиенту фрагментов генома донора, содержащих целевые гены, существенно ускоряя процесс получения новых сортов, а также позволяет применять новый подход в селекции – пирамидизацию генов (Landjeva *et al.*, 2007). Молекулярная паспортизация сортов служит для повышения эффективности регистрации новых сортов, защиты авторских прав и проверки чистоты сортового материала.

Подходы к выделению нуклеотидных последовательностей генов и анализ их транскрипционной активности

Существует достаточно широкий спектр подходов для направленного выделения нуклеотидной последовательности целевого гена. Выбор подхода зависит от исходных данных о гене и от того, насколько полная информация о последовательности гена необходима для решения дальнейших задач. В табл. 2 приведены критерии выбора адекватного подхода к выделению нуклеотидной последовательности целевого гена, названия соответствующих подходов и примеры их использования. В качестве иллюстрации приведены схемы таких методов выделения нуклеотидных последовательностей генов, как дифференциальный скрининг библиотек кДНК (рис. 2), дифференциальный дисплей (рис. 3) и вычитающая гибридизация (рис. 4).

Большинство из перечисленных в табл. 2 подходов приводит к выделению частичной нуклеотидной последовательности целевого гена. Секвенирование частичной нуклеотидной последовательности достаточно для дальнейшего картирования и изучения экспрессии целевого гена. Для получения полной последовательности кДНК были разработаны методы амплификации концов кДНК in vitro, известные под общим названием «быстрая амплификация концевых фрагментов кДНК» (rapid amplification of cDNA ends, RACE). Эти подходы разделяются на 5'RACE и 3'RACE; принцип данных подходов основан на селективной супрессии полимеразной цепной реакции (Лукьянов и др., 1999). Дальнейшее конструирование

праймеров к различным участкам выделенной полной последовательности кДНК (или к EST) и использование их для амплификации геномной ДНК позволяют выделить последовательности интронов.

Для понимания функциональной организации и эволюции целевого гена требуется выделение его полноразмерной геномной последовательности включая промоторную область, а иногда и более протяженные прилегающие районы. Наличие полных геномных последовательностей в базах данных, полученных в результате реализации проектов по секвенированию геномов растений (например арабидопсиса или риса), позволяет на основе гомологии идентифицировать и анализировать полноразмерные последовательности целевых генов, но только у этих видов. Для того чтобы выделить полноразмерную последовательность целевого гена из неотсеквенированного генома, необходимо с помощью гомологичных последовательностей (путем гибридизации) или подобранных к ним праймеров (методом ПЦР) проводить скрининг геномных библиотек изучаемого вида. Дальнейший анализ отобранных позитивных клонов позволяет определить полноразмерную геномную последовательность целевого гена включая прилегающие районы. Выделение промоторных участков генов может проводиться и с помощью подхода, основанного так же, как и RACE-метод, на селективной супрессии полимеразной цепной реакции и известного под названиями «прогулка по хромосоме» (chromosome walking) или «прогулка по геному» (genome walking). Таким способом, например, были выделены последовательности промоторных областей гомеологичных генов WLHS-1 пшеницы, контролирующих идентичность органов цветка (Shitsukawa et al., 2007).

Реализация масштабных программ по секвенированию геномов различных организмов привела к накоплению огромного числа нуклеотидных последовательностей и поставила перед исследователями задачу определения функционального значения полученной генетической информации. Основным инструментом, определяющим функцию генов, является дифференциальное исследование генной экспрессии. Путем определения того, какие гены экспрессируются, а какие неактивны в данной



Рис. 3. Схема метода «Дифференциальный дисплей» на примере выделения гена периллы, кодирующего 5-О-гликозидантоцианидинтрансферазу (Yamazaki *et al.*, 1999).





Рис. 4. Схема выделения гена, кодирующего ауреузидинсинтазу львиного зева, на основе вычитающей гибридизации (Nakayama *et al.*, 2000).

ткани (органе) в данных условиях у данного организма (генотипа), можно выяснить их функциональное значение.

Методы анализа транскрипционной активности генов можно разделить на три основные группы: методы, основанные (1) на гибридизации нуклеиновых кислот, (2) на ПЦР (при использовании в качестве матрицы кДНК) и (3) на секвенировании экспрессирующихся последовательностей ДНК. Кроме того, в зависимости от поставленных задач все подходы по анализу экспрессии генов разделяются на подходы, направленные на изучение экспрессии индивидуальных генов и на выделение наиболее полного спектра генов, по экспрессии которых отличаются сравниваемые образцы (табл. 3).

К числу методов анализа транскрипционной активности генов на основе гибридизации нук-

леиновых кислот относится метод вычитающей гибридизации, позволяющий идентифицировать дифференциально экспрессирующиеся гены (рис. 4), метод Нозерн-блот гибридизации (Нозерн-блоттинг), обратный Нозерн-блоттинг, ставший прототипом современного подхода, известного как «gene expression profiling» (составление профилей экспрессии генов), основанного на различных высокопроизводительных методиках, в частности на использовании ДНК-чипов, позволяющих одновременно анализировать экспрессию тысяч генов.

Применение ДНК-чипов пришло в транскриптомику из геномики, где использование ДНК-чипов сначала было предложено в качестве альтернативного метода для секвенирования ДНК (Drmanac *et al.*, 1989), а затем и для высокопроизводительного генотипирования. Однако

	Критерии выбор;	а адекватного подхода к выделению нуклеотидной по (Winkel-Shirley, 2001; Himi, Noda, 2004; Khlestkina	оследовательности целевого гена a <i>et al.</i> , 2008)
Исходные данные 1	Исходные данные 2	Подход к выделению нуклеотидной последовательности гена	Пример
Продукт целевого гена неизвестен,	Имеются мутантные или изогенные	Метод транспозонного мечения	Ген <i>CI</i> кукурузы, кодирующий транскрипционный фактор, необ- ходимый для биосинтеза антоцианов (Cone <i>et al.</i> , 1986)
с какими генами взаимодействует – не известно	линии по целевому признаку	Метод Т-ДНК мечения	Ген LCR арабидопсиса, кодирующий лейкоантоцианидинре- дуктазу (Devic et al., 1999)
		Дифференциальный дисплей	Ген 5 <i>GT</i> периллы, кодирующий 5-О-гликозидантоцианидин- трансферазу (Yamazaki <i>et al.</i> , 1999)
	Локус картирован	Позиционное клонирование гена	Ген <i>ТТG1</i> арабидопсиса, кодирующий транскрипционный фактор, необходимый для биосинтеза антоцианов (Walker <i>et al.</i> , 1999)
Продукт целевого гена неизвестен,	I	Саузерн-Вестерн скрининг экспрессирующейся библиотеки	Гены <i>CPRF1</i> и <i>CPRF2</i> петрушки, кодирующие регуляторные факторы биосинтеза флавоноидов (Weisshaar <i>et al.</i> , 1991)
но известно, с каки- ми генами он взаи- модействует		Метод двугибридного скрининга	Гены <i>CPRF5</i> , <i>CPRF6</i> и <i>CPRF7</i> петрушки, кодирующие регуляторные факторы биосинтеза флавоноидов (Rügner <i>et al.</i> , 2001)
Известен продукт целевого гена	Известна аминокислотная последовательность	ПЦР-скрининг кДНК библиотеки с помощью вырожденных праймеров, подобранных к аминокислотной последователь- ности	Ген <i>IOMT</i> люцерны, кодирующий изофлавон-О-метилтранс- феразу (Не <i>et al.</i> , 1998)
	белкового продукта	Метод выделения индуцированных кДНК, соответствующих аминокислотной последовательности очищенного фермента	Ген <i>CHR</i> сои, кодирующий халконредуктазу (Welle <i>et al.</i> , 1991)
		Вычитающая гибридизация + секвенирование пептидов	Ген <i>AUS</i> львиного зева, кодирующий ауреузидинсинтазу (Nakayama <i>et al.</i> , 2000)
	Выделен белковый продукт	Скрининг экспрессирующихся <i>in vitro</i> библиотек кДНК при помощи антител к очищенному белковому продукту	Ген <i>CHI</i> фасоли, кодирующий халконфлавононизомеразу (Mehdy, Lamb, 1987)
		Дифференциальный скрининг библиотек кДНК	Ген <i>RT</i> петунии, кодирующий антоцианидин-3-гликозидрамно- зилтрансферазу (Brugliera <i>et al.</i> , 1994)
Известна нуклео- тидная последова- тельность гена	Отсутствуют гомологичные EST в базе данных	Саузерн- или ПЦР-скрининг геномной ДНК или кДНК биб- лиотеки	Ген <i>F3H</i> кукурузы, кодирующий флаванон-3-гидроксилазу (Deboo <i>et al.</i> , 1995)
с такои же функци- ей у других видов	изучаемого вида	ПЦР на геномной ДНК или кДНК с консервативными прай- мерами	Ген <i>DFR</i> пшеницы, кодирующий дигидрофлавонол-4-редуктазу (Himi, Noda, 2004)
	Имеются гомологич- ные EST в базе дан- ных изучаемого вида	ПЦР на геномной ДНК или кДНК со специфическими прай- мерами	Ген <i>F3H</i> пшеницы, кодирующий флаванон-3-гидроксилазу (Khlestkina <i>et al.</i> , 2008)

ž

Таблица 2

Вавиловский журнал генетики и селекции, 2011, Том 15, № 4

763

Таблица 3

Классификация	Выделение наиболее полного спектра генов, по экспрессии которых отличаются сравниваемые образцы	Изучение экспрессии индивидуальных генов
Методы, основанные на гибридизации нуклеиновых кислот	Вычитающая гибридизация (Sargent, Dawid, 1983) Обратный нозерн-блоттинг Гибридизация НК на микрочипах (Drmanac <i>et al.</i> , 1989)	Нозерн-блоттинг (Alwine <i>et al.</i> , 1977)
Методы, основанные на ПЦР	РНК-фингерпринтинг с помощью ПЦР (Moody <i>et al.</i> , 2001)	ОТ-ПЦР со специфическими праймерами (Rappolee <i>et al.</i> , 1988) ОТ-ПЦР в реальном времени (Higuchi <i>et al.</i> , 1993)
Методы, основанные на секвенировании экспрессирующихся последовательностей ДНК	Анализ EST (Adams <i>et al.</i> , 1991) SAGE (Velculescu <i>et al.</i> , 1997) Секвенирование транскриптома методами высокопроизводительного секвенирования (Blencowe <i>et al.</i> , 2009)	Анализ EST, гомологичных целе- вому гену

Классификация методов анализа транскрипционной активности генов

наиболее успешным направлением исследований с использованием ДНК-чипов стал именно анализ экспрессии генов. В основе создания ДНК-чипов для мониторинга экспрессии генов лежит возможность идентифицировать целевую последовательность на основании последовательности гибридизующейся с ней пробы. При этом пробы иммобилизованы на плоскости, и каждой из них соответствует определенная локализация (Schena *et al.*, 1995).

Первый чип для анализа экспрессии (cDNA microarray) содержал всего 45 различных последовательностей длиной около 1000 п.н., полученных с помощью ПЦР, каждая из которых соответствовала определенному гену. Для размещения проб на чипе использовалось специально сконструированное автоматическое устройство. Однако первые чипы для анализа экспрессии генов отличались рядом недостатков (дорогостоящий и трудоемкий процесс создания чипов, низкая воспроизводимость результатов, ограниченное число проб на одном чипе). Преодолеть эти недостатки удалось с применением фотолитографического метода синтеза чипов, несущих пробы в виде коротких (20-25 п.н.) олигонуклеотидов (по 10-20 олигонуклеотидов, соответствующих каждому гену). Такой подход, предложенный компанией Affymetrix (www.affymetrix.com), существенно повышает точность и воспроизводимость количественного анализа экспрессии генов, делает возможной высокую плотность размещения проб, это позволяет анализировать с помощью одного чипа тысячи генов и полностью охватывать геном изучаемого организма.

Несколько опережая развитие методов дифференциального анализа экспрессии генов с помощью ДНК-чипов, появились и получили широкое применение методы РНК-фингерпринтинга на основе ПЦР: RAP-PCR, дифференциальный дисплей (DD-PCR), cDNA-AFLP, ACP-PCR GeneFishing. Несмотря на то что в настоящее время данные подходы уступают по своей воспроизводимости, возможности автоматизации анализа, производительности и возможности количественного анализа методам, основанным на использовании ДНК-чипов, доступность и низкая стоимость методов РНКфингерпринтинга на основе ПЦР способствуют их широкому применению. Данные подходы основаны на ОТ-ПЦР (ПЦР на кДНК) с применением различных методов фингерпринтинга. Например, сочетание ОТ-ПЦР и AFLP дало метод cDNA-AFLP, сочетание ОТ-ПЦР и RAPD дало RAP-PCR. Метод дифференциального дисплея основан на использовании праймеров в виде олигоdT с двумя случайными основаниями на 3'-конце (рис. 3). Метод выявления дифференциально экспрессирующихся генов с помощью высокоспецифичной ПЦР (АСР-

PCR GeneFishing) основан на использовании структуры их трех составляющих, а именно из полиdI (дезоксиинозин) линкера, соединяющего целевую (с 3'-конца линкера) и универсальную нецелевую (с 5'-конца линкера) последовательности. Такая конструкция позволяет значительно повысить специфичность ПЦР, а сочетание использования данной структуры и случайных праймеров дает эффективный метод выявления дифференциально экспрессирующихся генов (Moody, 2001).

Тогда как РНК-фингерпринтинг используется для выявления дифференциально экспрессирующихся генов, методы, основанные на ОТ-ПЦР со специфичными праймерами, призваны помочь исследователям выявить различия в экспрессии определенного гена у разных образцов. При этом с помощью ОТ-ПЦР могут быть продемонстрированы как качественные отличия (активен ген или неактивен), так и количественные изменения. Количественная ПЦР (или ПЦР в реальном времени) основана на флюоресцентной регистрации накопления ДНК непосредственно в процессе ПЦР, что дает возможность определять количество исходного числа матриц. В случае ОТ-ПЦР количественный анализ позволяет установить число молекул мРНК (или относительный уровень экспрессии) определенного гена в том или ином образце (Ребриков и др., 2009).

В начале 1990-х гг. развитие высокопроизводительных методов секвенирования ДНК положило начало созданию баз данных EST (expressed sequences tags) на основе секвенирования библиотек кДНК. EST получают в результате случайного отбора клонов из библиотек кДНК и секвенирования коротких участков (длиной 300-500 п.н.) из расчета один участок на клон. Количественные различия в экспрессии какого-либо гена могут быть установлены в результате подсчета частоты, с которой последовательность данного гена встречается в библиотеках, полученных на различных образцах. Результаты такого сравнения являются достаточно точными (при условии использования ненормированных библитотек, т. е. библиотек, при получении которых не происходило выравнивания численности клонов, содержащих транскрипты разных генов), а эффективность такого подхода возрастает с накоплением информации в базах данных EST.

Существует ускоренная версия секвенирования EST - последовательный анализ экспрессии генов (serial analysis of gene expression, SAGE). SAGE-последовательности получают на основе мРНК, выделяя короткую последовательность из определенного участка (как правило, SAGEпоследовательности представляют собой 9 пар оснований сразу после последнего сайта узнавания эндонуклеазой в данном транскрипте). Множество SAGE-последовательностей лигируют между собой так, чтобы получались удобные для секвенирования последовательности длиной 300-500 п.н., встраивают в вектор для клонирования, секвенируют и анализируют полученные последовательности (Moody et al., 2001).

С разработкой подходов высокопроизводительного секвенирования, основанных на методе пиросеквенирования (Nyren, 2007), в частности «454 секвенирования» (Rothberg, Leamon, 2008), стало возможным осуществление прямого секвенирования транскриптома. В настоящее время это наиболее точный и перспективный метод идентификации дифференциально экспрессирующихся генов (Blencowe *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010).

Применение современных молекулярных методов позволило существенно расширить фундаментальные исследования в области физиологической генетики, популяционной генетики, онтогенетики и филогенетики растений, получить новые данные об эволюции генома и составить представление о молекулярно-генетических механизмах, лежащих в основе наследования и формирования полезных признаков у растений. Внедрение молекулярных методов в селекционно-генетические исследования принесло и ощутимый практический вклад и позволило эффективно проводить получение новых сортов с заранее заданными свойствами.

Литература

- Лукьянов К.А., Гурская Н.Г., Богданова Е.А., Лукьянов С.А. Селективная супрессия полимеразной цепной реакции // Биоорг. химия. 1999. Т. 25. С. 163–170.
- Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др. ПЦР в реальном времени. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 215 с.

- Хлесткина Е.К., Салина Е.А. SNP-маркеры: методы анализа, способы разработки и сравнительная характеристика на примере мягкой пшеницы // Генетика. 2006. Т. 42. С. 725–736.
- Adams M.D., Kelley J.M., Gocayne J.D. *et al.* Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project // Science. 1991. V. 252. P. 1651–1656.
- Alwine J.C., Kemp D.J., Stark G.R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5350–5354.
- Blencowe B.J., Ahmad S., Lee L.J. Current-generation high-throughput sequencing: deepening insights into mammalian transcriptomes // Genes Dev. 2009. V. 23. P. 1379–1386.
- Botstein D., White R.L., Scolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // Am. J. Hum. Genet. 1980. V. 32. P. 314–331.
- Brugliera F., Holton T.A., Stevenson T.W. *et al.* Isolation and characterization of a cDNA clone corresponding to the *Rt* locus of *Petunia hybrida* // Plant J. 1994. V. 5. P. 81–92.
- Cone K.C., Burr F.A., Burr B. Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus C1 // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 9631–9635.
- Devic M., Guilleminot J., Debeaujon I. *et al.* The BANYULS gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development // Plant J. 1999. V. 19. P. 387–398.
- Deboo G.B., Albertsen M.C., Taylor L.P. Flavanone 3hydroxylase transcripts and flavonol accumulation are temporally coordinate in maize anthers // Plant J. 1995. V. 7. P. 703–713.
- Drmanac R., Labat I., Brukner I., Crkvenjakov R. Sequencing of megabase plus DNA by hybridization: theory of the method // Genomics. 1989. V. 4. P. 114–128.
- He X.Z., Reddy J.T., Dixon R.A. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L). XXII. cDNA cloning and characterization of an elicitor-inducible isoflavone 7-O-methyltransferase // Plant Mol. Biol. 1998. V. 36. P. 43–54.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions // Biotechnology. 1993. V. 11. P. 1026–1030.
- Himi E., Noda K. Isolation and location of three homoeologous dihydroflavonol-4-reductase (DFR) genes of wheat and their tissue-dependent expression // J. Exp. Bot. 2004. V. 55. P. 365–375.
- Jaccoud D., Peng K., Feinstein D., Kilian A. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping // Nucl. Acids Res.

2001. V. 29. P. e25.

- Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA// Nature. 1985. V. 314. P. 67–73.
- Kalendar R., Schulman A.H. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting // Nat. Protoc. 2006. V. 1. P. 2478–2484.
- Khlestkina E.K., Röder M.S., Salina E.A. Relationship between homoeologous regulatory and structural genes in allopolyploid genome – a case study in bread wheat // BMC Plant Biol. 2008. V. 8. P. 88.
- Konieczny A., Ausubel F.M. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotypespecific PCR-based markers // Plant J. 1993. V. 4. P. 403–410.
- Landjeva S., Korzun V., Börner A. Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding // Euphytica. 2007. V. 156. P. 271–296.
- Mehdy M.C., Lamb C.J. Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection // EMBO J. 1987. V. 6. P. 1527–1533.
- Moody D.E. Genomics techniques: An overview of methods for the study of gene expression // J. Anim. Sci. 2001. V. 79. P. 128–135.
- Nakayama T., Yonekura-Sakakibara K., Sato T. *et al.* Aureusidin Synthase: a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration // Science. 2000. V. 290. P. 1163–1166.
- Nyren P. The history of pyrosequencing // Meth. Mol. Biol. 2007. V. 373. P. 1–13.
- Olson M., Hood L., Cantor C., Dotstein D. A common language for physical mapping of the human genome // Science. 1989. V. 245. P. 1434–1435.
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H. *et al.* Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 2766–2770.
- Paran I., Michelmore R.W. Development of reliable PCRbased markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce // Theor. Appl. Genet. 1993. V. 85. P. 985–993.
- Rappolee D.A., Mark D., Banda M.J., Werb Z. Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors *in vivo*: analysis by mRNA phenotyping // Science. 1988. V. 241. P. 708–712.
- Rothberg J.M., Leamon J.H. The development and impact of 454 sequencing // Nature Biotech. 2008. V. 26. P. 1117–1124.
- Rügner A., Frohnmeyer H., Näke C. *et al.* Isolation and characterization of four novel parsley proteins that interact with the transcriptional regulators CPRF1 and CPRF2 // Mol. Genet. Genomics. 2001. V. 265. P. 964–976.

- Sargent T.D., Dawid I.B. Differential gene expression in the gastrula of *Xenopus laevis //* Science (Wash. DC). 1983. V. 222. P. 135–139.
- Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray // Science. 1995. V. 270. P. 467–470.
- Shitsukawa N., Tahira C., Kassai K. *et al.* Genetic and epigenetic alteration among three homoeologous genes of a class E MADS box gene in hexaploid wheat // Plant Cell. 2007. V. 19. P. 1723–1737.
- Tautz D., Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. P. 4127–4138.
- Velculescu V.E., Zhang L., Zhou W. *et al.* Characterization of the yeast transcriptome // Cell. 1997. V. 88. P. 243–251.
- Vos P., Hogers R., Reijans M. *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 4407–4414.
- Walker A.R., Davison P.A., Bolognesi-Winfield A.C. et al. The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein // Plant Cell. 1999. V. 11. P. 1337–1350.
- Wang D.G., Fan J.B., Siao C.J. *et al.* Large-scale identification, mapping, and genotyping of singlenucleotide polymorphisms in the human genome // Science. 1998. V. 280. P. 1077–1082.
- Wang L., Li P., Brutnell T.P. Exploring plant transcriptomes using ultra high-throughput sequencing // Brief. Funct. Genom. 2010. V. 9. P. 118–128.

- Waugh R., McLean K., Flavell A.J. *et al.* Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP) // Mol. Gen. Genet. 1997. V. 253. P. 687–694.
- Weisshaar B., Armstrong G.A., Block A. *et al.* Lightinducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness // EMBO J. 1991. V. 10. P. 1777–1786.
- Welle R., Schröder G., Schiltz E. *et al.* Induced plant responses to pathogen attack. Analysis and heterologous expression of the key enzyme in the biosynthesis of phytoalexins in soybean (*Glycine max* L. Merr. cv. Harosoy 63)// Eur. J. Biochem. 1991. V. 196. P. 423–430.
- Welsh J., Chada K., Dalal S.S. *et al.* Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA// Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 4965–4970.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 6531–6535.
- Yamazaki M., Gong Z., Fukuchi-Mizutani M. *et al.* Molecular cloning and biochemical characterization of a novel anthocyanin 5-O-glucosyltransferase by mRNA differential display for plant forms regarding anthocyanin // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 7405–7411.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. 1994. V. 20. P. 176–183.

MOLECULAR METHODS OF THE ANALYSIS OF THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ORGANIZATION OF GENES AND GENOMES IN HIGHER PLANTS

E.K. Khlestkina

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

Summary

A significant progress has been made in plant genetics in recent decades with the advent of molecular methods. Notions on the molecular mechanisms governing the inheritance and formation of valuable traits in plants have been developed. Chromosomal maps with molecular markers and genes have been compiled for the most important crops. Molecular methods have been introduced to breeding, and steps have been done to molecular certification of crop cultivars. In addition to the obvious practical advantages, molecular methods have given an impetus to basic studies in plant genetics and evolution. Modern methods of plant genetics and the range of their application are reviewed.

Key words: higher plant genomes, gene cloning, molecular markers, gene transcription.

ЭВОЛЮЦИЯ БАЗОВОГО ЧИСЛА ХРОМОСОМ В СЕМЕЙСТВЕ ЗЛАКОВЫХ (POACEAE BARNH.)

А.И. Щапова

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

Семейство злаков (Poaceae Barnh.) является одним из крупных таксонов среди покрытосеменных растений, включает более 10 тыс. видов, 700 родов, 41 трибу. Приведены результаты сравнительного анализа базовых чисел хромосом (БЧХ) (основного числа хромосом гаплоидного генома) у видов злаков 372 родов 37 разных триб. Показано, что при наличии в семействе злаков большого разнообразия БЧХ (x = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13) этот признак оказался очень консервативным, виды одного рода имеют преимущественно одно БЧХ. При этом у большинства родов x = 10 (31,9%) и x = 7 (29,5%). У 25 триб различий между родами по БЧХ не обнаружено: одна триба имеет x = 13, две – x = 7, три – x = 11, четыре – x = 10, пятнадцать – x = 12. Остальные трибы имеют несколько БЧХ. Наибольшее разнообразие по БЧХ обнаружено у трибы Роеае (x = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 13).

С помощью RFLP (restriction fragment length polymorphism) и EST-SSR-маркеров установлена гомология генетических карт геномов у видов, принадлежащих не только к разным трибам, но и даже к разным подсемействам злаков. Приведены также экспериментальные доказательства того, что разнообразие БЧХ в семействе злаков является следствием многократной гибридизации с последующей полиплоидизацией и дисплоидизацией предковых малохромосомных видов.

Результаты кариологических исследований по определению чисел хромосом и молекулярных исследований по составлению генетических карт у видов злаков, составленных с использованием RFLP и EST-SSR маркеров, указывают на то, что эволюционные преобразования гаплоидных геномов, а следовательно и их БЧХ, путем полиплоидизации и дисплоидизации в основном были завершены у предковых форм ныне существующих родов. Имеющееся разнообразие БЧХ в семействе злаков, вероятно, является следствием того, что предковые формы разных родов претерпели разную степень полиплоидизации и дисплоидизации, а филогению видов злаков разных родов следует рассматривать не как производные от одного предкового прародителя полиплоидного генома, а как параллельные ряды, произошедшие от гибридизации разных близкородственных малохромосомных видов.

Предполагается, что дальнейшее преобразование гаплоидных геномов у предковых форм посредством полиплоидизации и дисплоидизации было приостановлено в период перехода злаков на устойчивую спорофитную фазу жизненного цикла. Основным фактором, наложившим запрет на этот процесс, возможно, явилось существенное преобразование в этот период архитектоники клеточного ядра в связи с переходом его на устойчивую диплофазу.

Ключевые слова: семейство злаковых, базовое число хромосом, гаплоидный геном, систематика, филогения, эволюция видов.

Введение

Семейство злаков (Poaceae Barnh. = Gramineae Juss.) является одним из крупных семейств цветковых растений. По количеству родов оно уступает только семейству Asteraceae (Сложноцветные). Злаки занимают обособленное положение по многим морфологическим признакам не только среди покрытосеменных растений, но и в пределах класса однодольных (Liliopsida). Исходя из обособленности злаков, многие исследователи пришли к выводу, что ни один из современных порядков однодольных не может быть предковым по отношению к злакам (Цвелев, 1976). Предполагают также, что семенные растения появились в конце мезозойской эры (75 млн лет назад) (Рейвн и др., 1990), а древние ископаемые злаки обнаружены в палеоцене–эоцене (50–60 млн лет назад) (Bennetzen, Freeling, 1997).

Исследованию видов злаков и их систематики посвящено большое число работ. На основании морфологических, анатомических, биохимических и ряда других признаков виды злаков объединены в рода, трибы и подсемейства. В семейство злаков по данным разных исследователей, включено более 10000 видов, 700 родов, 41 триба (Tzvelev, 1989; Kellogg, 1998, 2001). Согласно систематике, предложенной Н.Н. Цвелевым (Tzvelev, 1989), все имеющееся разнообразие видов злаков поделено на два подсемейства: Bambusoideae и Pooideae. В подсемейство Bambusoideae включено 14 триб, а в Pooideae 27 триб пяти разных групп: Оризоидные, Фестикоидные, Арундиноидные, Хлоридоидные и Паникоидные.

Однако в последние годы в систематику семейства злаков внесены некоторые изменения, касающиеся в основном деления подсемейства Pooideae на несколько подсемейств: Oryzoideae, Pooideae, Arundinoideae, Chloridoideae, Panicoideae (Mathews *et al.*, 2000). Трибы злаков подсемейства Pooideae, отнесенные Н.Н. Цвелевым к разным группам, вошли по новой классификации в разряд подсемейств. Продолжаются также исследования по уточнению систематики видов разных триб злаков (Goncharov *et al.*, 2009).

Однако, несмотря на проведенные многочисленные исследования, филогения семейства злаков остается детально неизученной. В данной работе приведены результаты сравнительного анализа цитологических и молекулярных исследований по выяснению эволюции базового числа хромосом злаков (основного числа хромосом, или наименьшего гаплоидного числа хромосом в полиплоидном ряду видов одного рода (БЧХ).

Разнообразие базового числа хромосом в семействе злаковых

Еще в 1931 г. Н.П. Авдуловым было установлено, что в семействе злаков размер хромосом и базовое число хромосом генома, являются признаками постоянными в пределах не только большинства родов, но и даже отдельных триб (Авдулов, 1931). Им было проведено кариологическое исследование видов 106 разных родов злаков. В результате этого исследования было установлено, что виды одного рода не различаются по БЧХ, а размах изменчивости по БЧХ видов разных родов составил от x = 5 до x = 12. При этом у большинства родов x = 7 и x = 10. У видов одного рода (Briza L.) базовое число хромосом оказалось x = 5, а у видов родов *Schismus* Beauv. и Sphenopus Trin. -x = 6. Кроме этого было установлено, что кариотипы видов злаков различаются по уровню плоидности и размеру хромосом. Наиболее крупные хромосомы имеют виды трибы Hordeae (= Triticeae) с x = 7. Результаты этого исследования стимулировали проведение кариологических работ по определению базового числа хромосом у большего числа видов злаков, представляющих интерес не только для систематики, но и филогении.

Наиболее полная сводка результатов по подсчету чисел хромосом у покрытосеменных видов растений, в том числе и семейства злаков, приведены в монографии «Хромосомные числа цветковых растений» (Болховских и др., 1969) и в работах Н.Н. Цвелева (Tzvelev, 1989). При сравнительном анализе полученных данных по подсчету чисел хромосом у 3465 видов 372 родов 37 триб (35% всех видов злаков) установлено, что БЧХ злаков варьирует от x = 2до x = 13. У большинства родов злаков различий между видами по БЧХ не обнаружено. Наибольшее число родов имеет x = 7 (29,49%)и x = 10 (31,90%). Различия по БЧХ между видами одного и того же рода обнаружены у рода Panicum L. и Poa L. У двух родов злаков обнаружено наименьшее БЧХ x = 2: Zingeria P. Smirn. и Colpodium Trin. трибы Poaceae (Цвелев, Жукова, 1974).

В подсемействе Bambusoideae из 111 родов 14 триб БЧХ определено у 109 родов 11 триб. Установлено, что виды родов у 8 исследованных триб имеют x = 12, виды у одной трибы x = 11, а виды родов остальных двух триб имеют разные БЧХ: Bambuseae x = 9, 10, 12, а у Olyreae x = 9, 10, 11.

У остальных пяти подсемейств из 778 родов 27 триб БЧХ определено у видов 263 родов 26 разных триб. В подсемействе Рооіdeae размах изменчивости по базовому числу хромосом составил: от x = 2 до x = 13. Наибольшее раз-

нообразие по БЧХ обнаружено у трибы Роеае (x = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 13). Трибы Triticeae и Bromeae имеют x = 7, Brachypodieae -x = 5, 7, a Phleeae x = 5, 9. У трех триб (Brylkinieae, Diarrheneae, Lygeeae) x = 10, у двух триб (Meliceae, Stipeae) x = 9, 10, у Brachyelytreae x = 11, a у Nardeae x = 13.

В подсемействе Oryzoideae две изученные трибы имеют x = 12, у пяти триб подсемейства Arundinoideae x = 12, одной x = 11, у другой x = 6, 9, 12, в подсемействе Panicoideae x = 5, 8,9, 10, 12, 13, a y Chloridoideae x = 7, 8, 9, 10.

Среди проанализированных видов 370 родов злаков обнаружены различия и по уровню плоидности. Размах изменчивости по этому признаку составил 2x - 24x. Виды 118 родов (31,89%) оказались диплоидными (2x), у 137 (37,03%) наивысший уровень плоидности отдельных видов был тетраплоидным (4x), у 91 рода (24,60%) – гекса- и октоплоидным (6x – 8x), а у остальных 24 (6,48%) уровень плоидности отдельных видов был 10x - 24x.

В результате сравнительного анализа результатов кариологических исследований 3465 видов 372 родов 37 разных триб шести разных подсемейств злаков установлено, что при наличии в данном семействе растений большого разнообразия по БЧХ гаплоидных геномов (x = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13) виды одного рода имеют преимущественно одно БЧХ. При этом не обнаружено различий по БЧХ между родами у 25 триб. Из них две трибы имеют x = 7, четыре -x = 10, три -x = 11, пятнадцать x = 12 и одна – x = 13. Между родами остальных 12 триб обнаружены различия по БЧХ. В подсемействе Bambusoideae из 11 триб только у двух обнаружены разные БЧХ, а остальные имели x = 12. У двух кариологически изученных триб подсемейства Oryzoideae x = 12. У пяти из семи триб подсемейства Arundinoideae БЧХ также равно x = 12, у одной трибы x = 11 и другой x = 6,9 и 12. Таким образом, у большинства триб подсемейств Bambusoideae, Oryzoideae и Arundinoideae x = 12. Большим разнообразием БЧХ характеризуется подсемейство Pooideae. У двух триб этого подсемейства x = 7, у трех -x = 10, у одной x = 11 и у одной x = 13. Остальные пять триб имеют разные БЧХ. Особенно большое разнообразие их обнаружено у трибы Роеае (*x* = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 13). Одна кариологически исследованная триба подсемейства Chloridoideae и три из четырех триб подсемейства Panicoideae имеют также большое разнообразие БЧХ. Данные подсемейства злаков характеризуются большим разнообразием БЧХ входящих в них разных триб.

В систематике и филогении злаков учитывают также и размеры геномов. Размах изменчивости по количеству ДНК на диплоидное ядро среди изученных видов злаков варьирует в пределах 0,5–18,8 рg (Kellogg, 1998). Однако хромосомы крупного размера имеют только виды подсемейства Pooideae (6,0–18,8 рg).

Гомология генетических карт геномов разных видов злаков, составленных с использованием RFLP- и EST-SSR-маркеров

Первые генетические карты геномов злаков были составлены на основе RFLP маркеров (restriction fragment length polymorphism) для видов, принадлежащих не только к разным родам, но и к разным трибам и подсемействам (Hulbert et al., 1990; Whitkus et al., 1992; Ahn, Tanksley, 1993; Moore et al., 1995; Bennetzen, Freeling, 1997; Gaut, Doebley, 1997). При сравнительном анализе генетических карт трех разных геномов гексаплоидной пшеницы Triticum aestivum L. BBAADD 6x = 42, составленных с помощью RFLP-проб ДНК, было установлено не только родство этих трех геномов, произошедших в результате полиплоидизации от трех разных диплоидных видов трибы Роасеае подсемейства Pooideae, но и то, что порядок генов этих геномов пшеницы сходен (Moore et al., 1995).

При сравнительном анализе генетических карт ржи *Secale cereale* L. 2x = 14 и гексаплоидной пшеницы *Triticum aestivum* L. 6x = 42, принадлежащих к разным родам трибы Tritiсеае, было установлено не только родство их геномов, но существенные различия по наличию транслокаций между негомологичными хромосомами генома ржи, возникших в процессе эволюции (Devos *et al.*, 1993). Оказалось, что плечи хромосом ржи *S. cereale* L. 2RS, 3RL, 4RL, 5RL, 6RS, 6RL, 7RS и 7RL имеют по отношению к геномам пшеницы по меньшей мере по одной транслокации между негомологичными хромосомами генома ржи.

На примере генетических карт кукурузы Zea mays L. 2x = 20 и сорго Sorghum bicolor (L.) Moench. 2x = 20, составленных с использованием RFLP маркеров ДНК кукурузы, было установлено также, что геномы этих видов, принадлежащих к разным родам трибы Andropogoneae Dum., обладают консервативными блоками со сходным числом и расположением в них генов (Hulbert et al., 1990; Whitkus et al., 1992). B peзультате этих исследований в геноме кукурузы обнаружено наличие дупликаций. На основании этих результатов было сделано предположение о полиплоидном происхождении генома кукурузы. В дальнейшем были получены подтверждения о тетраплоидном происхождении генома кукурузы от двух разных геномов с x = 5 (Gaut, Doebley, 1997).

С помощью метода FISH (fluorescence in situ hybridization) были получены также результаты, указывающие на тетраплоидное происхождение генома *Sorghum bicolor* (Gomez *et al.*, 1998).

С помощью RFLP блоков риса проведен сравнительный анализ геномов шести видов злаков пяти разных триб, различающихся по БЧХ: 1) Oryza sativa L. x = 12 (Oryzeae Dum.); 2) Saccharum x = 10 (Arundinelleae Raddi.); 3) Sorghum bicolor x = 10 и Zea mays L. x = 5+5(Andropogoneae Dum.), Setaria italica x = 9 (Paniceae R. Br.) и Triticum aestivum L. геном D x = 7(Poaceae) (Moore *et al.*, 1995). Виды Saccharum, S. bicolor, Z. mays и S. italica принадлежат к подсемейству Panicoideae, a T. aestivum – к подсемейству Pooideae.

Результаты проведенного исследования показали, что большинство RFLP блоков риса (18–20) были локализованы на хромосомах данных видов, имеющих меньшее по сравнению с геномом риса БЧХ.

Сравнительный анализ локализации RFLP блоков риса на хромосомах этих видов злаков показал, что геномы видов *O. sativa* L., *Saccharum, S. bicolor* (L.) Moench. сходны по локализации и последовательному расположению этих блоков на шести разных хромосомах этих видов. *S. italica* (L.) Beauv. имеет подобный характер локализации блоков на четырех хромосомах, D геном пшеницы – только на двух, а хромосомы кукурузы не имеют подобных по набору и последовательной локализации RFLP блоков среди пяти исследованных видов злаков.

Если предположить, что геном риса - самый малый по количеству ДНК и с самым высоким БЧХ – близок к прародительскому геному злаков, то уменьшение базового числа хромосом до x = 10 у *Saccharum* по сравнению с x = 12у Orvza sativa могло произойти в результате объединения в одну хромосому блоков 7 и 9 двух разных хромосом риса и добавления к этой хромосоме блока 11а от другой хромосомы, а также объединения блока 11в с блоками 12а, 12b другой хромосомы у Saccharum, а также преобразования двух хромосом посредством выделения блока 3с в отдельную хромосому и включения блока 10 в хромосому вместо 3с. Уменьшение базового числа хромосом до x = 10у S. bicolor могло быть обусловлено включением хромосомы с блоком 10 в хромосому с блоками 3a, 3b, 3c, а также объединением двух хромосом с блоками 9 и 7 и отсутствием блоков 11b и 12b. Уменьшение БЧХ до x = 9 у *S. italica* могло произойти вследствие объединения двух хромосом с блоками 1a, 1b и 5a, 5b, двух хромосом с блоками За, Зb, Зс и 10, а также хромосом с блоками 9 и 7 и отсутствием 11b и 12b.

Геномы *S. bicolor* x = 10 и *S. italica* x = 9, принадлежащие к разным трибам подсемейства Panicoideae, одинаковы по характеру перестроек хромосом, связанных с уменьшением их базового числа, которое могло произойти в результате объединения хромосом с блоками 3a, 3b, 3c и 10, а также с 9 и 7 и отсутствия 11b и 12b блоков. Уменьшение числа хромосом у *S. italica* до x = 9по сравнению с x = 10 у *S. bicolor* могло быть обусловлено дополнительным слиянием двух хромосом с блоками 1a, 1 и 5a, 5b.

Отличия в локализации RFLP блоков в геноме кукурузы от генома риса оказались существенными. В каждом его геноме (x = 5+5) содержится по 18 блоков, а по локализации блоков каждая хромосома этих двух геномов индивидуальна.

В геноме D пшеницы (x = 7) только хромосомы 3D (1a 1b) и 6D (2) оказались подобными по локализации блоков хромосомам генома риса. Три хромосомы пшеницы могли быть результатом слияния двух разных хромосом: 1D (5a, 5b и 10), 2D (4a, 4b и 7), 7D (6a, 6b и 8), а хромосома 5D – результатом слияния трех разных хромосом с блоками 11a, 11b и 12a, 12b и 9 и добавочным блоком 3a. В геноме D пшеницы локализованы все 20 разных RFLP блоков риса.

В дальнейшем при сравнительном исследовании генетических карт разных видов злаков начали использовать различные микросателлитные маркеры. С помощью микросателлитных маркеров ржи EST (expressed sequence tag) и микросателлитных маркеров пшеницы (WMS) было локализовано 44 WMS-локуса пшеницы на хромосомах ржи (Khlestkina *et al.*, 2004). Большинство этих маркеров были локализованы на гомеологичных хромосомах ржи. Однако некоторые маркеры пшеницы локализовались и на негомеологичных хромосомах ржи. Результаты этого исследования указывают на наличие межхромосомных транслокаций в геноме ржи.

Исследования геномов разных видов *Aegilops* L. с помощью микросателлитов SSR пшеницы показали не только гомологию их геномов, но и наличие межхромосомных транслокаций (Adonina *et al.*, 2005).

С помощью EST-SSR изучено родство генома ячменя Hordeum vulgare L. с Ttiticum aestivum L., Secale cereale L. и Oryza sativa L. (Varshney et al., 2005). Показано, что наиболее близки к геному ячменя геномы пшеницы (78,1%) и ржи (75,2%) и значительно дальше геном риса (42,4%). Негомеологичная локализация блоков хромосом ячменя ЗН и 7Н обнаружена на хромосомах ржи 6R и 4R и пяти разных хромосомах ячменя 2Н, 3Н, 4Н, 6Н и 7Н на хромосомах 3A, 2A и 7A, 2D, 2D и 5B, 2В пшеницы соответственно. Неожиданными оказались результаты по локализации блоков ячменя на хромосомах риса. Блоки 1Н хромосомы ячменя оказались локализованными на трех разных хромосомах риса (R1, R5, R10), 2H - также на трех хромосомах риса (R3, R4, R12), 3H - на четырех (R1, R2, R4, R8), 4H – на шести (R2, R3, R5, R7, R8, R10), 5H – на четырех (R3, R7, R9, R12), 6H – на трех (R2, R8, R10), 7H – на шести (R2, R5, R6, R8, R9, R12).

С помощью EST-SSR-маркеров ржи проведена локализация их в геноме риса (Hackauf *et al.*, 2009). EST-SSR-маркеры, полученные от семи разных хромосом ржи, оказались распределенными на всех 12 хромосомах риса. При этом блоки хромосом ржи 1R и 6R были локализованы на 10 разных хромосомах риса, 2R и 5R – на 11, а 3R, 4R и 7R – на 9. На хромосомах риса R1, R2 и R3 обнаружены блоки от семи хромосом ржи, на хромосомах R4, R6, R8 и R12 – от шести хромосом ржи, на хромосомах R5, R7, R10 и R11 – от пяти хромосом ржи, а у R9 – от четырех разных хромосом ржи.

При использовании разных молекулярных методов в геноме риса обнаружены множественные дупликации (Guyot, Keller, 2004). Оказалось, что хромосома риса R1 содержит блоки хромосом R3 и R5, R2 – R4 и R6, R3 – R1, R5, R7, R10 и R12, 4R – R2, R8 и R10, R5 – R1 и R3, R6 – R2, R7–R3, R8–R9 и R4, R9–R8, R10–R3, R11–R9, R12 – R3 и R11.

С помощью С-метода дифференциального окрашивания хромосом у видов рода *Triticum* L. трибы Triticeae Dum. обнаружены также структурные перестройки между негомологичными хромосомами геномов (Badaeva *et al.*, 2007).

Результаты проведенных исследований указывают на то, что эволюция гаплоидных геномов злаков сопровождалась структурными преобразованиями хромосом, а также полиплоидизацией и дисплоидизацией.

Дисплоидия, приводящая к уменьшению или увеличению базового числа хромосом, обнаружена и у видов семейства Brassicaceae Burnett. (Yogeeswaran *et al.*, 2005; Lysak *et al.*, 2006; Guerra, 2008) и Liliaceae Juss. (Hipp, 2007).

Результаты молекулярных исследований указывают на многократную полиплоидизацию и дисплоидизацию гаплоидных геномов в процессе эволюции покрытосеменных видов растений, в том числе и видов семейства злаковых.

Базовое число хромосом прародителя семейства злаков

Многими исследователями на основе результатов, полученных по изучению различных морфологических и биохимических признаков, а также сравнительного анализа генетических карт, составленных с помощью различных молекулярных маркеров, сделано заключение о монофилетическом происхождении семейства злаков, и о том, что на самом раннем этапе дивергенции произошло разделение его на две ветви (Bennetzen, Freeling, 1997; Kellogg, 1998, 2001; Mathews *et al.*, 2000). Одна из ветвей этой радиации включает подсемейства:

Bambusoideae, Oryzoideae и Pooideae, а вторая ветвь - Panicoideae, Arundinoideae и Chloridoideae. Однако филогения видов каждого из этих подсемейств остается детально неизученной, а следовательно остается невыясненным БЧХ прародителя семейства злаков. Н.Н. Цвелев (Tzvelev, 1989) считает, что на современном этапе наших знаний изображение родственных отношений между трибами и подсемействами злаков правильнее представлять в виде не родственного древа, а поперечного сечения этого древа, как это сделал в свое время Г. Стеббинс (Stebbins, 1956). На предложенной им схеме представлены трибы, расстояние которых от центра на этой схеме свидетельствует о степени их специализации.

На основании результатов кариологических исследований Н.П. Авдуловым (1931) впервые было сделано предположение о том, что исходное базовое число хромосом для всех видов злаков было x = 7, а виды с меньшим либо большим его числом являются производными от x = 7.

Наличие консервативных крупных блоков со сходным порядком генов в геномах видов, принадлежащих не только к разным трибам, но и даже к разным подсемействам злаков, позволило ряду исследователей предложить гипотетическую модель прародителя генома злаков в виде первоначальной хромосомы (Moore et al., 1995). На примере этой модели предпринята попытка выяснить пути реорганизации геномов разных видов относительно генома риса и гипотетического прародителя. В основу этого сравнения были взяты результаты по локализации 20 RFLP-блоков риса на хромосомах видов злаков, различающихся по БЧХ. Результаты проведенного сравнительного анализа геномов шести видов злаков показали, что эволюция БЧХ геномов злаков сопровождалась неоднократной полиплоидизацией и дисплоидизацией, и что дупликации целых геномов являются существенным фактором в эволюции гаплоидных геномов злаков. Однако БЧХ прародителя оставалось невыясненным.

В дальнейшем на основе сходства геномов злаков по количеству и линейному порядку консервативных блоков ДНК у видов, дивергировавших в эволюции на протяжении 50–70 млн лет, наличия у них внутригеномных дупликаций и различных транслокаций, а также с учетом количества генов и размеров гаплоидных геномов были предложены схемы эволюции геномов злаков в виде концентрических кругов и филогенетического древа (Salse, Feuillet, 2011). Прародительский геном злаков на этих схемах представлен пятью протохромосомами с минимальным размером генома и минимальным количеством генов. Авторы предполагают, что прародительский геном x = 5 в эволюции прошел через дупликации целых геномов и межхромосомных транслокаций к формированию промежуточного прародительского генома x = 12. Согласно этим схемам геном риса x = 12сохранил БЧХ промежуточного прародителя. Уменьшение БЧХ генома кукурузы до x = 10произошло в результате объединения двух разных хромосом с последующей полиплоидизацией до x = 20 и уменьшением БЧХ до x = 10(5+5)посредством 17 разных слияний хромосом. Промежуточный прародительский геном трибы Triticeae подвергся пяти разным слияниям хромосом, а геном Brachypodium через семь слияний. Согласно предложенным схемам все виды злаков произошли от одного прародителя c x = 12, который в процессе эволюции сформировался в результате полиплоидизации двух разных видов с x = 6, а каждый из этих видов произошел от видов с x = 5 в результате структурных преобразований некоторых хромосом.

В задачу настоящей работы входило выяснить – действительно ли все виды злаков с разнообразием их БЧХ: от x = 2 до x = 13 могли произойти от одного прародителя с x = 12.

Результаты цитологических исследований показали, что размах изменчивости по БЧХ среди видов злаков значительный (x = 2-13). При этом виды одного рода имеют преимущественно одно БЧХ, т. е. не различаются по этому признаку. Из этого следует, что БЧХ прародителя конкретного рода соответствует БЧХ видов этого рода злаков. Большинство триб (25 из 37 изученных) также имеют одно БЧХ, все входящие в них роды не различаются по данному признаку. Две трибы имеют x = 7, четыре x = 10, три x = 11, пятнадцать x = 12 и только одна x = 13. Из этого также следует, что БЧХ прародителя соответствует БЧХ конкретной трибы.

В подсемействах Bamdusoideae, Oryzoideae и Arundinoideae большинство триб злаков имеют x = 12. Однако трибы подсемейства Pooideae различаются по БЧХ. Две трибы имеют x = 7, три x = 10 и одна x = 13. Виды родов злаков, включенные в остальные пять триб этого подсемейства, различаются по БЧХ. Особенно большим разнообразием характеризуется триба Poeae (x = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 и 13). Результаты исследования данного подсемейства указывают на то, что прародители триб этого подсемейства имели разные БЧХ. Существенные различия по БЧХ обнаружены между родами, включенными в трибы подсемейств Chloridoideae и Panicoideae.

Молекулярные исследования по составлению генетических карт с помощью PFLP проб, а также различных микросателлитных маркеров пока проведены только у одного вида Oryza sativa L. подсемейства Oryzoideae, четырех разных видов трех разных триб подсемейства Panicoideae (Sorghum bicolor L., Zea mays L., Setaria italica и Saccharum) и различных видов трибы Triticeae подсемейства Pooideae. В трибе Andropogoneae подсемейства Panicoideae обнаружено три разных БЧХ: x = 5, 9 и 10. У исследованного вида этой трибы Zea mays x = 5+5, a y Sorghum *bicolor x* = 10. Размах изменчивости БЧХ родов трибы Paniceae этого же подсемейства составил *x* = 7, 8, 9 и 13, а у вида этой трибы *Setaria italica* x = 9. Триба Arundinelleae имеет четыре разных БЧХ: *x* = 7, 9, 10 и 12. А БЧХ у *Saccharum* этой трибы x = 10. Возможно, что прародители триб этих подсемейств злаков также имели разные базовые числа хромосом.

С помощью RFLP-блоков риса было экспериментально доказано, что геном кукурузы является аллополиплоидом, сформировавшимся в результате полиплоидии двух разных геномов с БЧХ x = 5. При этом на каждом их этих двух геномов обнаружена локализация 18 разных RFLP-блоков риса. Оба эти генома существенно различаются по характеру локализации этих блоков как друг от друга, так и от генома риса. В геноме кукурузы нет хромосомы, подобной по локализации RFLP-блоков не только рису, но и остальным исследованным видам злаков. Результаты проведенных исследований указывают на то, что геном кукурузы сформировался не вследствие дисплоидизации полиплоида с x = 20, а каждый из двух его геномов, вероятнее всего, прошел через многократную полиплоидизацию и дисплоидизацию. Подобное могло происходить и в эволюции прародителя генома видов трибы Triticeae с x = 7. Только одна из семи хромосом генома D пшеницы оказалась подобной хромосоме риса.

Неожиданными оказались и результаты по локализации RFLP-блоков на хромосомах Sorghum bicolor x = 10, принадлежащей к той же трибе, что и кукуруза. Экспериментально было доказано, что гаплоидный геном данного вида сорго также является аллополиплоидом. Однако 18 RFLP-блоков риса оказались локализованными на 10 разных хромосомах сорго. Дупликаций каждого из этих блоков в геноме этого вида не обнаружено, а по характеру локализации RFLP-блоков и последовательному их расположению на шести хромосомах геном сорго оказался сходен с геномом риса с x = 12 и геномом Saccharum с x = 10. Из 20 RFLP-блоков риса на этих шести хромосомах сорго локализовалось только 10 (1a, 1b, 5a, 5b, 6a, 6b, 8, 2, 4a и 4b), что соответствует хромосомам риса: R1, R5, R6, R8, R2 и R4. Остальные четыре хромосомы сорго существенно различаются по характеру локализации набора RFLP-блоков.

Результаты этого анализа подтверждают не только полиплоидное происхождение гаплоидного генома сорго, но и полиплоидное происхождение генома риса в результате аллополиплоидизации малохромосомных видов, существенно различающихся по набору крупных консервативных блоков. С помощью микросателлитов и других молекулярных методов установлено также, что геном риса содержит множественные дупликарии (Guyot, Keller, 2004), а микросателлиты EST-SSR индивидуальных хромосом ржи и ячменя локализуются на многих хромосомах риса (Varshney et al., 2005; Hackauf et al., 2009). При этом из 20 консервативных блоков, выделенных из генома риса, на пяти хромосомах локализуется по одному блоку, на шести – по два разных блока, и на одной – три. Результаты проведенных исследований указывают на то, что гаплоидный геном риса произошел вследствие неоднократной аллополиплоидизации и дисплоидизации малохромосомных видов, претерпевших в свою очередь разную степень дисплоидии. С БЧХ, равным 12, исследован пока только один вид – Oryza sativa L. Поэтому вывод о прародительском гаплоидном геноме

для злаков с x = 12 преждевременен. С помощью молекулярных исследований не изучены также геномы малохромосомных видов с x = 2и x = 3 трибы Роеае, характеризующейся очень большим разнообразием БЧХ.

Результаты кариологических исследований показали, что БЧХ у злаков является очень консервативным признаком. На современном этапе эволюции гаплоидных геномов этого семейства покрытосеменных растений изменение БЧХ посредством полиплоидизации или добавлением к его геному отдельных хромосом оказалось невозможным. Экспериментально полученные формы растений с чужеродно дополненными хромосомами либо анеуплоидные по отдельным хромосомам гаплоидного генома оказываются цитологически нестабильными. Изменение БЧХ в результате перестроек хромосом остается возможным лишь посредством Робертсоновских транслокаций, которые часто происходят в мейозе межродовых и межвидовых гибридов в связи с унивалентным состоянием у них ряда хромосом. Экспериментально у видов трибы Triticeae они получены. Кариотипы исследованных видов злаков имеют метацентрические и субметацентрические хромосомы, а видов с акроцентрическими хромосомами у злаков пока не обнаружено. Примеров экспериментального изменения БЧХ в результате транслокаций между негомологичными хромосомами набора у видов злаков также пока нет. Встает вопрос: на каком этапе эволюции гаплоидных геномов видов семейства злаков произошел запрет на изменение БЧХ и какие факторы оказались определяющими в этом процессе?

Полагают, что самые ранние одноклеточные организмы (прокариоты) появились на земле около 3,5 млрд лет назад и на протяжении 2 млрд лет они были единственной формой жизни, а эукариоты возникли только 1,5 млрд лет назад (Рейвн и др., 1990). На протяжении довольно длительного периода первые эукариоты были гаплоидными и размножались преимущественно бесполым путем посредством митоза, а переход на диплоидную фазу жизненного цикла и связанное с этим возникновение мейоза и регулярного полового способа размножения произошли около 850 млн лет назад (Райков, 1982; Maguire, 1992; Raikov, 1995). Переход на диплоидную структуру ядра должен был сопровождаться изменением его архитектоники. Должен был выработаться механизм, обеспечивающий поддержание в одном ядре разных гаплоидных геномов.

В настоящее время накоплено достаточно много экспериментальных данных, подтверждающих наличие в клеточном ядре эукариот упорядоченного пространственного расположения хромосом. Результаты этих исследований указывают на то, что основной единицей пространственной организации генетического материала в ядре является гаплоидный набор хромосом (Щапова, 1971; Беннетт, 1986; Чубыкин, 2001).

Усовершенствование микроскопической техники позволило не только подтвердить наличие в клеточном ядре эукариот упорядоченного расположения хромосом (Tanaka, 1981a, b; Cremer *et al.*, 2001; Foster, Bridger, 2005; Schneider, Grosschedl, 2007; Щапова, 2010). Показано также, что пространственная организация хромосом в ядре эукариот не только высокоупорядоченна, но и динамична. Установлено, что в процессе эволюции видов архитектоника ядра претерпевает изменение (Стегний, 1993; Стегний, Вассерлауф, 1994; Вассерлауф, 2008).

С позиции упорядоченной пространственной организации хромосом в клеточном ядре переход на диплофазу должен был сопровождаться преобразованиями в структуре ядра, направленными на сохранение упорядоченности хромосом гаплоидного генома и на поддержание парного расположения гомологов при пространственном разобщении разных гаплоидных геномов, что и было в дальнейшем подтверждено результатами многих исследователей (Feldman, 1966; Yacobi *et al.*, 1982; Щапова, Кравцова, 1990; Mikhailova *et al.*, 1998; Чубыкин, 2001).

Переход на диплофазу способствовал разобщению между слиянием гаплоидных гамет и редукционным делением диплоидного ядра. В жизненном цикле ныне живущих видов растений, включая водоросли, мхи, папортники и семенные, наблюдается чередование гаплоидной и диплоидной фаз, существенно различающихся по их продолжительности (Курсанов и др., 1966). Полагают, что предковые формы злаков произошли 65 млн лет назад. Однако неизвестно, как долго в эволюции злаков преобладающей стадией жизненного цикла была гаплофаза. Возможно, что эволюционные преобразования гаплоидных геномов злаков по увеличению или уменьшению их базового числа хромосом посредством полиплоидизации и дисплоидизации происходили в основном на стадии гаплофазы, а с переходом на стадию жизненного цикла с преобладанием диплофазы, возможно, и произошел запрет на дальнейшую полиплоидию гаплоидных геномов.

Известно также, что отдаленные гибриды злаков вследствие унивалентного состояния всех хромосом набора высокостерильны. Формирование жизнеспособных гамет у таких гибридов возможно только благодаря мейотической реституции, приводящей к формированию полиплоидных форм (Aase, 1930; Wagenaar, 1968).

В результате проведенных нами цитологических исследований мейоза у пшеничноржаных и пшенично-пырейных гибридов были получены экспериментальные доказательства генетической обусловленности мейотической реституции у полигаплоидов (Щапова и др., 1987а; Потапова, Щапова, 1989; Силкова и др., 2003, 2011). Показано также, что образовавшиеся от самоопыления полиплоидные формы в большинстве случаев являются анеуплоидами по 2-3 разным хромосомам, что приводит к нарушению расхождения унивалентных хромосом в мейотическом делении в последующем их поколении и образованию различных транслокаций между негомологичными хромосомами. Кроме этого, вновь образовавшиеся полиплоиды в результате мейотической реституции межродовых гибридов в большинстве случаев являются также мейотически нестабильными, что приводит как к формированию различных межхромосомных транслокаций, так и к снижению уровня плоидности (Щапова и др., 1987б; Щапова, Кравцова, 1990). А в потомстве беккроссов межродовых гибридов и полученных от них аллополиплоидов процесс стабилизации кариотипов этих гибридов сопровождается не только снижением уровня плоидности, но и различными межхромосомными замещениями (Shchapova et al., 1984).

Таким образом, результатами этих исследований установлено, что гибридизация видов злаков, различающихся по геномной структуре гаплоидных геномов, с последующей полиплоидизацией вследствие мейотической реституции и структурные преобразования отдельных хромосом в ряде последующих поколений отдаленных гибридов являются единым процессом. Представления, касающиеся того, что вначале в эволюции гаплоидных геномов предковых форм злаков сформировались полиплоиды, а уже позже все имеющееся разнообразие БЧХ в данном семействе стало следствием дисплоидизации прародительского полиплоидного генома, вряд ли являются верными. Эволюционные преобразования гаплоидных геномов и их БЧХ на каждом этапе сопровождались гибридизацией, полиплоидизацией и дисплоидизацией. Характер этих преобразований в зависимости от генотипа гибридов был различен.

Заключение

Результаты проведенных исследований указывают на то, что эволюционные преобразования, связанные с увеличением БЧХ гаплоидных геномов посредством полиплоидии у злаков, в основном были приостановлены еще на уровне формирования родов, вероятно, в период перехода на устойчивую спорофитную фазу жизненного цикла. Различия между родами одной трибы по БЧХ являются результатом либо дальнейшей дисплоидизации прародительского гаплоидного генома исходного рода, либо немонофилетического происхождения родов, включенных в трибу. Запрет на дальнейшую полиплоидизацию гаплоидных геномов мог, вероятно, быть результатом преобразования архитектоники клеточного ядра в процессе перехода с преимущественно спорофитной фазы жизненного цикла злаков на гаметофитную.

На основании имеющихся на сегодня результатов сделан вывод, что эволюция гаплоидных геномов злаков и их базовых чисел хромосом является результатом неоднократной гибридизации с последующей полиплоидизацией и дисплоидизацией предковых малохромосомных видов злаков с x = 1-3.

Гаплоидные геномы видов разных триб претерпели разную степень дисплоидизации. Филогению видов разных родов и отдельных триб следует рассматривать не как производные от одного предкового прародительского полиплоидного гаплоидного генома, а как параллельные ряды, произошедшие от разных предковых форм, различающихся по БЧХ. В исследованиях филогении морфологическое сходство видов разных триб злаков желательно также рассматривать с учетом «Закона гомологических рядов в наследственной изменчивости», сформулированного Н.И. Вавиловым (Vavilov, 1922), согласно которому родственные виды и рода в значительной степени повторяют друг друга в своей изменчивости. При этом гомологическую изменчивость следует, вероятно, учитывать не только на организменном, но и на клеточном уровне.

Литература

- Авдулов Н.П. Карио-систематическое исследование семейства злаков. Приложение 44 к трудам по прикладной ботанике, генетике и селекции. Л.: ВАСХНИЛ. Ин-т растениеводства, 1931. 428 с.
- Беннетт М.Д. Нуклеотическая основа пространственной упорядоченности хромосом эукариот и ее значение для эволюции генома и фенотипической изменчивости. М.: Мир, 1986. С. 234–256.
- Болховских З.В., Гриф В.Г., Захарьева О.И., Матвеева Т.С. Хромосомные числа цветковых растений / Под ред. А.Н. Федорова. Л.: Наука, 1969. 920 с.
- Вассерлауф И.Э. Изменение организации хромосом в ядрах трофоцитов яичников *Drosophila melanogaster* при инбридинге и гибридном дисгенезе // Вестник ТГУ. 2008. № 301. С. 222–226.
- Курсанов Л.И., Комарницкий Н.А., Раздорский В.Ф., Уранов А.А. Ботаника. Т. І. Анатомия и морфология растений. М.: Просвещение, 1966. 423 с.
- Потапова Т.А., Щапова А.И. Мейоз у фертильных пшенично-пырейных полигаплоидов // Цитология. 1989. Т. 31. № 1. С. 108–110.
- Райков И.Б. Новые данные о мейозе у простейших // Генетика, биохимия и цитология мейоза. М.: Наука, 1982. С. 75–80.
- Рейвн П., Эверт Р., Айкхорн С. Современная ботаника. Т. І. М.: Мир, 1990. 347 с.
- Силкова О.Г., Щапова А.И., Кравцова Л.А. Механизмы мейотической реституции и их генетическая регуляция у пшенично-ржаных полигаплоидов // Генетика. 2003. Т. 39. № 11. С. 1505–1515.
- Силкова О.Г., Щапова А.И., Шумный В.К. Мейотическая реституция у амфигаплоидов в трибе Triticeae // Генетика. 2011. Т. 47. № 4. С. 437–448.
- Стегний В.Н. Архитектоника генома, системные мутации и эволюция. Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та, 1993. 110 с.
- Стегний В.Н., Вассерлауф И.Э. Видовая архитектоника хромосом генеративной ткани и проблемы филогенетических отношений в подгруппе mela-

nogaster рода *Drosophila* (Sophophora) // Генетика. 1994. Т. 30. № 4. С. 478–483.

- Цвелев Н.Н. Злаки СССР. Л.: Наука. Ленингр. отдние, 1976. С. 788 с.
- Цвелев Н.Н., Жукова П.Г. О наименьшем основном числе хромосом в сем. Роасеае // Ботан. журнал. 1974. Т. 59. С. 265–269.
- Чубыкин В.Л. Генетический контроль формирования и реорганизации хромоцентра у дрозофилы // Генетика. 2001. Т. 37. № 8. С. 1068–1074.
- Щапова А.И. О структуре кариотипа и порядке расположения хромосом в интерфазном ядре // Цитология. 1971. Т. 13. № 9. С. 1157–1164.
- Щапова А.И. Пространственная организация хромосом в клеточном ядре эукариот и ее особенности у разных видов растений и животных // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 4. С. 612–621.
- Щапова А.И., Кравцова Л.А. Цитогенетика пшенично-ржаных гибридов. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1990. 164 с.
- Щапова А.И., Кравцова Л.А., Потапова Т.А. Закономерности преобразований геномной структуры пшенично-ржаных полигаплоидов ABDR // Генетика. 19876. Т. 23. № 2. С. 295–302.
- Щапова А.И., Потапова Т.А., Кравцова Л.А. Генетическая обусловленность нерасхождения хромосом в мейозе пшенично-ржаных полигаплоидов // Генетика. 1987а. Т. 23. № 3. С. 473–481.
- Aase H.C. Cytology of Triticum, Secale, and Aegilops hybrids with reference to phylogeny // Res. Stud. State Coll. Wash. 1930. V. 2. P. 5–60.
- Adonina I.G., Salina E.A., Pestsova E.G., Roder M.S. Transferability of wheat microsatellites to diploid Aegilops species and determination of chromosomal localizations of microsatellites in the S genome // Genome. 2005. V. 48. P. 959–970.
- Ahn S., Tanksley S.D. Comparative linkage maps of rice and maize genomes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 7980–7984.
- Badaeva E.D., Dedkova O.S., Gay G. *et al.* Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution // Genome. 2007. V. 50. P. 1–20.
- Bennetzen J.L., Freeling M. The unified grass genome: synergy in synteny // Genome Res. 1997. V. 7. P. 301–306.
- Cremer M.J., Hase J., Volm T. *et al.* Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells // Chromosome Res. 2001. V. 9. P. 541–567.
- Devos K.M., Atkinson M.D., Chinoy C.N. *et al.* Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat // Theor. Appl. Genet. 1993. V. 85. P. 673–680.
- Feldman M. The effect of chromosomes 5B, 5D and 5A on chromosomal pairing in *Triticum aestivum* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1966. V. 55. P. 1447–1453.

- Foster H.A., Bridger J.M. The genome and the nucleus: a marriage made by evolution. Genome organization and nuclear architecture // Chromosoma. 2005. V. 114. P. 212–229.
- Gaut B.S., Doebley J.F. DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 6808–6814.
- Guerra M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implication // Cytogenet Genome Res. 2008. V. 120. P. 339–350.
- Guyot R., Keller B. Ancestral genome duplication in rice // Genome. 2004. V. 47. P. 610–614.
- Gomez M.I., Islam-Faridi M.N., Zwick M.S. *et al.* Tetraploid nature of *Sorghum bicolor* (L.) Moench // J. Hered. 1998. V. 89. P. 188–190.
- Goncharov N.P., Golovnina K.A., Kondratenko E.Y. Taxonomy and molecular phylogeny of natural and artificial wheat species // Breeding Sci. 2009. V. 59. P. 492–498.
- Hackauf B., Rudd S., R. van der Voort. *et al.* Comparative mapping of DNA sequences in rye (*Secale cereale* L.) in relation to the rice genome // Theor. Appl. Genet. 2009. V. 118. P. 371–384.
- Hipp A.I. Non uniform processes of chromosome evolution in sedges (Carex: Cyperaceae) // Evolution Int. J. Org. Evolution. 2007. V. 61. P. 2175–2199.
- Hulbert D.F., Richter T.E., Axtell J.D., Bennetzen J.L. Genetic mapping and characterization of sorghum and related crops by means of maize DNA probes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 4251–4255.
- Kellogg E.A. Relationships of cereal crops and other grasses // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 2005–2010.
- Kellogg E.A. Evolutionary history of the grasses // Plant Physiol. 2001. V. 125. P. 1198–1205.
- Khlestkina E.K., Myint Than M.H., Pestsova E.G. *et al.* Mapping of 99 new microsatellite-derived loci in rye (*Secale cereale* L.) including 39 expressed sequence tags // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 109. P. 725–732.
- Lysak M.A. Berr A., Pecinka A. et al. Mechanisms of chromosome number reduction in Arabidopsis thaliana and related Brassicaceae species // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 5224–5229.
- Maguire M.P. Evolution of meiosis // J. Theor. Biol. 1992. V. 154. P. 43–55.
- Mathews S., Tsai R.C., Kellogg E.A. Phylogenetic structure in the grass family (Poaceae): evidence from the nuclear gene phytochrome B // Amer. J. Bot. 2000. V. 87. P. 96–107.
- Mikhailova E., Naranjo T., Shepnerd K. et al. The effect of the wheat PhI locus on chromatin organiza-

tion and meiotic chromosome pairing analysed by genome painting // Chromosoma. 1998. V. 107. P. 339–350.

- Moore G., Devos K.M., Wang Z., Gale M.D. Grasses, line up and form a circle // Curr. Biol. 1995. V. 5. P. 737–739.
- Raikov I.B. Meiosis in Protists: recent advances and persist in problems // Europ. J. Protistol. 1995. V. 31. P. 1–7.
- Salse J., Feuillet C. Palaeogenomics in cereals: Modeling of ancestors for modern species improvement // C. R. Biologies. 2011. V. 334. P. 205–211.
- Schneider R., Grosschedl R. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression // Genes Dev. 2007. V. 21. P. 3027–3049.
- Shchapova A.N., Potapova T.A., Kpavtsova L.A., Numepova O.M. Karyotype stabilization in intergeneric hybrids of the subtribe Triticinae. 1. The effect of genome structure // Theor. Appl. Genet. 1984. V. 68. P. 289–296.
- Stebbins G.L. Cytogenetics and the evolution of the grass family // Amer. J. Bot. 1956. V. 43. P. 890–905.
- Tanaka N. Studies of chromosome arrangement in some higher plants. 1. Interphase chromosomes in three Liliaceous plants // Cytologia. 1981a. V. 46. P. 343–357.
- Tanaka N. Studies on chromosome arrangement in some higher plants. 2. The determining factor of the distribution of centromeric regions in the nucleus // Cytologia. 1981b. V. 46. P. 531–544.
- Tzvelev N.N. The system of grasses (Poaceae) and their evolution // Bot. Rev. 1989. V. 55. P. 141–204.
- Varshney R.K., Sigmund R., Borner A. *et al.* Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice // Plant Sci. 2005. V. 168. P. 195–202.
- Vavilov N.I. The law of homologous series in variation // J. Genet. 1922. V. 12. P. 47–89.
- Wagenaar E.B. Meiotic restitution and the origin of polyploidy. II. Prolonged duration of metaphase I as causal factor of restitution induction // Can. J. Genet. Cytol. 1968. V. 10. P. 844–852.
- Whitkus R., Doebley J., Lee M. Comparative genome mapping of sorghum and maize // Genetics. 1992. V. 132. P. 1119–1130.
- Yacobi Y.Z., Mello-Sampaya T., Feldman M. Genetic induction of bivalent interlocking in common wheat // Chromosoma. 1982. V. 87. P. 167–175.
- Yogeeswaran K., Frary A., York T.L. *et al.* Comparative genome analyses of Arabidopsis spp.: Inferring chromosomal rearrangement events in the evolutionary history of *A. thaliana* // Genome Res. 2005. V. 15. P. 505–515.

EVOLUTION OF THE BASIC CHROMOSOME NUMBER IN POACEAE (BARNH.)

A.I. Shchapova

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

Summary

Poaceae (Barnh.) are a large angiosperm taxon. It includes over 10,000 species, belonging to 700 genera and 41 tribes. This paper presents a comparison of the basic chromosome numbers (BCNs) in species of 372 genera from 37 Poaceae tribes. Although BCNs broadly vary in the family (x = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13), this trait is conservative. Species of one genus have mainly identical BCNs. In most genera, x = 10 (31,9%) or 7 (29,5%). Twenty-five tribes show no BCN differences among their genera: x = 13 in 1 tribe; 7, in 2, 11, in 3; 10, in 4, and 12, in 15. Other tribes have several BCNs each. The Poeae tribe is the most variable in this trait: x = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 13.

Similarity of genetic maps in species belonging not only to different tribes but even to different Poaceae subfamilies was established by using RFLP and EST–SSR markers. There is also experimental evidence that the diversity in BCN in the Poaceae family was caused by multiple hybridization followed by polyploidization and dysploidization of ancestral species with few chromosomes.

Studies of chromosome numbers and molecular mapping of Poaceae species with RFLP and EST–SSR markers indicate that the evolutionary transformations of the haploid genomes and, as a consequence, their BCNs, by polyploidization and dysploidization were completed in general in ancestral species of the presently existing genera. The present BCN diversity in the family stems from the fact that the ancestors of different genera underwent different degrees of polyploidization and dysploidization. Phylogenetically, species of different genera should be regarded as parallel series originating by crosses of related species with few chromosomes rather than descendants of a single ancestor with a polyploid genome.

It is suggested that further transformation of haploid genomes in ancestors by polyploidization and dysploidization was arrested by the transition of Poaceae to the stable sporophytic phase of the life cycle. Probably, the main factor responsible for this arrest was a significant modification of the cell nucleus structure associated with the transition to the stable diplophase.

Key words: Poaceae family, basic chromosome number, haploid genome, systematics, phylogeny, species evolution.

НОВЫЙ МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ ПРИЗНАК В РОДЕ TRITICUM L.

Е.В. Твердохлеб

Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева Национальной академии аграрных наук, Харьков, Украина, e-mail: etverd@meta.ua

У растений, полученных в беккроссной комбинации (*T. timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. × *T. durum*, сорт Спадщина) × Спадщина обнаружен новый для рода *Triticum* L. морфологический признак – опушение остей цветковых чешуй. Получены формы, сочетающие этот признак со светлым и темным цветом колосовых чешуй, наличием и отсутствием опушения на них, темным и светлым цветом остей, наличием ЦМС и генов восстановления фертильности.

Ключевые слова: Triticum, морфологический признак.

Опушение остей является одним из легко распознаваемых признаков и может служить морфологическим маркером при идентификации образцов пшеницы. В частности, им можно маркировать остистые сорта пшеницы для обеспечения их охраноспособности с помощью проведения последующих тестов на отличимость, однородность и стабильность (DUS-тестов) (Методика..., б.г.).

У остистых форм всех видов рода *Triticum* L. ости цветковых чешуй, как правило, бывают в разной степени зазубрены (Фляксбергер, 1935; Культурная флора СССР, 1979). Сравнительно редко встречаются формы с гладкими остями: они имеются лишь у двух видов культурных тетраплоидных пшениц: *T. durum* Desf. и *T. turgidum* L. (Дорофеев, 1972). Генетический анализ показал, что зазубренность остей по отношению к гладкоостости у тетраплоидных пшениц контролируется одним доминантным геном и модификаторами. У гексаплоидных пшениц гладкоостые формы не обнаружены (Knowles, Harrington, 1943; Allan, Vogel, 1960).

До сих пор не описаны формы пшеницы с опушенными остями (Цвелев, 1976; Культурная флора СССР, 1979). В семействе Мятликовых (Poaceae) этот признак хорошо проявляется у видов ковыля (*Stipa* L.). В подтрибе Пшеницевых (*Triticinae* Trin. ex Griseb.), по нашим наблюдениям, этот признак проявляется у *Aegilops speltoides Tausch var. ligustica* (Savign.) Fiori., а также дазипирума (*Dasypyrum villosum* (L.) Coss. & Durieu ex P. Candargy) в нижней части ости колосковой чешуи как продолжение опушения киля колосковой чешуи жесткими трихомами.

Мы обнаружили такие формы (рис., а, б) в потомстве скрещивания *T. timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. с сортом Спадщина *T. durum*. Опушение остей является продолжением опушения верхушки внешней цветочной чешуи и распространяется на длину около 2,5 см независимо от длины ости (рис., б).

У гибридных растений F_1 *T. timopheevii* Zhuk. × сорт Спадщина *T. durum* ости были зазубренными, но не опушенными.

Пыльцой сорта Спадщина опылили 154 цветка F_1 гибридов, получили 22 зерновки. Из них выращено 12 растений F_1BC_1 и получено 8 зерновок. В F_2BC_1 получили 12 колосьев, 4 из них оказались фертильными, озерненность составляла от 2,8 до 47,4 %. Все колосья были неокрашенными (белыми), со светлыми остями и слабоопушенными чешуями. При пересеве 25 зерновок получили растения F_3BC_1 , которые можно расклассифицировать (разделить) на 5 групп (таблица). Растения 1-й группы получены от спонтанного опыления гибрида пыльцой *Triticum carthlicum* Nevski, их фертильность была близка к нулю.

Учитывая, что все растения, описанные в таблице, имеют цитоплазму *T. timopheevii*,



Рис. Опушенные ости у Triticum durum Desf. var. pubivalenciae E. Tverdokhleb.

Таблица

Распределение растений по сочетанию морфологических признаков колоса

Группа Число		Окраск	а Опуше		e	Фертильность
i pyilla	растений	колосковых чешуй	остей	колосковых чешуй	остей	растений, %
1	5	темно-коричневые	черная	нет	есть	0,7
2	2	неокрашенные	черная	нет	есть	18,2–25,0
3	5	неокрашенные	черная	есть	есть	19,2–34,2
4	8	неокрашенные	цвета чешуи	есть	есть	2,6–3,1
5	5	неокрашенные	цвета чешуи	нет	нет	2,6–9,4

следует заключить, что большинство растений, полученных после беккроссирования твердой пшеницей, и все растения от опыления *T. carthlicum* имели цитоплазматическую мужскую стерильность. Единичные растения со сравнительно высокой фертильностью, полученные от беккросса с твердой пшеницей, вероятно, имели гены восстановления фертильности, унаследованные от *T. timopheevii*.

Таким образом, опушение остей может сочетаться со светлым и темным цветом колосковых чешуй, наличием и отсутствием опушения на них, темным и светлым цветом остей, цитоплазматической мужской стерильностью и наличием генов восстановления фертильности.

Относительно генетической природы опушения остей можно предположить следующее. Как указано выше, этот признак присутствует у *Aegilops speltoides Tausch var. ligustica*, предполагаемого донора субгенома G T. timopheevii (Lilienfeld, Kihara, 1934; Конарев и др., 1971 и др.), не проявляется у пшеницы Тимофеева, твердой пшеницы Спадщина и их гибрида F_1 , а появляется только в потомстве беккроссов и ступенчатых скрещиваний. Вероятно, его проявление у T. timopheevii подавляется геном-ингибитором, локализованным в субгеноме *A*, который при расщеплении не наследуется частью растений – потомков беккроссов. Именно у этих растений проявляется опушение остей.

Наличие опушения остей у форм с достаточно высокой для отдаленных гибридов фертильностью: от 18 до 34 % – дает основание предполагать возможность получения константных форм, несущих этот признак. Более того, одна из таких форм получена, и мы предлагаем возвести ее в ранг разновидности, присвоив название var. pubivalenciae.

Triticum durum Desf. *var. pubivalenciae* E. Tverdokhleb var. nov. – Glumes album, pubescentis; arista non picta, pubescent; frumentum album.

Туриs: Ukraine, reg. Kharkov, in Instituti de olus industria in nomine V.J. Juriev, area experimentalis. 2011, 27.07.2011, № 100071, Е. Tverdokhleb creavit. In herbario CWU (кафедра ботаники Харьковского ун-та им. В.Н. Каразина) conservatur.

Affinitas. Orbus hybrida – in combination F_3 (*Triticum durum* Desf. × *Triticum timopheevii* (Zhuk.) Zhuk.) × *Triticum durum* Desf.

Habitat. In collectionis.

Литература

- Дорофеев В.Ф. Пшеницы Закавказья // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1972. Т. 47. Вып. 1. С. 3–202.
- Конарев А.В., Мигушова Э.Ф., Гаврилюк И.П., Конарев В.Г. О природе генома пшениц группы *Т. timopheevii* по данным электрофореза и иммунохимического анализа // Докл. ВАСХНИЛ. 1971. № 4. С. 13–16.
- Культурная флора СССР / Под общ. ред. В.Ф. Дорофеева; ВНИИР им. Н.И. Вавилова. Л., 1979. Т. 1: Пшеница / В.Ф. Дорофеев, А.А. Филатенко, Э.Ф. Мигушова и др. 346 с.
- Методика проведения экспертизы сортов пшеницы твердой (*Triticum durum* Desf.) на отличимость, однородность и стабильность / электронный

pecypc http://sops.gov.ua/uploads/files/documents/ Metodiki/pshen%20tv.pdf (на украинском языке).

- Фляксбергер К.А. Пшеница род *Triticum* L. pr.p. // Культурная флора СССР. Т. І. Хлебные злаки. Пшеница. М.; Л.: ГИЗ совх. и колх. лит-ры, 1935. С. 17–404.
- Цвелев Н.Н. Злаки СССР. Л.: Наука, 1976. 788 с.
- Allan R.E., Vogel O.A. F₁ monosomic analysis involving a smooth-awn durum wheat // Wheat Inform. Serv. 1960. N 11. P. 3–4.
- Knowles P.F., Harrington J.B. Breeding smooth-awned durum and vulgare wheats // Sci. Agric. 1943. N 23. P. 697–707.
- Lilienfeld F., Kihara H. Genomanalyse bei *Triticum* und *Aegilops*. V. *Triticum timopheevi* Zhuk. // Cytologia. 1934. Bd. 6. N 1. S. 87–122.

A NEW MORPHOLOGICAL TRAIT IN THE GENUS TRITICUM L.

E.V. Tverdokhleb

V.Ya. Yuryev Plant Production Institute of the National Academy of Agricultural Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine, e-mail: etverd@meta.ua

Summary

A new morphological trait for the genus *Triticum* L., pubescence of lemma awns, has been revealed in plants obtained from a backcrossed hybrid combination (*T. timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. × *T. durum*, cv. Spadschina) × *T. durum*, cv. Spadschina. Various forms have been obtained by combining this trait with light or dark glume color, presence or absence of their pubescence, black or light color of awns, presence of cytoplasmic male sterility (CMS) and fertility restoration genes.

Key words: Triticum, morphological traits.

КОМПЬЮТЕРНАЯ СИСТЕМА WheatPGE ДЛЯ АНАЛИЗА ВЗАИМОСВЯЗИ ФЕНОТИП–ГЕНОТИП–ОКРУЖАЮЩАЯ СРЕДА У ПШЕНИЦЫ

М.А. Генаев¹, А.В. Дорошков¹, Е.В. Морозова¹, Т.А. Пшеничникова¹, Д.А. Афонников^{1, 2}

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

В настоящей работе для решения задачи интеграции генотипических и фенотипических данных, а также параметров окружающей среды и для анализа взаимосвязей между генотипом и фенотипом у пшеницы представлена система WheatPGE. Система служит для интеграции разнородных данных о растении, хранения информации об отношениях, описывающих различные характеристики растения, его генотипа, фенотипа и факторов внешней среды и доступа к ней. Система имеет web-интерфейс и доступна по адресу www.wheatdb.org. Возможности использования системы в генетическом эксперименте продемонстрированы на примере анализа количественных характеристик опушения листа пшеницы. Используя WheatPGE, мы провели классификацию опушения листьев 47 сортов яровой пшеницы методом многомерного шкалирования. Результаты анализа позволили выявить различия между опушением листа у растений российских и немецких сортов.

Ключевые слова: пшеница, интеграция данных, фенотип, генотип, окружающая среда, опушение листа, база данных.

Введение

Одна из важнейших проблем биологии изучение взаимосвязи между генотипом и фенотипом у живых организмов. Для решения этой задачи в последнее время все более широко применяются компьютерно-экспериментальные подходы выявления и картирования генов, контролирующих количественные признаки (quantitative trait loci, QTL). Они основаны на использовании ассоциаций между молекулярными ДНК-маркерами и их расположением на хромосоме и фенотипическими данными организмов (Kearsey, 1998; Shavrukov et al., 2010). Применение этих подходов требует анализа информации как по генотипам, так и по фенотипам организмов. Поэтому в последнее время возрастает интерес к разработке систем информационной поддержки хранения и обработки фенотипических данных и их интеграции с геномной информацией. Эти работы наиболее систематически ведутся для видов, являющихся базовыми генетическими моделями, например, мышь (Hancock *et al*, 2007; Grubb *et al*., 2009; NIG Mouse Phenotype Database), крыса (Twigger *et al*., 2007), человек (Kahraman *et al*., 2005), кукуруза (VPhenoDBS: Maize). Эти базы данных содержат информацию о фенотипах организмов, в том числе и мутантных, базируются на последовательностях полных геномов, которые секвенированы к моменту создания ресурса, содержат ссылки на аннотации генов, списки маркеров и другую геномную информацию.

Создание систем и подходов, интегрирующих информацию о генотипе, фенотипе и окружающей среде, – актуальная задача не только для модельных организмов, но и для важных сельскохозяйственных культур. Для разных видов растений в последнее время ведется активная разработка таких систем. Например, подход, необходимый для управления генетическими коллекциями, основанный на интегрирован-

ном описании фенотипа и генотипа растений, предложен в базе данных GERMINATE (Lee et al., 2005). Интересным проектом является база данных SGH (Sol Genomic Network), которая содержит информацию о фенотипе, генотипе, полногеномных данных и генных и метаболических сетях для пасленовых (томаты, картофель, баклажан, перец и петуния). Эта база данных позволяет производить поиск фенотипа, результатов анализа количественных признаков (QTL), списка маркеров, генов, метаболических сетей. Она тесно интегрирована с геномными данными. Важно отметить, что большинство описанных выше систем используют поддержку хранения информации о фенотипе в виде изображений, поскольку методы анализа изображений используются при анализе фенотипа растения все более интенсивно (Kaminuma et al., 2004; Дорошков и др., 2009; Eberius, Lima-Guerra, 2009).

Однако основным недостатком таких подходов является то, что такие базы данных ориентированы на вид, а не на отдельное растение, которое является минимальной экспериментальной единицей в генетических исследованиях. Информация, характеризующая конкретное растение, в базе данных не представлена. Такой подход свойственен и для всех упомянутых выше баз данных, что делает их в большей степени информационными ресурсами (коллекцией результатов, полученных из литературных источников, геномных баз данных и т.п.). Это не позволяет использовать их для поддержки генетических экспериментов, обеспечивающих базу знаний для селекции по важным агрономическим признакам растений, и молекулярного картирования локусов количественных признаков (OTL).

Следует отметить, что, по некоторым оценкам, генотип обусловливает до 50% фенотипических вариаций (Kearsey, 1998). Остальная часть фенотипической изменчивости обусловлена влиянием факторов внешней среды. Эту изменчивость также необходимо учитывать при анализе данных.

Создание систем для поддержки лабораторных экспериментов является наиболее перспективным подходом в развитии интегрированных междисциплинарных направлений исследований. Подобным проектом является Chloroplast2010 (Ajjawi *et al.*, 2010). Высокопроизводительное фенотипирование, эффективный сбор, хранение большого объема фенотипических данных, их интеграция с геномными данными позволили создать прорывную технологию анализа взаимосвязи между генотипом и фенотипом у Arabidopsis thaliana (Lu et al., 2008). Однако данная система не позволяет учитывать влияние окружающей среды на развитие фенотипа растения. PlantDB (Exner et al., 2008) – инструмент на основе Microsoft Access для занесения базовой информации о генотипе и некоторых фенотипических признаках исследуемых растений. Эта база данных в отличие от предыдущих ориентирована на описание параметров каждого растения, для которого проводится эксперимент. Однако ее структура не является гибкой и не позволяет расширять описание фенотипа растений. Она также не позволяет учитывать параметры внешней среды.

Примером системы, учитывающей параметры среды в ходе экспериментов, является PHENOPSIS DB (Fabre et al., 2011), которая создана для документирования и накопления данных, полученных в ходе экспериментов по анализу Arabidopsis thaliana. В этой системе используются автоматизированные боксы для выращивания растений, в которых поддерживаются необходимые параметры окружающей среды: температура, влажность воздуха, интенсивность света и др. Эти параметры в режиме реального времени передаются на управляющий сервер системы PHENOPSIS DB, где происходят их хранение и последующая статистическая обработка. В ходе эксперимента производится автоматическое фотографирование различных органов растения (корни, листья, цветки). Цифровые изображения сохраняются на сервере, обрабатываются для получения количественных характеристик фенотипа, которые заносятся в базу данных системы. Генотип каждого растения представлен экотипом, линией, описанием семян, из которых растение было выращено, и другими параметрами. Однако такая база данных не подходит для исследования растений в естественных им полевых условиях, что особенно важно для работы с сельскохозяйственными культурами. Таким образом, назрела необходимость создания базы данных, с одной стороны, ориентированной на отдельное растение как объект генетического эксперимента, а с

другой – учитывающей его генотип и условия окружающей среды.

В СССР и России важной вехой в селекционно-генетических экспериментах на пшенице явился проект ДИАС (Драгавцев и др., 1984). Эта была программа скрещиваний 15 сортов яровой пшеницы (каждого сорта с каждым из других сортов). Она проходила с 1973 по 1983 гг. и включала экологические испытания в течение двух лет родителей и гибридов поколений F₁, F₂ с измерениями у каждого растения 19 количественных признаков в 9 географических точках Сибири. При этом в каждой географической точке проводилась регистрация динамики основных метеохарактеристик среды. В результате исследований была получена информация о более 5 млн замеров количественных признаков. Данные обрабатывались компьютерными программами на ЭВМ БЭСМ-6 Вычислительного центра СО АН. Программа «ДИАС» дала Западной Сибири и Казахстану 8 новых районированных сортов яровой пшеницы (Драгавцев, 2005). Выполнение исследований позволило выявить основные закономерности экологогенетической организации количественных признаков растений.

В настоящей работе для решения задачи сбора, интеграции, хранения и статистической обработки информации о растениях пшеницы мы предлагаем компьютерную систему WheatPGE (Wheat Phenotype, Genotype and Environment). Система хранит различные отношения, описывающие характеристики отдельного растения, и позволяет однозначно устанавливать взаимосвязь между генотипическими и фенотипическими признаками растений, а также параметрами окружающей среды. Применение системы позволит автоматизировать получение данных о взаимосвязи генотипа, фенотипа и окружающей среды у пшеницы, способствуя тем самым эффективному созданию новых сортов пшеницы с улучшенными свойствами.

Материалы и методы

Для описания различных характеристик растений пшеницы нами была спроектирована реляционная база данных, которая лежит в основе системы WheatPGE. Текущая модель данных представлена 27 таблицами, связанными между собой. В качестве сервера используется MySQL. Для работы с базой данных разработан webинтерфейс, реализованный на основе модуля Catalyst - свободного кроссплатформенного программного каркаса, написанного на языке Perl. В Catalyst заложена методология разработки программного обеспечения MVC, в которой модель данных приложения, пользовательский интерфейс и управляющая логика разделены на три отдельных компонента. В результате модификация одного из компонентов оказывает минимальное воздействие на другие компоненты. Это позволяет добиться эффективной масштабируемости системы. Для связи базы данных с Catalyst используется технология ORM (объектно-реляционная проекция) - технология программирования, которая связывает базы данных с концепциями объектно ориентированных языков программирования, создавая «виртуальную объектную базу данных». Технология позволяет связывать таблицы базы данных с объектами реального мира, например, объект «генотип» состоит из 9 связанных таблиц.

Важная особенность нашей системы - возможность для пользователя описывать произвольные морфологические признаки и параметры окружающей среды без помощи программиста. При этом происходит автоматическое расширение схемы базы данных, создается новая модель, описывающая объекты этого признака. Генерируются контроллеры и представления, реализующие базовые возможности работы с признаком (создание, удаление, редактирование). Этот подход имеет существенное ограничение. Семантическое описание нового признака ограничено одним реляционным отношением. Это означает, что описание должно укладываться в одну таблицу базы данных. Тем не менее этого оказывается достаточным для описания большинства морфологических признаков и параметров окружающей среды, с которыми имеют дело экспериментаторы.

При занесении в базу большого количества гибридных генотипов становится актуальной задача визуализации схем скрещивания растений. Система WheatPGE позволяет автоматически визуализировать схемы скрещивания растений на основе информации об отношениях родитель-потомок, которые хранятся в базе данных. Схема представляется в виде ориентированного графа. Для размещения графа на плоскости и его рендеринга используется библиотека GraphViz (рис. 1).

🕑 Wheat database project - Mozilla Firefox	×
Eile Edit View History Bookmarks Tools Help	
-4. Wheat database project +	
◆ → A, http://wheatdb.org ☆ - C 福 - Google P 命	4.
WheatPGE ^{®®}	
Main Plants Search Admin	
Genotype - 102/00i x Hong-mang-mai (hybrid)	
First parent: 102/00i	н
Second parent: Hong-mang-mai	
Generation: 2	
Crossing scheme:	
102/00i Hong-mang-mai Line: 102/00i Cultivar: Hong-mang-mai	
102/00i x Hong-mang-mai Generation: 2	
	. *
The second se	-

Рис. 1. Пример визуализации схемы скрещивания для гибридного генотипа.

Серверная часть системы WheatPGE работает под управлением web-сервера Apache с модулем mod_perl и операционной системы CentOS Linux.

Структура базы данных

Центральным объектом базы данных является растение (рис. 2). Растение описывается как совокупность признаков генотипа, фенотипа и окружающей среды, в которой данное растение произрастает.

Генотип

Описание генотипа растения содержит следующую информацию: сорт растения, линия (в случае, если растение из чистой линии) или родители (в случае, если растение – гибрид). Для родителей указываются ссылки на генотипы соответствующих растений. Дополнительно для гибридов можно указать поколение и направление скрещивания. Для генотипа можно определить список молекулярных мар-



Рис. 2. Схема взаимосвязи между основными разделами информации в системе WheatPGE.

керов (характеристик геномных ДНК, которые определяются экспериментально или могут быть импортированы из других баз данных). Маркеры объединяются в группы. Для каждого маркера из группы определяется его состояние (например, молекулярная масса или длина). Группа маркеров является характеристикой генотипа растения (рис. 3). При описании маркера указываются его тип, имя, список состояний и локализация на хромосоме.

Фенотип

Для описания фенотипа растения система WheatPGE позволяет создавать наборы отношений, каждое из которых содержит описание характеристик определенного морфологического признака (опушение листа, окраска органов, форма колоса и др.), а также структуры урожая (длина побега и колоса, количество колосьев, продуктивность и др.).

В текущей версии базы данных наиболее полно представлено описание такого морфологического признака, как опушение листа. Для него заданы следующие характеристики: плотность опушения (количество трихом на единицу площади), вектор распределения трихом по длине. Система позволяет сохранять оцифрованные изображения морфологического признака, если это необходимо. Интерфейс для описания признака позволяет также подключать внешние программы анализа изображения для получения различных его характеристик. Для получения информации о количественных характеристиках опушения на основе анализа цифровых фотографий была использована программа LHDetect (Дорошков и др., 2009).



Рис. 3. Структурная схема реляционных отношений таблиц, описывающих молекулярные маркеры.

Структура базы данных позволяет легко расширять список анализируемых морфологических признаков растения и модифицировать информацию о них.

Окружающая среда

Подобно фенотипу, WheatPGE позволяет расширять схему базы данных, добавляя произвольные параметры окружающей среды. Окружающая среда в базе данных может быть представлена набором таких характеристик, как место произрастания (теплица или открытый грунт), средние температура и количество осадков за сезон, дата посева семян и т. п.

Авторизация пользователей и разделение прав доступа

Пользователь может получить доступ к базе данных, зарегистрировавшись на сайте www. wheatdb.org. Зарегистрированный пользователь имеет возможность добавлять и аннотировать собственные растения. В каждой таблице базы данных содержатся поля, в которых прописывается идентификационный номер пользователя, создавшего запись в таблице, и идентификационный номер пользователя, отредактировавшего запись в таблице.

Если для работы пользователю требуется возможность аннотировать дополнительные морфологические признаки или параметры окружающей среды, ему следует отправить запрос администратору системы с просьбой на расширение модели базы данных.

Пользовательский интерфейс

Пользователю предоставляется возможность просматривать списки генотипов, молекулярных маркеров, параметров окружающей среды и отдельные экземпляры растений, которые содержатся в базе. Кроме этого, пользователь имеет возможность осуществлять поиск по растениям, которые содержатся в базе.

Поиск производится по следующим полям:

- посевной номер растения;
- название генотипа растения;
- сорт растения;
- линия;
- является ли растение гибридом или нет;
- название родительских генотипов;
- название молекулярных маркеров, которые присвоены генотипу растения;
- хромосома, на которой локализован молекулярный маркер;
- тип молекулярного маркера;
- положение молекулярного маркера на хромосоме.

При формировании запроса допустимо использование регулярных выражений, например, если необходимо найти в базе все растения двух сортов Фора и Краса, в запросе достаточно написать *Фора Краса*.

Результаты любого запроса можно экспортировать в формате CSV с целью их дальнейшего анализа. При экспорте можно указать поля, необходимые для анализа. Экспортировать можно информацию о морфологических признаках растений, молекулярных маркерах и параметрах окружающей среды. Например, для анализа зависимости опушения листа от сорта растения пользователь должен на странице запроса указать список сортов растений (рис. 4, а), которые он хотел бы включить в анализируемую выборку, и указать список характеристик опушения (рис. 4, б). В итоге пользователь получает таблицу данных, в которой строкам соответствуют растения отобранных сортов, представленные в базе, а в колонках приводятся числовые характеристики опушения (рис. 4, в). Такая таблица может быть далее проанализирована любой программой статистического анализа (MS Excel, Statistica и др.).

Результаты и обсуждение

Текущая версия системы содержит 309 аннотированных растений, 88 генотипов и 1335 микроизображений сгиба листа пшеницы, позволяющих анализировать опушение – один из важных фенотипических признаков растения (Крупнов, Цапайкин, 1990).

Ранее с использованием подходов компьютерной обработки изображений, интегрированных в систему WheatPGE, нами была исследована морфология опушения листа ряда сортов пшеницы (Дорошков и др., 2011). В частности, было показано, что сорта Голубка и Саратовская 29, имеющие схожий тип опушения, различаются в соотношении трихом разной длины. Генетический анализ показал, что сорт Саратовская 29 несет 2 гена, а сорт Голубка – 1 ген опушения листа. Первый сорт по сравнению с сортом Голубка обладает большей плотностью трихом, которые имеют большую длину. На примере сорта Голубка исследовано влияние условий внешней среды на формирование опушения. Показано, что в полевых условиях растения этого сорта формируют большее количество трихом, но меньшей длины. Следует отметить, что проведение столь детального анализа опушения



Рис. 4. Пример работы с системой WheatPGE. Извлечение данных о взаимосвязи сорта растения и его опушения.

а – интерфейс формирования запроса отбора растений;
 б – выбор полей базы данных для экспорта в таблицу;
 в – вид таблицы в Excel и статистический анализ распределения плотности опушения для сортов Балаганка и Голубка.

листа стало возможно исключительно благодаря разработке и внедрению современных методов получения и обработки данных.

В настоящей работе с использованием разработанной компьютерной системы мы выполнили классификацию опушения различных сортов пшеницы методом многомерного шкалирования. Было отобрано 47 различных сортов, содержащихся в базе данных системы WheatPGE.

Эти сорта были выращены в условиях поля в окрестностях Новосибирска в 2008 г. Для определения количественных характеристик опушения растений нами были использованы их предфлаговые листья. Сформировавшиеся здоровые листья были отобраны, и из них были сделаны препараты сгиба листа, для которых по описанной ранее методике (Дорошков и др., 2009) были получены микроизображения. Всего проанализировано по 6 микроизображений для разных растений каждого сорта.

Определение количественных характеристик опушения на основе цифрового анализа микроизображений производилось с помощью программы LHDetect2 (LHDetect2), которая является улучшенной версией программы LHDetect (Дорошков и др., 2009) и интегрирована в систему WheatPGE. Для каждого микроизображения сгиба листа рассчитывалась гистограмма распределения трихом по длине в пределах 0-2500 мкм с шагом 31,5 мкм. На основе гистограммы для каждого изображения строился вектор n, элемент n_i которого соответствовал числу трихом с длиной в интервале от 31,5·(*i*-1) мкм до 31,5·*i* мкм, i = 1, ..., 80. Значения элементов *n* для растений одного и того же сорта усреднялись. Таким образом, была сформирована таблица данных, содержащая 47 строк, в которой каждая строка соответствовала определенному сорту пшеницы, а каждый столбец соответствовал среднему числу трихом в *i*-м интервале длины для растений этого сорта.

Данные были проанализированы при помощи метода неметрического многомерного шкалирования (Oksanen, 2011). Этот метод позволяет построить расположение точек, соответствующих сортам растений, на плоскости так, что взаимные расстояния между ними приблизительно пропорциональны евклидовым расстояниям между векторами *n* для этих сортов в многомерном пространстве, т. е. чем ближе друг к другу на плоскости располагаются точки, тем более сходное распределение трихом по длинам у соответствующих им сортов пшеницы. При анализе данных мы использовали математический аппарат, реализованный в пакете vegan, написанный на языке программирования R (R-project).

Результат классификации показан на рис. 5. На диаграмме хорошо выделяются два кластера. Первый располагается в верхнем левом углу диаграммы и состоит из сортов яровых пшениц, созданных в разное время на территории Поволжья и Сибири. Они имеют густое опушение листа. Во второй кластер (расположен справа) попали немецкие современные и стародавние сорта из коллекции Генбанка Института генетики растений (г. Гатерслебен Германия), имеющие слабое опушение листа.

Эти данные согласуются с прежположением о том, что сильное опушение характерно для



Рис. 5. Классификация 47 сортов пшеницы по опушению листа, полученная с помощью метода неметрического многомерного шкалирования.

Два кластера сортов, имеющих сходный тип опушения, выделены овалами и подписаны.

ряда засухоустойчивых сортов, относящихся к степной экологической группе; для сортов, полученных в условиях большего увлажнения, напротив, характерно более слабое опушение (Крупнов, Цапайкин, 1990).

Более детальный анализ распределения трихом по длинам у растений из разных кластеров показал следующее. Сорт Hohenheimer Franken, попавший во второй кластер (высокое значение координаты Х и близкое к нулю значение координаты Ү), содержит небольшое количество трихом. Сорта Балаганка и Лютесценс 62 (низкое значение координаты Х) хорошо опушены. Таким образом, можно предположить, что ось Х на рис. 5 отрицательно коррелирует с интенсивностью опушения: чем выше значение координаты Х, тем слабее опушение листа. Мы рассчитали коэффициент корреляции Пирсона между значениями координаты Х указанных сортов, средней длиной трихом <L> и средним числом трихом <N>. Оказалось, что эти коэффициенты значимы (p < 0.05) и отрицательны (r(X, <L>) = -0.99;r(X, <N>) = -0.82). Это подтверждает наше предположение о взаимосвязи между осью Х и интенсивностью опушения листа. Отметим, что между значениями <L> и <N> в нашей выборке также существует значимая положительная корреляция: r(<L>, <N>) = 0,78 (p < 0,05). Такая зависимость между средней длиной трихом и их средним числом на листе была обнаружена нами ранее для растений двух генотипов пшеницы (Дорошков и др., 2011) и может являться проявлением специфического механизма генетического контроля формирования опушения у пшеницы.

Отметим, что анализ корреляций значений оси Y и параметров <L> и <N> не выявил значимой связи между ними (r(Y, <L>) = 0,03; r(Y, <N>) = 0,03).

Интересно отметить, что растения кластера 1 на диаграмме (рис. 5) распределены в левой полуплоскости практически равномерно, в то время как растения кластера 2 формируют сильно вытянутое вдоль оси X облако. Оказалось, что коэффициенты корреляции между значениями <L>u <N> у растений этих двух кластеров сильно отличаются. Для кластера 1 корреляция не значима ($r_1(<L>, <N>$) = 0,06, p > 0,05). Для второго кластера она выше, чем для всей выборки сортов ($r_2(<L>, <N>$) = 0,80, p > 0,05). Это демонстрирует возможные генетические различия в формировании опушения у российских и немецких сортов. По-видимому, генетический механизм формирования опушения у сортов из Германии является сходным. Число генов, контролирующих опушение, невелико, и они одинаковым образом действуют и на формирование длин трихом, и на их число.

Генетические механизмы формирования опушения у российских сортов более разнообразны. Опушение у них может формироваться бо́льшим числом аллелей, действующих независимо друг от друга, при этом число трихом и их длина контролируются независимо и специфично для каждого генотипа, что отражается в отсутствии корреляций между этими признаками. Данное предположение подтверждается тем, что 4 сорта из российской коллекции (Селенгинская, Нарымская 3, Краса, Крохинская 10) оказались в одном кластере вместе с немецкими сортами. Это говорит о том, что в процессе их создания (гибридизация, многократные отборы) из генотипов были утеряны некоторые гены, контролирующие густое опушение листа.

Также интересно отметить, что сорта, имеющие в своей родословной сорт Саратовская 29 (Омская 9, Омская 11, Новосибирская 89) или общее место происхождения (Лютесценс 62), расположены в отдельной общей группе. Это означает, что они имеют сходный характер опушения: самое густое из всех представленных сортов.

Таким образом, проведенная кластеризация демонстрирует свою применимость для анализа экспериментальных результатов и может быть с успехом использована для классификации и всестороннего описания образцов в генетических коллекциях, а также новых линий и сортов пшеницы.

Заключение

Разработанная система WheatPGE позволяет устанавливать и анализировать взаимосвязь между генетическими и фенотипическими признаками растений и параметрами окружающей среды у пшеницы. Это обеспечивает поддержку целого ряда важных биологических задач. Прежде всего, это задачи подбора генетического материала для различных экспериментов, поиск и картирование генов, отвечающих за определенные признаки, особенности их фенотипического проявления, зависимости от различных факторов, таких, как условия внешней среды, стадии развития и т. п. Задачи, связанные с описанием генетических коллекций и работой с ними, также могут осуществляться с использованием средств системы WheatPGE.

На данный момент возможности анализа изображений системы WheatPGE позволяют быстро и эффективно проводить исследование опушения листа пшеницы, устанавливают зависимость морфологических характеристик опушения от сорта растения, места произрастания. Они облегчают поиск генетических маркеров, статистически связанных с тем или иным типом опушения пшеницы.

Сорта из Генбанка Института генетики растений любезно предоставлены доктором Андреасом Бернером (Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, г. Гатерслебен, Германия).

Работа поддержана программами РАН Б.25 и А.Ш.6, интеграционным проектом СО РАН 119, Министерством образования и науки Российской Федерации, ГК 07.514.11.4003, ГК 07.514.11.4023, ГК 07.514.11.4052 и грантом РФФИ 11-04-01748а.

Литература

- Дорошков А.В., Арсенина С.И., Пшеничникова Т.А., Афонников Д.А. Применение компьютерного анализа микроизображений листа для оценки характеристик опушения пшеницы *Triticum aestivum* L.// Информ. вестник ВОГиС. 2009. Т. 13. № 1. С. 218–226.
- Дорошков А.В., Пшеничникова Т.А., Афонников Д.А. Анализ особенностей морфологии и наследования опушения листа пшеницы *Triticum aestivum* L. с помощью компьютерных методов фенотипирования // Генетика. 2011. Т. 47. № 6. С. 836–841.
- Драгавцев В.А., Цильке Р.А., Рейтер Б.Г. и др. Генетика признаков продуктивности яровых пшениц в Западной Сибири. Новосибирск: СО АН, 1984. 121 с.
- Драгавцев В.А. Библиография деятелей науки. СПб: ГНУ ГНЦ РФ ВИР, 2005. С. 6.
- Крупнов В.А., Цапайкин А.П. Опушение листьев пшеницы: генетические и экологические аспек-

ты // С.-х. биология. Сер. «Биология растений». 1990. № 1. С. 51–57.

- Ajjawi I., Lu Y., Savage L.J. *et al.* Large-scale reverse genetics in Arabidopsis: case studies from the Chloroplast 2010 Project // Plant Physiol. 2010. V. 152. P. 529–540.
- Eberius M., Lima-Guerra J. High-Throughput Plant Phenotyping Data Acquisition, Transformation, and Analysis // Bioinformatics: Tools and Applications / Ed. D. Edwards *et al.* Springer Science+Business Media, 2009. P. 259–278.
- Exner V., Hirsch-Hoffmann M., Gruissem W., Hennig L. PlantDB – a versatile database for managing plant research // Plant Methods. 2008. V. 4. P. 1.
- Fabre J., Dauzat M., Négre V. *et al.* PHENOPSIS DB: an Information system for *Arabidopsis thaliana* phenotypic data in an environmental context // BMC Plant Biol. 2011. V.11. P. 77.
- Grubb S.C., Maddatu T.P., Bult C.J., Bogue M.A. Mouse phenome database // Nucl. Acids Res. 2009. N 37. P. D720–D730.
- Hancock J.M., Adams N.C., Aidinis V. et al. Mouse phenotype database integration consortium // Mamm. Genome. 2007. V. 18. N 3. P. 157–163.
- Kahraman A., Avramov A., Nashev L.G. *et al.* PhenomicDB: a multi-species genotype/phenotype database for comparative phenomics // Bioinformatics. 2005. V. 21. P. 418–420.
- Kaminuma E., Heida N., Tsumoto Y. *et al.* Automatic quantification of morphological traits via three-dimensional measurement of Arabidopsis // Plant J. 2004. V. 38. P. 358–365.
- Kearsey J.M. The principles of QTL analysis (a minimal mathematic approach) // J. Exp. Bot. 1998. V. 49. P. 1619–1623.
- Lee J.M., Davenport G.F., Marshall D. *et al.* GERMI-NATE. a generic database for integrating genotypic and phenotypic information for plant genetic resource collections // Plant Physiol. 2005. V. 139. P. 619–631.
- LHDetect2: Leaf image processing for wheat hairiness, available at http://wheatdb.org/lhdetect2.
- Lu Y., Savage L.J., Ajjawi I. *et al.* New connections across pathways and cellular processes: industrialized mutant screening reveals novel associations between diverse phenotypes in Arabidopsis // Plant Physiol. 2008. V. 146. P. 1482–1500.
- NIG Mouse Phenotype Database, available at http://molossinus.lab.nig.ac.jp/phenotype/.
- Oksanen J. Multivariate Analysis of Ecological Communities in R: vegan tutorial. 2011, available at http:// cc.oulu.fi/~jarioksa/opetus/metodi/vegantutor.pdf
- R-project: R: A language and environment for statistical computing, available at http://www.R-project.org.
- Sol Genomic Network, available at http://solgenomics. net/.

Shavrukov Y., Gupta N.K., Miyazaki J. et al. HvNax3–a locus controlling shoot sodium exclusion derived from wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. spontaneum) // Funct. Integr. Genomics. 2010. V. 10. P. 277–291.

Twigger S.N., Shimoyama M., Bromberg S. et al.

RGD Team. The rat genome database, update 2007easing the path from disease to data and back again // Nucl. Acids Res. 2007. N 35 (Database issue). P. D658–D662.

VPhenoDBS: Maize. available at http://vphenodbs.rnet. missouri.edu/

WheatPGE: A SYSTEM FOR ANALYSIS OF RELATIONSHIPS AMONG PHENOTYPE, GENOTYPE AND ENVIRONMENT IN WHEAT

M.A. Genaev¹, A.V. Doroshkov¹, E,V. Morozova¹, T.A. Pshenichnikova¹, D.A. Afonnikov^{1, 2}

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: mag@bionet.nsc.ru;
² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

The WheatPGE system, presented here, has been designed to solve the problem of integration of genotypic and phenotypic data and parameters of the environment, as well as to analyze the relationships between the genotype and phenotype in wheat. The system is used to consolidate miscellaneous data on a plant for storing and processing various morphological traits and genotypes of wheat plants as well as data on various environmental factors. The system is available at www.wheatdb.org. Its potential in genetic experiments has been demonstrated in quantitative indices of wheat leaf pubescence. We have classified 47 common wheat varieties according to leaf pubescence by multidimensional scaling. The results reveal differences between leaf pubescence in Russian and German wheat varieties.

Key words: wheat, data consolidation, phenotype, genotype, environment, leaf pubescence, database.

ВЗАИМОСВЯЗЬ КОРМОВОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ С ВЫСОТОЙ РАСТЕНИЙ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ПЕРИОДА ВЕГЕТАЦИИ ЛЮЦЕРНЫ В ЗАСУШЛИВОМ ПОВОЛЖЬЕ

Т.Н. Попова, В.А. Найдович

Ершовская опытная станция орошаемого земледелия, ГНУ Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока, Саратов, Россия, e-mail: raiser_saratov@mail.ru

Изучены уровень и варьирование кормовой продуктивности, высоты растений и продолжительности вегетации в трех последовательных укосах двух сортов люцерны, различающихся по семенной продуктивности. Установлено направление влияния высоты растений и продолжительности вегетации на кормовую продуктивность люцерны. Количественно показана взаимосвязь между этими признаками в трех последовательных укосах люцерны в засушливом Заволжье.

Ключевые слова: люцерна, взаимосвязь признаков, кормовая продуктивность, высота растений, период вегетации.

Введение

Люцерна (*Medicago sativa* L.) – одна из важнейших кормовых бобовых культур во многих странах (Гончаров, Лубенец, 1985; Lamb *et al.*, 2006). Большое значение она имеет для зоны засушливого Заволжья (Царев и др., 1985; Найдович, Малютов, 2003). По содержанию белка и составу аминокислот люцерна играет важную мелиоративную роль, способствуя обогащению почвы азотом, снижению почвенной и ветровой эрозии и повышению почвенного плодородия.

Для производства нужны сорта, сочетающие высокую семенную и кормовую продуктивность. Как показывает отечественный и зарубежный опыт, решение этой проблемы сталкивается с огромными трудностями, особенно при традиционной селекции (Найдович, Малютов, 2003; Малютов, 2005; Lamb *et al.*, 2006; Robins *et al.*, 2007). В ряде стран развернуты исследования по идентификации и локализации в хромосомах люцерны QTL семенной и фуражной продуктивности и ассоциированных с ними признаков (Lamb *et al.*, 2006; Robins *et al.*, 2007).

Как для теоретических исследований, так и для практической селекции важно знать взаимосвязь кормовой продуктивности с ее компонентами и другими признаками. К числу важных признаков продуктивности относятся высота растений и продолжительность вегетации в каждом укосе (Riday, Brummer, 2005; Robins *et al.*, 2007; Rimi *et al.*, 2010). В зоне засушливого Заволжья эти вопросы изучены крайне слабо, хотя здесь накоплен немалый опыт практической селекции люцерны на семена и фуражную продуктивность (Найдович, Малютов, 2003; Малютов, 2005).

Цель нашей работы – проанализировать и обобщить взаимосвязь урожайности кормовой массы с высотой растений и продолжительностью вегетации у двух сортов люцерны за период 1989–2010 гг. на Ершовской опытной станции орошаемого земледелия (Ершовская ОСОЗ), ГНУ Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока.

Материал и методы

Ершовская ОСОЗ находится в центре Саратовского Заволжья в зоне темно-каштановых почв. Среднегодовое количество осадков около 370 мм. Максимальная температура воздуха достигает +40 °C, а минимальная -41 °C. Среднегодовая температура воздуха составляет 4,8 °C.
Основное количество осадков приходится на осенне-зимний период, выпадают они крайне неравномерно, в результате чего возникает засуха, которая может быть как краткосрочной (рано весной, в начале, середине, конце лета и осенью), так и долгосрочной, нередко сочетаясь с жарой и суховеями.

Материалом служили два сорта люцерны – Ерусланка и Артемида селекции Ершовской ОСОЗ. Первый из них относится к сине-гибридной группе сортотипов люцерны изменчивой (*Medicago sativa* L. nothosubsp. varia (Martyn) Arcang.), может давать 3–4 укоса за сезон. Сорт допущен к использованию в Нижневолжском регионе с 1993 г.

Сорт Артемида относится к виду люцерны синей (*Medicago sativa* L., *subsp. sativa*). Основными преимуществами сорта Артемида перед другими районированными сортами являются повышенная устойчивость к заболеванию микоплазмозом и большое долголетие («многолетность»). Сорт Артемида допущен к использованию в Нижневолжском и Центрально-Черноземном регионах с 1996 г. (Государственный реестр селекционных достижений, 2011).

Полевые эксперименты и наблюдения проводили по методическим указаниям ВНИИ кормов (1971, 1993 гг.) и ВНИИ растениеводства (1973, 1982 гг.). Изучали урожайность зеленой массы (фуражная продуктивность) с трех укосов (У1, У2, У3) в питомнике конкурсного сортоиспытания, где ежегодно изучается 10–15 сортов и популяций (номеров). Посев сплошной, рядовой, с междурядьем 15 см, в 6-кратной повторности. Площадь каждой делянки 13 м². Уборку производили комбайном Е300. Поливы 1–2 раза из расчета 500 м³ воды во втором укосе во все годы и в третьем укосе – с 1989 по 2001 гг.

Анализ включал следующие учеты и наблюдения: 1) отрастаемость (на 7–10-й день после каждого укоса), количество побегов на 1 м², густота стояния растений и высота травостоя весной и перед каждым укосом; 2) поврежденность вредителями и болезнями (устойчивость к возбудителям заболеваний проводили на третьем году жизни перед каждым укосом); 3) засоренность сорняками – визуально, в процентах; 4) урожайность зеленой массы в фазу бутонизации–цветения; 5) урожайность сухой массы – по 1-килограммовому пробному снопу определяли вес воздушно-сухого вещества, абсолютно сухой вес, вес стеблей и листьев.

Метеорологические данные предоставлены Ершовской метеорологической станцией.

Данные экспериментальных исследований подвергли дисперсионному, корреляционному и регрессионному анализу по Б.А. Доспехову (1985) с помощью ПК и программы Microsoft Excel 2003.

Результаты и обсуждение

По данным Ершовской метеорологической станции, годы исследований (1989–2010, за исключением 2010 г.) являются типичными для зоны засушливого Заволжья как по количеству и времени выпадения осадков, так и по температурному режиму включая сезоны как относительно благоприятные, так и средне- и острозасушливые. Засуха наиболее ярко проявилась в 1995, 1996, 1998, 2000 гг., а 2010 г. оказался рекордно знойно-засушливым.

Результаты изучения кормовой продуктивности, высоты растений и вегетационного периода трех укосов в период с 1989 по 2010 гг. (за исключением 2002 и 2010 гг., когда укоса 3 (УЗ) не было) представлены в табл.

По данным конкурсного испытания на Ершовской СОЗ, семенная продуктивность Артемиды значимо выше, чем сорта Ерусланка (Найдович, Малютов, 2003; Малютов, 2005). Между тем, как видно из таблицы, по уровню и варьированию продуктивности (УЗМ), высоте растений и продолжительности вегетации сорт Артемида не уступает сорту Ерусланка. Наивысший УЗМУ1 (урожай зеленой массы, укос 1) у обоих сортов был в 1990 и 1993 гг., а самый низкий – в 2000 и 2010 гг. Таким образом, у сорта Артемида кормовая продуктивность сочетается с семенной продуктивностью более удачно, чем у сорта Ерусланка.

Высота растений. У обоих сортов в среднем за 22 года в укосе 1 (У1) высота растений значимо ниже, чем в У2 и У3, при примерно сходном варьировании по годам. Максимальной (83 см) она была у обоих сортов в 2003 г.: у сорта Ерусланка – 83 см, а у сорта Артемида – 81 см, а минимальной в 2010 г. – 28 см.

Результаты изучения взаимосвязи урожая зеленой массы и высоты растений в трех укосах

Таблица

Сорт	Укос	Признак	Среднее	Варьирование	V, %
	У1	УЗМ, т/га	$1,700 \pm 0,126$	0,840–2,690	34,7
	У2	УЗМ, т/га	$1,700 \pm 0,130$	0,810-3,020	35,4
	У3	УЗМ, т/га	$1,500 \pm 0,095$	0,810-2,260	28,2
	У1	ВР, см	$48,\!80\pm2,\!09$	29–77	20,1
Ерусланка	У2	ВР, см	$58,3 \pm 2,48$	28-83	19,9
	У3	ВР, см	$55,9 \pm 2,55$	26-72	20,4
	У1	ВПУ1, дней	$40{,}90\pm0{,}48$	38–44	5,5
	У2	ВПУ2, дней	$33,9\pm0,99$	28–46	13,7
	У3	ВПУ3, дней	$43,7 \pm 1,46$	35–55	14,9
Артемида	У1	УЗМ, т/га	$1,655 \pm 0,120$	0,920–2,670	32,9
	У2	УЗМ, т/га	$1,700 \pm 0,120$	0,800-3,050	32,2
	У3	УЗМ, т/га	$1,5\pm0,09$	0,850-2,170	27,3
	У1	ВР, см	$47,5 \pm 1,98$	31-72	19,5
	У2	ВР, см	$58,1 \pm 2,39$	28-81	19,3
	У3	ВР, см	$59,3 \pm 2,44$	29–73	18,5
	У1	ВПУ1, дней	$40{,}9\pm0{,}48$	38–44	5,5
	У2	ВПУ2, дней	$33{,}9\pm0{,}99$	28–46	13,7
	У3	ВПУ3, дней	$43,7 \pm 1,46$	35–55	14,9

Урожайность зеленой массы (УЗМ, т/га), высота растений (ВР, см), вегетационный период (ВПУ, дней) и коэффициенты вариации (V, %) сортов Ерусланка и Артемида в среднем за 22 года (1989–2010)

(У1, У2 и У3) у сортов Ерусланка и Артемида приведены на рис. 1.

Как видно из рис. 1, взаимосвязь между УЗМУ1 и ВР у сортов Ерусланка и Артемида во всех трех укосах положительная, от слабой до средней. Достоверно значимой она была у сорта Ерусланка в У1 и У3, а у сорта Артемида – только в У1.

Результаты наших исследований согласуются с данными исследований американских ученых на клонально размноженных гетерозисных гибридах *Medicago sativa* L., полученных от скрещивания *Medicago sativa subsp. sativa* с *subsp. falcata* (Riday, Brummer, 2005; Robins *et al.*, 2007). Уместно отметить, что в этом трехлетнем эксперименте ВР гибридов в У1 варьировала от 10 до 71 см, в У2 – от 18 до 38 см, а в У3 – от 29 до 60 см (Robins *et al.*, 2007), т. е. была примерно такой же, как и в нашем исследовании. Известны сообщения о более тесной положительной корреляции между УЗМ и ВР, например, в Хорватии и Италии (Tucak *et al.*, 2008; Rimi *et al.*, 2010).

Отсутствие в наших экспериментах тесной связи между УЗМ и ВР, по-видимому, можно объяснить недостаточно равномерным развитием побегов и листового полога по ярусам. Уместно отметить, что с ВР может быть положительно связана и семенная продуктивность люцерны (Sengul S., Sengul M., 2006).

Вегетативный период. У обоих сортов в среднем за 22 года все три укоса достоверно различаются по продолжительности периода вегетации: самый длинный он у УЗ, а самый короткий – у У2. Наименьший коэффициент вариации продолжительности ВП у У1, а наивысший – у У3.

Результаты изучения взаимосвязи между УЗМ и ВП в трех укосах (У1, У2 и У3) у сортов Ерусланка и Артемида за период с 1989 по 2010 гг. представлены на рис. 2.

Как видно из рис. 2, взаимосвязь между УЗМ и ВП у сорта Ерусланка у У1 значимо положительная, а у У2 и У3 – отрицательная, но недостоверная. У сорта Артемида она значимо



Рис. 1. Взаимосвязь урожая зеленой массы и высоты растений.

а, в, д – сорт Ерусланка, укос 1, 2, 3 соответственно; б, г, е – сорт Артемида укос 1, 2, 3 соответственно.

положительная у У1, тогда как у У2 и У3 – отрицательная, причем у У3 эта связь достоверная. Причины разнонаправленных связей между УЗМ и ВП неизвестны.

Большой интерес представляет изучение влияния предшествующего укоса на последующий. У обоих сортов в среднем за 22 года взаимосвязь между УЗМУ1 и УЗМ2 значимая, средняя положительная, у Артемиды $r = 0,51^*$, а у Ерусланки $r = 0,56^{**}$. Между тем, результаты изучения взаимосвязи УЗМУ2 и УЗМ3 прямо противоположные: у сорта Артемида $r = 0,52^*$ (т. е. такой же, как между первым и вторым укосом), у сорта Ерусланка коэффициент корреляции между этими признаками незначимый, хотя положительная тенденция проявилась и также положительная, но недостоверная (r = 0,29). У сорта Ерусланка взаимосвязь между УЗМУ1 и УЗМ2 также высокозначимая, средняя положительная ($r = 0.56^{**}$), а между УЗМУ2 и УЗМ3 – также положительная, но недостоверная (r = 0.29). Данные наших исследований согласуются с результатами американских ученых (Riday, Brummer, 2005; Robins *et al.*, 2007).

Заключение

На каштановых почвах засушливого Поволжья изучены уровень и варьирование кормовой продуктивности, высоты растений и продолжительности вегетации в трех последовательных укосах двух сортов люцерны, которые значимо различаются между собой по семенной продуктивности. Выявлено важное различие: оба сорта характеризуются весьма сходными параметрами урожайности, высоты



Рис. 2. Взаимосвязь урожая зеленой массы и продолжительности вегетационных периодов. а, в, д – сорт Ерусланка, укос 1, 2, 3 соответственно; б, г, е – сорт Артемида, укос 1, 2, 3 соответственно.

растений и продолжительностью вегетации в самых разных, весьма контрастных условиях увлажнения и температуры воздуха. Установлено направление влияния высоты растений и продолжительности вегетации на кормовую продуктивность люцерны. Количественно показана взаимосвязь между этими признаками в трех последовательных укосах люцерны в засушливом Заволжье.

Авторы благодарят проф. В.А. Крупнова за ценные замечания и предложения по работе.

Литература

Гончаров П.Л., Лубенец П.А. Биологические аспекты возделывания люцерны. Новосибирск: Наука, 1985. 256 с.

- Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. (Официальное издание). Т. 1. Сорта растений. М., 2011. 329 с.
- Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). 4-е изд. доп. и перераб. М.: Колос, 1985. 416 с.
- Малютов М.П. Селекция люцерны на семенную продуктивность в засушливом Заволжье : Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Саратов, 2005. 16 с.
- Найдович В.А., Малютов М.П. Влияние надземной биомассы и метеоусловий на семенную продуктивность орошаемой люцерны на темно-каштановых почвах // Кормопроизводство. 2003. № 9. С. 25–28.
- Методика опытов на сенокосах и пастбищах. Ч. 1. М.: ВНИИК им. В.Р. Вильямса, 1971. 232 с.
- Методические указания по изучению устойчивости к

болезням многолетних бобовых трав. Л.: ВНИИР им. Н.И. Вавилова, 1973. 57 с.

- Методические указания по селекции и первичному семеноводству многолетних трав. М.: ВНИИК им. В.Р. Вильямса, 1993. 76 с.
- Царев А.П., Денисов Е.П., Унгенфухт В.Ф., Васькин Д.В. Люцерна в Саратовской области. Саратов: Приволж. кн. изд-во, 1985. 88 с.
- Lamb J.F.S., Sheaffer C.C., Rhodes L.H. *et al.* Five decades of alfalfa cultivar improvement: Impact on forage yield, persistence, and nutritive value // Crop Sci. 2006. V. 46. P. 902–909.
- Riday H., Brummer E.C. Relationships among biomass yield components within and between subspecies of alfalfa [Online]. Available at http://www.medicagoreports.org/ (verified 22 Nov. 2005). Medicago Genetic Reports. V. 4.
- Rimi F., Macolino S., Ziliotto U. Relationships between dry matter yield, forage nutritive value, and some canopy parameters of alfalfa crop. Grassland in a changing world / Eds H. Schnyder *et al.* // Proc. of the 23rd General Meeting of the European Grassland Federation, Kiel, Germany, 29th August – 2nd September 2010. P. 548–550.
- Robins J.G., Bauchan G.R., Brummer E.C. Genetic mapping forage yield, plant height, and regrowth at multiple harvests in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) // Crop Sci. 2007. V. 47. P. 11–18.
- Sengul S., Sengul M. Determining relationships between seed yield and yield components in alfalfa // Pak. J. Biol. Sci. 2006. V. 9. P. 1749–1753.
- Tucak M., Popovic S., Grljusic S. *et al*. Variability and relationships of important alfalfa germplasm agronomic traits // Period. Biol. 2008. V. 110. N 4. P. 311–315.

CORRELATIONS OF ALFALFA FORAGE YIELD WITH PLANT HEIGHT AND VEGETATION DURATION IN THE DROUGHTY VOLGA REGION

T.N. Popova, V.A. Naydovich

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

Summary

The level and variation of forage yield, plant height and duration of vegetation have been studied in three consecutive cuts of two cultivars differing in seed yield. The directions of the influence of plant height of plants and vegetation duration on the forage yield of alfalfa have been determined. Correlations among these parameters in three consecutive cuts of alfalfa in the droughty Volga region are shown.

Key words: alfalfa, relationship of traits, forage yield, plant height, vegetation period.

РЕПРОДУКТИВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РОЗОВОЦВЕТКОВОГО ДЕКОРАТИВНОГО ГИБРИДА *FRAGARIA* × *POTENTILLA* (COPT FREL) В СЕЛЕКЦИИ КРУПНОПЛОДНОЙ ЗЕМЛЯНИКИ

С.О. Батурин, Л.Л. Кузнецова

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

Изучены репродуктивные особенности розовоцветкового декоративного сорта Frel (гибрид *Fragaria* × *Potentilla*). Жизнеспособность пыльцы до 90 %, доля полноценных семянок на ягоду при самоопылении составляет $33,9 \pm 1,8$ %, а всхожесть семянок варьирует от 12,5 до 71,3 %. Сорт является миксоплоидом, формирующим преимущественно гаметы с n = 28. Результаты генетического анализа указывают на доминантный монофакториальный контроль розовой окраски венчика с полисомической хроматидной сегрегацией аллелей. Сорт Frel по признаку «розовая окраска венчика» является гетерозиготным: при самоопылении образуется 41,2 % белоцветковых сеянцев – рецессивных гомозигот, а при гибридизации с *F*. × *ananassa* до 63,1 %. Гибриды *F*. × *ananassa* × Frel имеют низкую семенную фертильность, для получения урожайных розовоцветковых гибридов с выполненными ягодами необходим длительный отбор фертильных сеянцев в ряду поколений.

Ключевые слова: розовоцветковая земляника, *Fragaria* × *ananassa*, *Fragaria* × *Potentilla*, фертильность пыльцы, семенификация, проточная цитометрия, селекция, миксоплоидия, ремонтантность.

Введение

Коммерческие сорта крупноплодной земляники (*Fragaria* × *ananassa* Duch., 2n = 8x = 56) имеют венчик белой окраски. Розовая окраска венчика отмечена лишь у отдельных форм F. vesca (East, 1930). В начале 1960-х гг. в Англии были осуществлены успешные скрещивания по интрогрессии розовой окраски венчика в генофонд F. × ananassa (Ellis, 1962). Первый запатентованный сорт розовоцветковой земляники носит название Frel (коммерческое название Pink Panda) (Ellis, 1991). Он был получен в результате межродовой гибридизации F. × ananassa и Potentilla palustre (Comarum palustris) (2n = 6x = 42) с последующим колхицинированием проростков и беккроссированием полученных сеянцев (Ellis, 1962). В скрещиваниях в качестве опылителя использовался C. palustre, который имел пурпурную окраску венчика. По мнению автора патента, сорт Frel представляет собой линию крупноплодной земляники с добавленными хромосомами и является земляникой на 96%. Frel упоминается в родословных нескольких сортов и гибридов розовоцветковой земляники (Батурин, Кузнецова, 2010).

В настоящее время сортимент земляники с розовыми цветками насчитывает не более 30 сортов и гибридов преимущественно декоративного назначения (Khanizaden, 2000), которые зачастую не способны давать удовлетворительный урожай плодов с приемлемыми вкусовыми качествами (Mabberley, 2002; Батурин, Кузнецова, 2010). В селекции розовоцветковых земляник наиболее важной является задача повышения продуктивности и улучшения качества плодов. Несмотря на низкую урожайность и посредственный вкус ягод, существующие розовоцветковые сорта пользуются большим спросом у садоводов-любителей благодаря их декоративности, а кроме того, находят все более широкое применение в ландшафтном дизайне (Bentvelsen et al., 2006).

Цель данного исследования – изучить возможности использования сорта Frel при создании отборных форм розовоцветковой земляники, пригодных для выращивания в открытом грунте в условиях Западной Сибири.

Материал и методы

Исходный материал

В исследование были вовлечены сорт Frel, относящийся к розовоцветковым декоративным земляникам с ремонтантным типом цветения, а также белоцветковые образцы (8x) Fragaria × ananassa из экспериментального фонда земляник лаборатории популяционной генетики растений ИЦиГ СО РАН. Растения сорта Frel морфологически схожи с представителями Fragaria × ananassa, вегетативно размножаются при помощи укореняющихся розеток наземных столонов. Цветки Frel - совершенные (обоеполые), что обусловливает их самоплодность. Главной особенностью этого сорта является уникальная для представителей Fragaria розовая окраска лепестков. Следует отметить, что в условиях Западной Сибири сорт Frel обладает хорошей зимостойкостью, а также некоторой устойчивостью к болезням и вредителям.

Анализ фертильности пыльцы

Определение фертильности пыльцы проводили окрашиванием в течение 24 часов при температуре 20–22 °С солянокислым спиртовым кармином (Snow, 1965) пыльцевых зерен (не менее 1500 шт.), извлеченных из предварительно фиксированных в растворе Карнуа (Барыкина и др., 2004) полураскрытых бутонов.

Определение числа хромосом и плоидности растений

Подсчет числа хромосом в соматических тканях сорта Frel проводили при помощи микроскопа Zeiss Axiostar Plus на временных препаратах меристематической зоны корешков, окрашенных лактопропионовым орсеином (Preeda *et al.*, 2007).

Для определения плоидности сеянцев, полученных от самоопыления сорта Frel, использовали проточный цитометр CyFlow Green Partec, Münster, Germany. Анализ проведен в Университете технологии и естественных наук, г. Быдгощ, Польша. Для каждого образца было проанализировано от 7000 до 10000 ядер, извлеченных из растительных тканей листьев. Приготовление суспензии ядер готовили по методике J. Dolezel с соавт. (1998), содержание ядерной ДНК определялось согласно методике D.W. Galbraith с соавт. (1998). Анализ гистограмм проводился с использованием компьютерной программы DPAC v.2.2.

Техника скрещиваний

При самоопылении и направленных скрещиваниях соцветия изолировали прозрачным упаковочным целлофаном. Кастрацию обоеполых цветков проводили удалением андроцея вместе с околоцветником. Соцветия помещали в изолятор, вокруг основания цветоноса прокладывалась вата для предотвращения попадания насекомых (возможных переносчиков пыльцы), сверху изолятор у основания завязывали тонким шпагатом с этикеткой. Для скрещиваний использовали свежую пыльцу, выделенную из раскрывающихся (но еще с сомкнутыми лепестками) бутонов, подсушенную при температуре 20-22 °С без прямого доступа солнечных лучей. Опыление проводили через 2-3 дня после кастрации. Пыльцу наносили мягкой кисточкой однократно. Для проведения опытов по самоопылению изолировали цветоносы с нераскрывшимися бутонами.

Анализ семенификации плодов

Осемененность (семенификация, %) определяли как отношение нормально выполненных семян к общему числу завязей в процентах. Для этого верхний слой каждой ягоды (40 шт.) плотно прижимали к картону, просушивали при комнатной температуре, а затем проводили подсчет семянок с помощью бинокулярного микроскопа МБС-9.

Выращивание сеянцев

Семена проращивали в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге после 3-месячной стратификации при температуре 4 °С, после чего их высаживали в пикировочные ящики. В возрасте 3–4 месяцев сеянцы высаживались в открытый грунт, где их доращивали в условиях стандартного агрофона. Специальное укрытие в зимний период не применяли.

Результаты

Предварительные данные о жизнеспособности пыльцы дает анализ доли окрашенных пыльцевых зерен. Жизнеспособность пыльцы у сорта Frel составила 90,4 ± 0,56%, что свидетельствует о ее хорошем качестве, учитывая межродовое происхождение сорта. Следует отметить, что на препаратах окрашенной пыльцы, выделенной из некоторых цветков, с частотой 1,2% встречались пыльцевые зерна очень крупных размеров, которые, по-видимому, являются производными монад (рис. 1).

При самоопылении сорт Frel формирует мелкие безвкусные ягоды, как правило, при осеннем плодоношении. Ягоды развиваются на небольшом числе цветков, плодовитость варьирует от 21 до 34%. Доля полноценных семянок на ягоду составила $33,9 \pm 1,8\%$, что является достаточным условием для развития ягод, хотя и не вполне морфологически выполненных.

За период 1996–2010 гг. было выделено и проанализировано на всхожесть 1673 семянки, развившиеся в условиях инбридинга. Всхожесть



Рис. 1. Пыльцевые зерна сорта Frel (стрелками указаны необычно крупные пыльцевые зерна, повидимому, производные монад).

семян в различные годы колебалась в пределах от 12,5 до 71,3%. Проростки часто погибали на ювенильной стадии и до цветения доживала незначительная часть сеянцев, как правило, около 3,5% (изредка до 40,0%) от числа взошедших семян. Биоморфологический анализ сеянцев выявил фенотипы, значительно уклоняющиеся от фенотипа исходного сорта Frel. Различия среди потомков наблюдались по таким признакам, как высота растений, площадь и степень насыщенности зеленой окраски листа, способность развивать наземные столоны и др. Кроме того, при анализе семенного потомства I₁ сорта Frel выявлена сегрегация по тональности розовой окраски венчика, вплоть до выщепления белоцветковых растений (41,2%) (табл. 1). Появление растений с белой окраской венчика – рецессивных гомозигот - свидетельствует о гетерозиготности сорта. Результаты анализирующего скрещивания также указывают на гетерозиготность сорта Frel. В результате использования его в качестве опылителя в скрещиваниях с перспективными октоплоидными белоцветковыми гибридами F. × ananassa в потомстве F₁ белоцветковые сеянцы регистрируются в среднем с частотой 63% (табл. 2).

Потомство от самоопыления белоцветковых гибридов F₁, а также от их скрещивания между собой было представлено только белоцветковыми сеянцами (табл. 2). Из чего следует, что проанализированные гибриды были гомозиготными по белой окраске венчика. Напротив, гибриды F₁ с розовыми цветками при самоопылении и анализирующем скрещивании дали потомство с белыми цветками (60,1% при самоопылении) и розовыми цветками, которое можно ранжировать по тональности розовой окраски цветков. Один из розовоцветковых гибридов F₂ – № 00/9-30-5 с пестичным типом цветков при открытом опылении (рядом произрастали преимущественно белоцветковые формы крупноплодной земляники) успешно формировал семенное потомство, в котором доля белоцветковых растений составила 65,4%. У этого гибрида характер сегрегации по окраске венчика в семенном потомстве при открытом опылении оказался близок к сегрегации при анализирующем скрещивании – 63,1% (табл. 2), что указывает на перенос пыльцы насекомыми с белоцветковых форм при открытом опылении. У крупноплод-

Таблица 1

Образец/ комбинация скрещивания	Белый с розовыми жилками	Светло-розовый	Розовый	Темно-розовый	Белый
		Самоопыление			
Frel*	0	3	6	1	7 (41,2 %)
97/2-1-6*	0	8	6	2	25 (60,1 %)
97/2-1-4	0	0	0	0	11 (100 %)
Сибкроссы					
97/3-75-6* × 97/2-1-4	0	0	5	0	2 (28,6 %)
97/3-76-6 × 97/2-1-4	0	0	0	0	142 (100 %)
Открытое опыление					
00/9-30-5*	3	12	11	1	51 (65,4 %)

Сегрегация по окраске венчика в семенных потомствах

Примечание. * Цветки с розовой окраской венчика.

Таблица 2

Сег	регания по ок	раске венчика	в потомствах	F ₁ , пол	vченных c	участием	сорта Frel
	p	P		- ,	J	J	

Mananua danya	Окраска венчика сеянцев					
$F. \times ananassa$	слегка розовый	светло-розовый	розовый	темно-розовый	белый	
58д	5	7	17	3	52 (61,9 %)	
Д-3-3-1	0	0	3	0	9 (75,0 %)	
Л-1-15-1	0	2	5	0	15 (68,2 %)	
сорт Elin	1	4	1	0	6 (60,0 %)	
Всего	6	13	26	3	82 (63,1 %)	

ной земляники число развившихся семянок и равномерность их расположения на ягоде обусловливают полноценную форму ягоды. Развитие семянок на ягоде менее 50% часто становится причиной появления ягод неполноценной формы. Осемененность ягод розовоцветкового гибрида № 00/9-30-5 составила $43,8 \pm 3,4\%$, что недостаточно для формирования выполненных ягод. Однако в его семенном потомстве удалось выделить розовоцветковые сеянцы № 05/2-35-1 и № 05/2-14-6, у которых семенификация составляет 72,0 ± 4,6% и 80,2 ± 2,4% соответственно, что обусловливает развитие более выполненных ягод.

Высокая стерильность гибридов F_1 (*F*. × ananassa × Frel) инициировала нас на подсчет числа хромосом в соматических тканях у сорта Frel, поскольку опубликованных сведений по числу хромосом у этого сорта мы не обнаружили. Изучение 20 метафазных пластинок в клетках зоны роста корешков сорта Frel показало наличие разного числа хромосом: от 2n = 28 до 2n = 70. Были обнаружены клетки со следующим числом хромосом: 2n = 28, 35, 40, 42, 45, 49, 50,56, 61, 63, 70 (рис. 2). Таким образом, в тканях сорта Frel наблюдалась явно выраженная миксоплоидия. Следовательно, потомство сорта Frel от самоопыления и гибридизации с F. × ananassa может иметь разное число хромосом, что объяснило бы стерильность некоторых из них. Мы оценили общее содержание ДНК и его соответствие уровню плоидности у трех случайным образом отобранных сеянцев, полученных от самоопыления сорта Frel с помощью проточной цитометрии. На рис. 3 приводится сравнение двух цитометрических гистограмм: одна принадлежит известному октоплоидному сорту Mieze Schindler, другая -



Рис. 2. Метафаза в соматических клетках корня сорта Frel. a – 2n = 28; б – 2n = 42; в – 2n = 56; г – 2n = 70.

растениям инбредного потомства сорта Frel. С учетом значения внутреннего стандарта (редька посевная, сорт Saxa) было определено содержание ДНК, выраженное в пикограммах (пг) на клетку. Содержание ДНК у растений сорта Mieze Shcindler составило 1, 856 ± 0, 011 пг, в то время как содержание ДНК у сеянцев сорта Frel – 1, 886 ± 0, 016 пг, что указывает на преобладание октоплоидной группы клеток в исследуемых образцах сеянцев, т. е. 2n = 8x = 56. Следовательно, три проанализированных сеянца сорта Frel являлись октоплоидами.

Из потомства F_1 (*F*. × *ananassa* × Frel) подсчет числа хромосом провели при помощи световой микроскопии на корешках наиболее фертильного гибрида № 96/5-57-1 (58д × Frel). Анализ метафазных пластинок показал 2n = 56, что отчасти объясняет его семенную фертильность, достаточную для формирования относительно выполненных ягод.

Обсуждение

Семенное воспроизводство межродовых гибридов всегда сопряжено с трудностями из-за низкого качества мужского и женского гаметофитов, которое, как правило, обусловлено отсутствием гомологичности хромосом. Использование розовоцветкового межродового гибрида (*Fragaria* × *Potentilla*) сорта Frel в гибридизации стало возможным благодаря хорошей фертильности пыльцы. Природа такой высокой фертильности пыльцы пока остается неясной, поскольку при наличии миксоплоидии,





80

0

Region R1

0

Рис. 3. Цитометрический анализ сеянцев от самоопыления сорта Frel.

а – ДНК-гистограмма растений октоплоидного сорта Mieze Shcindler (пик 2), пик 1 соответствует внутреннему стандарту – Raphanus sativus, сорт Saxa (2С ДНК содержание – 1, 11 пг); пик 3 – ядрам Raphanus sativus, находящимся в G, стадии интерфазы; б – ДНК-гистограмма сеянцев, полученных от самоопыления сорта Frel (пик 2). Пик 1 соответствует внутреннему стандарту – Raphanus sativus, сорт Saxa, (2С ДНК содержание – 1, 11 пг); пик 3 – ядрам Raphanus sativus, находящимся в G2 стадии интерфазы.

partec PAS

1000

1000

partec PAS

1000

1000

100

обнаруженной нами в соматических тканях растений этого сорта, следует ожидать обратный эффект – низкую фертильность пыльцы из-за нарушений расхождения хромосом в микроспорогенезе. Известно, что у многих межродовых гибридов культурных растений миксоплоидия в археспориальной ткани является одной из причин возникновения анеуплоидных гамет (Кунах, 1995). В нашем случае можно предположить, что на зародышевом пути «успешными», т. е. формирующими жизнеспособные гаметы, будут те мега- и микроспороциты, которые будут содержать сбалансированное число хромосом и, по-видимому, таковыми оказываются чаще всего спороциты с 2n = 56. Это объясняет наличие октоплоидных сеянцев при самоопылении сорта Frel и октоплоидного розовоцветкового гибрида F₁ № 96/5-57-1. Однако причина появления стерильных и полустерильных сеянцев в I₁ и гибридов в F₁ остается до конца неясной. С одной стороны, возможно влияние миксоплоидии в археспориальной ткани, когда в мейоз могут вступать не только октоплоидные спороциты (как у $F. \times ananassa$), но и спороциты с другим уровнем плоидности, в том числе и анеуплоидные; с другой стороны, анеуплоидные гаметы могут быть результатом отсутствия (полной или частичной) бивалентной конъюгации хромосом в спорогенезе из-за межродового (Fragaria × Potentilla) происхождения сорта Frel. Тем не менее очевидно, что чем более будут сбалансированы геномы Fragaria и Potentilla по бивалентной конъюгации хромосом у гибридов, тем выше фертильность пыльцы. Для того чтобы достичь высокой фертильности мужских и женских гамет, необходим длительный отбор в гибридных потомствах наиболее фертильных сеянцев. Нами начаты такие отборы, результатом которых являются гибриды № 05/2-35-1 и № 05/2-14-6, которые имеют хорошую завязываемость семян (до 80%), что обусловливает выполненность ягод.

Таким образом, сорт Frel является миксоплоидом, формирующим преимущественно гаметы с n = 28. Высокая жизнеспособность пыльцы – до 90% позволяет использовать сорт в качестве опылителя для создания розовоцветковых гибридов разного направления использования. Анализ гибридного поколения (F₁), полученного от опыления пыльцой Frel образцов $F. \times ananassa$, показал сегрегацию по признаку «окраска лепестков венчика». При самоопылении образуется 41,2% белоцветковых сеянцев – рецессивных гомозигот, а при гибридизации с $F. \times ananassa - до 63,1\%$. Среди потомств розовоцветковых гибридов наблюдается плавный переход в интенсивности окраски венчика от интенсивно-розового до бледно-розового, что исключает дисомический контроль признака. Результаты генетического анализа свидетельствуют о доминировании розовой окраски венчика с предположительно полисомической хроматидной сегрегацией аллелей в семенных потомствах. Ранее эта модель наследования была описана и для других репродуктивных признаков Fragaria × ananassa, таких, как тип пола цветков и характер плодоношения (Малецкий и др., 1994; Батурин и др., 1995). Насыщающие скрещивания отборных розовоцветковых гибридов с лучшими сортами крупноплодной земляники и гибридами – донорами аромата и вкуса плода - позволяют создавать исходный материал для выведения сортов крупноплодной земляники многоцелевого (пищевого и декоративного) использования.

Благодарности

Авторы благодарят сотрудников лаборатории молекулярной биологии и цитометрии факультета генетики и селекции растений Университета технологии и естественных наук, г. Быдгощ, Польша и лично профессора сельскохозяйственных наук доктора Эльвиру Сливинска за проведенный цитометрический анализ экспериментальных образцов земляники.

Литература

- Батурин С.О., Кузнецова Л.Л. Состояние и перспективы селекции розовоцветковой крупноплодной земляники (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) в Западной Сибири // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 1. С. 165–171.
- Батурин С.О., Сухарева Н.Б., Малецкий С.И. Использование апомиксиса для изучения наследования ремонтантности у Земляники крупноплодной (*Fragaria* × *ananassa* Duch.)//Генетика. 1995. Т. 31. № 10. С. 1418–1424.
- Малецкий С.И., Сухарева Н.Б., Батурин С.О. Наследование пола у апомиктических сеянцев Земля-

ники крупноплодной (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) // Генетика. 1994. Т. 30. № 2. С. 237–243.

- Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. Изменчивость в природе // Биополимеры и клетка. 1995. Т. 11. № 6. С. 5–40.
- Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г. и др. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М.: Изд-во МГУ, 2004. 312 с.
- Bentvelsen G.C.M., Bouw E. Breeding ornamental strawberries // Acta Hort. (ISHS). 2006. N 708. P. 455–457.
- Dolezel J., Greilhuber J., Lucretti S. *et al.* Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison // Ann. Bot. 1998. N 82. P. 17–26.
- East E.M. The production of homozygotes throught induced parthenogenesis // Science. 1930. V. 72. N 1858. P. 148–149.
- Ellis J.R. Fragaria-Potentilla intergeneric hybridization and evolution in Fragaria // Proc. Linnean Soc. of London. 1962. N 173. P. 99–106.

- Ellis J.R. Fragaria Frel. 1991. United States Patent PP07598 // Patents online. available at http://www. freepatentsonline.com/PP07598.html
- Galbraith D.W., Lambert G.M., Macas J., Dolezel J. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants // Current Protocols in Cytometry / Eds J.P. Robinson, Z. Darzynkiewicz *et al.* 1998. 7.6.1–7.6.22.
- Khanizaden S. New hardy day-neutral red flowering strawberry cultivars // Acta Hort. 2000. V. 538. P. 779–780.
- Mabberley D.J. Potentilla and Fragaria (Rosaceae) reunited // Telopea. 2002. N 9(4). P. 793–801.
- Preeda N., Yanagi T., Sone K. *et al.* Chromosome observation method at metaphase and pro-metaphase stages in diploid and octoploid strawberries // Scientia Hort. 2007. V. 114. N 2. P. 133–137.
- Snow R.S. Alcoholic hydrochloric acid-carmine as a stain for squash preparations // Stain Techn. 1965. V. 38. P. 9–13.

REPRODUCTION FEATURES OF THE PINK-FLOWERING ORNAMENTAL FRAGARIA × POTENTILLA (CV. FREL) HYBRID AND PROSPECTS OF ITS USE IN GARDEN STRAWBERRY BREEDING

S.O. Baturin, L.L. Kuznetsova

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

Summary

The ornamental pink-flowering cultivar Frel (*Fragaria* × *Potentilla*) is a mixoploid producing mainly gametes with n = 28. Frel pollen viability reaches 90%, seed set percentage averages $33,9 \pm 1,8\%$, and germination capacity varies from 12,5 to 71,3%. White-flowering recessive homozygous descendants constitute 41,2% of the progeny of selfing of the hybrid, demonstrating its heterozygous state. The frequency of white-flowering plants in *F*. × *ananassa* crosses is 63,1%. The «corolla color» trait shows octosomic inheritance with the chromatid type of gene segregation. In order to obtain fruit-producing pink-flowering hybrids, long-term selection of fertile seedlings from the Frel × *F*. × *ananassa* hybrid population is required.

Key words: pink-flowering strawberry, *Fragaria* × *ananassa*, *Fragaria* × *Potentilla*, pollen fertility, seed set, flow cytometry, breeding, mixoploidy, everbearing.

ТРАНСПЛАСТОМНЫЕ РАСТЕНИЯ

С.Н. Щелкунов^{1, 2}, Ю.М. Константинов³, Е.В. Дейнеко¹

 ¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: deineko@bionet.nsc.ru; snshchel@rambler.ru;
² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия
³ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия

В обзоре освещены основные принципы создания транспластомных растений, структурные особенности генетических конструкций, предназначенных для встраивания в геном хлоропластов. Рассматриваются основные итоги успешной трансформации и экспрессии чужеродных генов в хлоропластах. Обосновывается перспективность данного метода для существенного повышения уровня синтеза чужеродного белка в транспластомных растениях.

Ключевые слова: хлоропласты, хлоропластная трансформация, биобаллистика, гомологичная рекомбинация, пластом.

Многочисленные работы показывают, что полученные классическими методами трансгенные растения с интеграцией целевого гена в хромосомы ядра клетки продуцируют обычно чужеродный белок на низком уровне (Щелкунова, Щелкунов, 2008; Shchelkunov, Shchelkunova, 2010). Существенного повышения уровня синтеза чужеродного белка можно добиться увеличением дозы гена, однако в хромосомной ДНК множественные повторы нестабильны. Преодолеть это затруднение удается при использовании трансгенной системы хлоропластов (пластид).

Пластиды находятся в большом количестве в клетках разных органов и тканей растений. Геном пластид – пластома – кольцевая молекула двухцепочечной ДНК размером 120–180 тыс. пар нуклеотидов (т.п.н.). Несмотря на небольшие размеры пластома пластидная ДНК составляет 10–20 % от всей ДНК клетки. Достаточно высокая доля пластидной ДНК по отношению к ядерной ДНК достигается тем, что пластиды полиплоидны, и каждая из них содержит от 10 до 100 пластомов. В единичной клетке зрелого листа число пластид может достигать 100, т. е. каждая такая клетка содержит до 10 тыс. пластидных геномов. Хотя в растении каждая клетка любого типа содержит идентичные пластидные геномы, данные органеллы в разных тканях растения значительно различаются по морфологии и функциям. Листья и зеленые ткани содержат фотосинтезирующие хлоропласты, зрелые фрукты и цветы – пигментированные хромопласты, клубни и другие запасающие органы – амилопласты или элайопласты, а другие незеленые ткани включая корни – лейкопласты (Maliga, 2003).

Принципиальную возможность введения и стабильной интеграции экзогенной ДНК в пластидный геном продемонстрировали Дж. Бойнтон с соавт. (Boynton et al., 1988) на примере одноклеточной водоросли Chlamydomonas reinhardtii. В 1990 г. З. Сваб, П. Хайдукевич и П. Малига описали первую стабильную трансформацию пластид высших растений (Svab et al., 1990). Листья табака Nicotiana tabacum обстреливали микрочастицами вольфрама, на поверхности которых была адсорбирована ДНК гибридной плазмиды pZS148 (рис. 1). Данная плазмида была получена встройкой в клонирующий вектор E. coli pBluescript фрагмента пластидной ДНК мутантной линии табака, высокоустойчивой к антибиотикам спектиномицину и стрептомицину за счет мутаций в гене rrn16 16S рибосомной РНК (мутации spc-2 и str-1 соответственно, см.



Рис. 1. Вектор пластидной трансформации pZS148. Состоит из последовательности плазмиды pBluescript (тонкая линия), *SacI-Eco*RV фрагмента пластидной ДНК, содержащей ген 16S рибосомной РНК (16SrDNA), и фрагмента пластидной ДНК с областью начала репликации (pt ori).

str-1 и spc-1 – мутации в гене 16SrDNA, обусловливающие устойчивость к стрептомицину и спектиномицину соответственно.

рис. 1). Предполагали, что гибридная плазмида проникнет в хлоропласты и произойдет встройка мутантного фрагмента пластидной ДНК за счет рекомбинации по областям гомологии. Такие растения, содержащие трансгенные пластомы, предложили называть транспластомными (transplastomic). Транспластомные линии селектировали по нелетальному маркеру устойчивости к спектиномицину. На селективной среде устойчивые клоны имеют зеленую окраску, в то время как чувствительные клоны - белую. Культивирование транспластомных клеток на селективной среде обеспечивает отбор пластид, несущих гены устойчивости к спектомицину, тогда как пластиды дикого типа элиминируются. Пластидная трансформация происходит редко, поэтому полагают, что получаемые в результате селекции стабильные транспластомные клоны растения содержат в пластидах идентичные рекомбинантные пластомы. В первой работе на 148 обстрелянных образцах листьев табака удалось отобрать лишь три транспластомных клона (Svab et al., 1990).

В 1993 г. З. Сваб и П. Малига в качестве селективного использовали бактериальный ген ааdA (кодирует аминогликозид 3'-аденилилтрансферазу, инактивирующую спектиномицин и стрептомицин аденилированием), встроенный в гибридной плазмиде в межгенную область сегмента пластидной ДНК (рис. 2) (Svab, Maliga, 1993). В этом случае выход транспластомных клонов варьировал между 0,5–5 проростков на обстрелянный образец листа табака. В большинстве последующих работ в качестве селективного использовали именно этот ген *ааdA*. Дополнительное использование *gfp*-гена зеленого флюоресцентного белка позволяет упростить отбор транспластомных растений и отличать их от спонтанных мутантов, устойчивых к спектиномицину (Jeong *et al.*, 2004).

В 2002 г. Ф. Хуанг с соавт. описали успешное использование кодирующей последовательности гена *aphA-6* аминогликозид фосфотрансферазы из *Acinetobacter baumannii*, находящейся под контролем промотора гена *rrn16*, для отбора транспластомных растений табака на среде с канамицином (Huang *et al.*, 2002).

Векторы пластидной трансформации представляют собой гибридные плазмиды E. coli, содержащие селективный и целевой гены, фланкированные с обеих сторон сегментами пластомной ДНК (рис. 3). Эти фланкирующие последовательности не обладают какими-либо специальными свойствами, они имеют размер 1-2 тыс. пар нуклеотидов и гомологичны выбранному району пластомы. Обычно встройку чужеродных генов осуществляют в межгенные участки ДНК пластид, и около двух десятков таких районов интеграции успешно опробованы (Maliga, 2004). Важным отличием транспластомных растений от трансгенных является то, что при пластидной трансформации трансген интегрируется в один и тот же район пластидной ДНК, т. е. трансформированные растения идентичны по месту интеграции трансгена. При встройке в ядерные хромосомы трансформанты различаются между собой районами интеграции трансгена (трансгенов).

Для экспрессии трансгена чаще всего используют сильный пластидный промотор гена *rrn16* (P_{rrn}). Для эффективной трансляции на рибосомах пластид мРНК трансгена должна включать соответствующий участок связывания рибосом на 5'-конце. Наряду с рибосом-связывающими участками некоторых пластидных ге-



Рис. 2. Вектор пластидной трансформации pZS197. Кодирующая последовательность гена *aadA* встроена во фрагмент пластидной ДНК между генами *rbcL* и *ORF512* под контролем промотора рибосомального оперона пластид Р_{ггп} (сверху приведена нуклеотидная последовательность) и ограничена 3'-концевой последовательностью пластидного гена *psbA*.

cpt1 и cpt2 – регуляторные области промотора. RBS – участок связывания рибосом.

нов хорошо себя зарекомендовала аналогичная последовательность гена 10 фага T7 (см. ниже). Некодирующий 3'-район гена *psbA* компонента реакционного центра II фотосистемы хлоропластов стабилизирует транскрипты чужеродных генов, поэтому его обычно подстраивают в 3'-концевую часть трансгена, создаваемого для встройки в пластиды (рис. 3). Используют и другие 3'-концевые последовательности пластидных генов (Maliga, 2004; Daniell, 2006).

На основании результатов анализа транспластомных растений, полученных в разных лабораториях, становится очевидным, что в данной системе можно добиваться продукции целевого чужеродного белка до уровня 1–25% суммарного растворимого белка (ОРБ) растения, а в некоторых случаях даже большей. Мощным толчком к развитию технологии получения рекомбинантных белков на основе хлоропластного генома послужило сообщение о создании транспластомных растений табака с выходом целевого белка (Cry2Aa2-белок из Bacillus thuringiensis) на уровне 45,3% от ОРБ (De Cosa et al., 2001). В настоящее время в литературе имеются сообщения о накоплении в тканях листа транспластомных растений до 72% рекомбинантного белка (проинсулин человека, слитый с холерным В-токсином) от ОРБ (Ruhlman et al., 2010). Авторами данной работы не выявлено негативных корреляций между уровнем накопления рекомбинантного белка и какими-либо нарушениями в росте и развитии растений. В работах других групп исследователей такие нарушения выявлялись: отмечены угнетение роста растения, пожелтение листьев и снижение мужской фертильности (Hasunuma et al., 2008; Waheed et al., 2011).

Наиболее просто удается осуществлять трансформацию хлоропластов и отбор транспластомных растений табака. Поэтому большая часть исследований пока выполнена на этом растении. Однако по мере увеличения числа



Рис. 3. Гибридные плазмиды пластидной трансформации для направленной встройки гена субъединицы В холерного токсина (а) и оперона *cry2*Aa2 белка токсина Bt (б) в пластому.

Схема направленной интеграции приведена в «а».

лабораторий, вовлеченных в развитие перспективного направления создания транспластомных растений, стала возможной трансформация пластид арабидопсиса Arabidopsis thaliana (Sikdar et al., 1998), картофеля Solanum tuberosum (Sidorov et al., 1999), томатов Lycopersicon esculentum ((Ruf et al., 2001), paпca Brassica napus (Hou et al., 2003), салата Lactuca sativa (Lelivelt et al., 2005), сои Glycine max (Peltier et al., 2004), капусты Brassica oleracea (Liu et al., 2007), моркови Daucus carota (Kumar et al., 2004) и других растений (Cardi et al., 2010). На примере транспластомной сои показано, что рекомбинантная пластома стабильно наследовалась в течение шести поколений (Dufourmantel et al., 2006). Перенос данной методологии на разные сельскохозяйственные культуры обеспечит значительный прогресс в создании растенийпродуцентов различных белков медицинского и биотехнологического применения.

Важной особенностью пластид является возможность экспрессии в них оперонов (набора генов, находящихся под контролем единого промотора) и трансляции белков с полицистронных мРНК, что характерно для прокариот, но не реализуется у эукариот (в том числе в ядре клеток растений) (del Campo, 2009). Недавно было обнаружено, что в полицистронных мРНК в хлоропластах наиболее эффективно обычно транслируется 5'-концевой ген, а для эффективной инициации трансляции последующих генов в ряде случаев может быть необходим эндонуклеазный процессинг такой мРНК с формированием моноцистронных мРНК (Drechsel, Bock, 2011).

Рассмотрим примеры успешной экспрессии чужеродных генов в транспластомных растениях табака. В 2001 г. Х. Даниэл с сотр. создали векторную конструкцию, в которой между фланкирующими пластидными генами табака *trnI* и *trnA* под контроль промотора P_{rm} тандемно встроили кодирующие последовательности генов *aadA* (селективный маркер) и *CTB* (субъединица В холерного токсина) (рис. 3, а). Перед каждой кодирующей последовательностью ввели синтетические рибосом-связывающие участки, а для стабилизации чужеродного транскрипта в 3'-концевой части конструкции встроили нетранслируемую З'-область гена psbA. После рекомбинационной встройки в пластом (рис. 3, а) отбирали на селективной среде транспластомные растения табака. Установлено, что рекомбинантный СТВ-белок в транспластомных растениях эффективно синтезировался, собирался в функциональные олигомеры и был антигенно идентичен очищенному природному СТВ. Уровень накопления рекомбинантного СТВ-белка в листьях табака составил 4,1 % суммарного растворимого белка, что в 400 раз выше по сравнению с уровнем накопления этого же белка у трансгенных растений табака при интеграции трансгена в ядерный геном (Daniell et al., 2001).

Другая интересная работа была выполнена с целью экспрессии в хлоропластах табака оперона cry2Aa2 Bacillus thuringiensis, направляющего синтез инсектицидного белка Вt и его упаковку в виде кубических кристаллов. Поскольку при получении трансгенных растений в ядре клетки с одной конструкции можно экспрессировать лишь один ген, вначале с помощью агробактериальной трасформации были созданы трансгенные растения, продуцирующие индивидуальный белок Вt в растворимой форме и умеренном количестве даже после перекодировки бактериального гена под часто встречаемые триплеты в генах растений (Estruch et al., 1997). Продуктивность по белку Вt удалось значительно повысить (до 3-5%) суммарного растворимого белка листьев) при создании транспластомных растений табака, экспрессирующих в хлоропластах индивидуальный ген cry2Aa2 (McBride et al., 1995). В другой работе под контролем промотора P_{rrn} были встроены последовательности гена aadA и оперона cry2Aa2 (рис. 3, б). Во встроенном опероне orf1 и orf2 кодируют шаперон, который сворачивает белок Вt так, что он формирует протеолитически стабильные кубические кристаллы. Накопление бактериального белка в листьях транспластомного табака, экспрессирующего бактериальный оперон (без перекодировки), достигало величины 45,3 % суммарного растворимого белка (Kota et al., 1999; De Cosa et al., 2001). Стабильная продукция Вt токсина в хлоропластах растения на столь высоком

уровне приводит к увеличению токсичности трансгенных растений для вредных насекомых и может предотвратить развитие среди них Bt-устойчивости.

Рекордной продуктивности по чужеродному белку удалось достичь в транспластомных растениях табака при встройке в хлоропластный геном гена бактериофагового лизина, являющегося гидролазой бактериальной клеточной стенки (Oey et al., 2009a, b). Лизины являются белками, высокоустойчивыми к действию бактериальных протеаз, что, по-видимому, обеспечивает высокий уровень накопления этого фермента при биосинтезе в хлоропластах. Хлоропласты не имеют клеточной стенки, характерной для прокариотической клетки, поэтому лизин не оказывает на них губительного воздействия. В листьях транспластомного табака бактериофаговый лизин PlyGBS накапливался до 70% (!) суммарного растворимого белка растения (Oey et al., 2009b). Получаемые таким образом фаговые лизины могут быть важны для разработки технологии получения новых белковых антибиотиков для лечения пневмонии и других бактериальных инфекций.

Первая работа, в которой удалось добиться высокой продукции человеческого белка в транспластомных растениях, выполнена Дж. Стауб с соавт. (Staub et al., 2000). Хлоропласты табака трансформировали тремя гибридными конструкциями (рис. 4), экспрессирующими человеческий соматотропин (hST), являющийся терапевтически важным белком. В плазмидах wrg4838 и pMON38755 кодирующая последовательность hST (синтетическая, с кодировкой для успешной экспрессии в бактериях) соединена с промотором и 5'-некодирующим районом пластидного гена *psbA*, а в плазмиде pMON38794 – с промотором P_{rrn} и 5'-некодирующей областью гена 10 фага Т7 (G10L). Все гибридные конструкции содержали З'-мРНК стабилизирующий элемент из гена rps16 белка малой субъединицы рибосом хлоропластов (рис. 4). В плазмидах рМОN38755 и рМОN38794 кодирующая последовательность hST была слита в правильной рамке трансляции с последовательностью, кодирующей убиквитин. Слитые белки убиквитина расщепляются специфичной убиквитиновой протеазой сразу после С-концевого остатка глицина убиквитина. Это свойство позволяет



Рис. 4. Схема интеграции в хлоропластную ДНК гибридных конструкций, экспрессирующих человеческий соматотропин (hST).

осуществлять продукцию рекомбинантных белков без метионинового остатка на N-конце. Сравнительный анализ продукции hST в трансформированных растениях табака (табл. 1) показал, что трансформация хлоропластов приводит к многократному увеличению синтеза рекомбинантного белка. Кроме того, на уровень продукции hST в транспластомных растениях существенное влияние может оказывать структура 5'-некодирующей области создаваемого трансгена.

На основании вышерассмотренных работ становится очевидным, что транспластомные растения можно рассматривать как наиболее перспективную платформу для эффективной продукции протективных антигенов патогенных агентов различной природы (табл. 2) и создания на их базе съедобных вакцин (Щелкунова, Щелкунов, 2008; Zhou *et al.*, 2008; Rigano *et al.*, 2009; Cardi *et al.*, 2010; Davoodi-Semiromi *et al.*, 2010; Shchelkunov, Shchelkunova, 2010).

Экспериментально показано, что в хлоропластный геном табака можно встраивать фрагменты чужеродной ДНК размером до 50 тыс. п.н. (Adachi *et al.*, 2007), что потенциально может обеспечить создание транспластомных растений с улучшенными или измененными метаболическими путями, контолируемыми полицистронными оперонами. Первый пример создания таких растений реализован при встройке в хлоропластный геном табака

Таблица 1 Продукция химерного hST в трансгенных и транспластомных растениях (Kota *et al.*, 1999)

		Продукция белка,
Плазмила	Локализация	кодируемого
Плаэмида	трансгена	трансгеном,
		% ОРБ*
wrg4776	ядро клетки	0,004 - 0,008
wrg4838	хлоропласты	0,2
pMON38755	хлоропласты	1,0
pMON38794	хлоропласты	7,0

* ОРБ – общий растворимый белок.

бактериального оперона размером 7 тыс. п.н., состоящего из трех генов, направляющих биосинтез биодеградируемого полиэфира полигидроксибитурата (Lossl *et al.*, 2003, 2005; Arai *et al.*, 2004). Однако в данном случае не всегда наблюдалось стабильное наследование получаемых транспластомных растений (Lossl *et al.*, 2003, 2005).

В некоторых случаях сверхсинтез рекомбинантных белков в хлоропластах может приводить к формированию в них этими белками телец включения (Millan *et al.*, 2003), что довольно часто наблюдается и при сверхсинтезе рекомбинантных белков в бактериальных клетках.

Таким образом, трансгенная система хлоропластов позволяет достичь высокой дозы

Таблица 2

Белок	Патоген	Вид растения	Уровень продукции, % ОРБ*	
	Бактериальные антиген	5I	•	
CTB	Vibrio cholerae	табак	4,1	
TetC	Clostridium tetani	табак	25	
LT-B	Escherichia coli	табак	2,5	
PAg	Bacillus anthracis	табак	18,1	
CaF1-LcrV	Yersinia pestis	табак	14,8	
OspA	Borrelia burgdorferi	табак	10	
CTB-AMA1	Vibrio cholera, Plasmodium falciparum	табак	13,2	
CTB-AMA1	Vibrio cholera, Plasmodium falciparum	салат	7,3	
CTB-MSP1	Vibrio cholera, Plasmodium falciparum	табак	10,1	
CTB-MSP1	Vibrio cholera, Plasmodium falciparum	салат	6,1	
Вирусные антигены				
VP1	Вирус ящура	табак	3	
VP-βGUS	Вирус ящура	табак	51	
CTB-2L21	Парвовирус собак	табак	31,1	
L1	Вирус папилломы человека	табак	24	
p24	Вирус иммунодефицита человека	табак	4,5	
p24-Nef	Вирус иммунодефицита человека	табак	40	
A27L	Вирус осповакцины	табак	18	

Примеры продукции антигенов патогенных агентов в транспластомных растениях (Staub *et al.*, 2000; Lelivelt *et al.*, 2005; Oey *et al.*, 2009a, b)

* ОРБ – общий растворимый белок.

чужеродного гена, что при оптимально сконструированном трансгене обеспечивает очень эффективную продукцию целевого белка. Более того, способность пластид осуществлять экспрессию оперонов позволяет создавать искусственные опероны (рис. 3, 4) и в перспективе станет возможным относительно просто вводить новые метаболические пути в растения, улучшая их потребительские свойства. Важной особенностью пластид является то, что они передаются по материнской линии и обычно не содержатся в пыльце. Поэтому транспластомные растения по сравнению с обычными трансгенными растениями более безопасны для окружающей среды, так как в них предотвращается неконтролируемое распространение трансгена в другие растения (Ruf et al., 2007). Поскольку интеграция в пластому происходит в результате гомологичной рекомбинации, отобранные клоны одинаковы и отсутствует эффект положения гена, характерный для случайной встройки трансгена при ядерной трансформации растений. В пластидах не наблюдается сайленсинг (замолкание) трансгена, поэтому его экспрессия стабильно сохраняется в последующих поколениях.

Итак, хлоропласты растений являются наиболее привлекательной системой экспрессии, в том числе для молекулярного биофарминга (molecular farming). Однако создание транспластомных растений сопряжено с рядом проблем, одна из которых связана с достаточно продолжительным периодом культивирования клеток на среде с антибиотиками, что связано со снижением их регенерационного потенциала и возникновением спонтанных мутаций устойчивости к антибиотикам. Ранее нами установлено, что устойчивость к спектиномицину клеток растений при их отборе на среде с антибитиком может быть обусловлена спонтанными мутациями в гене *rrn16* хлоропластного генома (Филипенко и др., 2011). Снижение регенерационной способности клеток в культуре *in vitro* влечет за собой целый ряд проблем, связанных с восстановлением полноценных растений из отдельных клеток. В связи с этим при создании транспластомных растений представляется чрезвычайно важной разработка методов отбора и сортировки клеток на начальных этапах переноса чужеродных генов в пластомы растений. Возможность введения дополнительного этапа разделения клеток после проведения биобаллистической трансформации с использованием проточной цитофотометрии показана нами при создании транспластомных растений табака.

Работа выполнена при поддержке гранта № 7 интеграционных междисциплинарных проектов СО РАН.

Литература

- Филипенко Е.А., Сидорчук Ю.В., Дейнеко Е.В. Спонтанные мутации в гене *rrn16* хлоропластного генома, обусловливающие устойчивость к спектиномицину, у каллусных линий *Daucus carota* // Генетика. 2011. Т. 47. № 1. С. 41–47.
- Щелкунова Г.А., Щелкунов С.Н. Съедобные вакцины на основе трансгенных растений // Молекуляр. медицина. 2008. № 2. С. 3–12.
- Adachi T., Takase H., Tomizawa K.-I. Introduction of a 50 kbp DNA fragment into the plastid genome // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2007. V. 71. P. 2266–2273.
- Arai Y., Shikanai T., Doi Y. *et al.* Production of polyhydroxybutyrate by polycistronic expression of bacterial genes in tobacco plastid // Plant Cell Physiol. 2004. V. 45. P. 1176–1184.
- Boynton J.E., Gillham N.W., Harris E.H. *et al.* Chloroplast transformation in Chlamydomonas with high velocity microprojectiles // Science. 1988. V. 240. P. 1534–1537.
- Cardi T., Lenzi P., Maliga P. Chloroplasts as expression platforms for plant-produced vaccines // Expert Rev. Vaccines. 2010. V. 9. P. 893–911.
- Daniell H. Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome // Biotechnol. J. 2006. V. 1. P. 1071–1079.
- Daniell H., Lee S.-B., Panchal T., Wiebe P.O. Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts // J. Mol. Biol. 2001. V. 311. P. 1001–1009.

- Davoodi-Semiromi A., Schreiber M., Nallapali S. *et al.* Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery // Plant Biotechnol. J. 2010. V. 8. P. 223–242.
- De Cosa B., Moar W., Lee S.B. *et al.* Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of inner crystals // Nat. Biotechnol. 2001. V. 19. P. 71–74.
- del Campo E.M. Post-transcriptional control of chloroplast gene expression // Gene Regulation and Systems Biol. 2009. V. 3. P. 31–47.
- Drechsel O., Bock R. Selection of Shine-Dalgarno sequences in plastids // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39. P. 1427–1438.
- Dufourmantel N., Tissot G., Garcon F. *et al.* Stability of soybean recombinant plastome over six generations // Transgenic Res. 2006. V. 15. P. 305–311.
- Estruch J.J., Carozzi N.B., Desai N. *et al.* Transgenic plants: an emerging approach to pest control // Nat. Biotechnol. 1997. V. 15. P. 137–141.
- Hasunuma T., Miyazawa S., Yoshimura S. et al. Biosynthesis of astaxanthin in tobacco leaves by transplastomic engineering // Plant J. 2008. V. 55. P. 857–868.
- Hou B.-K., Zhou Y.-H., Wan L.-H. *et al.* Chloroplast transformation in oilseed rape // Transgenic. Res. 2003. V. 12. P. 111–114.
- Huang F.-C., Klaus S.M.J., Herz S. *et al.* Efficient plastid transformation in tobacco using the *aphA-6* gene and kanamycin selection // Mol. Genet. Genomics. 2002. V. 268. P. 19–27.
- Jeong S.-W., Jeong W.-J., Woo J.-W. *et al.* Dicistronic expression of the green fluorescent protein and antibiotic resistance genes in the plastid for selection and tracking of plastid-transformed cells in tobacco // Plant Cell Rep. 2004. V. 22. P. 747–751.
- Kota M., Daniell H., Varma S. *et al.* Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confer resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insect // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 1840–1845.
- Kumar S., Dhingra A., Daniell H. Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenate gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance // Plant Physiol. 2004. V. 136. P. 2843–2854.
- Lelivelt C., McCabe M., Newell C. *et al.* Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.)// Plant Mol. Biol. 2005. V. 58. P. 763–774.
- Liu C.W., Lin C.-C., Chen J., Tseng M.-J. Stable chloroplast transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata L.) by particle bombardment // Plant Cell Rep. 2007. V. 26. P. 1733–1744.
- Lossl A., Bohmert K., Harloff H. et al. Inducible transactivation of plastid transgenes: expression of the

R. eutropha phb operon in transplastomic tobacco // Plant Cell Physiol. 2005. V. 46. P. 1462–1471.

- Lossl A., Eibl C., Harloff H.-J. *et al.* Polyester synthesis in transplastomic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.): significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction // Plant Cell Rep. 2003. V. 21. P. 891–899.
- Maliga P. Progress towards commercialization of plastid transformation technology // Trends Biotechnol. 2003. V. 21. P. 20–28.
- Maliga P. Plastid transformation in higher plants // Ann. Rev. Plant Biol. 2004. V. 55. P. 289–313.
- McBride K.E., Svab Z., Schaaf D.J. *et al.* Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco // Biotechnol. 1995. V. 13. P. 362–365.
- Millan A.F.-S., Mingo-Castel A., Miller M., Daniell H. A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify human serum albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation // Plant Biotechnol. J. 2003. V. 1. P. 71–79.
- Oey M., Lohse M., Kreikemeyer B., Bock R. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic // Plant J. 2009b. V. 57. P. 436–445.
- Oey M., Lohse M., Scharff L.B. *et al.* Plastid production of protein antibiotics against pneumonia via a new strategy for high-level expression of antimicrobial proteins // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2009a. V. 106. P. 6579–6584.
- Peltier G., Ferullo J.-M., Tissot G. Generation of fertile transplastomic soybean // Plant Mol. Biol. 2004. V. 55. P. 479–489.
- Rigano M.M., Manna C., Giulini A. *et al.* Transgenic chloroplasts are efficient sites for high-yield production of the vaccinia virus envelope protein A27L in plant cells // Plant Biotechnol. J. 2009. V. 7. P. 577–591.
- Ruf S., Hermann M., Berger I.J. et al. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of

a foreign protein in fruit // Nat. Biotechnol. 2001. V. 19. P. 870–875.

- Ruf S., Karcher D., Bock R. Determining the transgene containment level provided by chloroplast transformation // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007. V 104. P. 6998–7002.
- Ruhlman T., Verma D., Samson N., Daniell H. The role of heterologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression // Plant Physiol. 2010. V. 152. P. 2088–2104.
- Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. Plant-based vaccines against human hepatitis B virus // Expert Rev. Vaccines. 2010. V. 9. P. 947–955.
- Sidorov V.A., Kasten D., Pang S.-Z. *et al.* Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker // Plant J. 1999. V. 19. P. 209–216.
- Sikdar S.R., Serino G., Chaudhuri S., Maliga P. Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell. Rep. 1998. V. 18. P. 20–24.
- Staub J.M., Garcia B., Graves J. *et al.* High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts // Nat. Biotechnol. 2000. V. 18. P. 333–338.
- Svab Z., Hajdukiewicz P., Maliga P. Stable transformation of plastids in higher plants // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 8526–8530.
- Svab Z., Maliga P. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 913–917.
- Waheed M.T., Thönes N., Müller M. *et al.* Transplastomic expression of a modified humanpapillomavirus L1 protein leading to the assembly of capsomeres in tobacco: a step towards cost-effective second-generation vaccines // Transgenic Res. 2011. V. 20. P. 271–282.
- Zhou F., Badillo-Corona J.A., Karcher D. *et al.* Highlevel expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes // Plant Biotechnol. J. 2008. V. 6. P. 897–913.

TRANSPLASTOME PLANTS

S.N. Shchelkunov^{1, 2}, Yu.M. Konstantinov³, E.V. Deineko¹

 ¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: deineko@bionet.nsc.ru, snshchel@rambler.ru;
² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia;
³ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS, Irkutsk, Russia

Summary

Fundamentals of the development of transplastome plants and structural features of genetic constructs for incorporation into chloroplast genomes are reviewed. Major achievements in the transformation and expression of alien genes in chloroplasts are considered. The potential of this method for significant increase in the production of alien proteins in transplastome plants is substantiated.

Key words: chloroplasts, chloroplast transformation, biolistics, homologous recombination, plastome.

ГМО И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ РАСТЕНИЙ: ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ И АГРОТЕХНИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

Ю.В. Чесноков

Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия, e-mail: yu.chesnokov@vir.nw.ru

Рассмотрены вопросы экологической и агротехнической биобезопасности в связи с распространением генетически модифицированных организмов (ГМО). Обсуждается возможность непреднамеренного загрязнения образцов генных банков ГМО и трансгенами. На примере распространения ГМО в ряде регионов мира показано, что широкомасштабное коммерческое использование ГМО сопровождается потенциальными экологическими и агротехническими рисками.

Ключевые слова: генетически модифицированные организмы (ГМО), образцы генетических ресурсов растений (ГРР), экологическая и агротехническая безопасность.

В последние десятилетия, благодаря разработке новых и совершенствованию имеющихся методов молекулярно-генетического изучения геномов живых организмов, идет активное развитие сельскохозяйственной биотехнологии. Одним из результатов этой активности является производство и широкое внедрение в сельское хозяйство новых генно-инженерномодифицированных (ГМ) сортов растений. На сегодняшний день существует ряд международных соглашений, регламентирующих сохранение, а также устанавливающих надлежащий уровень защиты в области безопасной передачи, обработки и использования таких сортов (КБР, 1993; КПКБР, 2000). Так, согласно Конвенции по биоразнообразию (КБР, 1993), каждая страна-участница должна разработать стратегию и программу по сохранению и использованию своих биоресурсов, принимая во внимание их гарантированное и безопасное воспроизводство. Важными мероприятиями в этом контексте являются, например, установление и утверждение способов и методов регулирования, управления и контроля над рисками, связанными с созданием, использованием и распространением ГМ-сортов, а также разработка соответствующих процедур оценки возможного неблагоприятного воздействия генетически модифицированных организмов (ГМО) на сохранение биоразнообразия.

Сформулированные еще в 1998 г. принципы охраны окружающей среды при выпуске ГМО в природу требуют, во-первых, оценить, когда появятся вредные последствия выпуска ГМО на здоровье человека и природные системы, вовторых, выявить, когда ГМО или их продукты окажутся вредными при попадании в продукты потребления, в-третьих, определить, действительно ли ГМО дают тот положительный эффект, ради которого они и были созданы, и, наконец, гарантировать, что исключен какойлибо ущерб человеку или природе, когда ГМО появятся в различных регионах мира и различных экосистемах (Scientists' Working Group on Biosafety, 1998).

В 2010 г. исполнилось 15 лет со дня выхода коммерческих ГМ-культур на мировой рынок, и к настоящему времени общая суммарная площадь пахотных земель, на которых выращиваются коммерческие ГМ сельскохозяйственные культуры, составила более 1 млрд га (Clive, 2010). Всего же с 1996 по 2010 гг. произошло 87-кратное увеличение посевных площадей, занимаемых коммерческими ГМ-растениями. В 2010 г. площади под ГМ-растениями достигала 148 млн га, что составляет 10% общего количества возделываемых земель в мире. Более половины населения земного шара (59% или ~4 млрд) живет в 29 странах, выращивавших коммерческие ГМ-растения в 2010 г. Число фермеров, производивших ГМрастения, в 2009 г. составило 14 млн, а в 2010 г. – 15,4 млн человек, из них 90% - это мелкие и малообеспеченные фермеры из развивающихся стран. По прогнозам к 2015 г. ГМ-культуры будут выращивать 20 млн фермеров в 40 странах мира. В 2010 г. три страны – Пакистан, Мьянма и Швеция – впервые начали выращивать ГМрастения, а Германия возобновила их разведение. В 2010 г. более половины всех пахотных земель приходилось на 29 стран (19 развивающихся и 10 индустриальных), производивших ГМ-культуры. Общая рыночная стоимость реализованных в 2010 г. ГМ-семян составила 11,2 млрд US\$, что составляет 33% от 34 млрд US\$ общего коммерческого рынка семян 2010 г. Наибольшее распространение в 2010 г. получили следующие трансгенные культуры: соя – 50% от всех генетически-модифицированных культур (ГМК), кукуруза – 30%, хлопчатник – 14%, рапс – 5%. Основные ГМ-признаки: гербицидоустойчивость-61% от всех ГМК, два и более признаков – 22%, устойчивость к насекомым - 17%. В 2010 г. стекерные культуры, т. е. культуры с двумя и более трансгенными признаками, выращивали 11 стран, из них 8 – это развивающиеся страны. В целом по темпам внедрения коммерческих ГМкультур развивающиеся страны превосходят индустриальные – 17%, или 10,2 млн га в развивающихся странах против 5%, или 3,8 млн га в индустриальных странах. Всего в 2010 г. развивающиеся страны выращивали 48% всех коммерческих ГМ-культур, и к 2015 г. они обойдут по площадям индустриальные страны. По прогнозам International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), в 2011-2015 гг. на мировом рынке должны появиться следующие ГМ-культуры: с 2011 г. страны Евросоюза начнут производство картофеля сорта Amflora, устойчивого к фитофторозу; в том же 2011 г. в Индии ожидают окончательного одобрения Вt-баклажаны, предназначенные для коммерческой реализации населению; в 2013 г. золотой рис появится на Филиппинах, а затем и в Бангладеш, Индии, Индонезии и Вьетнаме; к 2013-2014 гг. начнется производство ГМ-риса и обогащенной фитазой кукурузы в Китае; устойчивая к засухе кукуруза появится в США в 2012 г., а в тропической Африке – в 2017 г.; в 2015 и последующие годы начнется выращивание ГМ-культур с усиленным поглощением азота и ГМ-пшеницы (Clive, 2010).

На сегодняшний день более 75% населения Земли живет в странах, в которых ГМО разрешены либо для выращивания, либо для применения, либо для ввоза. Эти страны практически полностью охватывают центры происхождения культурных растений, установленные великим русским ученым Н.И. Вавиловым (рис. 1). Такое положение дел вызывает закономерное беспокойство у специалистов, занимающихся сохранением и поддержанием генетических ресурсов растений (ГРР) во всем мире, в том числе и в России, где во Всероссийском НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР) сохраняется уникальнейшая коллекция ГРР, насчитывающая более 322 тыс. образцов культурных растений и их диких родичей (www.vir.nw.ru).

Россия является одной из стран, в которых запрещено выращивание коммерческих ГМкультур. Однако по данным Роспотребнадзора (Онищенко, 2008), в настоящее время в Российской Федерации прошли полный цикл всех необходимых исследований и разрешены для использования в питании 15 линий ГМО растительного происхождения, полученных с применением генно-инженерных технологий: 8 линий кукурузы, 3 линии сои, 2 сорта картофеля, 1 линия сахарной свеклы, 1 линия риса.

В 2005 г. наибольший удельный вес пищевых продуктов, содержащих компоненты ГМО, приходился на Северо-Западный (11,7%), Уральский (11,2%), Приволжский (8,4%), Центральный (8,2%) и Сибирский (8,0%) федеральные округа. Наибольшее количество исследований пищевых продуктов на ГМО в 2005 г. проведено в Центральном (5506), Приволжском (3579), Южном (2952) и Сибирском (2925) федеральных округах, наименьшее – в Уральском федеральном округе – 631. В 2007 г. наиболее часто пищевая продукция, произведенная из ГМО, встречалась при контроле птицепродуктов – 5% (2006 г. – 3,4%, 2005 г. – 6,1%), молочных продуктов – 3,7% (2006 г. – 0,4%, 2005 г. – 1,3%), мясопродуктов – 3,6% (2006 г. – 6,5 %, 2005 г. – 14,4 %), рыбных продуктов 2,7 % (2006 г. – 2,1 %, 2005 г. – 2,0 %), а



Рис. 1. Страны, в которых разрешено использование ГМ-продуктов, с указанием центров происхождения растений по Н.И. Вавилову (по http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4e/Gmo_accept_map.png с дополнениями).

также в группе «прочие продукты» (в основном в продуктах переработки сои) – 2,7 % (2006 г. – 4,4 %, 2005 г. – 8,2 %). Во всех видах пищевых продуктов, в которых обнаружена рекомбинантная ДНК, компонентами, произведенными из ГМО, являются продукты переработки сои (95 %), кукурузы (4,5 %) или другого растительного сырья (0,5 %) (Онищенко, 2008). Таким образом, по официальным данным, в период с 2005 по 2007 гг. произошло сокращение потребления ГМ-продукции населением РФ. Однако даже при сокращении потребления ГМ-товаров вероятные риски, связанные с возделыванием и реализацией ГМО населению, остаются.

В целом все потенциальные нежелательные явления и события, происходящие при возделывании и потреблении ГМО, можно объединить в три группы потенциальных рисков: пищевые, экологические и агротехнические (Кузнецов, Куликов, 2005). Существование пищевых рисков связано, прежде всего, с биологическими свойствами продуктов, обусловленными экспрессионной активностью трансгенов, а именно: непосредственным действием токсичных и аллергенных трансгенных белков ГМО; рисками, опосредованными плейотропным действием трансгенных белков на метаболизм растений; рисками, опосредованными накоплением гербицидов и их метаболитов в устойчивых сортах и видах сельскохозяйственных растений; рисками горизонтального переноса трансгенных конструкций, в частности в геном симбионтных для человека и животных бактерий (Escherichia coli, Lactobacillus (acidophillus, bifidus, bulgaricus, caucasicus), Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium и др.).

Экологические риски ГМО обусловливают те ограничения и опасности, которые вытекают из законов генетической и экологической изменчивости живых организмов. Поэтому, оценивая роль генетической инженерии в селекции растений, особенно в плане преодоления барьеров несовместимости любого уровня, следует учитывать и ограничения, обусловленные следующими причинами: непредсказуемость глобального нарушения экологического равновесия естественных и антропогенных систем; опасность сокращения биологического и генетического разнообразия экосистем; эффект «пестицидного бумеранга»; монополизация биотехнологического бизнеса; опасность терминаторных и двойных технологий; экологическая опасность Вt-защищенных и других трансгенных растений. В этой связи, поскольку многие закономерности генетической инженерии неизвестны и мы не знаем, сколько времени потребуется на их познание, было бы весьма опасным пренебрегать традиционными методами селекции, которые на сегодня кормят население Земли.

Пока полностью не ясны и потенциальные агротехнические риски распространения ГМО для живой природы и человека. Это, во-первых, угроза естественному (агро)биоразнообразию. Распространение ГМО может привести к сокращению видового разнообразия живых организмов, обитающих на полях, где они выращиваются, и вокруг них. Кроме того, быстрорастущие ГМ-организмы могут вытеснять обычные виды из естественных экосистем. Во-вторых, угроза разнообразию аборигенных пород и сортов. Распространение ГМО ведет к снижению разнообразия других сортов и пород. Это разнообразие основа устойчивости сельского хозяйства. В-третьих, засорение традиционных сортов трансгенными формами. В результате неконтролируемого опыления нетрансгенных сортов могут происходить ухудшение свойств и потеря генетической чистоты традиционных сортов. И наконец, в-четвертых, истощение и нарушение естественного плодородия почв. ГМ-растения с генами, ускоряющими рост и развитие, в значительно большей степени, чем обычные, могут истощать почву и нарушать ее структуру; в результате подавления токсинами ГМ-растений жизнедеятельности почвенной микробиоты может происходить нарушение естественного плодородия (Кузнецов, Куликов, 2005).

Кроме того, широкомасштабное коммерческое использование ГМ-организмов сопровождается не только названными выше пищевыми, экологическими и агротехническими рисками, но и проблемами политико-экономического характера. Поскольку выделенный, клонированный и перенесенный в другой организм ген, а вместе с ним и весь ГМ-организм, с юридической точки зрения рассматривается как «изобретение» и/или «интеллектуальная собственность», то компании-производители ГМО имеют право на роялти (лицензионные платежи). Это неизбежно приводит к зависимости аграрного сельскохозяйственного производства от транснациональных биотехнологических корпораций и тем самым несет угрозу национальной продовольственной безопасности. В этой связи роль генетических ресурсов растений, животных и микроорганизмов, их сохранения и воспроизводства возрастает многократно. Переоценить их значимость в условиях расширения и углубления глобального экологического кризиса очень трудно. Потеря (агро)биоразнообразия неизбежно приведет к практической реализации потенциальных пищевых, экологических и агротехнических рисков, и, как следствие, к ухудшению норм проживания человека, невозможности сохранения его здоровья на должном уровне и ухудшению благосостояния всего человечества.

Приведем некоторые примеры непреднамеренного, а порой и нелегального распространения ГМО в ряде регионов мира. В апреле 2005 г. в Китае в провинции Хубей, находящейся в непосредственной близости от центров биоразнообразия и происхождения дикого риса Китая, были обнаружены нелегитимные посадки ГМ-образцов этой культуры (Cheung et al., 2006). В июне того же года было установлено загрязнение трансгенным рисом из провинции Хубей риса в Гунжоу, самом большом городе северного Китая. Трансгенный Вt-рис был получен учеными биотехнологической фирмы «New Technology Company» Хуажонг Сельскохозяйственного университета в городе Вухан, столице провинции Хубей. На протяжении 2003-2005 гг. они проводили широкомасштабные полевые испытания Вt-риса, что послужило причиной нелегального распространения ГМ-риса как в провинции Хубей, так и за ее пределами. Следует отметить, что в 2003-2004 гг. Китай экспортировал рис в следующие страны: Японию, Корею, Россию, Германию, Великобританию, Словакию, Польшу, Чехию, Бельгию, Италию, Францию, Нидерланды, Швецию, Финляндию, Австрию, Кот-де-Вуар, Либерию, Гонконг и Индонезию. Остается неизвестным, из каких провинций и куда поставлялся произведенный в Китае рис.

Японские ученые обнаружили, что ГМ-рапс был непреднамеренно выпущен в окружающую среду и свободно произрастает в портах Японии, через которые он был ввезен в эту страну из Канады (National Institute ..., 2005). Проведенные исследования выявили наличие ГМ-рапса в 8 из 10 проверенных портов (табл.). Более того, в отдельных случаях ГМ-растения рапса были обнаружены в радиусе 30 км от порта. Таблица

Распространение ГМ-рапса в портах Японии (по: Frid *et al.*, 2005)

Порт	Провинция (префектура)	Обнаружение ГМ-рапса	
Чиба	Чиба	+	
Хаката	Фукуока	+	
Кашима	Ибараки	+	
Кобэ	Хуого	+	
Мизушима	Окаяма	_	
Нагойя	Аичи	+	
Шимизу	Шизуока	+	
Йокаичи	Мие	+	
Йокагама	Канагава	+	
Уно	Окаяма	_	

Япония не выращивает ГМ-рапс, но производит из него масло для пищевых целей и корма для животных. Собственное производство рапса в Японии ничтожно, и поэтому импорт семян этого растения очень велик (80% из Канады, 17% из Австралии и 3% из Франции). Завоз семян рапса производится в основном морским путем, что и явилось причиной генетического загрязнения ряда портов Японии и их окрестностей ГМ-рапсом. Причиной «выброса» ГМ-семян этой культуры в экосистему Японии явилась потеря семян при разгрузке в портах и последующей их транспортировке к месту хранения и переработки. Вследствие этого японские фермеры столкнулись с проблемой быстрого распространения дикорастущего ГМ-рапса, произрастающего во многих регионах Японии. Особое беспокойство вызывает возможность генетического загрязнения родственных и диких родичей рапса, многие из которых произрастают в Японии (Lefol et al., 1995). И хотя в 2005 г. генетического загрязнения у родственных видов выявлено не было, проведенными исследованиями доказано, что как минимум два ГМ-сорта рапса самопроизвольно произрастают на территории Японии (Frid *et al.*, 2005).

В 2003 г. были проведены специальные анализы, в результате которых установлено, что от 30 до 50% обследованных семян и собранных листьев папайи на Гавайях были генетически загрязнены ГМО (Bondera, Query, 2006). В 2004 г. были осуществлены дополнительные исследования с целью установления, насколько сильно генетически загрязнены трансгенами посадки не ГМ-папайи в этом штате США. Для этого на трех островах Гавай (Гавайи, Оаху и Кауаи) с обычных, не ГМ-растений папайи, произраставших на сельскохозяйственных фермах, производящих папайю на продажу, в садах возле жилых домов и с одичавших деревьев, растущих вдоль дорог, было собрано около 10 тыс. семян, которые методом ПЦР были проанализированы на наличие в них трансгена. Кроме того, дополнительно были собраны листья и семена с деревьев в экологически чистых фермах на островах Гавайи и Кауаи, а также образцы генетически не модифицированных сортов папайи, распространяемых Университетом Гавай. Проведенный анализ собранного материала выявил массивное генетическое загрязнение семян папайи, собранных на острове Гавайи (до 50%), существенное загрязнение на Оаху (немного меньше 5%) и очень незначительное на Кауаи (<0,01%). Все проверенные сельскохозяйственные фермы не имели непреднамеренных посадок ГМ-растений папайи, но плоды папайи, выращенные на этих фермах, содержали генетически модифицированные семена (< 5% на острове Гавайи и 0,01% на Кауаи). Загрязнение произошло за счет переопыления пыльцой трансгенных растений. Наибольшее беспокойство вызывает генетическое загрязнение запасов традиционной не ГМ-папайи Гавайского университета (от 0,01 до 0,1%), крупнейшего поставщика семян этой культуры в США и за их пределы.

В 2006 г. тесты образцов генетических ресурсов папайи, сохраняемых в хранилищах Гавайского университета, на наличие в них ГМО были повторены. В результате было обнаружено, что образцы в запасниках по-прежнему загрязнены в той же пропорции. Такие данные могли быть получены только вследствие генетического загрязнения семян пыльцой, переносимой ветром, насекомыми, птицами, животными или человеком. При этом мякоть плодов остается генетически не модифицированной, а часть семян модифицируются. Загрязнение семян может происходить за счет непреднамеренного ГМО загрязнения образцов ГР традиционных не ГМ-семян, находящихся в хранилищах ГР папайи, что, в свою очередь, ведет к появлению непреднамеренному появлению ГМ-растений с генетически модифицированными листьями, мякотью плодов и как минимум 3/4 семян.

Генетическое загрязнение обычной папайи ГМО стало возможным в результате неконтролируемого и непродуманного выращивания ГМ-папайи вблизи посадок традиционной папайи, а также проведение полевых испытаний ГМ-папайи в окружении обычных немодифицированных растений этой культуры. А если учесть, что традиционно на Гавайях посадки папайи осуществляют на больших площадях, деревья сажают близко друг от друга, производя монокультурные насаждения одного сорта, то результат такого совместного выращивания был предсказуем.

Другим примером распространения ГМО может служить выращивание трансгенной сливы в Румынии. Весной 1996 г. на помологической экспериментальной станции вблизи города Быстрица, расположенной в предгорьи Карпат недалеко от границы с Украиной, было высажено 100 трансгенных растений сливы. Спустя 10 лет трансгенные растения оказались окруженными производственными посадками сельхозугодий, производящих сливу на продажу, и научными образцами деревьев сливы. Никаких буферных зон создано не было. Трансгенные растения были лишь помечены буквой «Т» белой краской на стволах деревьев (рис. 2).

По мнению специалистов, распространение трансгенов пыльцой может достигать 600 км (Meunier et al., 2006). С учетом того что Румыния является третьим в мире производителем сливы и располагается в районе, протянувшемся от Венгрии до Грузии, где происходило одомашнивание этого вида растений, а также месте, где постоянно происходит генетический обмен между самопроизвольными популяциями Prunus и обычной культивируемой сливой (Prunus domestica), что является основой создания адаптивного потенциала генетических ресурсов культивируемых видов, можно ожидать, что генетическое загрязнение этой культуры ГМО приобретет массовую форму. Кроме того, Румыния с 1999 г. выращивает ГМ-сою и является одним из трех крупнейших производителей

ГМ-сои в Европе. Как следует из официальных источников, к ноябрю 2004 г. в Румынии от 75 до 100% этой культуры оказались генетически модифицированными или генетически загрязненными ГМО. Однако в том же 2004 г. Комиссия по биобезопасности Румынии дала согласие на создание и выращивание трансгенной пшеницы. Более того, в том же году в Университете города Тимишоара при финансовой поддержке Мирового банка планировалась реализация научного проекта по переносу Вt-гена, полученного от компании Monsanto, в один из местных сортов картофеля. Насколько успешными оказались эти проекты, а главное, насколько генетически безопасными для генетических ресурсов Румынии и прилежащих стран - остается неизвестным (Meunier et al., 2006).

В России для изучения факторов, влияющих на частоту свободного переопыления в естественных условиях Дальнего Востока, в 2004 г. были сформированы смешанные посевы культурной сои сортов Венера (не ГМ-сорт) и Stine 2254RR (раундап-устойчивый). Смешанные посевы и полученные в результате естественного переопыления гербицидоустойчивые гибриды изучали на протяжении трех лет (Тихонов и



Рис. 2. Дерево трансгенной сливы, выращиваемой на помологической экспериментальной станции в Быстрице в Румынии (по: Meunier *et al.*, 2006).

др., 2010). В результате проведенных исследований авторами было установлено, что в 2005 г. количество гербицидоустойчивых растений оказалось 0,2%, в 2006 г. их уже было 22,9%, в 2007 г. количество трансгенных растений возросло до 95,2%, а в 2008 г. – до 98,0%. Таким образом, как следует из проведенных исследований, насыщение агроценоза традиционной сои гербицидоустойчивой произошло всего за три года отбора на устойчивость к гербициду. В другом эксперименте по изучению элиминации вставки в отсутствие обработки гербицидом в поколениях сои, полученной при гибридизации традиционной и ГМ-сои, этими же авторами было установлено, что в отсутствие обработки селективным гербицидом процент погибших растений в 2007 г. составил 0,9%, в 2008 г. – 4,1% и в 2009 г. – 13,7 % соответственно (Тихонов и др., 2010). На основании полученных данных авторы прогнозируют ситуацию, при которой прекращение применения гербицида раундап приведет к возможной элиминации вставки из агроценоза только через 6-7 лет.

В работе В.И. Киль, (2010) в условиях Краснодарского края проводилось изучение возможности генетического загрязнения ГМ-пыльцой посевов обычной кукурузы. Полученные результаты ясно демонстрируют возможность переноса трансгенной пыльцы ветром на расстояние до 200 м в отсутствие каких-либо препятствий и заграждений, что еще раз подтверждает тезис об уязвимости генетических ресурсов растений в период их полевой репродукции.

Таким образом, генетическое загрязнение образцов генетических ресурсов растений, сохраняемых в генных банках различных стран, может быть обусловлено рядом широко распространенных случаев: перекрестным опылением растений на соседних полях; присутствием ГМ-особей среди обычных растений, выращиваемых на поле, где ранее выращивали ГМ-растения; опылением «одичавшими» ГМрастениями, произрастающими на окраинах полей и являющимися результатом небрежной транспортировки и/или сбора ГМ-растений, а также ГМ-примесным загрязнением через семенные лотки при обработке семян до посева или после сбора урожая. Нельзя сбрасывать со счетов и возможность поглощения экзогенной ДНК естественного или генно-инженерного происхождения, присутствующей в свободном или ином виде в окружающей среде, в том числе в производственных и лабораторных помещениях генных банков. В целом, исходя из вышеизложенного, можно выделить три основных фактора непреднамеренного генетического загрязнения ГМО генных банков ГРР: 1) сбор; 2) воспроизводство и 3) обмен образцами между генными банками. Четвертым фактором можно считать преднамеренное загрязнение образцов коллекций генных банков ГРР, что фактически можно приравнять к разновидности биотерроризма – генетическому терроризму.

Каково же положение дел с генетическим загрязнением ГМО генных банков мира на сегодня? В 2003 г. Университет Калифорнии отозвал 30 образцов семян томата, которые он рассылал в течение предыдущих 7 лет в научные колледжи США и в другие страны. Проведение тестов показало, что разосланные семена не являются запрашиваемыми образцами, а представляют собой схожую биотехнологическую разновидность. При работе с этими семенами научный персонал в их геноме неожиданно обнаружил присутствие широко используемого маркерного гена NPT II и проинформировал об этом центр Рика (Rick Center) генного банка США. Удалось установить, что семена, несущие ГМ-признак, берут свое начало от 20 г семян ГМ-образца, подаренного Университету Калифорнии в 1996 г. компанией Petoseed Company, впоследствии приобретенной Seminis Vegetable Seeds. До сих пор не ясно, где и когда произошло загрязнение (Koppenjan et al., 2003).

Известны как минимум два случая загрязнения образцов генного банка Чили. В 2000 г. семена образцов обычной сои, выращенной в Чили, но полученной из США, были загрязнены Roundup Ready соей фирмы Monsanto. Загрязнение произошло в Университете Северной Каролины при реализации Foundation Seedstocks Programm – программы по обмену образцами между генными банками. В 2005 г. было обнаружено, что образцы обычной кукурузы загрязнены трансгенными образцами NK603 и MON810. Где и когда произошло загрязнение – также неизвестно (Maria Isabel Mansur. Персон. сообщение).

В 2007 г. в прессе появилось сообщение, что ГМ-пшеница выращивается в непосредствен-

ной близости (в 500 м) от здания генного банка семян Германии. В своем интервью профессор А. Гранер, директор Института генетики растений и исследования возделываемых культур (г. Гатерслебен, Германия), в состав которого входит генный банк ФРГ, опроверг возможность загрязнения образцов генного банка трансгенными семенами (Graner, 2007). Несмотря на предпринятые попытки, каких-либо данных, подтверждающих утверждение о возможном генетическом загрязнении образцов генного банка Германии ГМО, получено не было и не представлено до сих пор.

Таким образом, на сегодня известно четыре случая непреднамеренного присутствия ГМО в образцах некоторых генных банков. Каково положение в остальных генных банках – остается неизвестным. Руководствуясь принципами сбора, сохранения и поддержания образцов коллекций ГГР, можно предположить, что ситуация находится под контролем. Однако, несмотря на принимаемые усилия, потенциальный риск загрязнения остается, поскольку исключить человеческий фактор из процесса сбора, обработки и хранения ГМ- и не ГМ-образцов невозможно. Каков же возможный сценарий дальнейшего развития событий в случае непреднамеренного появления ГМО в образцах генных банков?

Поскольку подавляющее большинство образцов коллекций ГРР является популяциями, то закономерно возникает вопрос, как поведет себя популяция под действием стабилизирующего отбора в соответствующей (агро)экосистеме, если в исходной популяции каким-либо образом появится ГМО? И как будет действовать стабилизирующий отбор на вновь возникшую ГМО-популяцию? Стабилизирующая форма естественного отбора, как известно, создает коадаптированные генные комплексы и «охраняет» вид путем устранения генотипов, обусловливающих развитие признаков, которые отклоняются от пределов, допустимых для данного вида в данных условиях среды (Шмальгаузен, 1938, 1982; Жученко, 1980, 1988, 2001, 2004). Если встроенный ген дестабилизирует эволюционно возникшие комплексы генов и признаков, то вопрос о выживаемости ГМО-популяции остается открытым. Так, например, даже если под действием стабилизирующего отбора ГМОпопуляция не будет обладать перспективой выживания, то появление генетически модифицированных особей может оказаться гибельным и для исходной не ГМО-популяции. Возможно ли такое? Это зависит от того, насколько уменьшится приспособленность ГМО-популяции по сравнению с приспособленностью исходной популяции под действием стабилизирующего отбора (Животовский, 2004). Проведенный анализ показывает (Животовский, 1998, 2004; Muir, Howard, 1999), что стабилизирующий отбор может создать ситуацию, когда чужеродный ген будет играть роль своеобразного «троянского коня»: трансгенные особи могут вытеснить особей дикого фенотипа, но сама ГМО-популяция попадет под пресс стабилизирующего отбора из-за выщепления фенодевиантов и, не успев адаптироваться, исчезнет, приводя, в свою очередь, к динамическим изменениям в соответствующей экосистеме.

Таким образом, действие встроенного чужеродного гена, скорее всего, разбалансирует, а не «гармонизирует» геном и генотипическую структуру популяции, которая до того длительное время эволюционировала в определенных условиях внешней среды. Это должно привести к изменению средних значений и/или увеличению фенотипической изменчивости в этой популяции по комплексам адаптивных признаков. При наличии стабилизирующего отбора по таким признакам (а то, что он всегда присутствует, показано многочисленными исследованиями (Шмальгаузен, 1938, 1982; Дубинин, 1948; Lerner, 1954; Dobzhansky, 1970) ожидается уменьшение приспособленности ГМО-популяции по сравнению с популяцией «дикого» фенотипа, поскольку ее фенотипическое разнообразие выходит за пределы нормы отбора. Кроме того, даже если действие чужеродного гена не изменяет среднепопуляционных значений признаков, а лишь обусловливает увеличение фенотипической изменчивости, то это также может резко снизить приспособленность ГМО-популяции и привести к ее быстрой элиминации из экосистемы. При этом, чем большее число признаков претерпевают изменения под действием встроенного гена, тем сильнее становится элиминирующее давление стабилизирующего отбора (Животовский, 1998, 2004). В то же время, при экстраполяции экспериментальных данных на природные ситуации следует иметь в виду, что

лабораторные условия (и соответствующие им оценки приспособленности) могут совсем не отвечать факторам отбора в естественной среде (Braig, Yan, 2002; Животовский, 2004).

13 июля 2010 г. Европейской комиссией были приняты рекомендации для разработки руководств по развитию совместных национальных мер по предотвращению непреднамеренного присутствия ГМО в традиционных и экологически чистых возделываемых культурах. Основная цель и задачи этих нормативных документов дать не имеющие обязательной силы рекомендации странам-членам Европейского Союза. Они предназначены обозначить общие принципы по развитию национальных мер по предотвращению непреднамеренного присутствия ГМО в традиционных и экологически чистых возделываемых культурах. Эти правила признают, что многие факторы, важные в контексте рассматриваемой проблемы, являются специфичными для национальных, региональных и местных условий. Выработка подобных правил в России позволила бы поставить еще один заслон по предотвращению возможности потенциального генетического загрязнения не только образцов коллекций ГРР, но и сортов и разновидностей возделываемых видов растений.

Таким образом, можно заключить, что в связи с увеличивающимся распространением и использованием ГМ-организмов на планете пищевые, экологические и агротехнические риски становятся все более очерченными. Исходя из этого, в интересах экологической и агротехнической безопасности необходима скорейшая разработка и принятие мер по снижению риска от неконтролируемого распространения ГМО и непреднамеренного загрязнения образцов генных банков, прежде всего, на основе изучения и устойчивого использования агробиоразнообразия, сохраняемого в генных банках. Для этого необходимо и достаточно поддерживать в генных банках в генетически чистом виде образцы культивируемых видов и их диких родичей, а также проводить постоянный мониторинг на наличие в образцах ГМО и трансгенов, предотвращая их непреднамеренное появление в коллекциях ГРР. В этой связи особенно актуальными становятся вопросы проведения мониторинга и контроля образцов мировых генетических коллекций с целью предотвращения возможности их генетического загрязнения ГМ-культурами и трансгенами, а также предупреждения бесконтрольного привлечения в коллекции ГРР ГМ-образцов путем выписки, обмена или непосредственного их сбора во время экспедиций.

Литература

- Дубинин Н.П. Экспериментальное исследование интеграции наследственных систем в процессах эволюции популяций // Журн. общ. биологии. 1948. Т. 9. № 3. С. 203–244.
- Животовский Л.А. Приспособленность и популяционный стресс // Жизнь популяций в гетерогенной среде / Ред. Л.А. Жукова и др. Йошкар-Ола: Периодика, 1998. Ч. 2. С. 126–140.
- Животовский Л.А. Стабилизирующий отбор и приспособленность популяций ГМО // ГМО – скрытая угроза России / Ред. И.В. Стариков. Матер. к докл. Президенту РФ «По анализу эффективности государственного контроля за оборотом генетически модифицированных продуктов питания» (п. 3 «и» Протокола № 4 совместного заседания Совета Безопасности и Президиума Госсовета РФ от 13.11.2003). М., 2004. С. 94–105.
- Жученко А.А. Экологическая генетика культурных растений (адаптация, рекомбиногенез, агробиоценоз). Кишинев: Штиинца, 1980. 588 с.
- Жученко А.А. Адаптивный потенциал культурных растений (эколого-генетические основы). Кишинев: Штиинца, 1988. 768 с.
- Жученко А.А. Адаптивная система селекции растений (эколого-генетические основы). М.: Агрорус, 2001. В 2 т. 1496 с.
- Жученко А.А. Экологическая генетика и проблемы агросферы (теория и практика). М.: Агрорус, 2004. В 2 т. 1156 с.
- Картахенский Протокол по биобезопасности к Конвенции о биологическом разнообразии (КПКБР). 2000 г. 29 с.
- Киль В.И. Теоретическое обоснование и практическое использование молекулярно-генетических методов в защите сельскохозяйственных растений от вредителей и оценке трансгенных растений на биобезопасность: Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. Краснодар: ФГОУ ВПО «Кубанский государственный аграрный университет», 2010. 46 с.
- Конвенция о биологическом разнообразии (КБР) // Unites Nations – Treaty Series. 1993. V. 1760. I-30619. P. 199–225.
- Кузнецов В.В., Куликов А.М. Генетически модифицированные организмы и полученные из них продукты: реальные и потенциальные риски // Рос. хим. журнал (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). 2005. Т. 49. № 4. С. 70–83.

- Онищенко Г.Г. «О совершенствовании надзора за пищевыми продуктами, содержащими ГМО и ГММ». Письмо Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 20 августа 2008 г. № 01/9044-8-32.
- Тихонов А.В., Мороховец В.Н., Яковец В.П. и др. Изучение безопасности и возможности сосуществования ГМ и традиционной сои в естественных условиях юга Дальнего Востока РФ // Матер. X Молодежн. науч. конф. «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». М., 2010. С. 45–47.
- Шмальгаузен И.И. Организм как целое в индивидуальном и историческом развитии // Организм как целое в индивидуальном и историческом развитии. М.: Наука, 1938. С. 12–228.
- Шмальгаузен И.И. Стабилизирующий отбор и эволюция индивидуального развития // Организм как целое в индивидуальном и историческом развитии. М.: Наука, 1982. С. 351–372.
- Bondera M., Query M. Hawaii papaya: GMO contaminated // Hawaii Seed. 2006. 19 p. www.gmofreehawaii.org
- Braig H.R., Yan G. The spread of genetic constructs in natural insect populations / Eds D.K. Letourneau, B.E. Burrows. Genetically Engineered Organisms: Assessing Environmental and Human Health Effects. CRC Press, L.; N.Y., 2002. P. 251–314.
- Cheung S.P., Cotter J., Truchi N. Genetically engineered rice: illegal and unwanted in China // Greenpeace. 2006. www.greenpeace.org.hk
- Clive J. Global status of commercialized Biotech/GM crops: 2010. ISAAA Brief No. 42. ISAAA: Ithaca, N.Y., 2010. 30 p.
- Dobzhansky Th. Genetics of the Evolutionary Process. N.Y., Columbia Univ. Press. 1970. 505 p.

- Frid A., Keenan L., Kiers E.T. Genetically engineered canola contamination confirmed across Japan – Canadian GE canola the culprit // Greenpeace. Canola Contamination in Japan: Report. 2005. www.greenpeace.org
- Graner A. We have 60 years' experience of propagating wheat seed. Interview to GMO Safety. 2007. http:// www.gmo-safety.eu/en/news/559.docu.html
- Koppenjan G., Bailey P., Lapin L. Tomato seed from seed bank found to be genetically modified // UC Davis News Service. 2003. http://www.news.ucdavis. edu/search/news detail.lasso?id=6833
- Lefol E., Danielou V., Darmency H. *et al.* Gene dispersal from transgenic crops. I. Growth of interspecific hybrids between oilseed rape and the wild hoary mustard // J. Appl. Ecol. 1995. V. 32. P. 803–808.
- Lerner I.M. Genetic Homeostasis. N.Y., John Willey, 1954. 134 p.
- Meunier E., de la Perriere R.A.B., Craioveanu D., Duminicioiu R. Transgenic plum tree tribulations in Romania // Inf'OGM. 2006. 73: 1–4. www.infogm.org
- Muir W.M., Howard R.D. Possible ecological risks of transgenic organism release when transgenes affect mating success: Sexual selection and Trojan gene hypothesis // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 13853–13856.
- National Institute for Environmental Studies (NIES): A monitoring survey concerning the environmental impact caused by Genetically Engineered living organisms (canola). 2005. http://www.bch.biodic. go.jp/download/natane/rapeseed_report16.pdf
- Scientists' Working Group on Biosafety (SWGB). Manual for Assessing Ecological and Human Health Effects of Genetically Engineered Organisms. The Edmonds Institute. Edmonds. WA. 1998. www.edmonds-institute.org/manual.html

GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS AND GENETIC POOLS OF PLANTS: ENVIRONMENTAL AND AGRICULTURAL SAFETY

Yu.V. Chesnokov

Vavilov Research Institute of Plant Industry, St. Petersburg, Russia, e-mail: yu.chesnokov@vir.nw.ru

Summary

Ecological and agricultural safety is considered in the context of the dissemination of genetically modified organisms (GMOs). The probability of involuntary pollution of gene bank accessions with GMOs is discussed. It is demonstrated by the example of GMO distribution in various regions of the world that the large-scale commercial use of GMOs is associated with ecological and agricultural risks.

Key words: genetically modified organisms, accessions of plant genetic resources, ecological and agricultural safety.

ОТ СЪЕЗДА – К СЪЕЗДУ: ВЕКОВАЯ ПОСТУПЬ СЕЛЕКЦИОНЕРОВ-РАСТЕНИЕВОДОВ

В.Н. Ожерельева, В.В. Кириченко

Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН Украины, Харьков, Украина, e-mail: yuriev1908@gmail.com

В статье приведены данные о подготовке и проведении Первого Всероссийского съезда деятелей по селекции, семеноводству и распространению семенного материала и Международного съезда селекционеров-растениеводов. Излагаются основные положения съездов. Раскрыто историческое значение мероприятий.

Ключевые слова: опытное дело, съезды, селекция, семеноводство, семенной материал.

6–8 июля 2011 г. в Харькове прошел Международный юбилейный съезд селекционеров-растениеводов. Это событие имело символическое значение, потому что именно в Харькове еще в 1881 г. было основано Харьковское общество сельского хозяйства, организовавшее первую в царской России селекционную станцию, а в январе 1911 г. при активном участии сотрудников станции в Харькове прошел Первый Всероссийский съезд деятелей по селекции, семеноводству и распространению семенного материала, который собрал цвет отечественной аграрной науки (Труды..., 1911).

И неслучайно Международный юбилейный съезд селекционеров-растениеводов прошел во всемирно известном центре растениеводческой селекции и генетики – Институте растениеводства Национальной академии аграрных наук Украины, который носит имя известного ученого в этой отрасли Василия Яковлевича Юрьева (Академік..., 2007) и где берегут и развивают славные традиции селекционной науки.

Рабочие дни съезда были насыщенными. В первый день гости только съезжались, регистрировались и размещались в гостинице. Сотрудники института провели экскурсию по вечернему Харькову. Во второй день участники ознакомились с музейными экспонатами института, тематической выставкой, выставкой селекционных достижений. Торжественное открытие съезда провел директор Института растениеводства им. В.Я. Юрьева, академик НААН Украины В.В. Кириченко. Приветственные слова прозвучали от предселателя Госинформнауки, академика В.П. Семиноженка, президента НААН Украины, академика НААН Украины Н.Д. Безуглого, заместителя председателя Харьковской облгосадминистрации В.В. Алексейчука.

На пленарном заседании украинские и зарубежные селекционеры выступили с основательными докладами о достижениях современной селекционной науки, продемонстрировали свое видение путей решения проблемных вопросов создания и внедрения в производство новых сортов и гибридов сельскохозяйственных культур. Селекционеры-растениеводы выдвинули конкретные предложения для усиления международного сотрудничества и ускорения решения задач увеличения продукции растениеводства в условиях глобального изменения климата и увеличения населения Земли.

В работе съезда приняли участие ведущие специалисты и ученые отраслей растениеводства Украины, России, Белорусии, Казахстана, Турции, в их числе: В.В. Кириченко (Харьков), Н.П. Гончаров (Новосибирск), А.А. Гончаренко (Немчиновка), В.В. Карпачев, Э.К. Горшкова (Липецк), В.И. Ковтун (Ставрополь), В.Н. Тищенко (Полтава), В.И. Сичкарь, В.И. Файт (Одесса), И.С. Матыс (Жодино).

На третий день работы съезда гости посетили селекционный центр института. Там они ознакомились с работой селекционных и семеноводческих подразделений института, осмотрели опытные поля и демонстрационные посевы. Заинтересовались ученые и материально-технической базой ведения селекционных работ института, одной из лучших в Украине.

В своем решении участники съезда отметили стратегически важную роль селекции в обеспечении реализации инновационных направлений в аграрном секторе экономики стран-участниц; одобрили работу учреждений в плане формирования национальных сортовых ресурсов, а также поручили расширить научные и деловые контакты в вопросах формирования и реализации перспективных направлений взаимовыгодного сотрудничества. Принятые решения будут доведены до правительственных и научных структур своих стран.

Процесс подготовки и проведения этого съезда во многом напоминал тот, что прошел ровно 100 лет назад. Проведению Первого съезда деятелей по селекции, семеноводству и распространению семенного материала предшествовало стремительное развитие агрономической деятельности и внимание самых широких слоев населения в 1908–1911 гг.

Второй съезд деятелей агрономической помощи в Москве, Харьковский съезд по вопросам школьного и внешкольного сельскохозяйственного просвещения, Областной съезд представителей земств и сельских хозяев Юга России в Екатеринославе (7–20 сентября 1910 г.), ряд совещаний при губернских управлениях, собрания больших сельскохозяйственных обществ – все это происходило в 1910–1911 гг. (Елина, 2008а, б). Не стал исключением и Первый Всероссийский съезд деятелей по селекции, семеноводству и распространению семенного материала, прошедший 10–15 января 1911 г.

Занимаясь вопросами создания высокоурожайных и однородных сортов, размножения улучшенного материала, ознакомлением крестьян с современным состоянием важных отделов сельскохозяйственной техники, совет Харьковского общества сельского хозяйства на заседании 12 февраля 1910 г. вынес предложение о созыве специального съезда деятелей по селекции сельскохозяйственных культур, семеноводству и распространению семенного материала. Местом проведения съезда был выбран г. Харьков. Это объяснялось его удачным расположением среди большого ряда семеноводческих хозяйств соседних уездов (ДАХО. Ф. 304. Оп. 1. Дел. 2681).

Работу съезда предложили разбить на три группы-секции: 1 отдел – обсуждение вопросов селекции сельскохозяйственных культур; 2 отдел – вопросы о производстве семян и 3 отдел – вопросы о распространении семян, контроле за качеством распространяемого материала. Именно эти вопросы интересовали крестьян независимо от места нахождения хозяйственных районов царской России.

На общем собрании (20 августа 1910 г.) Департамент земледелия Государственного управления землеустройства и земледелия (ДЗ ГУЗиЗ) разрешил Харьковскому обществу сельского хозяйства провести съезд. Согласно п. 6 «Правил о съезде» от 22 июня, утвержденных ГУЗиЗ, было решено выбрать состав Распорядительного комитета, утвердить положения и программу съезда (От Распорядительного Комитета..., 1910а).

Для более успешной работы в подготовке съезда состав Распорядительного комитета разделили на два отдела. Первый отдел по селекции сельскогозяйственных культур возглавил П.В. Будрин, помогать ему должны были П.П. Корхов и В.Я. Юрьев. Второй отдел по семеноводству возглавил Г.Г. Дибольд. Помощниками стали М.В. Мазурин и Н.С. Барабошкин (Хроника..., 1910).

На этом же заседании Комитет предложил список лиц, которые должны присутствовать на съезде, и выбрал его Организационное бюро. В состав Распорядительного комитета согласно «Положению» вошли: председатель – С.Н. Кузнецов, члены комитета – П.В. Будрин¹, И.А. Крарусский, Л.Д. Лесевицкий, И.К. Грищенко, П.С. Коссович¹, А.Е. Зайкевич¹, Д.Л. Рудзинский¹, Р.Э. Регель¹, В.Е. Брунст, Б.Н. Рожественский¹, П.П. Корхов, В.Я. Юрьев¹ и др.

В предложенных записках В.В. Колкунова и Д.Л. Рудзинского Комитету высказаны основные пожелания – остановиться на интересных статьях «Программы...» в отношении

¹ См. о П.В. Будрине (Вергунов, Коваленко, 2004), о П.С. Коссовиче (Прянишников, 1915), о Д.Л. Рудзинском (Елина, 2007), о Р.Э. Регеле (Гончаров, 2007), о Б.Н. Рожественском (Рожественский, 1984), о В.Я. Юрьеве (Академік..., 2007).

селекционной работы. Комитет начал вникать в суть статей. Главными по отделу селекции сельскохозяйственных культур Комитет признал вопросы организации селекционного дела, помещенные в статьях 2 и 7 «Программы...».

9 ноября на совете заседания Харьковского общества сельского хозяйства стал вопрос перед Департаментом земледелия и Харьковским губернским земским управлением о субсидии в 300 и 150 руб. на организацию съезда, а также субсидии в 500 руб. перед Департаментом земледелия на издание научных трудов этого съезда.

Общее количество докладов на съезде было 73. Все они отражены в трудах, которые были изданы (От Распорядительного Комитета..., 1910б).

По каждому докладу съезд выносил постановления. Как пример приведем постановления на доклады профессоров П.В. Будрина «Какого рода селекционные учреждения нам нужны и какие задачи должны они преследовать» (Будрин, 1911), В.В. Таланова «Желательная организация селекционных учреждений» (Таланов, 1911), Б.К. Енкена «К вопросу об организации сельскохозяйственной селекции в России» (Енкен, 1911).

«По предложению Э.Ю. Зеленского:

 при организации сети общественных селекционных учреждений желательно, чтобы были использованы уже существующие в известных районах учреждения (как, напр., секция семеноводства Центрального Земледельческого общества Царства Польского и др.); 2) желательно, чтобы общественные селекционные организации не ограничивали частной инициативы в деле селекции, а, наоборот, старались поощрять ее к координированию деятельности с общественной.

По предложению Р.Э. Регеля:

3) желательно учреждение совещания исполнителей-селекционеров, а именно: заведующих казенными, общественными и частными учреждениями по селекции или их заместителей, для планомерного распределения намеченных Съездом задач и для выяснения того, какие из этих задач могут быть выполнены непосредственно, какие из них должны быть отложены и что требуется для выполнения последних в ближайшем будущем» (Труды..., 1911). После этих выступлений на заседании 11 января были вынесены положения, основное содержание которых сводилось, соответственно, к открытию селекционных учреждений, которые будут решать конкретные практические задачи, параллельно с улучшением преподавания селекции в высших учебных заведениях.

На этом же заседании предложено поделить селекционные учреждения на три типа: первый селекционные отделы областных станций, оборудованных независимо от учебных заведений, которые должны работать по направлению работ отделов станций. Ко второму типу должны были принадлежать специальные самостоятельные селекционные учреждения и к третьему – кафедры селекции при высших сельскохозяйственных школах и университетах. Сеть селекционных учреждений конкретной области должна складываться из селекционного отдела областной станции, сети сортоиспытательных и селекционных участков соответственно количеству отдельных почвенно-климатических районов области, полей размножения и семенных участков, созданных в частных хозяйствах, и, наконец, сеть показательных участков, которая находилась бы в творческой связи с селекционными учреждениями.

Постановления, вынесенные на съезде, отразили основные насущные проблемы, обозначенные в выступлениях некоторых докладчиков, а именно:

по первому отделу – селекция сельскохозяйственных культур: (условия успешного развития селекционного дела в царской России; вопросы об организации, количестве и составе селекционных отечественных учреждений; персонал, земля, постройки, деньги; задачи селекционных учреждений; улучшение и создание новых сортов; изучение особенностей каждого сорта и сравнительное испытание сортов, селекция растений; принцип установления районов для проведения селекционных работ и размещение опытных полей, которые были при селекционных учреждениях; принципы отбора растений для селекционных работ на территории района; сортоизучение как самостоятельный раздел программы деятельности селекционных учреждений; вспомогательные отделения и филиалы селекционных учреждений с «полями размножения»; соединение
селекционных работ с размножением новых сортов; акклиматизация сортов; о создании кафедр по селекции при высших сельскохозяйственных учебных заведениях);

по второму отделу – производство семян: (вопросы техники массового размножения сортов, созданных селекционными станциями; производство семян в частных семеноводческих хозяйствах в правительственных, земских, гражданских, и кооперативных семеноводческих рассадниках; методы сортировки в семеноводческих хозяйствах: а) метод сортировки семян (машинный), б) метод массового отбора (постоянный отбор, полевой); чистота семян; чистота сорта (однородность, однотипность сорта); специализация семеноводческих хозяйств; контроль над производством семян и его организация;

по-третьему отделу – *распространение семенного материала* (значение элеваторов в деле распространения семенного материала; семенные склады: государственные, частные, гражданские и кооперативные; семенные выставки и их создание; семенной контроль; законодательное нормирование продажи семян, семенной обмен между различными районами страны, контрольно-семенные станции, законодательная регламентация их деятельности; контроль над фирмами разного типа собственности: меры борьбы с фальсификацией семян.

На Первом Всероссийском съезде по селекции и семеноводству прозвучало, что вопросы селекции на тот момент были актуальны в обществе. Благодаря ему многочисленные наиценнейшие научные труды, в которых освещены передовые селекционные отечественные достижения, стали доступны тем, для кого вопросы селекции были близкими. Вопросы о сельскохозяйственном просвещении и опытном деле неразрывно связаны между собой. Развитие агрономической деятельности возможно только при гарантии подготовленного персонала и научно обоснованных данных. Но в то же время известные селекционеры на Первом съезде обратили внимание на то, что в такой отрасли, как селекция, не хватает полной организации и дело специалистов идет вразброд.

Историческое значение Первого Всероссийского съезда деятелей по селекции, семеноводству и распространению семенного материала некоторыми исследователями осознается и в настоящее время.

1911 г. остался памятным в истории развития опытных учреждений созданием конкретных представлений об опытных учреждениях в форме разработанных ими планов и схем, которые уже испробовались на практике.

За годы, прошедшие с момента прохождения Первого Всероссийского съезда деятелей по селекции, семеноводству и распространению семенного материала, обогатилась теория селекции, появились новые методы, поменялась техника проведения работ, но основные положения съезда и сейчас актуальны и имеют значительную ценность для теории и практики селекционной работы.

Литература

- Академік Юр'ев Василь Якович (1897–1962): Біобібліогр. покажчик. Харьков: Магда LTD, 2007. 184 с.
- Будрин П.В. Какого рода селекционные учреждения нам нужны и какие задачи должны они преследовать // Тр. Первого съезда деятелей по селекции сельскохозяйственных растений, семеноводству и распространению семенного материала: доклады / Под ред. П.В. Будрина, А.А. Потебни, Б.М. Рожественского, Л.П. Сокальского (10–15 янв. 1911 г., г. Харьков). Харьков: Типолитография М.Х. Сергеева и К.М. Гальченка, 1911. Вып. 2. С. 1–6.
- Вергунов В.А., Коваленко С.Д. Петр Васильевич Будрин. М.: Наука, 2004. 188 с.
- Гончаров Н.П. К юбилеям заведующих Бюро по прикладной ботанике: А.Ф. Баталина, И.П. Бородина, Р.Э. Регеля // Информ. вестник ВОГиС. 2007. Т. 11. № 2. С. 445–461.
- ДАХО. Ф. 304. Оп. 1. Дел. 2681. С. 34.
- Елина О.Ю. «Наш учитель» Дионисий Леопольдович Рудзинский: к истокам дисциплинарного строительства селекции растений в России // Информ. вестник ВОГиС. 2007. Т. 11. № 3/4. С. 575–590.
- Елина О.Ю. От царских садов до советских полей. История сельскохозяйственных опытных учреждений XVIII–20-е годы XX века: В 2-х т. М., 2008а. Т. 1. 480 с.
- Елина О.Ю. От царских садов до советских полей. История сельскохозяйственных опытных учреждений XVIII–20-е годы XX века. В 2-х т. М., 2008б. Т. 2. 488 с.
- Енкен Б.К. К вопросу об организации сельскохозяй-

ственной селекции в России // Тр. Первого съезда деятелей по селекции сельскохозяйственных растений, семеноводству и распространению семенного материала: доклады / Под ред. П.В. Будрина, А.А. Потебни, Б.М. Рожественского, Л.П. Сокальского (10–15 янв. 1911 г., г. Харьков). Харьков: Типолитография М.Х. Сергеева и К.М. Гальченка, 1911. Вып. 2. С. 1–6; 328–331.

- От Распорядительного Комитета Первого съезда деятелей по селекции сельскохозяйственных растений, семеноводству и распространению семенного материала // Южно-русская сельскохозяйственная газета. 1910а. № 45/46. С. 7–9.
- От Распорядительного Комитета Первого съезда деятелей по селекции сельскохозяйственных растений, семеноводству и распространению семенного материала // Южно-русская сельскохозяйственная газета. 1910б. № 47/48. С. 15–16.
- Прянишников Д.Н. Памяти П.С. Коссовича // Журн. опытной агрономии. 1915. Т. 16. Кн. 5.

Рожественский Борис Николаевич // Биологи. Био-

графический справочник. Киев: Наук. Думка, 1984. С. 536.

- Таланов В.В. Желательная организация селекционных учреждений // Тр. Первого съезда деятелей по селекции сельскохозяйственных растений, семеноводству и распространению семенного материала: доклады / Под ред. П.В. Будрина, А.А. Потебни, Б.М. Рожественского, Л.П. Сокальского (10–15 янв. 1911 г., г. Харьков). Харьков: Типолитография М.Х. Сергеева и К.М. Гальченка, 1911. Вып. 2. С. 1–6; 96–106.
- Труды Первого съезда деятелей по селекции сельскохозяйственных растений, семеноводству и распространению семенного материала: Постановления съезда / Под ред. П.В. Будрина, А.А. Потебни, Б.М. Рожественского, Л.П. Сокальского (10–15 янв. 1911 г., г. Харьков). Харьков, 1911. С. 4–5.
- Хроника: Из деятельности Харьковского общества сельского хозяйства: К созыву селекционного съезда // Южно-русская сельскохозяйственная газета. 1910. № 32. С. 15.

FROM CONGRESS TO CONGRESS: AGE-OLD STEP OF PLANT BREEDERS

V.N. Ozherelieva, V.V. Kirichenko

Yuryev Plant Production Institute, Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kharkov, Ukraine, e-mail: yuriev1908@gmail.com

Summary

The article concerns the preparation and organization of the 1st All-Russia congress of experts in breeding, seed production and dissemination of the seed material and the International Congress of plant breeders. The main provisions of the congress are presented. The historical significance of the events is shown.

Key words: experimentation, congresses, breeding, seed industry, seed material.

АКАДЕМИК РАН НИКОЛАЙ ПАВЛОВИЧ БОЧКОВ (19.10.1931–28.09.2011)



28 сентября 2011 г. на 80-м году жизни скончался академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ Николай Павлович Бочков – заведующий лабораторией мутагенеза Медико-генетического научного центра РАМН.

Н.П. Бочков родился 19 октября 1931 г. в деревне Марьинке Староюрского р-на Тамбовской области. В 1955 г. окончил с отличием 2-й Московский медицинский институт, в 1958 г. защитил кандидатскую диссертацию, в 1969 г. – докторскую. В 1970 г. ему присвоено звание профессора по специальности «генетика», в 1971 г. Н.П. Бочков был избран членом-корреспондентом, а в 1978 г. – академиком АМН СССР.

Независимо от того, где работал Николай Павлович (Москва, Сухуми, Обнинск), характерной чертой его трудовой деятельности оставалась интенсивная научная работа в области регенеративной медицины, генетики человека, медицинской генетики. Особое место в его научных интересах занимали фундаментальные исследования по изучению закономерностей наследственной изменчивости человека. Эта тематика потребовала привлечения экспериментальных, популяционных, эпидемиологических и клинических подходов, осуществляемых в разных городах России, странах ближнего и дальнего зарубежья. Коллективом, руководимым Н.П. Бочковым, установлены общие закономерности спонтанного и индуцированного мутагенеза у человека в зародышевых и соматических клетках, разработаны принципы прогнозирования генетических эффектов от действия различных вредных факторов окружающей среды.

В прикладных исследованиях под руководством Н.П. Бочкова были разработаны принципы медико-генетического консультирования, мониторинга наследственной патологии и врожденных пороков развития. Н.П. Бочков активно участвовал в организации и совершенствовании медико-генетической службы в практическом здравоохранении. Он принимал активное участие в изучении генетических последствий радиоактивных загрязнений после челябинских выбросов и чернобыльской аварии. В последние годы Н.П. Бочков работал по тематике генной и клеточной терапии. Под его руководством проводились исследования по составлению алгоритмов генной терапии хронической ишемии нижних конечностей и бокового амиотрофического склероза, а также по применению клеточной терапии при хирургических заболеваниях (обеспечение безопасности и доказательности).

Научный поиск Н.П. Бочкова отличался четкой постановкой цели исследования, выбором адекватных методов, тщательным анализом полученных данных, четкостью выводов.

Опубликованные им статьи и книги выделяются строгой логикой изложения и предельной информативностью. Н.П. Бочков – автор 520 научных трудов, среди которых 12 книг: «Хромосомы человека и облучение», «Генетика человека», «Наследственность человека и мутагены внешней среды», «Гены и судьбы» и др. За учебник «Клиническая генетика» (учебник для вузов – 4 издания) Н.П. Бочков удостоен Премии Правительства РФ (2005 г.). За научные разработки Н.П. Бочкову дважды присуждали Государственные премии в области науки и техники (1983, 1998 гг.).

Н.П. Бочков создал Институт медицинской генетики АМН СССР, директором которого был с 1969 по 1989 гг. С этим институтом связано возрождение медицинской генетики в нашей стране. По его инициативе и при его непосредственном участии были организованы филиалы в Минске и Томске, которые затем стали самостоятельными авторитетными научными учреждениями.

Н.П. Бочков работал в Президиуме Академии медицинских наук: главным ученым секретарем (1980–1985 гг.), членом Президиума (1990– 1995 гг.), вице-президентом (1995–2006 гг.).

Николай Павлович всегда уделял большое внимание подготовке кадров. Он читал курсы по генетике человека в руководимом им институте, Московском и Новосибирском государственных университетах, провел 4 школы молодых ученых, реорганизовал учебу на кафедре медицинской генетики в ЦОЛИУВ. В 1988 г. он основал кафедру медицинской генетики в Первом МГМУ им. И.М. Сеченова и возглавлял ее до 2009 г. Им создана школа медицинских генетиков: более 75 его учеников (докторов и кандидатов наук) работают в разных городах России, в странах ближнего и дальнего зарубежья.

Н.П. Бочков был организатором многих национальных и международных конгрессов, съездов, конференций, его приглашали в качестве эксперта ВОЗ по генетике человека, избран почетным членом ряда научных обществ, входил в состав редколлегий ряда отечественных и зарубежных журналов. С 1985 г. являлся главным редактором журнала «Вестник Российской академии наук».

Н.П. Бочков дважды избирался президентом Всесоюзного общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова (1975 и 1978 гг.). Он организовал Всесоюзное научное общество медицинских генетиков и был председателем его правления с 1978 по 1990 гг. Он был один из организаторов международного движения «Врачи мира за предотвращение ядерной войны».

Н.П. Бочков был награжден орденами «Знак Почета», «Октябрьской революции», «За заслуги перед Отечеством» IV степени.

Вавиловское общество генетиков и селекционеров, коллектив Медико-генетического научного центра РАМН, редколлегия журнала «Вавиловский журнал генетики и селекции»

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 17.12.2011 г. Формат бумаги 60×84 1/8. Усл.-печ. л. 25,5. Уч.-изд. л. 24,01 Тираж 400. Заказ 14

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН» 630090, Новосибирск, Морской проспект, 2