
БАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

ОСНОВАН В 1997 г.

Том 16

2

июнь 2012

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

FOUNDED IN 1997

Vol. 16

2

June 2012

«Вавиловский журнал генетики и селекции» / «Vavilov Journal of Genetics and Breeding» до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС» / «The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists».

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен ВАК Минобрнауки России в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук (по биологическим наукам).

(Редакция 17 июня 2011 г.: <http://vak.ed.gov.ru>)

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен в федеральный почтовый Объединенный каталог «ПРЕССА РОССИИ».

Персональный подписной индекс № 42153.

Адрес редакции:

«Вавиловский журнал генетики и селекции»,
ИЦиГ СО РАН,
Проспект Академика Лаврентьева, 10,
Новосибирск, 630090

Факс: (383) 3331278

e-mail: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Ответственный секретарь редакции:

С.В. Зубова,

тел. 363-4922 *1351

Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870
выдано Федеральной службой по надзору в сфере
связи, информационных технологий и массовых
коммуникаций 20 июля 2011 г.

При перепечатке материалов ссылка на журнал
обязательна.

© Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт цитологии и
генетики Сибирского отделения Российской
академии наук, 2012

© Вавиловский журнал генетики и селекции, 2012

© Сибирское отделение Российской академии
наук, 2012

Содержание

<i>Н. Н. Юрченко, О. В. Трапезов, И. К. Захаров</i> НИКОЛАЙ КОНСТАНТИНОВИЧ КОЛЬЦОВ – АВТОР ИДЕИ МАТРИЧНОГО СИНТЕЗА И ОСНОВАТЕЛЬ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ В РОССИИ	310
<i>И. К. Захаров, Ю. Э. Гербек, О. В. Трапезов</i> ДМИТРИЙ КОНСТАНТИНОВИЧ БЕЛЯЕВ. ЭВОЛЮЦИЯ, СЖАТАЯ ВО ВРЕМЕНИ СОИЗМЕРИМО С ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ ВЕКОМ	321
<i>Е. Л. Мищенко, Н. В. Иванисенко, И. Р. Акбердин, П. С. Деменков, В. А. Лихошвай, Н. А. Колчанов, В. А. Иванисенко</i> ПОДАВЛЕНИЕ РЕПЛИКАЦИИ СУБГЕНОМНОГО РНК РЕПЛИКОНА ВИРУСА ГЕПАТИТА С ИНГИБИТОРОМ NS3 ПРОТЕАЗЫ SCH 503034 В Huh-7 КЛЕТКАХ: СТОХАСТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ	339
<i>А. Г. Богомоллов, К. С. Задесенец, Т. В. Карамышева, Н. Л. Подколотный, Н. Б. Рубцов</i> ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ХРОМОСОМОСПЕЦИФИЧНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК ПРИ ПРОВЕДЕНИИ FISH МИКРОДИСЕКЦИОННЫХ ДНК-ПРОБ С МЕТАФАЗНЫМИ ХРОМОСОМАМИ	348
<i>О. В. Ваулин, Ю. М. Новиков</i> ПОЛИМОРФИЗМ И МЕЖВИДОВАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА СУБЪЕДИНИЦЫ I ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ (COI) У ВИДОВ-ДВОЙНИКОВ А И В <i>ANOPHELES MESSEAE</i> И <i>AN. BEKLEMISHEVI</i> (DIPTERA: CULICIDAE)	358
<i>Г. К. Исакова</i> ЕСТЕСТВЕННЫЙ МУТАЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС КАК ВОЗМОЖНЫЙ ПРИЧИННЫЙ ФАКТОР ВОЗНИКНОВЕНИЯ ОБЛИГАТНОЙ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ДИАПАУЗЫ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ (ГИПОТЕЗА)	369
<i>О. В. Трапезов, Л. И. Трапезова, Л. А. Семенова</i> ОПЫТ ДОМСТИКАЦИИ РЕЧНОЙ ВЫДРЫ (<i>LUTRA LUTRA</i> LINNAEUS, 1758)	375

<i>И. А. Драчкова, С. В. Шеховцов, С. Е. Пельтек, П. М. Пономаренко, Т. В. Аршинова, М. П. Пономаренко, Т. И. Меркулова, Л. К. Савинкова, Н. А. Колчанов</i>	
ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТАТА-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА С ТАТА-ЭЛЕМЕНТОМ ПРОМОТОРА ГЕНА <i>NOS2A</i> С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА	391
<i>Е. В. Долгова, В. П. Николин, Н. А. Попова, А. С. Проскурина, К. Е. Орищенко, Е. А. Алямкина, Я. Р. Ефремов, Е. Р. Черных, А. А. Останин, Е. М. Малкова, О. С. Таранов, В. А. Рогачев, С. В. Сидоров, С. С. Богачев, М. А. Шурдов</i>	
ИНТЕРНАЛИЗАЦИЯ ЭКЗОГЕННОЙ ДНК ВО ВНУТРЕННИЕ КОМПАРТМЕНТЫ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ	397
<i>Э. С. Фомин, Н. А. Алемасов</i>	
ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ МУТАНТНЫХ ФОРМ БЕЛКА БАРНАЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОГРАММНОГО КОМПЛЕКСА MOLKERN	415
<i>В. А. Драгавцев, Г. А. Макарова, А. А. Кочетов, Г. В. Мирская, Н. Г. Синявина</i>	
НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ЭКСПРЕССНОЙ ОЦЕНКЕ ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ И ГЕНЕТИЧЕСКОЙ (АДДИТИВНОЙ) ДИСПЕРСИЙ СВОЙСТВ ПРОДУКТИВНОСТИ РАСТЕНИЙ	427
<i>О. О. Тимина</i>	
СКРИНИНГ <i>CAPSICUM ANNUUM</i> VAR. <i>ANNUUM</i> L. НА РАННЕСПЕЛОСТЬ	437
<i>В. А. Крупнов, Г. Ю. Антонов, А. Е. Дружин, О. В. Крупнова</i>	
УСТОЙЧИВОСТЬ К ПРЕДУБОРОЧНОМУ ПРОРАСТАНИЮ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С <i>6AGⁱ(6D)</i> -ХРОМОСОМОЙ ОТ <i>AGROPYRON INTERMEDIUM</i>	444
<i>В. С. Юсов, М. Г. Евдокимов, Б. М. Татина</i>	
ИЗМЕНЧИВОСТЬ КОМБИНАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ ВЫРАЩИВАНИЯ	451
<i>Г. В. Щипак, Р. А. Недоступов, В. Г. Щипак</i>	
СЕЛЕКЦИЯ ОЗИМОЙ ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ НА ПОВЫШЕНИЕ АДАПТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА И УРОЖАЙНОСТЬ	455
<i>Г. V. Shchipak, Yu. V. Tsupko, A. P. Petrova, V. G. Shchipak</i>	
PRODUCTIVITY, ADAPTABILITY AND GRAIN QUALITY OF MODERN UKRAINIAN WINTER TRITICALE CULTIVARS	464
<i>А. А. Подгаецкий</i>	
МЕЖВИДОВАЯ ГИБИРИДИЗАЦИЯ В СЕЛЕКЦИИ КАРТОФЕЛЯ В УКРАИНЕ	471
<i>Е. Е. Радченко, Т. Л. Кузнецова, Н. В. Алтатьева</i>	
ДИНАМИКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ КРАСНОДАРСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ОБЫКНОВЕННОЙ ЗЛАКОВОЙ ТЛИ ПРИ СМЕНЕ РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА	480
<i>С. В. Шалимов</i>	
ТРИ СТОЛЕТИЯ БИОЛОГИИ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ	488

Content

N. N. Yurchenko, O. V. Trapezov, I. K. Zakharov

NIKOLAI KONSTANTINOVICH KOL'TSOV, THE AUTHOR OF THE TEMPLATE-DIRECTED SYNTHESIS CONCEPT AND FOUNDER OF EXPERIMENTAL BIOLOGY IN RUSSIA 310

I. K. Zakharov, Yu. E. Herbek, O. V. Trapezov

DMITRY KONSTANTINOVICH BELYAEV. EVOLUTION COMPRESSED TO A HUMAN LIFETIME 321

*E. L. Mishchenko, N. V. Ivanisenko, I. R. Akberdin, P. S. Demenkov, V. A. Likhoshvai,
N. A. Kolchanov, V. A. Ivanisenko*

SUPPRESSION OF SUBGENOMIC HEPATITIS C VIRUS RNA REPLICON REPLICATION IN HUH-7 CELLS BY THE NS3 PROTEASE INHIBITOR SCH5030334: A STOCHASTIC MATHEMATICAL MODEL 339

A. G. Bogomolov, K. S. Zadesenets, T. V. Karamysheva, N. L. Podkolodnyi, N. B. Rubtsov

VISUALIZATION OF CHROMOSOME-SPECIFIC DNA SEQUENCES BY FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION OF MICRODISSECTION DNA PROBES WITH METAPHASE CHROMOSOMES 348

O. V. Vaulin, Yu. M. Novikov

POLYMORPHISM AND INTERSPECIFIC VARIABILITY OF CYTOCHROME OXYDASE SUBUNIT I (COI) GENE NUCLEOTIDE SEQUENCE IN SIBLING SPECIES OF A AND B *ANOPHELES MESSEAE* AND *AN. BEKLEMISHEVI* (DIPTERA: CULICIDAE) 358

G. K. Isakova

NATURAL MUTAGENESIS AS A POSSIBLE CAUSAL FACTOR FOR OCCURRENCE OF OBLIGATE EMBRYONIC DIAPAUSE IN MAMMALS (A HYPOTHESIS) 369

O. V. Trapezov, L. I. Trapezova, L. A. Semenova

AN EXPERIMENT ON RIVER OTTER (*LUTRA LUTRA* LINNAEUS 1758) DOMESTICATION 375

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

SURFACE PLASMON RESONANCE STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN THE HUMAN TATA-BOX BINDING PROTEIN AND THE TATA ELEMENT OF THE *NOS2A* GENE PROMOTER 391

<i>E. V. Dolgova, V. P. Nicolin, N. A. Popova, A. S. Proskurina, K. E. Orishchenko, E. A. Alyamkina, Y. R. Efremov, E. R. Chernykh, A. A. Ostanin, E. M. Malkova, O. S. Taranov, V. A. Rogachev, S. V. Sidorov, S. S. Bogachev, M. A. Shurdov</i>	
INTERNALIZATION OF EXOGENOUS DNA INTO INTERIOR COMPARTMENTS OF MURINE BONE MARROW CELLS	397
<i>E. S. Fomin, N. A. Alemasov</i>	
STUDY OF THE THERMAL STABILITY OF BARNASE PROTEIN MUTANTS WITH MOKLERN SOFTWARE	415
<i>V. A. Dragavtsev, G. A. Makarova, A. A. Kochetov, G. V. Mirskaya, N. G. Sinyavina</i>	
PROXIMATE ESTIMATION OF GENOTYPIC AND GENETIC (ADDITIVE) VARIANCES OF PLANT PRODUCTIVITY TRAITS	427
<i>O. O. Timina</i>	
TEST OF <i>CAPSICUM ANNUUM</i> VAR. <i>ANNUUM</i> L. ACCESSIONS FOR EARLINESS	437
<i>V. A. Krupnov, G. Yu. Antonov, A. E. Druzhin, O. V. Krupnova</i>	
PREHARVEST SPROUTING RESISTANCE IN SPRING BREAD WHEAT CARRYING CHROMOSOME <i>6Agⁱ(6D)</i> FROM <i>AGROPYRON INTERMEDIUM</i>	444
<i>V. S. Yusov, M. G. Evdokimov, B. M. Tatina</i>	
VARIABILITY OF COMBINING ABILITY IN DURUM WHEAT DEPENDING ON GROWTH CONDITIONS ..	451
<i>G. V. Shchipak, R. A. Nedostupov, V. G. Shchipak</i>	
BREEDING DURUM WINTER WHEAT FOR IMPROVEMENT OF ADAPTIVE POTENTIAL AND YIELD ...	455
<i>G. V. Shchipak, Yu. V. Tsupko, A. P. Petrova, V. G. Shchipak</i>	
PRODUCTIVITY, ADAPTABILITY AND GRAIN QUALITY OF MODERN UKRAINIAN WINTER TRITICALE CULTIVARS	464
<i>A. A. Podgayetsky</i>	
INTERSPECIES CROSSES IN POTATO BREEDING IN UKRAINE	471
<i>E. E. Radchenko, T. L. Kuznetsova, N. V. Alpatieva</i>	
DYNAMICS OF THE GENETIC STRUCTURE OF THE KRASNODAR GREENBUG POPULATION UNDER HOST PLANT ALTERATION	480
<i>S. V. Shalimov</i>	
THREE CENTURIES OF BIOLOGY IN ST. PETERSBURG	488

УДК 57.08:577.21(091)

НИКОЛАЙ КОНСТАНТИНОВИЧ КОЛЬЦОВ – АВТОР ИДЕИ МАТРИЧНОГО СИНТЕЗА И ОСНОВАТЕЛЬ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ В РОССИИ

© 2012 г. Н.Н. Юрченко, О.В. Трапезов, И.К. Захаров

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: yurchen@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 9 апреля 2012 г. Принята к публикации 19 апреля 2012 г.

Николай Константинович Кольцов (1872–1940) прошел научный путь от сравнительной анатомии позвоночных к экспериментальной цитологии и далее – к генетике и молекулярной биологии. Им был открыт внутренний молекулярный скелет клеток. Он видел продуктивное развитие биологии только в союзе с физикой, химией и математикой. Он показал, что сильные физические и химические воздействия приводят к образованию мутаций у организмов; им был высказан принцип матричного синтеза биологических макромолекул. Н.К. Кольцов создал замечательную школу экспериментальной биологии, представители которой успешно развивали исследования в области частной генетики животных и растений, искусственного мутагенеза, генетики популяций и многих других научных направлений. На протяжении 40 лет Н.К. Кольцов занимался, по сути дела, одной определенной проблемой – принципами организации клетки. Его исследования происходили параллельно историческому развитию биологии, он активно участвовал в зарождении и развитии новых экспериментальных направлений в цитологии, биохимии, механике развития и генетике.

Ключевые слова: Н.К. Кольцов, сравнительная анатомия позвоночных, цитоскелет, физико-химические методы исследования в биологии, экспериментальная регуляция пола, партеногенез, химический и радиационный мутагенез, евгеника.

Там был блестящий Николай Кольцов, возможно, лучший зоолог нашего поколения, доброжелательный, немислимо образованный, ясно мыслящий ученый, обожаемый всеми, кто его знал.

Р. Гольдшмидт

Николай Константинович Кольцов родился 3 (15) июля 1872 г. в г. Москве в семье бухгалтера крупной меховой фирмы. Он очень рано лишился отца. Его семья была в родстве с известным театральным деятелем К.С. Станиславским и братьями С.С. и Н.С. Четвериковыми. С детства Н.К. Кольцов собирал гербарии и коллекционировал семена и насекомых, в юности много путешествовал: исходил пешком Московскую губернию и весь Крым. В возрасте 8 лет поступил в 6-ю Московскую гимназию, которую закончил с золотой медалью в 1890 г., и был принят в Московский университет.

В начале 90-х годов XIX в. биологи занимались сравнительной анатомией и эмбриологи-

ей для подтверждения эволюционной теории Ч. Дарвина. Н.К. Кольцов, будучи студентом, попал в великолепную школу зоологов Московского университета: орнитолог профессор М.А. Мензбир читал лекции по зоологии позвоночных и сравнительной анатомии; орнитолог П.П. Сушкин; приват-доцент, впоследствии профессор эмбриологии и гистологии В.Н. Львов; гистолог и философ Н.А. Иванцов; сравнительный анатом А.Н. Северцов.

Н.К. Кольцов с большим увлечением погружился в изучение сравнительной анатомии, которая привлекла его более высоким теоретическим уровнем по сравнению с другими зоологическими дисциплинами. Он принимал



Николай Константинович Кольцов

участие в издании литографированных лекций профессора М.А. Мензбира, изучал скелеты из музейной коллекции, препарировал хрящевой скелет ската. На третьем курсе М.А. Мензбир предложил Н.К. Кольцову попытаться написать сочинение «Пояс задних конечностей и задние конечности позвоночных» на золотую медаль. Для этого ему потребовалось проработать около 50 монографий и журнальных статей на иностранных языках: немецком, английском и французском. Н.К. Кольцов с задачей справился, написав к сроку книгу в несколько сот страниц с двумя десятками таблиц, рисунков, нарисованных пером. Проблема происхождения и развития парных конечностей позвоночных животных в то время вызывала ожесточенные споры. Кольцов глубоко проработал научную литературу по этой теме, просмотрел на препаратах большой материал по разным группам позвоночных и выработал свою оригинальную точку зрения.

В то время от студентов не требовалось самостоятельных экспериментальных исследований. Н.К. Кольцов же выбрал для самостоятельного исследования тему «Развитие таза у лягушки» и разрабатывал ее с позиции только

зарождающегося тогда нового направления в биологии — механики развития. В 1894 г. он сделал доклад по этой работе на секционном заседании Всероссийского съезда естествоиспытателей и врачей, резюме которого стало его первой научной публикацией.

Хотя Н.К. Кольцов специализировался по сравнительной анатомии, в студенческие годы он гораздо более увлекался гистологией и эмбриологией под влиянием своего преподавателя В.Н. Львова, который обучил его микроскопической технике и точности в экспериментальной работе. В.Н. Львов на втором курсе познакомил Н.К. Кольцова с книгой Августа Вейсмана «О зачатковом пути», которая на всю жизнь дала ему прививку от заражения ламаркизмом.

В 1894 г. Н.К. Кольцов окончил Московский университет с дипломом 1-й степени и золотой медалью и был оставлен «для подготовки к профессорскому званию», которая заключалась в изучении нескольких десятков толстых томов на иностранных языках, и сдачи в течение трех лет 6 магистерских экзаменов: по сравнительной анатомии и палеонтологии, зоологии позвоночных и беспозвоночных, ботанике и физиологии. Н.К. Кольцов проявлял самостоятельность мышления: например, известен его спор (на экзамене!) с профессором А.П. Павловым, в котором он трактовал по-своему предложенную К.А. Циттелем классификацию палеозойских и мезозойских крокодилов.

Целью магистерской подготовки было дать будущему профессору глубокую теоретическую базу к его будущей лекторской деятельности не из учебников, а на основе самостоятельной и критической проработки первоисточников. Из-за обширности материала это неизбежно приводило к узкой специализации. Так как Н.К. Кольцов готовился к лекционной деятельности по сравнительной анатомии позвоночных, то времени на чтение литературы по орнитологии, энтомологии, ботанике и физиологии ему просто не хватало, что входило в противоречие с его стремлением быть энциклопедически образованным специалистом-синтетиком во многих областях не только биологии, но и физики и химии. М.А. Мензбир в качестве специального вопроса для экзамена по сравнительной анатомии, для которого литература должна была быть

проработана с особой тщательностью, предложил Н.К. Кольцову цитологическую проблему клеточного деления «митоз и амитоз», которая заострила его интерес к цитологии.

После успешной сдачи магистерского экзамена в 1894 г. Н.К. Кольцов был направлен в заграничную командировку в Германию, в Киль, в лабораторию профессора В. Флемминга, известного цитолога в области митотического деления. У Н.К. Кольцова уже была готовая тема для исследования «Зародышевый путь при развитии амфибий», которую он выбрал себе еще на 2-м курсе университета под влиянием теории Вейсмана. Н.К. Кольцов предполагал, что внешние воздействия у амфибий могут регулировать пол, так как будущие зачатковые клетки рано обособливаются от соматических клеток и тем самым резко отличаются от последних. Ему казалось, что экспериментальным путем можно добиться превращения бесполок личинок в мужские или женские особи. В 1879 г. еще не было учения о половых хромосомах, и лаборатория Флеминга оказалась неподходящим местом для изучения такой темы.

В лаборатории Флеминга Н.К. Кольцов познакомился с молодым ассистентом Ф. Мевесом, который был специалистом по микроскопической технике и напечатал несколько работ по сперматогенезу у саламандры. При этом он был чистым морфологом, мало интересующимся физиологией, физикой и химией. Он не разделял интересов Н.К. Кольцова к литературе по индивидуальности хромосом, непрерывности пути зачатковых клеток и экспериментальной регуляции пола.

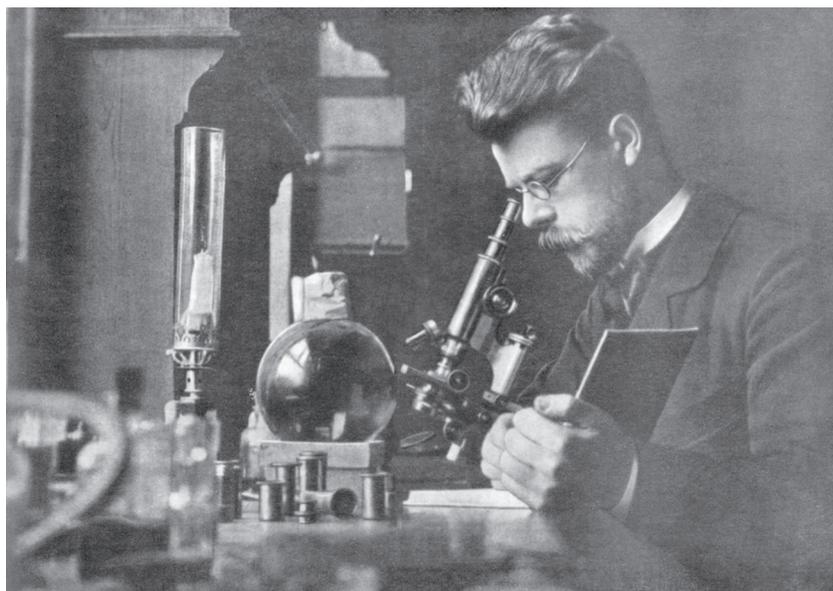
После полугодового пребывания в Киле Н.К. Кольцов овладел тончайшей микроскопической техникой, но разочаровался в чисто морфологическом подходе, царившем тогда в цитологии, и был огорчен невозможностью экспериментального подхода к своей теме. Он собрал большой фактический материал по развитию половых желез у амфибий и через год сделал доклад в Обществе испытателей природы, но печатать его не стал, так как уровень теоретических знаний того времени не позволил осветить этот материал с общебиологической точки зрения, как это признавал сам Н.К. Кольцов по прошествии 40 лет, а довольствоваться чисто морфологическим описанием он не захотел.

После Кили Н.К. Кольцов провел несколько месяцев на Неаполитанской зоологической станции. Он решил оставить на время цитологию и для диссертации взял тему по сравнительной анатомии – проблему происхождения головы позвоночных, которой начал заниматься еще В. Гёте, а затем Т. Гексли, К. Гегенбаур и Д. Дорн, на примере изучения стадий развития головы миноги. А. Дорн, возглавлявший работу Неаполитанской станции, способствовал сбору эмбриологического материала, обработку которого Н.К. Кольцов закончил во время пребывания на зоологической станции в Роскове и Виллафранке. Итогом этого исследования было опубликование на двух языках работы «Развитие головы миноги – к вопросу о метамерии головы позвоночных». Тем самым Н.К. Кольцов завершил «сравнительно-анатомический период» своей научной деятельности, так как считал, что чистый сравнительный и описательный методы исчерпали свои возможности и только синтетический подход в соединении с экспериментальными методиками физиологии развития и генетики являются основным направлением становления биологии.

За границей, на приморских станциях, Н.К. Кольцов познакомился с величайшим разнообразием животного мира и имел возможность изучать под микроскопом многочисленные виды одноклеточных организмов и широкое разнообразие клеточных и тканевых структур. Огромное значение для него имело знакомство с иностранными биологами, которые представляли основные направления в биологии того периода и будущего: А. Дорном и Р. Дорном, мюнхенским эмбриологом фон Купфером, Лаказ-Дютье, Ив Делажем, Робером, Лебреном, Г. Дришем, К. Гербстомом, Э. Вильсоном, Р. Гольдшмидтом, М. Гартманом.

В 1899 г. Н.К. Кольцов вернулся в Москву и уже в следующем году был утвержден приват-доцентом Московского университета в качестве лектора по цитологии. В 1901 г. он защитил магистерскую диссертацию о метамерии головы позвоночных, которая была опубликована в 1902 г.

1 января 1902 г. он вновь уезжает за границу на два года – в Виллафранку и Неаполь. Там после мучительного поиска подходящей модельной системы он приступил к изуче-



Н.К. Кольцов. Лаборатория в Гейдельберге.

нию организации клетки. Сначала он занялся изучением железистых клеток в мантии крылоногих моллюсков, которые можно было рассмотреть даже без микроскопа. Но описательные работы его не удовлетворяли: «... я вовсе не хотел их описывать, я хотел понять их организацию».

Н.К. Кольцов хотел наблюдать и экспериментировать с живыми клетками, которые были бы не связаны с тканью, чтобы можно было подвергать их различным средовым воздействиям. На эту роль подходили спермии десятиногих раков.

Эксперименты с живыми спермиями можно было проводить, зная основные законы физической и коллоидной химии: проблемы плазмолиза, осмотического давления, диссоциации солей в растворах. В начале работы Н.К. Кольцов установил резкое различие между действием изомолекулярных растворов органических соединений сахара, солей моно- и бивалентных катионов.

Своеобразная форма спермиев натолкнула Н.К. Кольцова на мысль о наличии твердых обручей в этих клетках. Эта идея стала руководящей в работе «Исследования о форме клеток», в которой Н.К. Кольцов не просто описывал и сравнивал, но объяснял и показывал общие физико-химические закономерности в организации клетки. Он считал, что «нельзя называть меха-

низмом распространение законов физики на биологические явления». Экспериментальный раздел своей основной и, как сам Н.К. Кольцов считал, лучшей из всего им написанного, работы состоял из трех частей: морфологической, биофизической и физиологической.

В 1904 г. Н.К. Кольцов вернулся в Москву для подготовки докторской диссертации. Он также подготовил отчет о преподавании зоологии в германских университетах, который был напечатан в журнале Министерства народного просвещения.

Его диссертация была принята физико-математическим факультетом Московского университета.

Кольцов решительно выступал за университетские свободы, еще в 1905 г. помогал печатать манифесты студенческого комитета, которые хранились в его кабинете в Московском университете, а в 1906 г. опубликовал брошюру «Памяти павших. Жертвы из среды московского студенчества в октябрьские и декабрьские дни». Спустя несколько дней после кровавого подавления декабрьской революции в знак солидарности с начавшейся тогда забастовкой студентов Кольцов отказался защищать диссертацию. Поддержка Н.К. Кольцовым революционного студенчества испортила его отношения с официальной профессурой, и защита диссертации сделалась невозможной.

Н.К. Кольцов решительно критиковал устаревшую систему образования в написанной им брошюре «Белые рабы», напечатанной анонимно в 1910 г.

Н.К. Кольцов читал лекции в Московском университете и на Высших женских курсах В.И. Герье с 1903 г. и также в Московском городском народном университете им. А.Л. Шанявского. Наряду с Московским государственным университетом в Москве существовал Московский городской свободный университет, открытый в 1905 г. по инициативе и на средства генерала Альфонса Леоновича Шанявского (1837–1905) и его жены Лидии Алексеевны (урожденной Родственной), наследницы иркутских золотопромышленников. Университет подчинялся не правительству, а Городской Думе. Лаборатории университета были оснащены первоклассным по тому времени оборудованием, здесь читались научно-популярные и специальные лекции по гуманитарным и естественно-научным дисциплинам, по истории живописи, архитектуры, скульптуры, истории музыки и музыкальных инструментов. Курс лекций по теоретическим основам фармакологии читал фармаколог и химик, петербургский профессор Н.П. Кравков. Н.К. Кольцов организовал в университете Шанявского первую специальную кафедру и лабораторию экспериментальной биологии, вокруг которых собралась группа талантливой молодежи, с чьей помощью он создал целую школу экспериментальной биологии. Слушатели принимались с 16-летнего возраста без каких-либо цензовых ограничений. По окончании университета они не получали аттестатов, уравненных с правами правительственных учебных заведений, но охотно приглашались на работу в частные и общественные учреждения. В 1919 г. Свободный народный Московский городской университет был закрыт, и на его базе была создана Высшая партийная школа. Во вводном курсе общей биологии он излагает свои новые взгляды на организацию клетки. Этот курс он читал в течение 25 лет, дополняя новыми данными – он никогда не издавал своих лекций. Н.К. Кольцов организовал беспрецедентный по объему для московских высших учебных заведений большой зоологический практикум, рассчитанный на два года при ежедневных занятиях. Для работы с пособиями для этого курса

от студентов требовались знания нескольких иностранных языков.

На Высших женских курсах он познакомился со студенткой Марией Полиевктовной Садовниковой, сестрой будущего академика, химика-органика П.П. Шорыгина, которая стала его женой в 1907 г.

Только на зимних и летних каникулах, в свободное от интенсивной преподавательской деятельности время, Н.К. Кольцов продолжает экспериментальные исследования, например, по изучению скелетных волокон, определяющих форму головки сперматозоидов у различных животных. Летом 1907 г. он снова посещает Неаполь, где заканчивает вторую часть труда «Исследования о форме клетки». Открытым им волокнам в неподвижных головках сперматозоидов он приписал формоопределяющую функцию. В 1910 г. в Неаполе и в Виллафранке он проводил опыты по изучению влияния пониженного осмотического давления и измененного ионного состава на морские сувойки, зоотамнии.

В это время физико-химическая биология успешно развивалась и открывала новые экспериментальные подходы к изучению динамики сократимости живых клеток. В третьей части «Исследований о форме клетки» Кольцов привел опыты с *Zoothamnium alternans*. Им было показано, что сократимый стебелек сувойки количественно реагирует на изменения в составе ионов в окружающем растворе.

Параллельно с научными изысканиями Н.К. Кольцов выступает в печати по актуальным вопросам общественной жизни России: в 1909–1910 гг. выпускает в свет книгу «К университетскому вопросу», в которой призывает к реформам в системе образования.

В феврале 1911 г. Кольцов вместе с 60 профессорами и доцентами подал в отставку в знак протеста против реформ министра народного просвещения Л.А. Кассо, который издал ряд предписаний, свертывающих автономию университетов, но он остался профессором в Университете Шанявского и на Высших женских курсах. Н.К. Кольцов сорвал план правительства пригласить на вакантные должности в российские университеты немецких профессоров, – ему удалось донести до ученых в западноевропейских университетах мотивы такого предложения и они отказались его принять.

Идея об определении формы клетки скелетными образованиями была благоприятно встречена иностранными учеными: Ф. Мевесом, в лабораториях Р. Гертвига и О. Бючли. Р. Гольдшмидт в своей монографии ввел понятие «кольцовский принцип» для объяснения формы нервных и мускульных клеток у аскариды. На этот принцип ссылались сотрудники Гейдельбергского зоологического института профессор Шуберт, д-р Гамбургер, д-р Цюльцер, шотландский ученый Д. Томпсон, известный американский цитолог Э. Вильсон и М. Гартман в первом томе своей монографии «Общая биология».

После 1912 г. Н.К. Кольцов занимается организационной работой по созданию в Университете Шаняевского научно-исследовательской лаборатории в Москве.

Из нее вышла замечательная плеяда российских ученых: М.М. Завадовский, А.С. Серебровский, С.Н. Складовский, Г.В. Эпштейн, Г.И. Роскин, П.И. Живаго, И.Г. Коган, В.Г. Савич, В.В. Ефимов. Лаборатория университета была хорошо оборудована импортной физико-химической аппаратурой, что позволяло, например, впервые в биологии определять концентрацию Н-ионов электрометрическим методом. В лаборатории также были сделаны пионерские работы по гормональной регуляции развития щитовидной и половой желез.

В 1915 г. Императорская академия наук предложила Н.К. Кольцову возглавить вновь создаваемую кафедру экспериментальной биологии в Санкт-Петербурге и стать ее действительным членом-академиком, но он не захотел покидать Москву и своих учеников, и в 1916 г. был избран членом-корреспондентом.

В 1916 г. Н.К. Кольцов берется за организацию Института экспериментальной биологии Общества Московского научного института. Это была новая для России форма чисто научно-исследовательского биологического учреждения, не связанного с преподавательской деятельностью. Н.К. Кольцов активно пропагандировал идею создания такого учреждения в публичных выступлениях и в печати.

Институт экспериментальной биологии открылся в середине 1917 г. В его стенах начала успешно развиваться русская генетика. Считается, что генетика как новая биологическая

наука зародилась в 1900 г. Русские биологи-эволюционисты вначале ее игнорировали. Менделевские методы только-только начали применяться в растениеводстве, в животноводстве же господствовали отжившие неолитаркистские взгляды. Работы Т. Моргана на дрозофиле, проводившиеся в Колумбийском университете, в течение целого десятилетия после своего появления в печати вообще не были известны в России. Многие российские биологи не признавали связи между хромосомами и наследственностью. Несмотря на эти неблагоприятные обстоятельства, Н.К. Кольцов решил избрать именно генетические исследования, как общие, так и прикладные, самыми главными в работе Института экспериментальной биологии. В кольцовском институте начали работать впоследствии ставшие известными генетики: С.С. Четвериков, Н.В. Тимофеев-Ресовский, Е.А. Тимофеева-Ресовская, Н.К. Беляев, Б.Л. Астауров, Е.И. Балкашина, Д.Д. Ромашов, А.Н. Промтов, П.Ф. Рокицкий, С.Р. Царапкин, С.М. Гершензон, Н.П. Дубинин.

В 1919 г. Н.К. Кольцов входит в группу либеральных общественных деятелей, которая обсуждает научные вопросы восстановления социально-экономической жизни России после Октябрьского переворота. В ЧК было сфабриковано дело «Тактического центра». В августе 1920 г. в Политехническом музее начался процесс. В числе 20 обвиняемых Н.К. Кольцов был приговорен к расстрелу, но вскоре освобожден, благодаря ходатайствам П.А. Кропоткина, М. Горького и А.В. Луначарского перед В.И. Лениным, который лично отменил приговор. Даже в ожидании казни Н.К. Кольцов оставался ученым, изучая «какое влияние на вес тела производят душевные переживания». Эти наблюдения вошли в статью «Об изменении веса человека при неустойчивом равновесии», опубликованную в «Известиях ИЭБ» за 1921 г.

1 января 1920 г. Институт экспериментальной биологии был включен в систему научно-исследовательских учреждений Наркомздрава. Это имело огромное значение для развития Института — ряд активно работающих сотрудников-волонтеров были включены в штат. При Институте были созданы отделы по главным отраслям экспериментальной биологии: генетике, цитологии, эндокринологии, физико-хи-

мической биологии, гидробиологии, механике развития, зоопсихологии, евгенике, экспериментальной хирургии, культуре тканей. Институт располагал кабинетом микрофотокиносъемки, при институте были открыты гидробиологическая и генетическая станции. Работа генетической станции была напрямую связана с Отделом животноводства Наркомзема РСФСР и Комиссией по изучению производительных сил Академии наук СССР для внедрения генетики непосредственно в медицину и практическую деятельность по выведению новых пород животных и сортов растений. Поддержку ИЭБ оказывали министерства здравоохранения, просвещения, земледелия, а также АН СССР, МГУ, издательство медицинской и биологической литературы – Биомедгиз. В 1920-е гг. ИЭБ посетили видные зарубежные ученые: К. Бриджес, Г. Меллер, Дж.Б.С. Холдейн, О. Фогт, У. Бэтсон, Р. Гольдшмидт, З. Ваксман, С. Дарлингтон. В библиотеку института поступали все ведущие биологические журналы мира. Сам институт издавал ряд научных журналов, преемником которых является современный «Журнал общей биологии».

Работы в области генетики животных

Н.К. Кольцов глубоко понимал значение генетики для практики животноводства. Еще в 1918 г. им была организована Аниковская генетическая станция, специализировавшаяся по генетике сельскохозяйственных животных. Несколько позже в Тульской области была организована другая станция – по птицеводству. В начале 1920-х гг. обе станции были объединены, получили новое название: «Центральная станция по генетике сельскохозяйственных животных», директором которой в разные годы был сам Н.К. Кольцов и его ученики. По результатам экспериментальной работы на станции уже на I Всероссийском съезде по племенному делу в 1923 г. Н.К. Кольцов убеждал участников в необходимости изучать генетику и решительно отказаться от ламаркизма (Бабков, 2006. С. 457).

Громадная заслуга Н.К. Кольцова состояла в том, что он привлек для работы на станции много талантливых людей, известных впоследствии как создатели целых направлений в генетике и

селекции отдельных видов сельскохозяйственных животных.

В 1924 г. будучи директором Аниковской генетической опытной станции, Н.К. Кольцов приглашает на работу в качестве заведующего отделом овцеводства Бориса Николаевича Васина. Васин со второго курса Московского зоотехнического института занимался генетикой дрозофил, но вскоре предпочел работать по генетике овец, что предвещало получение интересных практических результатов.

В ИЭБ была также организована лаборатория Н.П. Дубинина, откуда в 1932 г. вышло первое отечественное методическое руководство по частной генетике кроликов.

Особо интересными были работы по выяснению природы и механизмов поддержания генетической изменчивости окраски меха в природных популяциях пушных зверей, которые проводились в лаборатории С.С. Четверикова, Д.Д. Ромашовым совместно с Е.Д. Ильиной из Института пушного звероводства (г. Балашиха), поскольку в конце 1920-х годов в Северной Америке и Европе стала интенсивно развиваться новая отрасль – клеточное пушное звероводство. К этому времени в нашей стране в аппарате Госторга НКВТ на основе положений проекта Ф.Г. Мальнера уже было принято решение о создании специализированных звероводческих хозяйств и был сформирован отдел звероводства, который возглавил один из первых лидеров звероводческой отрасли А.М. Дижбит.

С 1927 по 1929 гг. Д.Д. Ромашовым и Е.Д. Ильиной была проведена большая работа по фенотипическому анализу окрасочного разнообразия природных популяций лисиц – объектов звероводческой отрасли. В 1931 г. на Дарвиновском семинаре ИЭБ докладываются материалы по изменчивости окраски меха у лисиц в ареале их обитания на площади около 3 тыс. км². Представленные данные были восторженно встречены участниками семинара, ведь изложенные авторами результаты способствовали преодолению кризиса непонимания, который в ту пору существовал между генетиками и зоологами-дарвинистами. Сами обстоятельства настоятельно требовали ввести в обиход генетиков наряду с модельными дрозофилиными объектами данные по большим выборкам из природных популяций, адаптивность

генотипов в которых оценивалась не в пробирках, а в условиях свойственного популяции ареала. Дарвиновский семинар ИЭБ рекомендовал представить изложенные материалы в том же году на очередном съезде зоологов. Таким образом, именно это заседание Дарвиновского семинара ИЭБ следует считать точкой отсчета, когда впервые генетики и российские зоологи-звероводы заговорили на общем языке.

В ходе дальнейшей обработки собранных данных в расчетах Д.Д. Ромашова и Е.Д. Ильиной получалось, что кажущаяся на первый взгляд неупорядоченность окрасочного разнообразия в диких популяциях лисиц в действительности управляется строгим математическим законом. Вскрытая закономерность не только подчинялась правилу Харди, она замечательным образом иллюстрировала вышедшую еще в 1869 г. работу «Социальная физика...», написанную основателем статистики и научного учения об индивидуальной изменчивости бельгийским философом А. Кэтле (1796–1874), в которой указывалось на том, что его цель – показать, что в мире, где многие упорно видят только беспорядочный хаос, существуют всесильные и неизменные законы, столь же прочные и непреложные, как законы, управляющие небесными телами. Эти законы существуют вне времени и вне людских прихотей. Работа Ильиной и Ромашова, проведенная на пушных зверях, впервые экспериментально иллюстрировала соотношение случайных и закономерных процессов в эволюции – новое научное направление, которое в конце 1920-х гг. оформилось под названием «математическая теория эволюции» и разрабатывалось в начале 1930-х гг. представителями американской школы Р. Фишером и С. Райтом, а в нашей стране – Н.П. Дубининым и Д.Д. Ромашовым в ИЭБ. Работа, сделанная Е.Д. Ильиной и Д.Д. Ромашовым на лисице показала, что количественное расплывчатое определение дарвиновской эволюции может быть формализовано в математически четких терминах, указавших ее естественные пределы на популяционном уровне.

Н. К. Кольцов не оставлял и теоретические изыскания в области организации клетки. Он изучил движения хроматидов различных животных: головоногих моллюсков, костистых рыб и амфибий, для этого в 1924 и 1927 гг. он побывал на Неаполитанской зоологической

станции. В 1930 г. в Сорбонне он прочитал доклад по этой теме.

Интерес генетиков-теоретиков к шелководству определялся развитием шелководства в стране, а также тем, что научно-организационным центром, координирующим изучение естественных производительных сил страны при АН СССР – КЕПС, руководил Н.К. Кольцов. В 1929 г. по совету Н.К. Кольцова в Среднеазиатский институт шелководства и шелководения (САНИИШ), г. Ташкент, перешел Н.К. Беляев. Позднее, в 1930 г., руководствуясь советом Николая Константиновича Беляева, перешел в этот институт и Б.Л. Астауров. Н.К. Кольцов также занимается вопросом искусственного партеногенеза шелковичного червя под воздействием самых разнообразных физических и химических раздражителей. Эту работу продолжили С.Л. Фролова (Фролова, 1935; Аргутинская, Захаров, 2005; Захаров, Шумный, 2005, 2006) и Б.Л. Астауров, которые получили многие десятки тысяч партеногенетических шелковичных червей и бабочек при воздействии высокой температуры на неоплодотворенные яйца. В.А. Струнников открыл возможность получения мейотического партеногенеза.

Н.К. Кольцов занимался экспериментальной полиплоидией. Его ученик В.В. Сахаров использовал колхицин в качестве индуктора удвоения хромосом у гречихи и других растительных объектов. В.В. Сахаров получил значительное число видимых и летальных мутаций при воздействии крепких растворов йода на оплодотворенные яйца дрозофилы, тем самым открыв химический мутагенез (Сахаров, 1935).

Одной из блестящих идей Н.К. Кольцова была идея «экспериментального получения мутаций при воздействии рентгеновскими лучами на организм». Над этой проблемой работали его сотрудники Д.Д. Ромашев и Н.В. Тимофеев-Ресовский. Они делали эту работу на неизученных с генетической точки зрения местных грибных видах дрозофилы, при отсутствии точных методов учета мутаций. К сожалению, эти эксперименты не дали положительного результата. Более удачлив в продвижении в этом направлении оказался американский генетик Г. Мёллер на виде *Drosophila melanogaster* из лаборатории Т. Моргана. За свои работы Г. Мёллер получил Нобелевскую премию в 1946 г.

В 1921 г. Мёллер посетил Россию и ИЭБ и сообщил Н.К. Кольцову и С.С. Четверикову о работах школы Моргана по хромосомной теории наследственности на *Drosophila melanogaster*. С.С. Четвериков организовал на Звенигородской биостанции генетические исследования по поиску мутаций в природных популяциях дрозофил.

Н.К. Кольцов – один из первых, кто стал использовать физико-химические методы для решения проблем в области цитологии, механизмов наследственности и развития – об этом свидетельствуют названия его опубликованных статей: «Физиологический ряд катионов» (1912 г.), «Влияние водородных ионов на фагоцитоз у пресноводных сувоек» (1915 г.), «Физико-химические основы раздражимости пигментных, мускульных и железистых клеток (1929 г.)». В 1927 г. в Ленинграде на III Всесоюзном съезде зоологов, анатомов и гистологов он выступил с программным докладом «Физико-химические основы морфологии», в котором сформулировал в общем виде матричный принцип репродукции наследственных молекул (хромосом): «каждая молекула от молекулы – *Omnis moleculae ex molecula*». При этом на протяжении всей жизни Кольцов отрицал роль ДНК как носителя генетической информации. Он считал, что эту роль выполняют более сложноустроенные белковые молекулы.

Н.К. Кольцова порой называли «механистом», упрощенцем. Кольцов же стремился свести сложность биологических процессов до простоты химических и физических процессов, протекающих в молекулярных структурах, для последующего синтеза на организменном уровне. Открытие дифракции рентгеновских лучей на кристаллах породило у Н.К. Кольцова следующее пророческое утверждение: «Биологи ждут, когда эти методы (рентгеноструктурного анализа) будут усовершенствованы настолько, что можно будет при их помощи изучить кристаллическую структуру внутриклеточных скелетных твердых структур белкового и иного характера».

В 1933 г. Кольцов был избран почетным членом Эдинбургского Королевского общества; в 1934 г. был удостоен звания заслуженного деятеля науки РСФСР; в 1935 г. Н.К. Кольцов был избран академиком ВАСХНИЛ и доктором зоологии.

Вместе со своим сотрудником С.Г. Левитом Н.К. Кольцов занимается генетикой человека в Евгеническом отделе ИЭБ, а с Ю.А. Филиппенко основывает Русское евгеническое общество, издает «Русский евгенический журнал». Н.К. Кольцов очень широко трактует вопросы евгеники. По его мнению, она должна заниматься составлением генеалогий; географией болезней; витальной статистикой; социальной гигиеной и др. Евгенический отдел занимался исследованиями генетики психических особенностей человека, типов наследования биохимических показателей групп крови, наследованием цвета волос и глаз, изменчивостью и наследственностью сложных признаков у однояйцевых близнецов. При отделе работала первая медико-генетическая консультация. Благодаря «Русскому евгеническому журналу» широкий круг людей познакомился с родословными А.С. Пушкина, Л.Н. Толстого, К. Бэра, Бакуниных, соратников Петра I. В публичных лекциях Н.К. Кольцов говорил об уроне, нанесенном революцией и гражданской войной генофонду русской нации.

Жертвами гонения на генетику 1930-х годов оказались и сам Н.К. Кольцов, и его Институт. В 1930 г. был упразднен Евгенический отдел в кольцовском Институте экспериментальной биологии, прекратило свое существование Русское евгеническое общество, закрылся журнал. В статье «Евгеника» в Большой Советской Энциклопедии за 1931 г. было написано: «Н.К. Кольцов пытался перенести в советскую практику выводы фашистской евгеники». (Бабков В.В. «Заря генетики человека», Эволюция и генетика человека в контексте эпохи (Н.К. Кольцов, Г.Г. Меллер и И.В. Сталин). На самом деле кольцовская евгеника не имела ничего общего с фашистской программой «санации нации», а призывала к созданию в России широкой сети учреждений медико-генетического консультирования.

В апреле 1939 г. Н.К. Кольцов был снят с должности директора института после статьи «Лжеученым не место в Академии наук» в газете «Правда», в которой в резкой форме подвергались критике старые статьи Н.К. Кольцова по евгенике.

В состав Академии наук СССР Н.К. Кольцов так и не был избран.

2 декабря 1940 г. Н.К. Кольцов скончался от обширного инфаркта и был похоронен в Ленинграде на Волковском кладбище. Его жена, Мария Полиевктовна, написала о смерти Н.К. Кольцова в Москву — и покончила с собой.

В 1976 г. Институту биологии развития АН СССР было присвоено имя Н.К. Кольцова. В честь него получил название наукоград «Кольцово» под Новосибирском. В феврале 2000 г., в Санкт-Петербурге состоялся симпозиум «Генетика народонаселения», посвященный Н.К. Кольцову, — первая ласточка признания его евгенических идей.

Литература

- Аргутинская С.В., Захаров И.К. Николай Константинович Беляев // Информ. вестник ВОГиС. 2005. Т. 9. № 2. С. 99–105.
- Бабков В.В. Москва, 1934: рождение медицинской генетики // Информ. вестник ВОГиС. 2006. Т. 10. № 3. С. 455–478.
- Захаров И.К., Шумный В.К. 100-летие со дня рождения академика Б.Л. Астаурова // Информ. вестник ВОГиС. 2005. Т. 9. № 2. С. 91–98.
- Захаров И.К., Шумный В.К. Шелковая нить жизни: академик Владимир Александрович Струнников (1914–2005) // Информ. вестник ВОГиС. 2006. Т. 10. № 1. С. 213–218.
- Сахаров В.В. Иод как химический фактор, действующий на мутационный процесс у *Drosophila melanogaster* // Биол. журнал. 1935. Т. IV. Вып. 2.
- Фролова С.Л. Цитология искусственного партеногенеза тутового шелкопряда // Биол. журнал. 1935. Т. 4. Вып. 2.
- Статьи и монографии Н.К. Кольцова**
- Кольцов Н.К. Исследования о форме клетки. Часть I. Исследование о спермиях десятиногих раков в связи с общими соображениями относительно организации клетки. М.: Унив. тип., 1905. 200 с.
- Кольцов Н.К. Памяти павших. Жертвы из среды московского студенчества в октябрьские и декабрьские дни. М.: Бурче, 1906. 90 с.
- Кольцов Н.К. Исследования о форме клетки. Часть II. 1908.
- Кольцов Н.К. Образование новых видов и число хромосом // Усп. эксперим. биологии. 1922. Т. 1. Вып. 2.
- Кольцов Н.К. Генетический анализ психических особенностей человека // Рус. евген. журнал. Т. 1. Вып. 3/4. 1923.
- Кольцов Н.К. Улучшение человеческой породы. Пг., 1923.
- Кольцов Н.К. Влияние культур на отбор в человечестве // Рус. евген. журнал. 1924. Т. 2. Вып. 1.
- Кольцов Н.К. Жизнь // Научное слово. 1928. № 9.
- Кольцов Н.К. Физико-химические основы морфологии //

- Усп. эксперим. биологии. 1928. Сер. Б. Т. 7. Вып. 1.
- Кольцов Н.К. Задачи и методы изучения расовой патологии // Рус. евген. журнал. 1929. Т. 7. Вып. 2/3.
- Кольцов Н.К. Об экспериментальном получении мутаций // Журн. эксперим. биологии. 1930. Т. 6. Вып. 4.
- Кольцов Н.К. Проблема прогрессивной эволюции // Биол. журнал. 1933. Т. 2. № 4/5. С. 475–500.
- Кольцов Н.К. Наследственные молекулы // Наука и жизнь. 1935. № 5.
- Кольцов Н.К. Организация клетки. Сб. экспериментальных исследований, статей и речей. 1903–1935. М.; Л.: Биомедгиз, 1936. 652 с.
- Кольцов Н.К. Структура хромосом и обмен веществ в них // Биол. журнал. 1938. Т. 7. № 1.
- Кольцов Н.К. Физико-химические основы морфологии // Классики советской генетики. 1920–1940. Л., 1968.
- Кольцов Н.К. Предисловие к книге «Организация клетки» (1936). Повторная публикация; вступит. ст. // Онтогенез. 1972. № 4. С. 339–359.
- Кольцов Н.К. О науке. Подборка высказываний Н.К. Кольцова; Вступит. Замечания Б.Л. Астаурова; портрет // Природа. 1972. № 7. С. 32–35.
- Н.К. Кольцов. Избранные труды. Сер. «Памятники отечественной науки. XX век». М.: Наука, 2006. 295 с.

Статьи о Н.К. Кольцове

- Астауров Б.Л. Николай Константинович Кольцов (3.VII. 1872–2.XII.1940) // Наука и жизнь. 1973. № 1. С. 47–53.
- Астауров Б.Л., Рокицкий П.Ф. Николай Константинович Кольцов. «Научно-биографическая литература», АН СССР. М.: Наука, 1975. 168 с.
- Бабков В.В. Кольцов: борьба за автономию науки и поиски поддержки власти // ВИЕТ. 1989. № 3. С. 3–19.
- Бабков В.В. Московская школа эволюционной генетики. М.: Наука, 1989.
- Бабков В.В. Н.К. Кольцов и его Институт в 1938–1939 гг. // Онтогенез. 1992. № 4. С. 443–459.
- Бабков В.В. Заря генетики человека. Русское евгеническое движение и начало медицинской генетики. М.: Прогресс-Традиция, 2008. 816 с.
- Винберг Г.Г. Кольцовское начало // Химия и жизнь. 1972. № 7. С. 31–34.
- Евгеньев М.Б. Кольцовские чтения // Вестн. АН СССР. 1972. № 11. С. 121–123.
- Канаев И.И. Николай Константинович Кольцов (к 100-летию со дня рождения) // Цитология. 1972. Т. 14. № 9. С. 1201–1203.
- Рапопорт И.А. Кольцов, каким я его помню // Химия и жизнь. 1972. № 7. С. 34–38.
- Рокицкий П.Ф. Научные воззрения Н.К. Кольцова: (к 100-летию со дня рождения) // Вопр. философии. 1972. № 7. С. 90–101.
- Рокицкий П.Ф. Роль Н.К. Кольцова в развитии общей и экспериментальной биологии в нашей стране // Природа. 1972. № 7. С. 24–31.
- Рокицкий П.Ф. Н.К. Кольцов и современная биология: (воспоминания и сопоставления) // Неман. № 10. С. 141–146.

- Рокицкий П.Ф. Влияние школы Н.К. Кольцова на развитие генетики и цитологии в СССР // Пробл. эксперим. генетики. Минск: Наука и техника, 1972. С. 3–11.
- Сидоров Б.Н. Николай Константинович Кольцов // Генетика. 1972. Т. 8. № 8. С. 170–172.
- Энгельгарт В.А. У истоков отечественной молекулярной биологии // Природа. 1972. № 6. С. 56–65.
- Николай Константинович Кольцов. Вступительная статья Б.Л. Астаурова; портрет. М.: Наука, 1973. (Сер. «Биография ученых СССР»).
- Польнин В. Пророк в своем отечестве. М.: Сов. Россия, 1969. 126 с.
- Гайсинович А.Е., Россиянов К.О. «Я глубоко убежден, что я прав...», Н.К. Кольцов и лысенковщина // Природа. 1989. № 5. С. 86–95.
- Сойфер В.Н. Власть и наука, История разгрома генетики в СССР. М.: Изд-во «Лазурь», 1993.
- Сойфер В.Н. Мужество великого Кольцова // Наука и жизнь. 2002. № 8.

**NIKOLAI KONSTANTINOVICH KOL'TSOV,
THE AUTHOR OF THE TEMPLATE-DIRECTED SYNTHESIS CONCEPT
AND FOUNDER OF EXPERIMENTAL BIOLOGY IN RUSSIA**

N.N. Yurchenko, O.V. Trapezov, I.K. Zakharov

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

Summary

Nikolai K. Kol'tsov (1872–1940) went on his scientific way from comparative anatomy of vertebrates to experimental cytology and then to genetics and molecular biology. He discovered the cytoskeleton. He foresaw that the successful development in biology would require a union with physics, chemistry, and mathematics. He demonstrated that strong physical and chemical factors could produce mutations in organisms. He also put forward the concept of template-directed synthesis of biopolymers. Professor Kol'tsov established a prominent school of experimental biologists, who succeeded in studies of special genetics of animals and plants, artificial mutagenesis, population genetics, and other fields. For four decades Koltsov was working on one major problem, cell organization. His studies were in line with trends in global biology. He participated in the creation and development of new experimental approaches in cytology, biochemistry, developmental mechanics, and genetics.

Key words: N.K. Kol'tsov, comparative anatomy of vertebrates, cytoskeleton, physicochemical methods in biology, experimental sex determination, parthenogenesis, chemical and radiation mutagenesis, eugenics.

УДК 575.822(092)

ДМИТРИЙ КОНСТАНТИНОВИЧ БЕЛЯЕВ. ЭВОЛЮЦИЯ, СЖАТАЯ ВО ВРЕМЕНИ СОИЗМЕРИМО С ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ ВЕКОМ

И.К. Захаров^{1,2}, Ю.Э. Гербек¹, О.В. Трапезов¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: zakharov@bionet.nsc.ru;

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 12 мая 2012 г. Принята к публикации 29 мая 2012 г.

Академик Дмитрий Константинович Беляев находился в эпицентре событий отечественной биологической науки: участвовал в возрождении генетики, подвергавшейся запрету и гонениям многие годы в СССР, в организации и становлении Сибирского отделения Академии наук СССР и Института цитологии и генетики в его составе, в налаживании связей с мировым генетическим сообществом. Его концепция и дестабилизирующего отбора прошла полувекую экспериментальную проверку и продолжает свое дальнейшее развитие.

Ключевые слова: Беляев Д.К., ИЦиГ, СО АН СССР, генетика, темпы эволюции, дестабилизирующий отбор, изменчивость, экспериментальная domestикация, антропогенез, стресс, агрессия, альтруизм.



17 июля 2012 г. исполняется 95 лет со дня рождения выдающегося биолога-эволюциониста, генетика и селекционера, организатора науки и экспериментальной ее базы, педагога, солдата-фронтовика и гражданина СССР – академика Дмитрия Константиновича Беляева. Д.К. Беляев – специалист в области эволюционной теории, биологии и генетики пушных зверей, генетики и селекции животных, генетики и физиологии стресса, закономерностей фотопериодизма у животных, генетики поведения и биосоциальной природы человека. Д.К. Беляев четверть века (1959 по 1985 гг.) возглавлял Институт цитологии и генетики Сибирского отделения АН СССР, ставший крупнейшим комплексным по проводимым в нем фундаментальным и прикладным исследованиям генетическим, цитологическим и молекулярно-биологическим центром страны. В 1958 г. Д.К. Беляев организовал лабораторию частной генетики животных и до 1985 г. был ее заведующим (с 1963 г.

лаборатория эволюционной генетики животных ИЦиГ СО АН СССР). Д.К. Беляев поддерживал развитие и стоял у истоков формирования новых в Сибири направлений в биологии, в том числе цитологии и цитогенетики, биоинформатики и генетической инженерии, иммуногенетики и медицинской генетики, физиологической генетики животных, генетики и селекции растений (Шумный, 1987; Дмитрий ..., 2002; Ратнер, 2002; Колчанов, Захаров, 2005; Трут, 2008).

Идея создания Института цитологии и генетики и ее реализация по времени совпали с организацией Сибирского отделения АН СССР, 55-летие которых отмечается в этом году. Создание комплекса научных учреждений сразу по множеству научных дисциплин и направлений было в свое время уникальным проектом не только в СССР, но и в мире. За Уралом в короткие сроки был создан еще один мощный научный центр после Москвы, Ленинграда и Киева – Новосибирский научный центр, известный в мире как Академгородок.

Всесторонняя поддержка руководства Сибирского отделения АН СССР сыграла решающую роль в создании и развитии Института цитологии и генетики СО АН СССР, в возрождении генетики в нашей стране. Организаторы Сибирского отделения, сами не будучи специалистами-биологами, проявили громадную прозорливость и принципиальность, включив с самого начала в список институтов Сибирского отделения Институт цитологии и генетики (Постановление Президиума АН СССР от 7 июня 1957 г. № 448). Основную ответственность за существование ИЦиГ в составе Сибирского отделения взял на себя и нес долгие годы первый его председатель академик М.А. Лаврентьев. За полвека существования ИЦиГ СО РАН разные периоды были связаны с трудностями совершенно различного характера. В первое десятилетие становления Института, когда в результате проверок различными и частыми комиссиями с предвзятыми и конкретными установками «покончить с менделизмом-морганизмом» Институт не раз подводили на грань ликвидации или перепрофилирования, М.А. Лаврентьеву приходилось принимать неординарные решения, которые спасали Институт.

С именем Д.К. Беляева связаны важнейшие события отечественной науки: возрождение ге-

нетики, подвергавшейся в СССР запрету и гонениям многие годы, организация и становление Сибирского отделения Академии наук СССР и Института цитологии и генетики в его составе, налаживание связи с мировым генетическим сообществом и признание отечественной классической генетики.

Д.К. Беляев уделял много внимания подготовке квалифицированных генетических кадров: с 1962 г. он организатор и заведующий кафедрой общей биологии, а с 1967 г. – организатор и заведующий кафедрой цитологии и генетики факультета естественных наук Новосибирского государственного университета. Д.К. Беляев был председателем Специализированного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора биологических наук при ИЦиГ СО АН СССР (1976–1985 гг.).

Поддерживая и развивая принципы, заложенные при создании Института Н.П. Дубининым, для создания и развития новых подразделений и направлений исследований директор ИЦиГ Беляев приглашает известных ученых, среди них Р.Л. Берг, Н.Н. Воронцов, В.В. Хвостова, Е.П. Раджабли (Гогейзель) и С.И. Раджабли, О.И. Майстренко, Л.И. Корочкин, М.Г. Колпаков, Л.И. Иванова, Е.В. Науменко, Н.К. Попова, Ю.Г. Целлариус и др.

Следует отметить и заслуги Д.К. Беляева в становлении и развитии Сибирского отделения АН СССР. В 1976–1985 гг. Д.К. Беляев избирался заместителем председателя СО АН СССР. Систематически проводились выездные сессии Президиума СО АН СССР и Объединенного ученого совета по биологическим наукам (с 1980 г. Д.К. Беляев был его председателем) в филиалы и научные центры СО АН СССР, что обеспечивало широкое ознакомление, обсуждение и планирование исследований, позволяло направлять средства на наиболее перспективные исследования в биологии. Д.К. Беляев внес крупный вклад в организацию фундаментальных и прикладных биологических исследований в Сибири, в развитие сотрудничества с Сибирскими отделениями ВАСХНИЛ и АМН СССР, в создание комплексных координационных межведомственных программ с четко сформулированной конечной задачей, дающей существенный вклад в фундаментальную науку и народное хозяйство (Захаров и др., 2007; Трут и др., 2007).

Д.К. Беляев многие годы был председателем Проблемного совета по генетике и селекции при Президиуме АН СССР. На этих постах он курировал все биологические исследования, проводимые в Сибири. Беляев принимал активное участие в организации Всесоюзного общества генетиков и селекционеров, много сил приложил для того, чтобы Обществу было присвоено имя Н.И. Вавилова, а с 1967 по 1985 гг. был вице-президентом и председателем Сибирского отделения ВОГиС им. Н.И. Вавилова. В июле 1978 г. Д.К. Беляев избран генеральным секретарем XIV Международного генетического конгресса (Москва, 1978 г.) и президентом Международной генетической федерации на период 1978–1983 гг.

В 1946–1957 гг. Д.К. Беляев работал старшим научным сотрудником, а затем был назначен заведующим отделом селекции и разведения Всесоюзной научно-исследовательской лаборатории пушного звероводства и пантового оленеводства (ВНИЛЗО) НКВТ СССР. В 1957 г. его назначают заведующим отделом разведения Всесоюзного научно-исследовательского института пушного звероводства и кролиководства (станция Удельная Московская область).

С февраля 1958 г. Д.К. Беляев навсегда связывает свою жизнь с Сибирским отделением АН СССР. По приглашению чл.-корр. АН СССР Н.П. Дубинина он возглавляет отдел генетики животных в организуемом Институте цитологии и генетики СО АН СССР, становится заведующим лабораторией частной генетики и с октября 1958 г. – заместителем директора Института. После вынужденного ухода из ИЦиГ и отъезда Н.П. Дубинина в Москву в октябре 1959 г. Д.К. Беляев в течение 5 лет исполнял обязанности директора ИЦиГ и только в 1965 г. был утвержден в должности директора ИЦиГ СО АН СССР.

В это первое сложное для генетики десятилетие существования ИЦиГ СО АН СССР Д.К. Беляев взял на себя ответственность за сохранение и становление ИЦиГ, за дальнейшую организацию и кадровую политику, формирование и развитие научных направлений в Институте, определение соотношения фундаментальных и прикладных исследований, решение большого круга практических задач.

Следует подчеркнуть, что в течение целого десятилетия, до создания в 1966 г. Института общей генетики им. Н.И. Вавилова АН СССР в Москве, новосибирский ИЦиГ СО АН СССР оставался единственным крупным и комплексным генетическим институтом в стране, в котором «под одной крышей» были собраны и сконцентрированы со всего Советского Союза остатки основных генетических школ и получили развитие основные направления теоретической и практической генетики всех уровней организации живого – молекулярная генетика, цитология и цитогенетика, частная генетика растений и животных, популяционная и эволюционная генетика, а также селекция (Захаров и др., 2007).

Д.К. Беляев считал важным создать экспериментальную базу для Института. В 1960 г. было организовано экспериментальное хозяйство СО АН СССР, основные цель и задача которого заключались в получении и выращивании высококлассных и племенных сельскохозяйственных животных и уникальных цветных форм окраски пушных зверей на основе фундаментальных теоретических разработок ученых.

П.К. Шкварников, А.Н. Лутков, Ю.П. Мирюта и другие генетики растений и селекционеры, прошедшие ВИРовскую/вавилонскую школу экспериментальной биологии, в основе которой были положены глубокие теоретические знания в совокупности с высокой культурой полевого эксперимента, привнесли и заложили фундамент научного полевого эксперимента и селекции в ИЦиГ СО АН СССР. Теплицы и созданные в Краснодарском крае и Казахстане опорные пункты Института позволили ускорить селекционный процесс. Был создан генетико-селекционный центр Института, в экспериментальном хозяйстве СО АН СССР были выделены земли под опытные поля для растениеводческих лабораторий Института. С созданием Сибирского отделения ВАСХНИЛ многие работы проводились совместно с его учреждениями.

Спектр изучаемых проблем в лаборатории эволюционной генетики животных ИЦиГ СО АН СССР был широким. Решалась одна из главных проблем эволюционной генетики – причины возникновения широкого спектра изменчивости в процессе отбора при доме-

стикации, который впоследствии был назван Д.К. Беляевым дестабилизирующей формой отбора (Belyaev, 1969; Беляев, 1972, 1974; Трут, 1986).

Одна из основных задач, поставленных перед лабораторией эволюционной генетики в начальном периоде ее организации, состояла в анализе жестко стабилизированных механизмов эволюционных преобразований, в фенотипической изменчивости которых проявляется лишь минимальная доля генетического разнообразия. Д.К. Беляев подошел к решению этой проблемы с совершенно новых позиций. Основную роль в эволюционной реорганизации стабилизированных признаков он отводил реорганизации коррелятивных связей в процессе отбора, затрагивающего функцию основных регуляторных систем организма.

**От идеи к ее практическому воплощению:
организация специальной
экспериментальной базы
для масштабных и длительных
эволюционных опытов**

Крупнейший эволюционист XX в., создатель учения о темпах эволюционного процесса Дж. Симпсон, желая как можно нагляднее продемонстрировать неравномерность эволюционных преобразований, предложил в мысленном эксперименте «сжать все время эволюции на Земле до одних суток». По предложенной им сжатой шкале времени ранним вечером, в 18 часов, поднимаясь вверх по эволюционной лестнице от кишечнорастных докембрия, где-то в ордовике на нашей планете появились рыбы, затем через 2,5 часа в девоне–карбоне от них ответвились и приступили к освоению суши амфибии. Земноводные породили пресмыкающихся, а те за мезозойскую эру воплотились в огромное число форм, среди которых всегда вспоминают динозавров. Пребывание на Земле динозавров закончилось в конце мела, уступив в 23 часа планету более прогрессивным млекопитающим. Последние в свою очередь, быстро совершенствуясь, породили приматов. Наконец, около минуты до полуночи появились первые прямоходящие представители семейства *Hominidae*, в эволюции которых быстро промелькнули стадии: рамапитек, австралопитек,

человек способный, человек прямоходящий (питекантроп, синантроп, гейдельбергский человек), неандерталец и, наконец, эту жуткую гонку завершил кроманьонец. А вся история цивилизованного человечества уже вмещается в последнюю четверть секунды до боя часов.

Вместе с человеком это эволюционное соревнование завершили два миллиона других видов, около пятидесяти из которых стали домашними. Из многочисленных хищных ими оказались представители только двух семейств – собака и кошка, непарнокопытных тоже два – осел и лошадь. Парнокопытных и мозолоногих больше: корова, коза, овца, свинья, як, верблюд, лама, буйвол, олень. Из зайцеобразных – лишь кролик. Насекомых два – шелковичный червь и пчела. Два обитателя вод – карп и золотая рыбка. Более всего птиц, но также не так уж много: куры, утки, гуси, индюшки, цесарки, голуби, канарейки, японский перепел. «Только что», сто лет назад, в новейшей истории началась domestикация пушных зверей: лисиц, песцов, енотовидных собак, норок, хорьков, соболей, нутрий, сурков, шиншилл. И это весь небольшой список за 15 тыс. лет истории domestикации диких видов.

В самые первые годы создания новосибирского Академгородка генетик-селекционер, последовательный сторонник дарвиновской идеи domestикации как модели видообразования Д.К. Беляев развернул уже не умоглядный, а экспериментальный метод сжатия во времени 15-тысячелетней истории эволюции домашних животных, соизмерив ее с продолжительностью человеческой жизни, – опыт по отбору лисиц на одомашнивание. Эффект небывалого эксперимента оказался поразительным. Доместицируемые лисицы были втянуты в тот же канал отбора, в котором гораздо раньше них оказались предки нынешних собак. Но еще раньше этот путь для самого себя проложил сам человек, вернее, наш обезьяноподобный предок, претерпевший через загадочные стрессы формообразовательные процессы в глубинах Южной и Восточной Африки 1–3 млн лет назад. Кто выживал в этих условиях, тот приобретал шансы через дарвиновский отбор стать претендентом на звание рода людского (http://www.znanie-sila.ru/online/issue_1271.html).

Фундаментальная догма синтетической теории эволюции (СТЭ) постулирует, что отбор

и изменчивость действуют независимо друг от друга. Более того, в рамках СТЭ общепринято, что изменчивость в процессе отбора сужается, пропадает. Во-первых, в направлении действия отбора она исчерпывается, естественно, самим отбором, а во-вторых, отбор всегда связан с гомогенными скрещиваниями, с некоторой степенью инбридинга, в результате чего изменчивость так или иначе уменьшается. Но Дмитрий Константинович всегда считал это глубочайшим заблуждением эволюционной теории – на самом деле не так! – отбор может выступать в качестве творца изменчивости. Он может создавать изменчивость как в направлении своего действия, так и в других направлениях.

Изменчивость и наследственность – два основных модуса, благодаря которым осуществляется селекция, и если законы наследственности в значительной мере описаны, то законы изменчивости еще ждут своего часа. И благодаря организации уникальных экспериментальных исследований по взаимоотношениям изменчивости и отбора Д.К. Беляев был одним из первооткрывателей этих законов (Беляев, 1951, 1958; Беляев, Ивонин, 1951; Аргутинская, 2002).

Ведь действительно, на основе разработанной им концепции о роли поведения в механизмах одомашнивания диких животных Д.К. Беляеву удалось экспериментально объяснить появление в процессе одомашнивания громадного разнообразия форм домашней собаки в сравнении с мономорфностью ее дикого предка волка. С позиций концепции дестабилизирующего отбора можно допустить, что где-то в эоцене многие виды млекопитающих напоминали своим разнообразием нынешних собак: от сенбернара до гончей, от бульдога до таксы. Позднее такой уровень различий стал обычным для разных родов, а в наши дни он обычен для разных семейств. Если бы мы не знали долгой истории сосуществования людей и собак, то наверняка отнесли бы породы собак к разным таксонам.

К изучению феноменологии изменчивости Д.К. Беляев приступил в 1939 г. в отделе генетики и селекции пушных зверей Центральной научно-исследовательской лаборатории пушного звероводства при Министерстве внешней торговли СССР. В экспериментальном исследовании наследования количественных признаков он пришел к общим выводам прин-

ципального характера, которые касались определенных особенностей их наследования не только у экспериментальной модели – лисиц: эти выводы вносили существенную поправку в сложившиеся в ту пору представления, которые не учитывали взаимодействия с другими генами (Беляев, 1940а, б; 1946).

Но тогда первые генетические исследования Д.К. Беляева были прерваны начавшейся Великой Отечественной войной. Он вынужден был, как и абсолютное большинство его ровесников, оставить науку и рядовым уйти на фронт. Несмотря на годы непрерывных боевых действий, в своих мыслях во фронтовых окопах он возвращался и как бы дописывал незавершенные главы своей монографии «Основы генетики и селекции пушных зверей»; его не покидают раздумья о «лисий» эволюционной модели, – ведь она может дать рациональное объяснение появлению в процессе одомашнивания возникшего разнообразия форм домашней собаки в сравнении с мономорфностью – волка. Именно поэтому, когда перед ним, 28-летним майором, в декабре 1945 г. открывается, казалось бы, многообещающая перспективная военная карьера, он без колебаний и раздумий выбирает возвращение в науку (Аргутинская, 2002. С. 20).

Этот период фронтовой жизни Д.К. Беляева поразительно напоминает похожий фрагмент из военной биографии английского генетика-эволюциониста Дж. Холдейна. Несмотря на, казалось бы, полную погруженность в военную обстановку первой мировой войны, Холдейн в мыслях также не расставался с наукой. Он писал своему учителю, знаменитому генетику Уильяму Бэтсону: «На случай, если меня убьют, будьте добры, помогите моей сестре оформить нашу совместную работу по наследованию признаков у мышей». Позже Холдейн говорил, что он, возможно, был единственным из офицеров, кто на передовой дописывал свою научную работу – статью по генетике, опубликованную затем в 1915 г. в «Journal of Genetics» (Фельдман, 1976. С. 29).

Уже в 1948 г. Д.К. Беляев начал работу по многолетнему экспериментальному воспроизведению процесса доместикиции. Сразу же возник вопрос: как организовать эксперимент, где начать воспроизведение исторического процесса доместикиции, на какой базе. Понятно,

что моделью экспериментальной доместикации должна быть его любимая модель – серебристо-черная лисица – она была выбрана им еще до войны. Характерной особенностью этого животного было то, что лисица только недавно была вовлечена в условия жизни в неволе, она сохранила все свойства своих диких сородичей: моноэстричность, реакцию на фотопериод в виде сезонности размножения и линьки и, главное, – относительно дикое поведение.

В качестве первой опорной экспериментальной базы послужила лисья ферма одного из звероводческих хозяйств Эстонии «Кохила» (впоследствии «Салатагузе»), где Дмитрий Константинович встретил не только понимание, но и активнейшую поддержку со стороны всего коллектива и особенно главного зоотехника Нины Федоровны Сорокиной (Беляев, 1951; Беляев, Ивонин, 1951).

С.В. Аргутинская в своих воспоминаниях писала: «Свою идею о ведущей роли отбора по поведению и роли нейрогормональной регуляции в наследственной перестройке в процессе доместикации Д.К. Беляев изложил в ряде докладов еще в 1951–1952 гг. Это была чистая идея без экспериментального подтверждения, помимо того, что новая, еще и сложная для восприятия. Д.К. Беляев пришел к пониманию ключевой роли

отбора по поведению в процессе одомашнивания диких животных. Он предположил, что отбор по поведению, затронув нейрогормональные компоненты фотопериодических механизмов регуляции, может вызвать реорганизацию сезонных функций животных, в частности, изменить моноэстричность, характерную для диких животных, на полиэстричность, отличающую домашних животных. Профессор Московской ветеринарной академии Г.И. Азимов во время сдачи мной кандидатского экзамена по физиологии после ответа по билету с пристрастием расспрашивал меня об этой идее ДК и в 1954 г. написал в своей книге со ссылкой на Д.К. Беляева: “Нужно полагать, что домашние животные потеряли строгую сезонность размножения... главным образом в связи с изменением их высшей нервной деятельности”. Это и было первым упоминанием о работе, которая, развиваясь и расширяясь, продолжается уже около 50 лет» (Аргутинская, 2002. С. 25–28).

С этой идеей Д.К. Беляев приезжает в Академгородок. Новосибирский научный центр еще только создавал материальную базу, но уже в 1958 г. в зверосовхозе «Лесной» Алтайского края Д.К. Беляев в полном объеме разворачивает отбор животных по поведению. Параллельно в 60 км от г. Новосибирска в зверосовхозе «Бело-



1975 г. Справа-налево: М.Н. Жуков, имея опыт строительства крупного зверосовхоза «Северинский» Краснодарского края, принимал самое активное участие в строительстве экспериментальной зверофермы Института цитологии и генетики СО АН СССР; Д.К. Беляев – директор ИЦиГ; М.Д. Абрамов – автор первого, вышедшего в 1957 г. практического пособия по генетическим основам цветного норководства (НИИПЗК); Н.Ш. Перельдик – основатель школы кормления пушных зверей в нашей стране (НИИПЗК).

ярский» на другом модельном объекте организовываются фотопериодические эксперименты. Причем от районного центра Мошково до села Белоярка (35 км) зимой нужно было добираться целый день на тракторных санях по огромным сугробам.

Все это требовало создания собственной особой экспериментальной зверофермы непосредственно в Академгородке. В 1962 г. при активном содействии и участии экономиста-зверовода М.Н. Жукова (имевшего опыт строительства крупного зверосовхоза «Северинский») завершилось строительство экспериментальной зверофермы ИЦиГ, на которой и были развернуты основные опыты не только на лисах, но и на норках.

Именно на этой звероферме было показано, что, изменяя соотношение света и темноты в течение суток, можно добиться снижения эмбриональной смертности и даже преодоления ее, как было с летальной *Белой грузинской* (W^G/W^G) мутацией у лисиц, и с летальной мутацией

Shadow (S^H/S^H) у норок (Беляев и др., 1962, 1963; Беляев, Клочков, 1965; Беляев и др., 1973; Belyaev *et al.*, 1975).

Особо впечатляющие результаты были получены при отработке метода ускоренного созревания меха у норок. На экспериментальной звероферме ИЦиГ СО АН СССР в летне-осенний период испытывались различные варианты фотопериодических световых режимов, из которых впоследствии выбрали два наиболее перспективных, принятых к внедрению в зверосовхозе «Магистральный» Алтайского края.

Представленная картина излагает в самой краткой форме моделирование процесса одомашнивания на пушных зверях в условиях Экспериментальной зверофермы Института цитологии и генетики СО РАН, его отличие в темпах или скоростях domestikации от стихийного процесса промышленного одомашнивания лисиц и норок, которых вот уже более сотни лет разводят на зверофермах мира.



1976 г. Экспериментальная звероферма Института цитологии и генетики СО АН СССР. Слева-направо: В.И. Евсиков (исследуя генетико-селекционные аспекты моногибридного гетерозиса в норководстве, осуществил вместе с Д.К. Беляевым первый в нашей стране генетический синтез трехрецессивных *жемчужных* норок, но не по американскому – $k/k a/a p/p$, а по шведскому паломино – $t^p/t^p a/a p/p$; в настоящее время разрабатывает генетико-эволюционные вопросы гомеостаза плодовитости млекопитающих); Д.К. Беляев; В.М. Гукин (работал главным зоотехником Белоярского зверосовхоза, с 1962 по 1981 гг. заведовал экспериментальной зверофермой ИЦиГ); Л.П. Зверева (провела обширные исследования по генетико-гистологическим вопросам меланогенеза у мутантных форм американской норки).

Развитие Д.К. Беляевым целого раздела экспериментальной генетики в изучении наследственности и изменчивости, формировании представлений о роли поведения в механизмах одомашнивания диких животных явилось новой парадигмой в изучении процесса доместикации и эволюции. Проблема была ориентирована на интеграцию теории искусственного отбора с современными представлениями о функциях мозга. Ведь Д.К. Беляев на модели серебристо-черных лисиц заложил не умозрительный, а экспериментальный метод сжатия во времени 15-тысячелетней истории эволюции домашних животных, соизмерив ее с продолжительностью человеческой жизни. На экспериментальной базе ИЦиГ в воспроизведении процесса исторической доместикации он показал, что эволюция домашних животных дает ключ к пониманию всей эволюции, когда отбор за считанные поколения приводит к тем результатам, на которые в природе уходят целые тысячелетия (Беляев, 1968, 1970, 1972, 1974, 1979, 1981а, 1983; Belyaev, 1969, 1979; Беляев, Трут, 1982, 1983; Аргутинская и др., 2002).

Разные науки обретали свои парадигмы в разное время. Парадигма, пишет американский историк науки, один из виднейших философов науки XX столетия Томас Кун в своей книге «Структура научных революций», может рассматриваться как новая система взглядов в определенной области научного знания, как некое «образцовое достижение прошлого» (Кун, 1975). По мнению Т. Куна, основная ценность парадигмы состоит в том, что она объединяет в единое целое все схемы, существующие в рамках дисциплины, и дает исследователям уверенность в социальной оправданности их дорогостоящих и кропотливых исследований. Но в какой-то момент возникает теория, объясняющая некую проблему в данной области знаний лучше, чем другая теория, существующая в данной области знаний и конкурирующая с первой. Такая теория начинает привлекать внимание большинства исследователей последующих поколений, и в результате старые конкурирующие школы прекращают свое существование. По аналогии с естественным отбором в природе парадигмы в науке выживают потому, что вымирают их конкуренты. И если среди конкурирующих теорий выделяется

одна, а предлагаемые ею новые объяснения явлений получают признание у последующих поколений исследователей, можно считать, что родилась новая парадигма. Парадигмы должны при этом обладать двумя свойствами, которые Кун определил так: «Их создание было в достаточной мере беспрецедентным, чтобы привлечь на длительное время группу сторонников из конкурирующих направлений научных исследований. В то же время они были достаточно открытыми, чтобы новые поколения ученых могли в их рамках найти для себя нерешенные проблемы любого вида» (Кун, 1975. С. 34).

Согласно парадигмальной концепции развития науки, переход от одной парадигмы к другой имеет характер научной революции. Пример этого – переход от классической филогенетики (учение об общих предках) к кладистике.

История науки, как пишет Т. Кун, есть смена последовательных парадигм (подобно тому как в истории общества один социальный строй сменяется другим), каждая из которых сильно переориентирует интересы ученых внутри определенной области знаний. К примеру, 100 лет назад ученые были также убеждены в том, что картезианско-ньютонская механическая парадигма объясняет устройство Вселенной, как в наше время убеждены, что устройство Вселенной объясняется теорией относительности Эйнштейна. Иными словами, физик XIX столетия был не менее уверен в правильности своего понимания физических явлений, чем современный физик, знакомый с теорией относительности. Но, тем не менее, величие обеих концепций вызывает восхищение (Кун, 1975).

К концу 1960-х годов Д.К. Беляев выдвигает идею дестабилизирующей функции отбора по поведению в отношении его последствий для регуляционных систем онтогенеза. С целью дальнейшего развития этой идеи была поставлена задача изучения эволюционной роли стресса и генетических основ стрессоустойчивости животных. Исследование этой проблемы так же, как опыт доместикации лисиц, дало основание расценивать функциональную установку центральных звеньев нейрогормональной регуляции онтогенеза как одного из основных внутренних механизмов эволюции, которые могут вскрывать необнаруживаемые в норме ре-

зервы наследственной изменчивости, выводить их на фенотипический уровень и испытывать отбором. Оформилась новая проблема – изучение устойчивой функциональной активации репрессированного генетического материала и ее возможной эволюционной роли.

Результаты трех направлений экспериментальных исследований лаборатории эволюционной генетики и других лабораторий, связанных с работами по экспериментальной доместикации, – воспроизведение процесса доместикации, изучение эволюционной роли стресса и анализ стабильных в ряду последовательных поколений изменений функциональной активности генетического материала, были синтезированы Д.К. Беляевым в его концепции дестабилизирующего отбора (Belaev, 1969; Беляев, 1974, 1981a, 1983; Трут, 1986, 2008; Trut *et al.*, 2009).

Сущность концепции заключается в том, что движущий отбор, направленный на признаки, изменчивость которых в сильной степени сопряжена с изменчивостью функционального состояния регуляционных систем онтогенеза, обладает дестабилизирующей функцией. Генетические элементы, контролирующие свойства нейрогормональных регуляционных систем, занимают высокое положение в иерархической структуре генома. Поэтому изменения в процессе отбора этих элементов генома могут служить источником огромного повышения темпов и размаха изменчивости, т. е. сообщать такому отбору большую эволюционную силу.

Отбор по поведению.

Реакция на человека и реакция человека

Основной движущей силой доместикации животных на ее ранних этапах, вероятнее всего, являлся несознательный отбор на социальное поведение, а именно на толерантность к человеку (Беляев, 1962), т. е. в первую очередь на ослабление агрессии к человеку. Однако остается открытым вопрос, затрагивал ли отбор на ослабление агрессии к человеку другие формы агрессии? Тщательные эксперименты на серых крысах, проведенные И.Ф. Плюсониной с соавторами, дают положительный ответ на этот вопрос и указывают на повышение порога межсамцовой агрессии у ручных крыс по сравнению с аг-

рессивными и неселекционированными животными (Plyusnina *et al.*, 2011). У лисиц, согласно отдельным наблюдениям, доместикация также снижает внутривидовую агрессию, однако на данный момент мы не располагаем точными экспериментальными данными. В настоящее время ведется более детальный эксперимент, который, вероятно, позволит окончательно решить этот вопрос.

Теория дестабилизирующего отбора не могла обойти такие кардинальные проблемы биологии, как антропогенез и биосоциальная природа человека, отдельные аспекты которых активно обсуждались в печати (Астауров, 1971; Эфроимсон, 1971; Беляев, 1976, 1981a–в). Бурные дискуссии не раз возникали и на Межинститутском философском семинаре СО АН СССР, председателем которого в течение двух десятилетий был Д.К. Беляев.

Считая, что отбор на доместикационное поведение обладает широким действием на многие формы социального поведения, Д.К. Беляев указывал на сходство процессов доместикации и антропогенеза (Беляев, 1981б–г). По его мнению, ключевым этапом в формировании человека также был переход к иным, чем у предков, формам социальной организации, а важнейшим объектом естественного отбора были свойства нервной системы, позволяющие человеку адаптироваться к социальным нормам жизни. На первое место среди этих качеств Д.К. Беляев ставил «подвижность» нервной системы, связанной с дестабилизацией баланса раздражительных и тормозных процессов (Давиденков, 1947; Беляев, 1981в). «Подвижность» нервных процессов отличает также и доместичированных животных. Исследования, проведенные на лисицах, обнаружили, что экспериментальная доместикация повышает пластичность нервных процессов, на что указывают как снижение порога нервно-мышечной возбудимости, так и усиление способности к ее торможению (Васильева, 1991, 1992). Регуляция этих процессов во многом связана с нейромедиаторными системами, которые вовлекает в сферу своего влияния отбор по поведению, являясь, по существу, отбором на их определенную активность (Попова и др., 1975; Попова, 2000). Так, показано, что вследствие доместикации изменяется активность серото-

нинергической и дофаминергической систем у разных видов животных: лисицы, норки, крысы и форели (Никулина и др., 1993; Попова, 2000; Øverli *et al.*, 2005).

Особое значение как при антропогенезе, так и в эволюции высших позвоночных вообще Д.К. Беляев отводил стрессу (Беляев, 1981в; Беляев, Бородин, 1982). Повышение давления стресса при резкой смене условий среды изменяет активность нейромедиаторных систем и регулируемые ими формы поведения, что может инициировать последующие эволюционные события (Шмальгаузен, 1968; Belyaev, 1969; Майр, 1974; West-Eberhard, 1989). При таких экстремальных условиях уровень стресс-реактивности может стать одним из основных критериев приспособленности животных, позволяющих переносить изменение нейрорегуляторных систем без подавления размножения (Беляев, Бородин, 1982). При экспериментальной domestикации основным стрессором являлся близкий контакт с человеком, так что отбор на domestикационное поведение стал и отбором на снижение стресс-реактивности, что подтвердили исследования, проведенные на лисицах, крысах, норках и форели (Трут и др., 1972; Дыгало и др., 1985; Науменко и др., 1987; Гулевич и др., 1995; Øverli *et al.*, 2005; Оськина и др., 2008). Для человека стресс как эволюционный фактор и как фактор, воздействующий на нервную систему, по-видимому, играл важную роль. Повышение организации мозга, усложнение поведения, расширение среды обитания неизбежно должны были усиливать давление стресса. А развитие речи, которая сама по себе стала сильным стрессором в социальных условиях жизни, должно было вызвать новый уровень психической стрессорности. В таких условиях низкий уровень стресс-реактивности должен был стать важным критерием выживаемости (Беляев, 1981в, г). Во многих экспериментальных работах показано, что пониженная стрессорность способствует обучению (Wilcock, Broadhurst, 1968; Satinder, 1971; Васильева, 1991; Плюснина и др., 2006). Так, у domestизируемых лисиц и крыс в большинстве тестов выявлена повышенная способность к обучению по сравнению с агрессивными и неселекционированными (Васильева, 1991;

Плюснина и др., 2007). Однако другие работы указывают на роль в обучении и формировании следа памяти как самого стресса, так и его гормонов, глюкокортикоидов и их рецепторов (de Kloet *et al.*, 1988; Oitzl, de Kloet, 1992; Korte *et al.*, 1996; Korte, 2001; Reul *et al.*, 2009). Это отражено и в исследованиях по domestикации – в некоторых тестах агрессивные лисицы проявляли лучшую обучаемость, чем domestизируемые (Мухамедшина, 2012), а пренатальная метилобогатая диета, приводящая к усилению глюкокортикоидного стресс-ответа, улучшала обучаемость крыс (Гербек и др., 2010). По-видимому, до определенного уровня глюкокортикоиды играют положительную роль в обучаемости, однако при сильном стрессе они начинают ингибировать формирование следа памяти, что отражает «перевернутая» U-образная зависимость обучаемости от уровня глюкокортикоидов. Говоря о человеке и антропогенезе, Д.К. Беляев также отмечал важность состояния достаточной, а иногда и очень высокой стрессорности для активной социальной жизни и творческой деятельности (Беляев, 1981в).

Еще одна важная черта, сближающая процессы антропогенеза и domestикации, – неотения. Низкий уровень стресс-реактивности, отсутствие агрессии к человеку, повышенная исследовательская активность – все это рассматривают как признаки неотении, возникшей вследствие отбора на domestикацию. С той же точки зрения оценивают изменение параметров черепа, возникновение вислоухости и сдвиги временных параметров развития гормональной системы (Трут, 2008; Trut *et al.*, 2009). Черты неотении, появившиеся, по-видимому, вследствие исторической domestикации, обнаруживают и у собак (Clutton-Brock, 1997). Возникновение неотении, по-видимому, является общим следствием отбора на ослабление агрессии, который затрагивает нейрорегуляторные системы, имеющие широкое влияние на процессы развития. Неотения, по-видимому, играла большую роль и в антропогенезе (Bolk, 1926; Somel *et al.*, 2009; Buehl *et al.*, 2011), а также в эволюции бонобо (Wrangham, Pilbeam, 2001). Эти обезьяны, подобно domestизированным животным, отличаются от шимпанзе ослаблением внутригрупповой агрессии.

Альтруизм

Одним из следствий биосоциальной эволюции человека и, в частности, отбора по социальным формам поведения, явилось развитие такого важного свойства, как альтруизм (Беляев, 1981в). Вопрос происхождения этого феномена привлекал многих крупных биологов (Холдэн, 1935; Дарвин, 1953; Астауров, 1971; Эфроимсон, 1971, 1995; Филатов, 1974; Беляев, 1976, 1981а–в; Darlington, 1978; Кропоткин, 1991). Однако вопрос, существует ли альтруизм у животных, т.е. имеет ли он биологические корни или же относится к строго социальным явлениям, по-прежнему не решен (Silk, 2007; de Waal, 2008; Batson, 2011). Альтруизм чаще всего определяют как поведение особи, вследствие которого повышается индивидуальная приспособленность другой особи за счет снижения собственной приспособленности (de Waal, 2008). Из этого определения следует, что эволюционное развитие абсолютного альтруизма, т.е. по отношению к любой особи в группе, невозможно. Только взаимный и родственный альтруизм позволяет накапливаться «аллелям альтруизма» в популяции и повышать совокупную приспособленность при снижении индивидуальной (Холдэн, 1935; Hamilton, 1964; Trivers, 1971; Silk, House, 2011). Тем не менее альтруизм не обязательно должен включать самопожертвование, более того, он может приносить и выгоду, которая, однако, не является самоцелью (Batson, 2011). Это, по-видимому, увеличивает шансы биологического происхождения абсолютного альтруизма.

Современные исследования базируются на представлениях о мотивационной природе альтруизма, где основной мотивацией является сопереживание (Batson, 2011), проявление которого, видимо, присуще и животным (de Waal, 2008). Альтруистическое поведение может проявляться как: 1) спонтанный альтруизм – бескорыстная помощь в ответ на мольбу о помощи или крики боли; 2) усвоенный альтруизм – условный рефлекс с положительным подкреплением; 3) намеренный альтруизм – помощь, оказанная из-за предполагаемых результатов, которые она может принести. В одном случае ожидается взаимный ответ, тогда действие будет приносить чистую выгоду, такое поведение

называют намеренным эгоистическим альтруизмом. В другом случае помощь оказывается из соображений, какую пользу она может принести другим. Такое поведение называют намеренным альтруистическим альтруизмом (de Waal, 2008). Намеренный альтруизм наиболее сложен в экспериментальном моделировании на животных и интерпретации результатов эксперимента. Шимпанзе делает такой выбор, после которого еда достается не только ей, но и другой обезьяне (de Waal, 2008), однако это можно интерпретировать не как желание помочь, а просто как выбор большего количества пищи.

Более надежные результаты получены при исследовании спонтанного альтруизма как в эксперименте, так и в полевых наблюдениях у обезьян (Masserman *et al.*, 1964; Wechkin *et al.*, 1964; de Waal, 2008), особенно у бонобо, у которых описана не только помощь «знакомым» обезьянам своего вида, но и птице с перебитым крылом (de Waal, 2005). При этом считается, что именно человеческий альтруизм отличается направленностью на другие виды, в частности, на детенышей домашних животных (Bradshaw, Paul, 2010). Впрочем, это утверждение ставил под сомнение еще П.А. Кропоткин (1991), указывающий на множество примеров межвидовой взаимопомощи. В разнообразных экспериментах было выявлено спонтанное альтруистическое поведение и у других млекопитающих. Крысы избегали наступать на педаль или заходить в «домик», если при этом подавался электрический ток на пол соседней клетки, где находилась другая крыса (Evans, Braud, 1969; Симонов, 1981), даже при наличии пищевого подкрепления (Church, 1959; Greene, 1969). Аналогичные результаты были получены и в экспериментах на собаках (Преображенская, 1973). В ряде экспериментов крысы оказывали помощь: нажимали на педаль, которая избавляла других крыс от подвешенного состояния или макания в воду (Rice, Gainer, 1962; Rice, 1965) или открывали дверцу ограничивающей движение клетки и делились пищей (Bartal *et al.*, 2011). Однако трудно сказать, отражает ли это поведение заботу о других или же животные стараются только избавиться от криков боли, являющихся для них эмоционально отрицательными (аверсивными) сигналами (Batson, 2011). Однако даже если это и так, сопереживание у

человека связано с появлением схожих ощущений. Как показали исследования с применением нейровизуализации, страдания ближнего вызывают возбуждение областей мозга, ответственных за боль (Singer *et al.*, 2006). Мыши, наблюдающие за страдающими соседями по клетке, также, по-видимому, воспринимают болевые стимулы (Langford *et al.*, 2006). Вероятно, альтруистическое поведение человека, мотивированное сопереживанием, направлено в том числе и на то, чтобы помочь себе избавиться от таких аверсивных стимулов (de Waal, 2008). В таком случае нет оснований утверждать, что альтруистическое поведение человека не имеет глубоких биологических корней, а модели этого поведения, воспроизведенные на животных, не имеют ничего общего с альтруизмом.

Исследования, проведенные на разных животных (обезьянах, собаках, крысах), выявили полиморфизм по этому поведению в популяции (Masserman *et al.*, 1964; Симонов, 1981). Так, в экспериментах П.В. Симонова только у 32 % крыс снижалось время пребывания на педали, включающей ток в соседней клетке. Среди макак-резусов таких животных было больше – 10 обезьян из 15 переставали нажимать на педаль даже при наличии пищевого подкрепления (Masserman *et al.*, 1964). Как показали специальные исследования, у этих крыс снижена тревожность и агрессивность и повышена исследовательская активность. Именно такие черты поведения характерны для одомашнированных животных, что в совокупности с повышенным affiliативным поведением позволяет предположить, что процесс одомашнивания так же, как антропогенез, должен усиливать альтруистическое поведение. Поэтому одомашниваемые лисицы и крысы могут представлять особый интерес для изучения филогенетических корней альтруизма.

Вместе с тем Д.К. Беляев подчеркивал двуполнаправленность вектора отбора на социально значимые качества в процессе антропогенеза (Беляев, 1981г). В определенные моменты истории человечества, такие, как периоды тяжелых голодовок, эгоизм и антигуманизм приобретали адаптивное значение для нравственно неразвитого общества. Уничтожение стариков, больных и детей до определенного возраста, обременявших группу, позволяло вы-

жить наиболее активной репродуктивной части общества (Морган, 1934; Мечников, 1961), что можно было рассматривать как альтруизм по отношению к последним (Беляев, 1981б).

Д.К. Беляев в своих выступлениях не раз подчеркивал огромное положительное значение генетического и фенотипического разнообразия среди людей. Альтруизм и антигуманизм являлись разными формами адаптивного поведения, которые имели разную ценность для адаптации при разных условиях жизни, а значит, обе стратегии были важны для популяции и попадали под действие группового отбора, а функциональные группы генов, контролирующие их проявление, были включены в генофонд человека (Беляев, 1981в). Однако в индивидуальном поведении человека эти потенции могут проявляться по-разному, что во многом зависит от средовых условий (Беляев, 1981б). Так, формирование, по-видимому, тесно связанного с эгоизмом и антигуманизмом агрессивного поведения в большей степени (58 %) зависит от наследственных факторов, согласно исследованиям близнецов, воспитывающихся в разных семьях и при разных социальных условиях, однако на 42 % связано с внешними воздействиями (Dionne *et al.*, 2003). Значительную роль (56–72 %) генотип играет, по-видимому, и в проявлении альтруистического поведения (Rushton *et al.*, 1984; Rushton, 2004). Причем до 3,5 лет роль наследственных факторов неуклонно растет (Knafo *et al.*, 2009). Наблюдения за маленькими детьми при первом знакомстве, у которых эгоистические мотивации и применение силы положительно коррелируют с желанием поделиться (Hay, 2009), еще раз подчеркивают, что отбор в процессе антропогенеза шел не только на альтруизм, как на это указывает В.П. Эфроимсон (1971). Автор предполагает, что младенцы в равной степени склонны как к альтруизму и взаимопомощи, так и к эгоизму и агрессии, однако они могут отличаться по общительности, в которую включены все эти качества (Hay, 2009). Тем не менее физическая агрессия в наибольшей степени проявляется в возрасте до трех лет (Trembley, 2005), а затем постепенно снижается к взрослому состоянию у большинства людей, кроме небольшой группы (около 4 %) (Broidy *et al.*, 2003), для которой патологическая агрессия едва ли коррелирует с альтруизмом.

Возможные молекулярно-генетические механизмы альтруистического поведения

Одним из методов изучения социального поведения человека в лабораторных условиях являются экономические игры с использованием денег. В игре «Диктатор» первый игрок («диктатор») делает единоличное решение о распределении фиксированной суммы денег между собой и вторым игроком, «получателем». Поскольку «получатель» совершенно беспомощен, то «диктатор» не боится ответных действий или других стратегических ходов, и распределение денег рассматривается как мера альтруизма (Forsythe *et al.*, 1994; Knafo *et al.*, 2008). 80 % «диктаторов» выделяют «получателю» лишь небольшое количество денег, и только 20 % делят деньги поровну (Forsythe *et al.*, 1994). А. Кнафо с соавторами выявили достоверную связь между поведением в игре и длиной повторов RS3 в промоторе *AVPR1a* (Knafo *et al.*, 2008). «Диктаторы» с коротким вариантом повторов (308–325 п.н.) в гомозиготном состоянии жертвуют достоверно меньше денег, чем участники игры с длинным вариантом повторов (327–343 п.н.). Кроме того, различия поведения в игре «Диктатор» ассоциированы с однонуклеотидными полиморфизмами (ОНП) в гене *OXTR* (Israel *et al.*, 2009).

Хотя мало что известно о роли аргинин-вазопрессина и близкого ему нейропептида окситоцина в альтруистическом поведении животных, однако они, а также их рецепторы в мозге играют, по-видимому, ведущую роль в социальном поведении, таких его формах, как аффилиативное и половое поведение, материнская забота и агрессия (Hammock, Young, 2004; Young *et al.*, 2004; Bosch *et al.*, 2005; Bartz, Hollander, 2006). Пионерские работы на полевках выявили зависимость моногамного и полигамного полового поведения от длины повторов в промоторе рецептора 1a аргинин-вазопрессина, *Avpr1* (Hammock, Young, 2004). У человека также наряду с ролью в формировании альтруистического поведения показана зависимость особенностей индивидуального полового поведения от длины повторов в промоторе *AVPR1a* (Ebstein *et al.*, 2010). Однако сравнительное исследование промотора *Avpr1a* на многих видах полевок, обладающих и не

обладающих моногамностью, не выявило строгой зависимости между длиной промотора и стратегией полового поведения, из чего авторы делают вывод, что регуляция этого вида поведения, видимо, более сложная (Fink *et al.*, 2006). Тем не менее исследования на разных видах грызунов и на человеке выявили связь между распределением *AVPR1* в разных структурах мозга и длиной повторов в промоторе его гена (Hammock, Young, 2004; Knafo *et al.*, 2008). Кроме того, встраивание в промотор *Avpr1a* мыши повторов моногамных полевок усиливало их аффилиативное поведение (Young *et al.*, 1999).

Другие исследования выявили связь с альтруистическим поведением полиморфизмов генов, входящих в дофаминергическую систему (Bachner-Melman *et al.*, 2005; Reuter *et al.*, 2011). Схожий с игрой «Диктатор» эксперимент, в котором мерой альтруизма служил размер пожертвования голодающим детям из «развивающихся» стран, выявил значимость ОНП Val158Met *COMT*, гена катехол-о-метилтрансферазы, участвующей в катаболизме дофамина (Reuter *et al.*, 2011). Показано, что участники эксперимента, имеющие хотя бы один аллель, определяющий валин, жертвовали денег достоверно больше, чем индивиды, не имеющие таких аллелей (Reuter *et al.*, 2011).

Основным методом исследования поведения человека является использование опросников, один из которых был разработан для оценки склонностей игнорировать свои собственные потребности и удовлетворять чужие (Bachar *et al.*, 2001), т. е. по сути дела, для оценки степени альтруизма. С помощью этого опросника Р. Бахнер-Нельман с соавторами (Bachner-Nelman *et al.*, 2005) выявили зависимость альтруистического поведения от длины повторов в третьем экзоне гена рецептора D4 дофамина (*DRD4*). Опрошеные, несущие более короткий аллель *D4.4*, имели достоверно более высокую склонность к альтруистическому поведению, чем носители длинного аллеля *D4.7*.

Роль дофаминергической системы в социальном поведении так же, как и ее тесная функциональная связь с аргинин-вазопрессинном и окситоцином, хорошо известны (Skuse, Gallagher, 2008). Кроме того, показано, что у носителей как короткого аллеля *DRD4*, так и замены Val158Met *COMT* достоверно чаще

формируется агрессивное поведение (Volavka *et al.*, 2004; Fresan *et al.*, 2007). В исследованиях, проведенных на животных, показана роль в агрессивном поведении и катехол-о-метилтрансферазы, и рецепторов дофамина (Manson, 2009). Различия в дофаминергической системе выявлены также между domestизируемыми и агрессивными животными, как лисицами, так и крысами (Попова, 2000).

Результаты приведенных исследований подтверждают возможность связи между агрессией и альтруизмом и их наследственную природу. На примере баланса аллелей *D4.4* и *D4.7* Р. Вахнер-Нельман с соавт. (Wachner-Nelman *et al.*, 2005) повторяют след за Д.К. Беляевым положения эволюционной обусловленности различных поведенческих фенотипов в популяции человека, как альтруистического, частично определяемого аллелем *D4.4*, так и агрессивного и даже антиобщественного (*D4.7*). Однако очевидны также сложность и неоднозначность этой связи. У младенцев человека практически одновременно могут проявляться и высокая степень агрессии, и яркое альтруистическое поведение (Нау, 2009). У шимпанзе могут возникать вспышки беспричинной агрессии, однако от этого им так же, как и человеку, нельзя отказать в умении сопереживать (de Waal, 2008). Явна различная реакция на страдания знакомой особи и чужака, показанная как на мышах, так и на обезьянах (Langford *et al.*, 2006; de Waal, 2008). Диаметральные противоположные чувства могут вызывать у человека страдания честного или несправедливого товарища (Singer *et al.*, 2006). Однако неизвестно, будет ли столь важен предварительный опыт социальных контактов для животных с повышенным социальным поведением, таким, как у domestизируемых крыс и лисиц.

Многие аспекты альтруистического поведения, по словам Д.К. Беляева, имеют глубокие биологические корни. Схожесть процессов domestикации и антропогенеза в плане отбора на социально значимые качества нервной системы и его эффектов, сниженные тревожность и агрессия, повышенная исследовательская активность, характерные для животных с чертами альтруистического поведения, указывают на то, что экспериментально domestизированные животные могут быть удачной моделью для изучения механизмов альтруизма.

Концепция Д.К. Беляева о дестабилизирующей форме отбора продолжает развитие и начинает получать заслуженную оценку во всем мире как выдающееся открытие в биологии XX в. Ученые из университетов США, Германии, Израиля, Австралии, Финляндии и Дании в настоящее время плодотворно сотрудничают с лабораторией эволюционной генетики ИЦиГ СО РАН в изучении эффектов и механизмов дестабилизирующего отбора. Эта концепция получает дальнейшее развитие и расширение, используется для изучения процессов антропогенеза, развития когнитивных способностей человека, для объяснения некоторых аспектов биологии и медицины, а также формирования социальных отношений.

Литература

- Аргутинская С.В. Дима // Дмитрий Константинович Беляев: Книга воспоминаний. (Сер. «Наука Сибири в лицах»). Новосибирск: Изд-во СО РАН. Филиал «Гео», 2002. 284 с.
- Астауров Б.Л. *Homo sapiens et humanus*. Человек с большой буквы и эволюционная генетика человечности // Новый мир. 1971. № 10.
- Беляев Д.К. Методика племенной работы в Тобольском зверосовхозе // Кролиководство и звероводство. 1940а. № 11/12. С. 11–13.
- Беляев Д.К. Об интенсивности серебристости серебристо-черных лисиц // Науч. тр. ЦНИЛ. Т. 3. М.: Сельхозгиз, 1940б. С. 41–47.
- Беляев Д.К. Изменчивость и наследование серебристости меха у серебристо-черных лисиц: Дис. ... канд. биол. наук. М., 1946. 135 с.
- Беляев Д.К. Творческая роль отбора в возникновении некоторых вариаций окраски у лисиц // Каракулеводство и звероводство. 1951. № 5. С. 55–62.
- Беляев Д.К. Первые итоги разведения цветных норок в звероводческих совхозах // Бюл. науч.-техн. информ. НИИ пушного звероводства и кролиководства, 1958. № 3. С. 10–13.
- Беляев Д.К. О некоторых проблемах коррелятивной изменчивости и их значении для теории эволюции и селекции животных // Изв. СО АН СССР. 1962. № 10. С. 111–124.
- Беляев Д.К. Биологические аспекты domestикации животных // Генетика и селекция новых пород сельскохозяйственных животных: Матер. Всесоюз. совещ. 24–26 окт. 1968 г., Алма-Ата. Алма-Ата: Наука, 1970. С. 30–44.
- Беляев Д.К. Некоторые проблемы генетики // Вестн. АН СССР. 1968. № 6. С. 55–65.
- Беляев Д.К. Генетические аспекты domestикации животных. Проблемы domestикации животных и растений. М.: Наука, 1972. С. 39–45.
- Беляев Д.К. О некоторых вопросах стабилизирующего и дестабилизирующего отбора. История и теория эво-

- люционного учения. Л.: Наука, 1974. С. 76.
- Беляев Д.К. Проблемы биологии человека: генетические реальности и задачи синтеза социального и биологического // Природа. 1976. № 6. С. 26–30.
- Беляев Д.К. Дестабилизирующий отбор как фактор изменчивости при domestикации // Природа. 1979. № 2 С. 36–45.
- Беляев Д.К. Дестабилизирующий отбор как фактор domestикации // Генетика и благосостояние человечества. М.: Наука, 1981а. С. 53–66.
- Беляев Д.К. О некоторых методологических проблемах биологии // Методологические и философские проблемы биологии. Новосибирск, 1981б. С. 10–20.
- Беляев Д.К. Современная наука и проблемы исследования человека // Вопр. философии. 1981в. № 3. С. 3–16.
- Беляев Д.К. Современная наука и проблемы исследования человека // III Всесоюз. совещ. по философским вопросам современного естествознания: Матер. Всесоюз. совещ. М., 1981г. Вып. 2. С. 54–82.
- Беляев Д.К. Дестабилизирующий отбор // Развитие эволюционной теории в СССР (1917–1970 годы) / Ред. С.Р. Микулинский, Ю.И. Полянский. Л.: Наука. Ленингр. отделение, 1983. С. 266–277.
- Беляев Д.К., Бородин П.М. Влияние стресса на наследственную изменчивость и его роль в эволюции // Эволюционная генетика. Л., 1982. С. 35–59.
- Беляев Д.К., Ивонин Ф.М. Улучшить племенную работу в зверосовхозах // Каракулеводство и звероводство. 1951. № 5. С. 39–45.
- Беляев Д.К., Клочков Д.В. О повышении плодовитости у норок путем дополнительного освещения // Кролиководство и звероводство. 1965. № 12. С. 2–5.
- Беляев Д.К., Клочков Д.В., Железова А.И. Влияние света на процессы размножения и плодовитость норок // Проблемы зоологических исследований в Сибири. Горно-Алтайск, 1962. С. 270–271.
- Беляев Д.К., Клочков Д.В., Железова А.И. Влияние световых условий на воспроизводительную функцию и плодовитость норок // Бюл. Моск. об-ва испытателей природы. Отд. биологии. 1963. Т. 18. Вып. 2. С. 9–13.
- Беляев Д.К., Трут Л.Н. От естественного отбора к искусственному: чудеса селекции // Наука в СССР. 1982. № 5. С. 24–29, 60–64.
- Беляев Д.К., Трут Л.Н. Реорганизация сезонного ритма размножения у серебристо-черных лисиц (*Vulpes vulpes* Desm.) в процессе отбора на способность к domestикации // Журн. общ. биологии. 1983. Т. 42. № 6. С. 739–752.
- Беляев Д.Л., Трут Л.Н., Рувинский А.О. Генетически детерминированная летальность у лисиц и возможности ее преодоления // Генетика. 1973. Т. 9. № 9. С. 71–79.
- Васильева Л.Л. Анализ эффекта domestикации в изменении способности серебристо-черных лисиц (*Vulpes vulpes*) к обучению // Эволюционно-генетические и генетико-физиологические аспекты domestикации пушных зверей. Новосибирск, 1991. С. 57–69.
- Васильева Л.Л. Феногенетический анализ поведения серебристо-черных лисиц (*Vulpes vulpes*) при ослаблении эффективности отбора на domestикацию: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 1992. 16 с.
- Гербек Ю.Э., Оськина И.Н., Гулевич Р.Г., Плюснина И.З. Влияние материнской метилобогащенной диеты на экспрессию гена рецептора глюкокортикоидов в гиппокампе у крыс, селективируемых по поведению // Цитол. генет. 2010. Т. 44. № 2. С. 45–52.
- Гулевич Р.Г., Трапезов О.В., Маслова Л.Н., Харламова А.В. Функция надпочечников у норок *Mustela vison*, селекционируемых по типу поведения // Журн. эвол. биохимии и физиологии. 1995. Т. 31. № 4. С. 444–448.
- Давиденков С.Н. Эволюционно-генетические проблемы в невропатологии. Л.: Ин-т им. С.М. Кирова, 1947. 380 с.
- Дарвин Ч. Происхождение человека и половой отбор. М.: Изд-во АН СССР, 1953. 1040 с.
- Дмитрий Константинович Беляев: Книга воспоминаний. Новосибирск: Изд-во СО РАН. Филиал «Гео». 2002. (Сер. «Наука Сибири в лицах»). 284 с.
- Дыгало Н.Н., Шишкина Г.Т., Бородин П.М., Науменко Е.В. Роль нейрохимических систем головного мозга в изменении реактивности гипофизарно-надпочечникового комплекса серой крысы при селекции на поведение // Журн. эволюц. биохим. и физиологии. 1985. Т. 21. № 4. С. 342.
- Захаров И.К., Аргутинская С.В., Древич В.Ф. Академик Д.К. Беляев: к 90-летию со дня рождения // Информ. вестник ВОГиС. 2007. Т. 11. № 2. С. 251–272.
- Колчанов Н.А., Захаров И.К. Профессор Вадим Александрович Ратнер: биография и библиография // Информ. вестник ВОГиС. 2005. Т. 9. № 2. С. 106–124.
- Кропоткин П.А. Этика. М.: Изд-во политич. лит-ры, 1991. 495 с.
- Кун Т. Структура научных революций. М.: Прогресс, 1975. С. 216.
- Майр Э. Популяция, виды и эволюция. М.: Мир, 1974. 464 с.
- Мечников И.И. Этюды о природе человека. М.: Изд-во АН СССР, 1961. 288 с.
- Морган Л.Г. Древнее общество или исследование линий человеческого прогресса от дикости через варварство к цивилизации. Л.: Изд-во инст. народов Севера ЦИК СССР, 1934. 352 с.
- Мухамедшина И.А. Анализ эффектов отбора по поведению на некоторые параметры когнитивных способностей лисиц // Матер. 50-й Междунар. науч. студ. конф. «Студент и научно-технический прогресс»: Биология. Новосибирск, 2012. С. 247.
- Науменко Е.В., Попова Н.К., Иванова Л.Н. Нейроэндокринные и нейрохимические механизмы domestикации животных // Генетика. 1987. Т. 23. № 6. С. 1011–1025.
- Никулина Э.М., Трапезов О.В., Харламова А.А., Попова Н.К. Аффективное защитное поведение норок: воздействия на серотонергическую и дофаминергическую системы // Сиб. биол. журнал. 1993. Вып. 3. С. 9–12.
- Оськина И.Н., Гербек Ю.Э., Шихевич С.Г. и др. Изменения гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и иммунной систем при отборе животных на domestикационное поведение // Информ. вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 1/2. С. 39–49.
- Плюснина И.З., Щепина О.А., Оськина И.Н., Трут Л.Н. Некоторые особенности обучения в водном тесте

- Морриса у крыс, отобранных по реакции на человека // Журн. высш. нервн. деятельности. 2007. Т. 57. № 3. С. 344–351
- Попова Н.К. Роль медиаторов мозга в наследственных преобразованиях поведения при domestикации // Современные концепции эволюционной генетики: Сб. науч. тр. Новосибирск, 2000. С. 319–326.
- Попова Н.К., Войтенко Н.Н., Трут Л.Н. Изменение содержания серотонина и 5-оксииндолуксусной кислоты при селекции серебристо-черных лисиц по поведению // Докл. АН СССР. 1975. Т. 223. № 6. С. 1498–1500.
- Преображенская Л. А. Некоторые особенности условного рефлекса избегания, подкрепляемого болевым раздражением партнера // Журн. высш. нервн. деятельности. 1973. Т. 23. Вып. 1. С. 51.
- Ратнер В.А. Дмитрий Константинович Беляев // Ратнер В.А. Генетика, молекулярная кибернетика: личности и проблемы. Новосибирск: Наука, 2002. С. 54–64.
- Симонов П.В. Эмоциональный мозг. М.: Наука, 1981. 216 с.
- Трут Л.Н. Пути развития концепции дестабилизирующего отбора: Биография эволюционных идей академика Д.К. Беляева (1917–1985) // Журн. общ. биологии. 1986. Т. 47. № 4. С. 435–444.
- Трут Л.Н. Эволюционные идеи Д.К. Беляева как концептуальный мост между биологией, социологией и медициной // Информ. вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 1/2. С. 7–18.
- Трут Л.Н., Маркель А.Л., Бородин П.М. и др. К 90-летию со дня рождения Дмитрия Константиновича Беляева (1917–1985) // Генетика. 2007. Т. 43. № 7. С. 869–872.
- Трут Л.Н., Науменко Е.В., Беляев Д.К. Изменение гипофизарно-надпочечниковой функции серебристо-черных лисиц при селекции по поведению // Генетика. 1972. Т. 8. № 5. С. 35–43.
- Фельдман Г.Э. Джон Бэрдон Сандерсон Холдейн. М.: Наука, 1976. 215 с.
- Филатов Д.П. Нормы поведения, или Мораль будущего с естественноисторической точки зрения // Пути в незнаемое. М., 1974. Сб. 11. С. 317–415.
- Холдэн Дж.Б.С. Факторы эволюции. М.; Л.: Биомедгиз, 1935. 71 с.
- Шмальгаузен И.И. Факторы эволюции. М.: Наука, 1968. 452 с.
- Шумный В.К. Влияние идей Д.К. Беляева на развитие исследований по генетике растений // Генетика. 1987. Т. 23. № 6. С. 947–955.
- Эфроимсон В.П. Родословная альтруизма // Новый мир. 1971. № 10.
- Эфроимсон В.П. Генетика этики и эстетики. СПб: Талисман, 1995. 228 с.
- Bachar E., Latzer Y., Canetti L. *et al.* Rejection of life in anorexic and bulimic patients // Int. J. Eating Disord. 2001. V. 31. P. 43–48.
- Bachner-Nelman R., Gritsenko I., Nemanov L. *et al.* Dopaminergic polymorphisms associated with self-report measures of human altruism: A fresh phenotype for the dopamine D4 receptor // Mol. Psychiatry. 2005. V. 10. No. 4. P. 333–335.
- Bartal I.B.-A., Decety J., Mason P. Empathy and pro-social behavior in rats // Science. 2011. P. 334. No. 6061. P. 1427–1430.
- Bartz J.A., Hollander E. The neuroscience of affiliation: forming links between basic and clinical research on neuropeptides and social behavior // Horm. Behav. 2006. V. 50. No. 4. P. 518–528.
- Batson C.D. Altruism in Humans. N.Y.: Oxford Univ. Press, 2011. 329 p.
- Belyaev D.K. Destabilizing selection as a factor in domestication // J. Hered. 1979. V. 70. P. 301–308.
- Belyaev D.K. Domestication of animals // Sci. J. (UK). 1969. No. 5. P. 47–52.
- Belyaev D.K., Trut L.N., Ruvinsky A.O. Genetics of the *W* locus in foxes and expression of its lethal effects // J. Hered. 1975. V. 66. P. 331–338.
- Bolk L. Das Problem der Menschwerdung. Jena: Fischer, 1926.
- Bosch O.J., Meddle S.L., Beiderbeck D.I. *et al.* Brain oxytocin correlates with maternal aggression: link to anxiety // J. Neurosci. 2005. V. 25. P. 6807–6815.
- Bradshaw J., Paul E. Could empathy for animals have been an adaptation in the evolution of *Homo*? // Animal Welfare. 2010. V. 19. No. S1. P. 107–112.
- Broidy L.M., Nagin D.S., Tremblay R.E. *et al.* Developmental trajectories of childhood disruptive behaviors and adolescent delinquency: A six site, cross national study // Dev. Psychol. 2003. V. 39. P. 222–245.
- Bufill E., Agustí J., Blesa R. Human neoteny revisited: The case of synaptic plasticity // Am. J. Hum. Biol. 2011. V. 23. No. 6. P. 729–739.
- Church R.M. Emotional reactions of rats to the pain of others // J. Comp. Physiol. Psychol. 1959. V. 52. No. 2. P. 132–134.
- Clutton-Brock J. Origins of the dog: domestication and early history // Domestic dog: its evolution, behavior and interactions with people / Ed. J. Serpell. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1997. P. 2–19.
- Darlington P.J. Altruism: Its characteristics and evolution // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. No. 1. P. 385–389.
- De Kloet E.R., de Kock S., Schild V., Veldhuis H.D. Antigluccorticoid RU 38486 attenuates retention of a behaviour and disinhibits the hypothalamic-pituitary adrenal axis at different brain sites // Neuroendocrinol. 1988. V. 47. P. 109–115.
- de Waal F.B.M. Putting the altruism back into altruism: the evolution of empathy // Annu. Rev. Psychol. 2008. V. 59. P. 279–300.
- de Waal F.B.M. The empathic ape // New Scientist. 2005. No. 2509. P. 52–54.
- Dionne G., Tremblay R.E., Boivin M. *et al.* Physical aggression and expressive vocabulary in 19 month-old twins // Dev. Psychol. 2003. V. 39. P. 261–273.
- Ebstein R.P., Israel S., Chew S.H. *et al.* Genetics of human social behavior // Neuron. 2010. V. 65. No. 6. P. 831–844.
- Evans V.E., Braud W.G. Avoidance of a distressed conspecific // Psychon. Sci. 1969. V. 15. P. 166.
- Fink S., Excoffier L., Heckel G. Mammalian monogamy is not controlled by a single gene // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. No. 29. P. 5743–5748.
- Forsythe R., Horowitz J., Savin N.E., Sefton M. Fairness in simple bargaining experiments // Games Econ. Behav. 1994. V. 6. P. 347–369.

- Fresan A., Camarena B., Apiquian R. *et al.* Association study of MAO-A and DRD4 genes in schizophrenic patients with aggressive behavior // *Neuropsychobiology*. 2007. V. 55. P. 171–175.
- Greene J.Th. Altruistic behavior in the albino rat // *Psychon. Sci.* 1969. V. 14. No. 1. P. 47.
- Hamilton W.D. The genetical theory of social behavior. I, II // *J. Theoret. Biol.* 1964. V. 7. No. 1. P. 1–52.
- Hammock E.A.D., Young L.J. Functional microsatellite polymorphism associated with divergent social structure in vole species // *Mol. Biol. Evol.* 2004. V. 21, No. 6. P. 1057–1063.
- Hay D.F. The roots and branches of human altruism // *Br. J. Psychol.* 2009. V. 100. No. 3. P. 473–479.
- Israel S., Lerer E., Shalev I. *et al.* The oxytocin receptor (OXTR) contributes to prosocial fund allocations in the dictator game and the social value orientations task // *PLoS ONE*. 2009. V. 4. P. e5535.
- Knafo A., Israel S., Darvasi A. *et al.* Individual differences in allocation of funds in the dictator game associated with length of the arginine vasopressin 1a receptor RS3 promoter region and correlation between RS3 length and hippocampal mRNA // *Genes Brain Behav.* 2008. V. 7. P. 266–275.
- Knafo A., Zahn-Waxler C., Davidov M. *et al.* Empathy in early childhood: genetic, environmental, and affective contributions // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2009. V. 1167. P. 103–114.
- Korte S.M. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2001. V. 25. P. 117–142.
- Korte S.M., de Kloet E.R., Buwalda B. *et al.* Antisense to the glucocorticoid receptor in hippocampal dentate gyrus reduces immobility in forced swim test // *Eur. J. Pharmacol.* 1996. V. 301. P. 19–25.
- Langford D.J., Cramer S.E., Shehzad Z. *et al.* Social modulation of pain as evidence for empathy in mice // *Science*. 2006. V. 312. No. 5782. P. 1967–1970.
- Masserman J., Wechkin M.S., Terris W. Altruistic behavior in rhesus monkeys // *Am. J. Psychiatry*. 1964. V. 121. No. 6. P. 584–585.
- Maxson S.C. The genetics of offensive aggression in mice // *Handbook of Behavior Genetics* / Ed. Y.-K. Kim, N.Y.: Springer, 2009. P. 301–316.
- Oitzl M.S., de Kloet E.R. Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning // *Behav. Neurosci.* 1992. V. 106. P. 62–71.
- Øverli Ø., Winberg S., Pottinger T.G. Behavioral and neuroendocrine correlates of selection for stress responsiveness in rainbow trout // *Integr. Comp. Biol.* 2005. V. 45. P. 463–474.
- Plyusnina I.Z., Solov'eva M.Yu., Oskina I.N. Effect of domestication on aggression in gray norway rats // *Behav. Genet.* 2011. V. 41. No. 4. P. 583–592.
- Reul J.M.H.M., Hesketh S.A., Collins A., Mécinas M.G. Epigenetic mechanisms in the dentate gyrus act as a molecular switch in hippocampus-associated memory formation // *Epigenetics*. 2009. V. 4. No. 7. P. 434–439.
- Reuter M., Frenzel C., Walter N.T. *et al.* Investigating the genetic basis of altruism: The role of the COMT Val158Met polymorphism // *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.* 2011. V. 6. No. 5. P. 662–668.
- Rice G.E. Aiding responses in rats: Not in guinea pigs // *Proc. Ann. Conv. APA*. 1965. V. 73. P. 105–106.
- Rice G.E. Jr., Gainer P. 'Altruism' in the albino rat // *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1962. V. 55. No. 1. P. 123–125.
- Rushton J.P. Genetic and environmental contributions to prosocial attitudes: a twin study of social responsibility // *Proc. Biol. Sci.* 2004. V. 271. P. 2583–2585.
- Rushton J.P., Fulker D.W., Neale M.C. *et al.* Altruism and genetics // *Acta Genet. Med. Gemellol.* 1984. V. 33. P. 265–271.
- Satinder K.P. Genotype dependent effects of damphetamine sulphate and caffeine on escape-avoidance behavior of rats // *J. Comp. Physiol.* 1971. V. 76. P. 359–364.
- Silk J.B. Empathy, sympathy and prosocial preferences in primates // *The Oxford Handbook of Evolutionary Psychology* / Ed. R.I.M. Dunbar, L. Barrett. Oxford: Oxford Univ. Press, 2007. P. 115–126.
- Silk J.B., House B.R. Evolutionary foundations of human prosocial sentiments // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. No. S2. P. 10910–10917.
- Singer T., Seymour B., O'Doherty J.P. *et al.* Empathic neural responses are modulated by the perceived fairness of others // *Nature*. 2006. V. 439. No. 7075. P. 466–469.
- Skuse D.H., Gallagher L. Dopaminergic–neuropeptide interactions in the social brain // *Trends Cogn. Sci.* 2008. V. 13. P. 27–35.
- Somel M., Franz H., Yan Z. *et al.* Transcriptional neoteny in the human brain // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. No. 14. P. 5743–5748.
- Tremblay R.E. Towards an epigenetic approach to experimental criminology: The 2004 Joan McCord Prize Lecture // *J. Exp. Criminol.* 2005. V. 1. No. 4. P. 397–415.
- Trivers R.L. The evolution of reciprocal altruism // *Quart. Rev. Biol.* 1971. V. 46. No. 1. P. 35–57.
- Trut L., Oskina I., Kharlamova A. Animal evolution during domestication: the domesticated fox as a model // *Bioessays*. 2008. V. 31. No. 3. P. 349–360.
- Volavka J., Bilder R., Nolan K. Catecholamines and aggression: the role of COMT and MAO polymorphisms // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004. P. 1036. P. 393–398.
- Wechkin S., Masserman J.H., Terris W. Shock to a conspecific as an aversive stimulus // *Psychon. Sci.* 1964. V. 1. No. 2. P. 47–48.
- West-Eberhard M.J. Phenotypic plasticity and the origins of diversity // *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1989. V. 20. P. 249–278.
- Wilcock J., Broadhurst P.L. Strain differences in emotionality. Open-field and conditioned avoidance behavior in the rat // *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1968. V. 63. P. 335–338.
- Wrangham R., Pilbeam D. African apes as time machines // *All Apes Great and Small* / Ed. B. Galdikas, N. Briggs, L. Sheeran *et al.* N.Y.: Kluwer/Plenum Publishers, 2001. P. 5–18.
- Young L. J., Wang Z. The neurobiology of pair bonding // *Nat. Neurosci.* 2004. V. 7. P. 1048–1054.
- Young L.J., Nilsen R., Katrina G. *et al.* Increased affiliative response to vasopressin in mice expressing the V1a receptor from a monogamous vole // *Nature*. 1999. V. 400. No. 6746. P. 766–768.

**DMITRY KONSTANTINOVICH BELYAEV:
EVOLUTION COMPRESSED TO A HUMAN LIFETIME****I.K. Zakharov^{1,2}, Yu.E. Herbek¹, O.V. Trapezov¹**¹Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: zakharov@bionet.nsc.ru;²Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia**Summary**

Academician Dmitry Konstantinovich Belyaev was in the focus of events in Russian biology. Above all, he participated in the resurrection of genetics, which had been tabooed for years in the USSR; in the organization and development of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences, including its Institute of Cytology and Genetics; and in establishing communications with the global genetic community. His concept of destabilizing selection has passed through a half-century test and is still in development.

Key words: D.K. Belyaev, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences, genetics, rate of evolution, destabilizing selection, variability, experimental domestication, human evolution, stress, aggression, altruism.

УДК 577.213:578.891:004.942

ПОДАВЛЕНИЕ РЕПЛИКАЦИИ СУБГЕНОМНОГО РНК РЕПЛИКОНА ВИРУСА ГЕПАТИТА С ИНГИБИТОРОМ NS3 ПРОТЕАЗЫ SCH 503034 В Huh-7 КЛЕТКАХ: СТОХАСТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

© 2012 г. Е.Л. Мищенко¹, Н.В. Иванисенко^{1,2}, И.Р. Акбердин¹, П.С. Деменков¹, В.А. Лихошвай^{1,2}, Н.А. Колчанов^{1,2}, В.А. Иванисенко¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: elmish@bionet.nsc.ru;

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 14 мая 2012 г. Принята к публикации 6 июня 2012 г.

Вирус гепатита С (ВГС) вызывает опасное заболевание печени, часто сопровождающееся циррозом и гепатоклеточной карциномой. Против ВГС до сих пор нет эффективной терапии. Для предсказания эффективности действия новых потенциальных лекарств, направленных против ВГС, актуально применение математического моделирования. Впервые предложена стохастическая модель репликации субгеномного РНК репликона ВГС в Huh-7 клетках в присутствии ингибитора NS3 протеазы ВГС SCH 503034. Модель описывает экспериментально полученные кинетики подавления вирусной РНК в присутствии разных концентраций SCH 503034 и может применяться для разработки оптимальных стратегий подавления РНК ВГС в Huh-7 клетках.

Ключевые слова: вирус гепатита С, субгеномный репликон, математическое моделирование, эффективность лекарств.

Введение

В настоящее время вирус гепатита С (ВГС) широко распространен в мире, однако до сих пор против него не разработано ни эффективной терапии, ни вакцины (Zoulim *et al.*, 2003). Плюс-цепь РНК генома ВГС (~9,600 нуклеотидов) кодирует полипротеин С-Е1-Е2-р7-NS2-NS3-NS4А-NS4В-NS5А-NS5В, включающий структурные (С, Е1 и Е2) и неструктурные (NS2-NS5В) белки. Пептид р7 занимает промежуточное положение и выполняет роль ионного канала. Кодированная область генома фланкирована 5'- и 3'-нетранслируемыми районами (5'- и 3'-UTRs) (Tang, Grisy, 2009). Процессинг структурной части полипротеина осуществляется клеточной пептидазой. Процессинг неструктурной части включает самовыщепление протеаз NS2/NS3 и NS3 и расщепление NS3 протеазой остального фрагмента с образованием индивидуальных белков NS4А, NS4В,

NS5А, NS5В (Lin *et al.*, 1994). Так как NS3 выполняет критическую роль в процессинге полипротеина, функция этого белка делает его привлекательной мишенью для терапевтического воздействия на вирус.

Репликация РНК генома ВГС осуществляется репликационным комплексом в кластерах мембранных везикул. Везикулы образуются от мембран эндоплазматического ретикулума (ЭР) в присутствии NS4В (Egger *et al.*, 2002). В этот процесс вовлечены белки клетки-хозяина: PI4К-IIIα (Reiss *et al.*, 2011), hVAP-A/B (Miller, Krijnse-Locker, 2008), Rab5А, EEA1, rabaptin 5, Rab4 (Stone *et al.*, 2007).

Репликационный комплекс состоит из ассоциированных на мембране ЭР всех неструктурных белков ВГС (Moradpour *et al.*, 2003), а также белков клетки-хозяина: PI4К-IIIα (Reiss *et al.*, 2011), VAP-A/B, FKBP8, Hsp90, циклофилина А/В, геранилгеранилированного FBL2 (Moriishi, Matsuura, 2007). Главную роль в работе репли-

казного комплекса выполняет РНК-зависимая РНК-полимераза NS5B. Механизмы как сборки репликационного комплекса, так и формирования везикул остаются до сих пор неизученными. Репликационный комплекс синтезирует на матрице плюс-цепи РНК генома минус-цепь с образованием двуцепочечного РНК интермедиата, минус-цепь которого служит матрицей для синтеза новых плюс-цепей РНК (Targett-Adams *et al.*, 2008). Новые плюс-цепи РНК выходят из везикул в цитоплазму, где они могут транслироваться или вовлекаться в новые везикулы для следующего раунда репликации.

Долгое время не было экспериментальной клеточной системы для изучения ВГС. В 1999 г. был получен субгеномный РНК репликон ВГС (кодирующий только неструктурные белки), способный автономно реплицироваться в Huh-7 клетках (Lohmann *et al.*, 1999). Репликон и вирусные белки выходят на стационарные концентрации в клетках уже через 2–3 дня после трансфекции: плюс-цепь РНК ~ 1000 молекул/клетка; отношение плюс-цепь РНК/минус-цепь РНК ~ 10 : 1; белки ~ 10⁶ молекул/клетка (Quinkert *et al.*, 2005). Стационарные концентрации вирусных РНК и белков могут поддерживаться в течение нескольких лет культивирования клеток, поэтому репликационная клеточная система незаменима для изучения репликации генома ВГС и доклинической оценки эффективности новых потенциальных анти-ВГС лекарств (Quinkert *et al.*, 2005; Malcolm *et al.*, 2006).

Для РНК-зависимой РНК-полимеразы NS5B характерна высокая частота ошибок. Мутации, вводимые NS5B в вирусный РНК геном на каждом раунде репликации, приводят к гетерогенным РНК вариантам, которые могут быть источником устойчивости вируса к потенциальным лекарствам (Castro *et al.*, 2005). Недавно было установлено, что РНК варианты, устойчивые к специфическому лекарству, могут существовать как в культуре клеток, так и плазме пациентов еще до начала введения лекарств (Kieffer *et al.*, 2007; Robinson *et al.*, 2011).

Применение математического моделирования актуально для оценки эффективности действия новых потенциальных лекарств. Математическая детерминистическая модель репликации субгеномного ВГС репликона в Huh-7 клетках была впервые представлена в

работе Н. Dahari с соавт. (Dahari *et al.*, 2007). На основе этой модели была получена модель полного внутриклеточного процесса репликации ВГС (Nakabayashi, 2012), однако обе модели не включали описания механизмов действия лекарств и были не способны предсказывать эффективность их действия в репликационных клетках. В 2007 г. нами была предложена детерминистическая модель репликации субгеномного ВГС репликона в Huh-7 клетках, специально построенная для оценки эффективности действия лекарств на репликацию РНК ВГС (Mishchenko *et al.*, 2007). Модель хорошо описывала динамику падения РНК в присутствии ингибиторов NS3 протеазы на начальном временном интервале, но не давала хорошего согласия с экспериментальными данными при действии ингибиторов более 3 суток.

Целью данной работы было построение минимальной базовой модели, описывающей динамику подавления вирусной РНК ингибитором NS3 протеазы SCH 503034 в Huh-7 клетках (Malcolm *et al.*, 2006) на всем временном интервале экспериментально определенной динамики вирусной РНК. Одной из важных особенностей модели был учет лекарственно-устойчивых форм вирусной РНК в клетках. Мы предположили, что устойчивые к ингибитору мутантные формы вирусной РНК предсуществуют в клетках на основании экспериментального определения лекарственно-устойчивых вирусных РНК в репликационных клетках до введения ингибиторов (Robinson *et al.*, 2011). Для построения модели был предложен стохастический подход. Построенная модель хорошо предсказывала экспериментальные зависимости подавления вирусной РНК в присутствии SCH 503034.

Результаты и их обсуждение

Описание моделируемых процессов

Схема процессов, включенных в минимальную модель репликации субгеномного РНК репликона ВГС в Huh-7 клетках в присутствии ингибиторов NS3 протеазы, показана на рис. 1.

В модель были включены следующие биологические сущности: вирусный полипротеин *p* (NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B); вирусный мутантный полипротеин

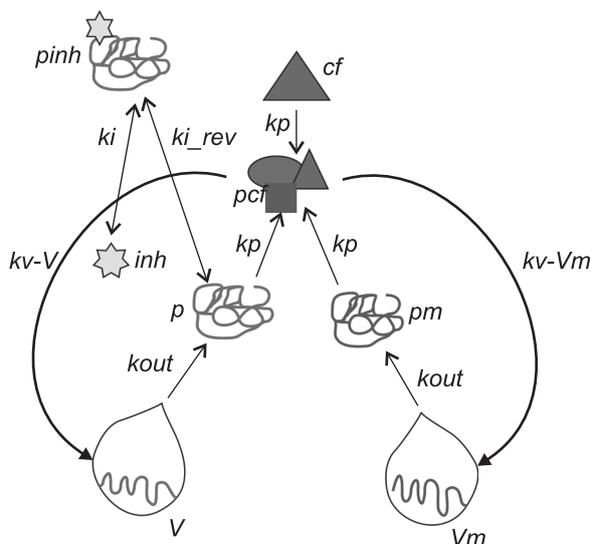


Рис. 1. Схема процессов, включенных в минимальную модель репликации субгеномного РНК репликона ВГС в Nuh-7 клетках в присутствии потенциальных лекарств – ингибиторов NS3 протеазы.

Обозначения: V , V_m – везикулы, содержащие вирусную РНК дикого типа и мутантные формы вирусной РНК соответственно; p , p_m – полипротеины, транслированные с РНК дикого типа и мутантных форм РНК соответственно; cf – интегральный клеточный фактор; pcf – комплекс интегрального клеточного фактора и вирусных неструктурных белков (репликаза); $pinh$ – комплекс ингибитор–полипротеин; стрелки – процессы; k_{out} – константа скорости образования вирусного полипротеина; k_v – константа скорости образования мембранных везикул, в которых идет репликация плюс- и минус-цепей вирусной РНК; k_p – константа скорости образования вирусной репликазы – комплекса клеточного фактора и вирусных белков; k_i – константа скорости взаимодействия ингибитора с полипротеином, k_{i_rev} – константа скорости диссоциации комплекса ингибитор–полипротеин.

p_m (NS2-NS3*-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B); интегральный клеточный фактор cf ; комплекс вирусных неструктурных и клеточных белков (репликаза) pcf и два типа мембранных везикул: везикулы V , продуцирующие в цитоплазму клетки вирусную плюс-цепь РНК дикого типа (кодирующую NS3 протеазу, способную взаимодействовать с ингибиторами), и везикулы V_m , продуцирующие в цитоплазму вирусные мутантные плюс-цепи РНК, кодирующие лекарственно-устойчивые формы NS3 протеазы. Предполагалось, что скорости образования полипротеинов дикого p и мутантного p_m типов определяются количеством везикул V и V_m соот-

ветственно и константой скорости k_{out} . Описание стадий наработки внутри везикул вирусной РНК, ее выход в цитоплазму и трансляцию на рибосомах были опущены. NS3 протеаза в составе полипротеина дикого типа p обратимо взаимодействует с ингибитором inh с образованием комплекса $pinh$ (константы скоростей k_i и k_{i_rev} для прямого и обратного процессов соответственно), в то время как NS3 протеаза в составе мутантного полипротеина p_m лекарственно-устойчива и не взаимодействует с ингибиторами. Было предположено, что комплекс неструктурных вирусных и клеточных белков pcf образуется при взаимодействии полипротеинов p и p_m с интегральным клеточным фактором cf с константой скорости k_p . Процессинг p и p_m является промежуточной стадией образования комплекса pcf и в модели не рассматривался. В свою очередь, комплекс pcf вовлечен в образование новых везикул V и V_m . Комплекс pcf включает репликазу, которая может связываться с плюс-цепью РНК в цитоплазме. Связывание pcf с плюс-цепями РНК дикого и мутантного типов приводит к формированию везикул V и V_m соответственно. Этот процесс был описан через взаимодействие pcf с V и V_m с константой скорости k_v , опуская промежуточные стадии синтеза РНК в везикулах, ее выход в цитоплазму и связывание с pcf . Было учтено, что основной вклад во фракцию мутантной вирусной РНК дает предсуществующая мутантная РНК до введения ингибиторов в клетку, так как количество мутантной РНК, появившейся в присутствии ингибиторов, незначительно (Robinson *et al.*, 2011). В модели также учтена скорость деградации вирусных белков и везикул с константами скоростей m_p и m_v соответственно. Предполагалось, что комплекс pcf деградирует также с константой скорости m_p . Клеточный фактор cf лимитирует неограниченный рост репликазы и, следовательно, вирусной РНК в клетках аналогично ранее предложенной модели (Mishchenko *et al.*, 2007).

Математическая стохастическая модель

Стохастический подход особенно важен при моделировании процессов, протекающих при малых концентрациях их участников (Srivastava *et al.*, 2001). Именно такая ситуация

наблюдается при продолжительном действии ингибиторов на вирусную мишень. Согласно экспериментальным данным, концентрация вирусной РНК может уменьшиться почти на 2 порядка уже на третьи сутки действия ингибитора SCH 503034 (Malcolm *et al.*, 2006). Все моделируемые процессы (рис. 1) рассматривали как случайные события. Моделирование проводили с использованием алгоритма Гиллеспи (Gillespie, 1976), который представляет собой разновидность методов Монте-Карло. Согласно алгоритму, каждый тип взаимодействия в системе является «химическим μ каналом реакций». При этом под реакцией подразумевается конкретное биохимическое событие (например, образование комплекса интегрального клеточного фактора с вирусными белками). Также предполагается, что общее количество таких μ каналов равно M . В данном алгоритме обновление состояния системы определяется: 1) временем, когда должна произойти следующая реакция; 2) какая именно реакция произойдет в этот момент времени.

Момент времени для реализации следующей реакции определяется генерацией случайного числа в соответствии с распределением Пуассона относительно промежутков времени Δt , проходящих между реакциями:

$$P(\tau) = \sum_{\mu} a_{\mu} \cdot \exp[-\tau \sum_{\mu} a_{\mu}], \quad (a)$$

где τ – время, когда должна произойти следующая реакция; a_{μ} – величина, характеризующая вероятность протекания биохимической реакции в единицу времени в канале μ . В свою очередь, a_{μ} определяется как $a_{\mu} = c_{\mu} h_{\mu}$, где c_{μ} – по сути, константа скорости реакции, h_{μ} – число различных комбинаций молекулярных реагентов, доступных в текущем состоянии системы в канале μ . Значение h_{μ} определяется кинетикой реакции. Вероятность того, что в момент времени τ произойдет реакция канала μ , можно рассчитать согласно дискретному распределению:

$$P(\mu = \mu') = \frac{a_{\mu'}}{\sum_{\mu} a_{\mu}}. \quad (б)$$

Таким образом, алгоритм состоит из следующих шагов:

1. Задать константы реакций c_{μ} в момент времени $t = 0$.

2. Рассчитать значения $a_{\mu} = c_{\mu} h_{\mu}$, $\mu = 1, \dots, M$.

3. Сгенерировать два случайных числа $u_1, u_2 \in [0, 1)$, которые удовлетворяют равномерному распределению. Первое число определяет момент времени для реализации ближайшей реакции Δt , а второе – канал μ , в котором будет протекать реакция в следующий момент Δt .

4. Рассчитать время τ , через которое произойдет следующая реакция, согласно распределению (а): $\tau = \frac{-(\ln u_1)}{\sum_{\mu} a_{\mu}}$.

5. Найти канал μ следующей реакции согласно распределению (б), μ определяется из условия $\sum_{v=1}^{\mu-1} \frac{a_v}{a_0} < u_2 < \sum_{v=1}^{\mu} \frac{a_v}{a_0}$, где $a_0 = \sum_{v=1}^M a_v$.

6. Увеличить время t на τ и обновить вектор состояния системы. Перейти к шагу 2.

В табл. 1 представлены значения величины a_{μ} , характеризующей вероятность протекания конкретной реакции (рис. 1) в единицу времени в канале μ .

Условие на концентрацию свободного клеточного фактора cf , не входящего в состав вирусных репликативных комплексов в везикулах, дано с учетом того, что суммарная концентрация существей, содержащих клеточный фактор, постоянна: $cf + pcf + k_1 V + k_2 Vm = ch_0$. Тогда концентрация cf определяется разностью между ch_0 и концентрациями клеточного фактора, входящего в состав везикул ($k_1 V + k_2 Vm$), а также в состав комплекса pcf .

Алгоритм был реализован на языке C++. Компьютерные эксперименты расчета подавления вирусной РНК в клетке повторяли до тех пор, пока средние значения РНК в каждой точке оставались практически неизменными.

Начальные условия модели

При расчете кинетики достижения концентрации РНК репликона ВГС стационарного значения после момента трансфекции (в отсутствие ингибитора) предполагали, что в начальный момент времени в клетке находятся 10 везикул V , количество везикул Vm было принято равным нулю. Начальные значения остальных трех переменных (p , pm , pcf) были также заданы равными нулю.

Таблица 1

Значения a_μ , использованные в алгоритме расчета стохастической модели подавления репликации субгеномного РНК репликона ВГС ингибитором NS3 протеазы SCH 503034

Реакция	a_μ	Изменения состояния системы в канале μ	Реакция	a_μ	Изменения состояния системы в канале μ
Образование V	$kv \cdot V \cdot pcf$	$V \rightarrow V + 1$ $pcf \rightarrow pcf - 1$	Образование p	$kout \cdot V$	$p \rightarrow p + 1$
Деградация V	$mv \cdot V$	$V \rightarrow V - 1$	Образование $pinh$	$ki \cdot p \cdot inh$	$p \rightarrow p - 1$ $pinh \rightarrow pinh$
Образование Vm	$kv \cdot Vm \cdot pcf$	$Vm \rightarrow Vm + 1$ $pcf \rightarrow pcf - 1$	Диссоциация $pinh$	$ki_rev \cdot pinh$	$p \rightarrow p + 1$ $pinh \rightarrow pinh$
Деградация Vm	$mv \cdot Vm$	$Vm \rightarrow Vm - 1$	Деградация p	$pm \cdot p$	$p \rightarrow p - 1$
Образование pcf	$kp \cdot p \cdot cf$	$pcf \rightarrow pcf + 1$ $p \rightarrow p - 1$	Деградация $pinh$	$pm \cdot pinh$	$pinh \rightarrow pinh$
Образование pcf	$kp \cdot pm \cdot cf$	$pcf \rightarrow pcf + 1$ $pm \rightarrow pm - 1$	Образование pm	$kout \cdot Vm$	$p \rightarrow p + 1$
Деградация pcf	$mp \cdot pcf$	$pcf \rightarrow pcf - 1$	Деградация pm	$mp \cdot pm$	$pm \rightarrow pm$

Начальными условиями при расчете кинетик подавления вирусной РНК в присутствии ингибитора NS3 протеазы являлись значения переменных, которые были получены после выхода РНК на стационар ($V = 100, p = 395, pcf = 0$). Количество везикул V и Vm задавали следующим образом. На основе литературных данных о предсуществовании мутантных лекарственно устойчивых вирусных РНК в репликоновых клетках до введения ингибитора (Robinson *et al.*, 2011) мы учитывали, что стационарное значение количества везикул V_0 является суммой V и Vm . Доля Vm по отношению к V_0 в начальный момент времени действия ингибитора задавалась как свободный параметр α , зависящий от концентрации ингибитора. Таким образом, в начальный момент времени количество везикул V и Vm в одной клетке выражали как $Vm = \alpha \cdot V_0$ и $V = (1 - \alpha) \cdot V_0$ соответственно.

Концентрацию мутантного полипротеина pm в момент введения ингибитора в клетку задавали аналогично: $pm = \alpha \cdot p_0, p = (1 - \alpha) \cdot p_0$, где p_0 – стационарная концентрация полипротеина в клетке.

Оценка параметров модели

Стохастическая модель имеет 8 параметров (табл. 2). Оценку параметров $\alpha, kv, mv, kp, kout$ производили с учетом соответствия расчета

концентрации вирусной РНК опубликованным экспериментальным данным в присутствии и отсутствии ингибитора. В отсутствие ингибитора стационарные концентрации плюс- и минус-цепей РНК в клетке оценены ~ 1000 молекул/клетка и ~ 100 молекул/клетка соответственно; время достижения стационара – 2–3 дня с момента трансфекции (Quinkert *et al.*, 2005). Также определены кинетики подавления РНК в присутствии разных концентраций SCH 503034 (Malcolm *et al.*, 2006). При адаптации модели использовали те значения параметров, которые давали минимальное среднеквадратичное отклонение теоретически рассчитанных значений концентрации РНК от экспериментальных значений.

Параметры mv, mp, ki, ki_rev, cf_0 были оценены на основе литературных данных. Зная времена полужизни неструктурных белков (10–16 ч (Pietschmann *et al.*, 2001)), начальные значения mv и mp задавали $0,1 \text{ ч}^{-1}$. В результате коррекции модели для mv и mp были получены значения $0,0555 \text{ ч}^{-1}$ и $0,25 \text{ ч}^{-1}$ соответственно. Константу ki_rev оценили, зная время полужизни комплекса $pinh$ (~ 23 ч (Malcolm *et al.*, 2006)); константу ki определяли из значений K_i и ki_rev , где $K_i = \frac{ki_rev}{ki}$. Количество cf_0 было оценено

Таблица 2

Оценки значений параметров стохастической модели репликации субгеномного репликона ВГС в Huh-7 клетках в присутствии ингибитора NS3 протеазы SCH 503034

Параметр	Значение	Ссылка
kv	1,0 молекула ⁻¹ ч ⁻¹	адаптация модели
mv	0,0555 ч ⁻¹	Pietschmann <i>et al.</i> , 2001
kp	0,00048 молекула ⁻¹ ч ⁻¹	адаптация модели
$kout$	1,04 ч ⁻¹	адаптация модели
α	0,01* 0,001**	адаптация модели
ki	1,0 молекула ⁻¹ ч ⁻¹	Malcolm <i>et al.</i> , 2006
ki_{rev}	1,0 ч ⁻¹	Malcolm <i>et al.</i> , 2006
mp	0,25 ч ⁻¹	Pietschmann <i>et al.</i> , 2001
$cf\theta$	130 молекул	Quinkert <i>et al.</i> , 2005

* При концентрации 0,5 μM ($1,2 \times IC_{90}$) SCH503034; ** при концентрации 2,5 μM ($6 \times IC_{90}$) SCH503034.

сопоставимым с количеством минус-цепей РНК в стационаре и задано равным 130. Параметры k_1 и k_2 задали равными 1 в предположении, что в одной везикуле находится один репликационный комплекс (в состав которого входят 1000 белков NS5B). Оценки параметра α для разных концентраций SCH503034 были в области значений 0,1–1 %, что близко к экспериментальной оценке (~1,5 % (Robinson *et al.*, 2011)). Значения параметров приведены в табл. 2.

Анализ модели

Первым этапом анализа модели было исследование динамики наработки вирусных плюс- и минус-цепей РНК в клетках после трансфекции в условиях отсутствия ингибитора. Концентрации плюс- и минус-цепей РНК в клетке рассчитывали из количества везикул в клетке. Мы предполагали, что каждая везикула, V или Vm , содержит одну минус-цепь РНК (количество везикул, содержащих большее количество минус-цепей РНК, пренебрежимо мало по статистическим оценкам количеств везикул и минус-цепей РНК в клетке) и учли, что в стационаре клетки содержат ~100 минус-цепей РНК на клетку (Quinkert *et al.*, 2005). Тогда оценка максимального количества везикул, содержащих минус-цепь РНК, соответствует 100

везикулам на клетку. Оценка отношения стационарных концентраций плюс-цепь РНК : минус-цепь РНК в клетке ~ 10 : 1 (Quinkert *et al.*, 2005). Таким образом, количеству везикул в клетке соответствует равное количество минус-цепей РНК и в 10 раз большее количество плюс-цепей РНК. Расчет кинетик образования везикул показал, что стационарное значение количества везикул (100 везикул на клетку) достигалось за 2,5 дня после трансфекции. Отсюда значения стационарных концентраций плюс- и минус-цепей РНК в клетке были 1000 и 100 молекул на клетку соответственно, что хорошо согласуется с литературными данными (Quinkert *et al.*, 2005); расчетное время выхода цепей РНК на стационарные концентрации (2,5 дня) также хорошо согласуется с литературными данными (Quinkert *et al.*, 2005) (не показано). Дальнейший анализ модели проводили сравнением расчетов кинетики подавления плюс-цепи вирусной РНК в присутствии SCH 503034 с экспериментальными данными (Malcolm *et al.*, 2006). Модель с хорошей точностью описывала кинетику подавления плюс-цепи РНК в присутствии SCH 503034 на всем временном интервале экспериментальных измерений (рис. 2, а).

Важным шагом исследования было применение модели для описания экспериментальной

зависимости степени подавления вирусной РНК от возрастающих концентраций SCH 503034. Оказалось, что модель хорошо описывала такую зависимость (рис. 2, б), хотя мы не использовали ее для адаптации модели. Полученное соответствие расчетов с экспериментальными данными (Malcolm *et al.*, 2006) указывает на хорошую предсказательную способность модели.

Заключение

В настоящей работе на основе упрощенной схемы процессов репликации РНК репликона ВГС в присутствии ингибитора NS3 протеазы SCH 503034 (рис. 1) впервые построена минимальная базовая модель, адекватно описывающая динамику подавления репликона ВГС в присутствии SCH 503034 на всем временном интервале экспериментальных наблюдений. Модель построена с привлечением минимального количества параметров, с учетом стохастичности процессов репликации и деградации РНК и присутствия лекарственно устойчивых мутантных вирусных РНК. Учет стохастичности и устойчивых мутантных форм вирусной РНК может быть

полезен для описания экспериментальных кинетик подавления вирусной РНК при действии ингибиторов, направленных также и на другие мишени. В дальнейшем мы планируем развить предложенную базовую минимальную модель для предсказания эффективности как индивидуальных ингибиторов, так и их комбинаций на различные мишени.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Н.Л. Подколдному, С.В. Николаеву и И.И. Титову за всестороннее обсуждение и сделанные ценные замечания.

Работа была поддержана грантом EU-FP7 SYSPATHO № 260429, Госконтрактом Минобрнауки РФ № 11.519.11.6041. Программой РАН «Биологическое разнообразие» Проект 29 «Биоинформатика генетической изменчивости: исследование влияния мутаций на молекулярно-генетические системы организмов»; Программой РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Научной школой» академика РАН Н.А. Колчанова НШ-5278.2012.4.

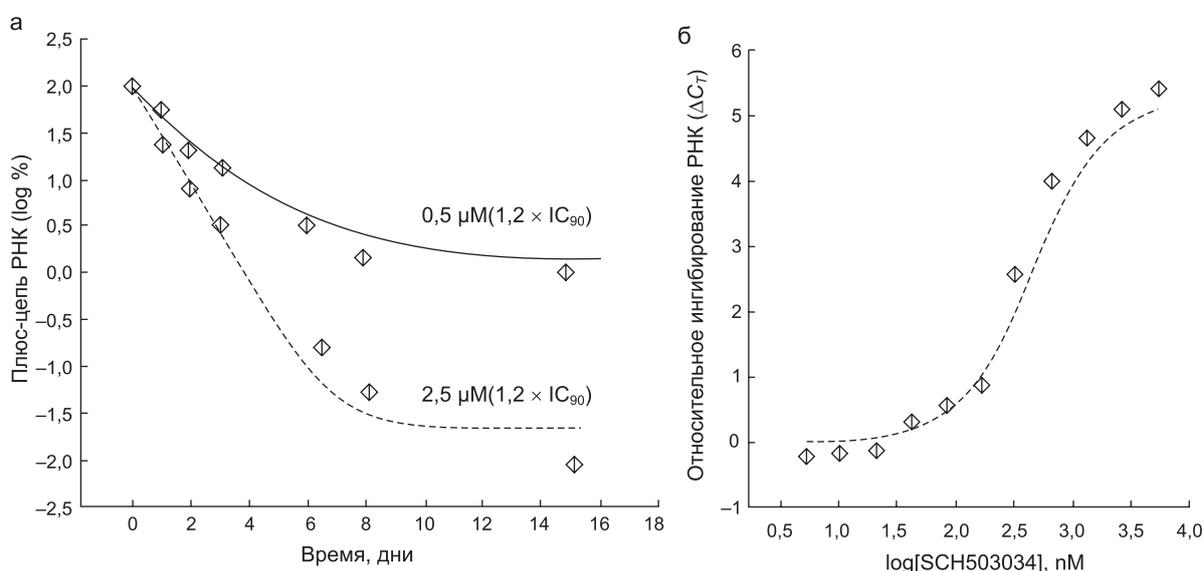


Рис. 2. Моделирование подавления плюс-цепи вирусной РНК в Huh-7 клетке в присутствии ингибитора NS3 протеазы SCH 503034 ($K_i = 14$ nM).

а – кинетики подавления стационарной концентрации РНК: при концентрации SCH 503034 0,5 μM – сплошная линия; при концентрации SCH 503034 – 2,5 μM, пунктирная линия; ромбы экспериментальные данные (Malcolm *et al.*, 2006); б – зависимость степени подавления РНК при возрастающих концентрациях SCH 503034 в течение 72 ч. Пунктирная линия – расчет модели; ромбы – экспериментальные данные (Malcolm *et al.*, 2006). Каждому ΔC_T (ось y) соответствует уменьшение уровня РНК в 2 раза.

Литература

- Castro C., Arnold J.J., Cameron C.E. Incorporation fidelity of the viral RNA-dependent RNA polymerase: a kinetic, thermodynamic and structural perspective // *Virus. Res.* 2005. V. 107. P. 141–149.
- Dahari H., Ribeiro R.M., Rice C.M., Perelson A.S. Mathematical modeling of subgenomic hepatitis C viral replication in Huh-7 cells // *J. Virol.* 2007. V. 81. P. 750–760.
- Egger D., Wölk B., Gosert R. *et al.* Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex // *J. Virol.* 2002. V. 76. P. 5974–5984.
- Gillespie D.T. General method for numerically simulating stochastic time evolution of coupled chemical reactions // *J. Comput. Phys.* 1976. V. 22. P. 403–434.
- Kieffer T.L., Sarrazin C., Miller J.S. *et al.* Telaprevir and pegylated interferon-alpha-2a inhibit wild-type and resistant genotype 1 hepatitis C virus replication in patients // *Hepatology.* 2007. V. 46. P. 631–639.
- Lin C., Pragai B.M., Grakoui A. *et al.* Hepatitis C virus NS3 serine proteinase: trans-cleavage requirements and processing kinetics // *J. Virol.* 1994. V. 68. P. 8147–8157.
- Lohmann V., Korner F., Koch J. *et al.* Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line // *Science.* 1999. V. 285. P. 110–113.
- Malcolm B.A., Liu R., Lahser F. *et al.* SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells // *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2006. V. 50. P. 1013–1020.
- Miller S., Krijnse-Locker J. Modification of intracellular membrane structures for virus replication // *Nat. Rev. Microbiol.* 2008. V. 6. P. 363–374.
- Mishchenko E.L., Bezmaternykh K.D., Likhoshvai V.A. *et al.* Mathematical model for suppression of subgenomic hepatitis C virus RNA replication in cell culture // *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2007. V. 5. P. 593–609.
- Moradpour D., Gosert R., Egger D. *et al.* Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex // *Antiviral. Res.* 2003. V. 60. P. 103–109.
- Moriishi K., Matsuura Y. Host factors involved in the replication of hepatitis C virus // *Rev. Med. Virol.* 2007. V. 17. P. 343–354.
- Nakabayashi J. A compartmentalization model of hepatitis C virus replication: An appropriate distribution of HCV RNA for the effective replication // *J. Theor. Biol.* 2012. V. 300. P. 110–117.
- Pietschmann T., Lohmann V., Rutter G. *et al.* Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs // *J. Virol.* 2001. V. 75. P. 1252–1264.
- Quinkert D., Bartenschlager R., Lohmann V. Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex // *J. Virol.* 2005. V. 79. P. 13594–13605.
- Reiss S., Rebhan I., Backes P. *et al.* Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment // *Cell Host Microbe.* 2011. V. 9. P. 32–45.
- Robinson M., Tian Y., Delaney W.E. 4th, Greenstein A.E. Pre-existing drug-resistance mutations reveal unique barriers to resistance for distinct antivirals // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 10290–10295.
- Srivastava R., Peterson M.S., Bentley W.E. Stochastic kinetic analysis of the *Escherichia coli* stress circuit using σ^{32} -targeted antisense // *Biotechnol. Bioengineer.* 2001, V. 75. P. 120–129.
- Stone M., Jia S., Heo W.D. *et al.* Participation of rab5, an early endosome protein, in hepatitis C virus RNA replication machinery // *J. Virol.* 2007. V. 81. P. 4551–4563.
- Tang H., Grisé H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis // *Clin. Sci. (Lond.)* 2009. V. 117. P. 49–65.
- Targett-Adams P., Boulant S., McLauchlan J. Visualization of double-stranded RNA in cells supporting hepatitis C virus RNA replication // *J. Virol.* 2008. V. 82. P. 2182–2195.
- Zoulim F., Chevallier M., Maynard M., Trepo C. Clinical consequences of hepatitis C virus infection // *Rev. Med. Virol.* 2003. V. 13. P. 57–68.

**SUPPRESSION OF SUBGENOMIC HEPATITIS C VIRUS RNA REPLICON
REPLICATION IN HUH-7 CELLS BY THE NS3 PROTEASE INHIBITOR
SCH5030334: A STOCHASTIC MATHEMATICAL MODEL**

**E.L. Mishchenko¹, N.V. Ivanisenko^{1,2}, I.R. Akberdin¹, P.S. Demenkov¹, V.A. Likhoshvai^{1,2},
N.A. Kolchanov^{1,2}, V.A. Ivanisenko¹**

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

²Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

Hepatitis C virus (HCV) causes a severe liver disease frequently associated with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. No effective anti-HCV therapy is available so far. Thus, it is pertinent to apply mathematical modeling to prediction of the efficiency of new candidate pharmaceuticals. A stochastic mathematical model for subgenomic HCV replicon replication in Huh-7 cells with the presence of the HCV NS3 protease inhibitor SCH 503034 is proposed. The model describes the experimental kinetic curves of viral RNA suppression at various SCH 503034 concentrations. It is applicable to the development of approaches to HCV RNA suppression in Huh-7 cells.

Key words: hepatitis C virus, subgenomic replicon, mathematical modeling, effectiveness of drugs.

УДК 575.222.7:576.316:577.113.5:004.4

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ХРОМОСОМОСПЕЦИФИЧНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК ПРИ ПРОВЕДЕНИИ FISH МИКРОДИССЕКЦИОННЫХ ДНК-ПРОБ С МЕТАФАЗНЫМИ ХРОМОСОМАМИ

© 2012 г. А.Г. Богомолов¹, К.С. Задесенец¹, Т.В. Карамышева¹,
Н.Л. Подколотный^{1,2}, Н.Б. Рубцов^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: mantis_anton@bionet.nsc.ru;

² Институт вычислительной математики и математической геофизики СО РАН,
Новосибирск, Россия;

³ Новосибирский государственный университет

Поступила в редакцию 15 мая 2012 г. Принята к публикации 30 мая 2012 г.

В настоящее время для улучшения результатов гибридизации *in situ* используется супрессия повторенных последовательностей (*chromosomal in situ suppression hybridization* – CISS-гибридизация). Однако CISS-гибридизацию не всегда можно провести. В статье представлен новый подход, позволяющий с помощью компьютерного анализа FISH изображений выделить сигнал хромосомоспецифичных последовательностей ДНК.

Ключевые слова: *Opisthorchis felineus*, *Metorchis xanthosomus*, *Homo sapiens*, мейотические хромосомы, диспергированные повторенные последовательности ДНК, хромосомоспецифичные последовательности ДНК, супрессионная гибридизация *in situ* (CISS), флюоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), анализ изображений.

Введение

Флюоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) в настоящее время является одним из наиболее эффективных и широко используемых методов молекулярной цитогенетики, предназначенных для визуализации изучаемых последовательностей ДНК на цитологическом препарате. Возможности, способы и результаты ее использования во многом зависят от состава конкретных ДНК-проб. ДНК хромосомных районов или целых хромосом включает в себя значительное количество повторенных последовательностей, что обуславливает присутствие в микродиссекционных и сортировочных ДНК-пробах большого количества меченой ДНК, гомологичной как кластеризованной, так диспергированной повторенным последовательностям. Особенности

распределения в хромосомах повторенных последовательностей и их влияние на результаты FISH недавно были детально рассмотрены (Morozkin *et al.*, 2011). При использовании микродиссекционных и сортировочных ДНК-проб для FISH с метафазными хромосомами интенсивный сигнал выявляется не только в районах или хромосомах, которые были использованы для создания ДНК-проб, но также на других хромосомах и хромосомных районах, содержащих гомологичные повторенные последовательности (Рубцов и др., 2005). Традиционно проблема выявления специфичного сигнала решается подавлением гибридизации меченых повторенных последовательностей при проведении предгибридизации ДНК-пробы с 50–100-кратным избытком Cot1 ДНК изучаемого вида. Этот прием получил название

Chromosomal *In Situ* Suppression Hybridization, CISS-гибридизация (Lichter *et al.*, 1988). Использование CISS-гибридизации сталкивается как минимум с двумя проблемами: 1) супрессия гибридации повторенных последовательностей приводит к исчезновению сигнала всех повторенных последовательностей, в том числе и хромосомоспецифичных; 2) в ряде случаев CISS-гибридизация не может быть проведена из-за отсутствия доступной Cot1 ДНК. Если для некоторых видов отсутствует коммерчески доступная Cot1 ДНК, но она может быть получена из соответствующих биологических образцов, то для других получение необходимого количества геномной ДНК практически невозможно.

В настоящей статье предложен метод, позволяющий в результате компьютерной обработки результатов двухцветной FISH ДНК-проб, полученных из разных хромосом, выделить сигналы FISH, обусловленные хромосомоспецифичными последовательностями, представленными в используемых ДНК-пробах. Разработанный метод и программное обеспечение были опробованы в экспериментах по гибридации микродиссекционных ДНК-проб, полученных из хромосом человека, *Opisthorchis felineus* и *Metorchis xanthosomus*.

Материалы и методы

Препараты метафазных хромосом человека получали из трехдневных культур клеток периферической крови здоровых доноров, согласно стандартным процедурам (Henegariu *et al.*, 2001). Препараты митотических и мейотических хромосом готовили из половозрелых мариит *O. felineus* и *M. xanthosomus*, как описано ранее (Zadesenets *et al.*, 2012). Мариты *O. felineus* и *M. xanthosomus* были любезно предоставлены В.А. Мордвиновым и А.А. Катохиным (лаборатория молекулярной и клеточной биологии ИЦиГ СО РАН). ДНК-пробы индивидуальных хромосом были получены из хромосом, собранных с цитологических препаратов, окрашенных красителем Гимза (*O. felineus* и *M. xanthosomus*) и методом G-дифференциального окрашивания (хромосомы человека). Микроманипуляционно собранный материал обрабатывали протеинкиназой K, а затем амплифицировали в полиме-

разной цепной реакции (ПЦР) с частично вырожденным праймером 6MW, как описано ранее (Rubtsov *et al.*, 2000). Мечение ДНК, полученной в такой ПЦР, проводили в дополнительных циклах ПЦР в присутствии Alexa Fluor 488-5-dUTP (Molecular Probes, USA), TAMRA (Molecular Probes, USA), SpectrumOrange (Abbott Molecular, USA) (Карамышева и др., 2001).

FISH микродиссекционных ДНК-проб, полученных из хромосом 1, 2, 18 и 19 человека, с хромосомами человека проводили как по стандартному протоколу CISS-гибридации, так и без супрессии гибридации повторенных последовательностей (Lichter *et al.*, 1988). FISH ДНК-проб, полученных из хромосом 1 и 2 *M. xanthosomus* и хромосом 1 и 2 *O. felineus*, с хромосомами *M. xanthosomus* и *O. felineus* проводили с хромосомами исходных видов без использования Cot1 ДНК (Zadesenets *et al.*, 2012). Общее окрашивание хромосом проводили красителем DAPI.

Микроскопический анализ был выполнен на микроскопе AxioPlan 2 Imaging microscope (Zeiss, Germany) с набором фильтров 49 (Zeiss, Germany), SP101 FITC (CHROMA, USA) и SP103v1 Cy3tmv1 (CHROMA, USA) CCD-камерой (CV M300, JAI Corporation, Japan). Для регистрации использовали программное обеспечение ISIS4 (METASystems GmbH). Микроскопию проводили в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Результаты регистрации сигнала каждого флуорохрома проводили в отдельных каналах: два канала – результаты регистрации сигналов FISH, один канал – окраска хромосом красителем DAPI.

Результаты

В результате проведения FISH микродиссекционных ДНК-проб была получена коллекция микроизображений метафазных пластинок человека и мейотических хромосом *M. xanthosomus* и *O. felineus*, которая включала FISH хромосомоспецифичных ДНК-проб человека (HSA 1, 2, 18, 19), *M. xanthosomus* (1 и 2), *O. felineus* (1 и 2) с хромосомами исходных видов.

Для выявления сигнала FISH хромосомоспецифических последовательностей учитывали следующие принципы формирования микроскопических изображений: суммарный сигнал

в каждой точке полутонового изображения (распределение интенсивности сигнала по каждому из каналов, в которых регистрировали сигналы FISH) представлял собой сумму сигнала FISH с хромосомоспецифичными последовательностями ДНК, представленными в микродиссекционной ДНК-пробе соответствующей хромосомы, сигнала FISH с диспергированными повторами, представленными в обеих микродиссекционных ДНК-пробах (диспергированные повторы, характерные для всех эухроматиновых районов хромосом, и кластерированные повторы, присутствующие в обеих хромосомах, из которых были получены микродиссекционные ДНК-пробы) и фонового сигнала, обусловленного оптической системой микроскопа и системой регистрации сигнала (рис. 1).

Таким образом, районам хромосом, из которых была получена ДНК-проба, соответствовала сумма специфического и неспецифического сигналов, тогда как районам остальных хромосом – только неспецифический сигнал (рис. 2). Сигнал FISH хромосомоспецифических последовательностей можно оценить как разницу между суммарным и неспецифическим сигналами. Разработка программного обеспечения, определяющего разницу между специфическим и неспецифическим сигналами, дает в руки исследователя инструмент для идентификации хромосом и хромосомных районов при проведении FISH без супрессии гибридизации повторенных последовательностей. Следует отметить, что результаты визуализации сигнала хромосомоспецифичных последовательностей

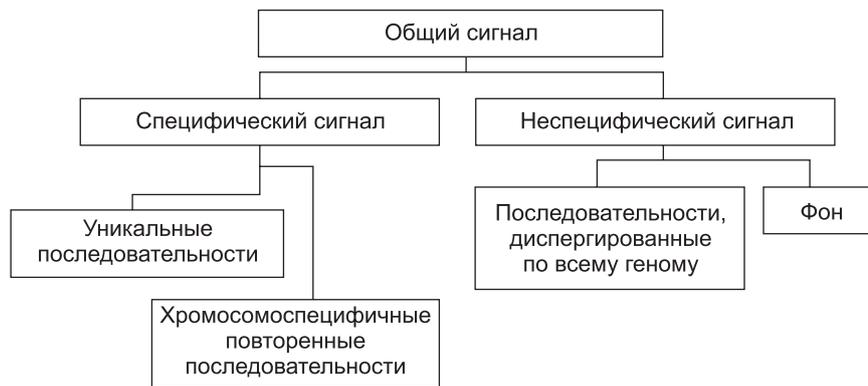


Рис. 1. Типы сигналов на FISH изображении. Под фоном подразумеваются различные шумы, которые, как правило, всегда присутствуют на изображениях.

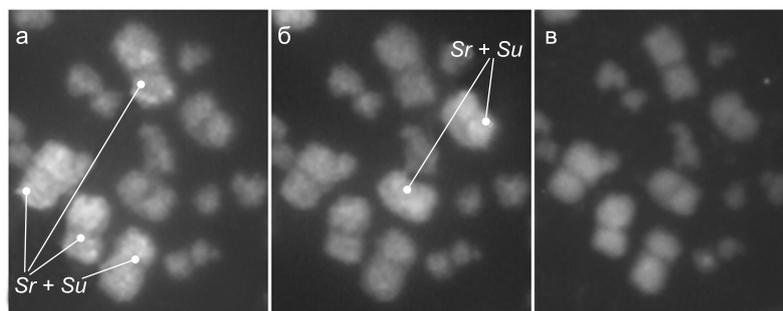


Рис. 2. Двухцветный FISH хромосом *M. xanthosomus* с ДНК-зондами из хромосом 1 (а) и 2 (б) *M. xanthosomus*.

Отмечены хромосомы, содержащие ДНК, специфичную хромосоме, из которой были получены ДНК-зонды. В отличие от других хромосом, на них был зарегистрирован не только неспецифический (Sr), но и сигнал хромосомоспецифических последовательностей (Su); (в) – общая окраска хромосом красителем DAPI. На микрофотографии приведен фрагмент двух пластинок мейотических хромосом.

с помощью компьютерного вычитания сигнала FISH повторенных последовательностей, представленных на другой хромосоме, могут отличаться от результатов традиционной CISS-гибридизации, так как в случае проведения CISS-гибридизации происходит супрессия гибридации всех повторенных последовательностей, включая хромосомоспецифичные. Таким образом, сопоставление результатов CISS-гибридизации и компьютерного выделения хромосомоспецифичного сигнала может помочь в определении локализации хромосомоспецифичных повторов (специфичных относительно хромосом, ДНК-пробы которых использовали в эксперименте).

В обработке микроскопических изображений оценка интенсивности специфического сигнала может быть получена в результате анализа FISH с ДНК-пробой другой хромосомы следующим образом:

для каждой точки (пикселя) изображения $i_{sa} = i_a - i_b$, а $i_{sb} = i_b - i_a$, где i_a – интенсивность сигнала FISH микродиссекционной ДНК-пробы, полученной из хромосомы a ; i_b – интенсивность сигнала FISH микродиссекционной ДНК-пробы, полученной из хромосомы b ; i_{sa} – рассчитанная интенсивность сигнала FISH хромосомоспецифичных последовательностей, представленных в микродиссекционной ДНК-пробе, полученной из хромосомы a ; i_{sb} – рассчитанная интенсивность сигнала FISH хромосомоспецифичных последовательностей, представленных в микродиссекционной ДНК-пробе, полученной из хромосомы b .

Возможность реализации такого подхода и его эффективность обусловлены проведением сравнения интенсивности сигналов FISH разных ДНК-проб в одних и тех же точках изображения препарата, что определяет идентичность условий, в которых проходили гибридизация и регистрация сигнала. Отношение интенсивности сигналов зависело только от состава ДНК, использованных ДНК-проб. Это подтверждают и результаты использования таких методов многоцветной FISH, как сравнительная геномная гибридизация и многоцветный бэндинг хромосом (Рубцов, Карамышева, 2000). Необходимо учесть, что регистрируемая интенсивность зависит от многих факторов, в частности от времени экспозиции. Это делает необходимым

проведение нормировки сигналов. При проведении количественной обработки сигналов также необходимо принять меры к повышению устойчивости сигнала и выделения районов, к которым должна быть применена предлагаемая обработка.

В связи с этим в предлагаемый метод были включены следующие этапы: 1) фильтрация; 2) сегментация; 3) выделение масок объектов – используется адаптированный под задачу алгоритм рекурсивной маркировки (Шапиро, Стокман, 2006); 4) распознавание объектов; 5) нормировка сигнала и выделение специфического сигнала; 6) линейное контрастирование (Софьер, 1996).

Фильтрация

Фильтрация использовалась для повышения устойчивости анализируемого сигнала, подавления помех и сглаживания неравномерного распределения сигнала при регистрации. В нашей работе для сглаживания сигнала использовался медианный фильтр (Гонсалес, Вудс, 2005). Основной задачей, которую решало применение медианного фильтра, являлось подавление импульсных шумов, к которым разрабатываемый метод оказался очень чувствителен. Отметим, что часть аддитивных шумов удаляется при вычислении специфического сигнала.

Сегментация

Для выделения на изображении участков, занятых хромосомами, использовали окрашивание красителем DAPI. Для сегментации были выбраны и использованы методы пороговой сегментации, основанные на анализе распределений характеристик пикселей. Основной проблемой их использования является выбор порога. В настоящее время предложено несколько подходов автоматической подборки значения порога: triangle (Zack *et al.*, 1977), isodate (Calvard, Ridler, 1978), Otsu (Otsu, 1979). Также существует возможность задания значения порога интерактивно. Однако даже при оптимально выбранном пороге сегментация не всегда дает хорошие результаты. В первую очередь это связано с проблемами формирования изображения и его качества. В случае препара-

тов метафазных хромосом одной из проблем могут оказаться их множественные контакты и перекрытия. Например, недостаточная гипотоническая обработка или приготовление препаратов в неоптимальных условиях приводят к многочисленным наложениям хромосом в метафазной пластинке.

Изображения хромосом метафазной пластинки после проведения автоматической сегментации нуждались в дополнительной обработке: удаление объектов шумов из обработки (ядра клеток, не полностью вошедшие в кадр хромосомы), разделение объектов (наложенные и соприкасающиеся хромосомы, отмеченные программой как одно целое). Часть объектов-шумов может быть автоматически обнаружена при использовании информации об их площади и эксцентриситете. На данный момент разделение хромосом выполняется пользователем интерактивно. Частично проблема разделения хромосом может быть решена использованием полуавтоматического метода разделения хромосом (Ji, 1989).

Распознавание образов (объектов)

На этапе «распознавание объектов» проводится определение хромосом, содержащих специфический сигнал. Для этого хромосомы разделяются на три класса: хромосомы, содержащие ДНК, специфичную хромосоме, из которой была получена первая ДНК-проба, использованная в эксперименте (класс 1); хромосомы, содержащие ДНК, специфичную хромосоме, из которой была получена вторая ДНК-проба, использованная в эксперименте (класс 2); хромосомы, не содержащие ДНК, специфичную хромосомам, из которых были получены ДНК-пробы (класс 3). Под распознаванием объектов (в нашем случае хромосом) понимают процедуру принятия решения о принадлежности объекта к одному из классов. Процедура принятия решений в общем виде заключается в следующем. Каждый из N классов представлен в Q -мерном (Q – размерность вектора признаков) пространстве, называемом признаковым пространством. Каждый объект в этом случае задается точкой Q -мерного пространства. Считается, что все объекты одного класса группируются в Q -мерном признаковом

пространстве компактно (гипотеза компактности), поэтому расстояние между объектами одного класса меньше, чем расстояние между объектами различных классов (Гонсалес, Вудс, 2005). В качестве признака для классификации в настоящей работе используется соотношение сигналов по двум каналам, а в качестве метода распознавания – метод минимального расстояния (Гонсалес, Вудс, 2005).

Определение отношения сигналов FISH требует предварительного проведения их нормировки. Для этого необходимо определить нормировочный (поправочный) коэффициент. При вычислении этого коэффициента используется гистограмма интенсивности, построенная для каждого канала (сигнал вне объектов обнуляется).

Рассмотрение гистограммы одного из каналов, содержащих результаты FISH, показало, что, как правило, она является бимодальной. Причем первый пик связан с неспецифическим сигналом, а второй (в области с высокими интенсивностями) – с общим сигналом. Учитывая этот факт, можно предложить следующие способы вычисления нормировочного коэффициента:

1. Отношение средних интенсивностей сигналов по всем хромосомам. Для обоих каналов с результатами FISH вычисляется средняя интенсивность сигнала:

$$M = \sum_{i=0}^{255} w_i \cdot i, \quad (1)$$

где M – средняя интенсивность сигнала, w_i – отношение количества точек с заданной интенсивностью i на гистограмме интенсивности к количеству всех точек, содержащихся в объектах.

Отношение вычисленных значений и есть поправочный коэффициент. На значение коэффициента влияет интенсивность общего сигнала. Поэтому предварительная нормировка с таким поправочным коэффициентом чувствительна к количеству и размерам хромосом, содержащих ДНК, специфичную хромосомам, из которых были получены ДНК-пробы.

2. Отношение средних интенсивностей сигналов с предварительной обработкой гистограммы интенсивности. Для того чтобы уменьшить влияние общего сигнала на значение коэффициента, из вычислений убираются пик и

его окрестности, связанные с общим сигналом. Для этого к гистограммам интенсивности обоих каналов, содержащих результаты FISH, применяется алгоритм Triangle. Далее коэффициент вычисляется так же, как описано выше.

Влияние размеров хромосом на коэффициент поправки можно снизить. Для этого строится усредненная гистограмма интенсивности, тогда средняя интенсивность вычисляется как:

$$M = \sum_{i=0}^{255} w_i \cdot i, w_i = \sum_{j=0}^n w_{ij}, \quad (2)$$

где M – средняя интенсивность сигнала, w_{ij} – отношение количества точек с заданной интенсивностью i на гистограмме интенсивности к количеству всех точек, содержащихся в j -м объекте, n – количество объектов.

Коэффициент позволяет выровнять уровни интенсивности сигналов в точке, для этого необходимо умножить значение интенсивности сигнала по одному из каналов на коэффициент поправки. Таким образом, в случае равномерного распределения повторенных последовательностей в хромосомных районах соотношение сигналов для районов хромосом, не содержащих последовательностей, специфичных хромосомам, из которых были получены ДНК-пробы, приблизительно равно 1. Для районов хромосом, из которых были получены ДНК-пробы (класс 1 и класс 2), отношение суммарного сигнала, представляющего сигнал хромосомоспецифических и неспецифических последовательностей к сигналу только неспецифических последовательностей, существенно превышает единицу.

Рассмотрим отношение (r) интенсивностей сигналов, полученных при гибридизации с первой ДНК пробой, к сигналам, полученным при проведении гибридизации со второй ДНК пробой. Каждый объект i будет представлен в пространстве признаков вектором $(r_i, 1/r_i)$, где r_i – отношение средних интенсивностей сигналов по объекту. Тогда класс 3 будет представлен в пространстве признаков вектором $(1, 1)$; класс 1 будет представлен объектом $(r_{max}, 1/r_{max})$ с максимальным соотношением r_{max} сигналов; класс 3 будет представлен объектом $(r_{min}, 1/r_{min})$ с минимальным соотношением r_{min} .

В идеальном случае в пространстве признаков наши классы примут вид, показанный на рис. 3, а. Однако в действительности соотношения несколько другие (рис 3, б, в).

Для измерения параметров признаков объектов (соотношений сигналов по двум каналам) необходимо вычислить средний сигнал по каналам внутри маски объекта. В работе используются два способа усреднения сигналов:

1) средний сигнал:

$$a = \sum_{j=1}^n I(j)/n, \quad (3)$$

где a – средний сигнал по каналу, n – количество точек, принадлежащих объекту, $I(j)$ – интенсивность сигнала по каналу в точке j .

2) средний максимальный сигнал:

$$am = \sum_{j=1}^n I(j)_{max}/n, \quad (4)$$

где am – средний максимальный сигнал по каналу, n – количество перпендикуляров, проведенных к оси инерции объекта (Журавель, 2012), $I(j)_{max}$ –

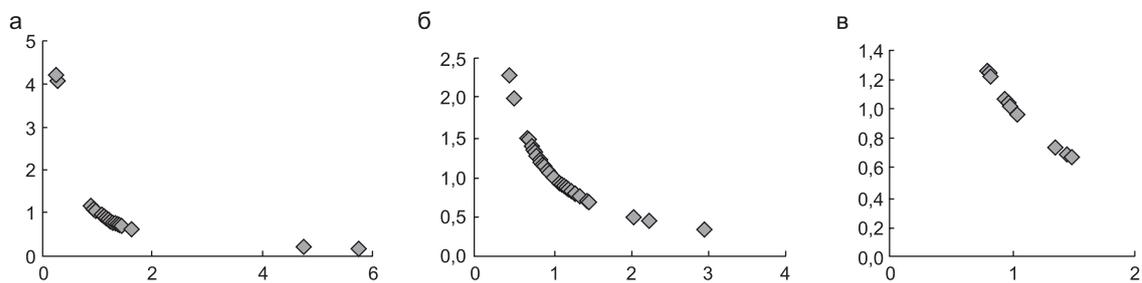


Рис. 3. Распределение объектов в пространстве признаков. Каждая точка соответствует объекту, а по осям откладываются значения признаков объекта (соотношение сигналов по двум каналам).

а – распределение для хромосом человека, полученное с использованием CISS-гибридизации. Этот случай очень близок к идеальному, так как значительно снижен уровень сигнала с повторенных последовательностей (как хромосомоспецифичных, так и диспергированных повторенных последовательностей); б – распределение соотношений в пространстве признаков, полученное для двухцветного FISH хромосом человека без супрессии; в – распределение соотношений в пространстве признаков для двухцветного FISH хромосом *M. xanthosomus*.

максимальная интенсивность в точке, принадлежащей объекту и j -му перпендикуляру.

При распластывании хромосомы на стекле сигнал на краях хромосомы может отличаться по интенсивности от сигнала в ее центральной части. Это может быть связано либо с различной доступностью ДНК хромосомы для ДНК-пробы, либо с различиями в ориентации поверхности хромосомы в различных ее участках. Поэтому более целесообразно использовать второй метод усреднения сигнала.

В некоторых случаях количество классов может отличаться от трех. Например, когда вместо одного из хромосомоспецифических зондов будет использована геномная ДНК, тогда количество классов будет равно двум. Для этого в методе используется критерий Ирвина (Третьяк, 2004), который позволяет оценить количество классов на изображении. Согласно этому критерию, аномальной считается точки ряда Y_t , отстоящая от предыдущей точки Y_{t-1} на величину, большую среднеквадратического отклонения ($\lambda_t > \lambda_q$):

$$\lambda_t = |Y_t - Y_{t-1}| / \sigma, \quad \lambda_t > \lambda_q, \quad (5)$$

где σ – среднеквадратическое отклонение, вычисленное по всем значениям выборки, λ_q – критическое (табличное) значение.

Из гипотезы о компактности классов следует, что если можно разбить множество на два класса, то между ними должен существовать достаточно большой промежуток (рис. 3). Поэтому в общих чертах процедуру принятия решения можно свести к поиску достаточно больших отрезков (5) между точками в пространстве признаков. После классификации объектов можно переопределить коэффициент поправки и провести повторно процедуру распознавания. Новый коэффициент использует гистограмму интенсивности, построенную для объектов, отнесенных к классу 3 (унимодальная гистограмма).

Нормировка сигнала и выделение специфического сигнала

Нормировка сигнала зависит от класса, к которому отнесли объект. Под нормировкой понимается действие (6) для сигналов в каждой точке объекта по каждому каналу, содержащему результаты FISH:

$$V_{new} = V_{old} \cdot 225 / V_n, \quad (6)$$

где V_{new} – новое значение в точке, V_{old} – старое значение в точке, V_n – величина относительно которой производится нормировка.

В работе применяются два способа нормировки сигнала: обычная и с выравниванием уровней сигналов.

Обычная нормировка. Для каждой точки хромосомы, принадлежащей к классу 1 или 2, нормировка сигнала проводится относительно максимальной интенсивности сигнала по объекту, а для хромосом, принадлежащих к классу 3, – относительно максимальной интенсивности сигнала по всем объектам. Нормированные сигналы вычитаются и в зависимости от знака разности результаты записываются в разные каналы.

Нормировка с выравниванием уровней сигналов. Нормировка для хромосом, принадлежащих к классам 1 и 2, проводится так же, как и для обычной нормировки. Что касается хромосом, принадлежащих к классу 3, то нормировка сигнала в разных каналах проводится относительно разных величин – относительно максимальной интенсивности сигнала по каналу (точки рассматриваются в пределах объекта). Нормированные сигналы вычитаются и в зависимости от знака разности результаты записываются в разные каналы. Если обычная нормировка позволяет выявить специфический сигнал даже у ошибочно классифицированного объекта, то нормировка с выравниванием уровней сигнала чувствительна к ошибкам классификации.

Результаты апробации метода выявления хромосомоспецифического сигнала

Проведен анализ более 100 микроскопических изображений. Обработка изображений проводилась согласно предложенному методу, с использованием различных способов нормировки сигнала. Полученные результаты показали, что предложенный метод позволяет выделить специфический сигнал в районах хромосом описторхид после проведения FISH без супрессии гибридизации повторенных последовательностей (рис. 4).

Точность метода можно оценить по результатам классификации (табл. 1, 2). Для оценки метода были использованы ошибки первого (7) и второго (8) рода.

$$E_1 = x_1 / (N_1 + N_2), \quad (7)$$

где x_1 – число хромосом, ошибочно отнесенных к классу 3, N_1 – количество объектов класса 1, N_2 – количество объектов класса 2.

$$E_2 = x_2 / N_3, \quad (8)$$

где x_2 – число хромосом, которые содержат только неспецифический сигнал, но были отнесены к одному из классов со специфическим сигналом. N_3 – количество хромосом, содержащих неспецифический сигнал.

Большие ошибки метода, полученные для хромосом *M. xanthosomus*, в первую очередь связаны с тем, что в выборку включены изображения с малым количеством объектов ($n < 7$), и критерий Ирвина (как и все статические методы, зависящий от количества объектов в выборке) не может найти достаточно большие отрезки.

Обсуждение

Предложенный метод не только выделяет на изображении хромосомоспецифические последовательности, но и позволяет выявить особенности распределения разного типа повторенных последовательностей. Обычно интенсивный сигнал связан с кластером повторенных последовательностей. При сравнении исходного изображения и обработанного можно оценить относительную концентрацию различных типов повторенных последовательностей в разных районах. Так, например, на рис. 4 в прицентромержном районе на хромосоме 1 интенсивный сигнал остался после обработки. Это указывает на то, что, скорее всего, район богат повторенными последовательностями, отличными от повторенных последовательностей хромосомы 2.

Метод обладает дополнительным преимуществом перед CISS-гибридизацией (рис. 5). Супрессия повторенных последовательностей, в отличие от предложенного метода, подавляет уровень сигнала всех повторенных последовательностей, как диспергированных, так и хромосомоспецифических повторенных последовательностей. Как вариант метода можно использовать в качестве одной из ДНК-проб меченую геномную ДНК. При использовании такого рода ДНК-пробы интенсивность сигнала уникальных последовательностей с районами

Таблица 1

Результаты распознавания объектов на изображении двухцветного FISH хромосом человека с ДНК-зондами из хромосом человека 18 и 19

Типы усреднения сигнала	X_1	X_2	E_1	E_2
Средний сигнал	13	10	0,1238	0,0071
Средний максимальный сигнал	2	13	0,019	0,0154

Примечание. X_1 – число хромосом, ошибочно отнесенных к классу 3, X_2 – число хромосом, которые содержат только неспецифический сигнал, но были отнесены к одному из классов со специфическим сигналом, E_1 – ошибка первого рода, E_2 – ошибка второго рода. Всего на изображениях было 951 хромосома, из них 105 содержали ДНК, специфичную хромосомам, из которых были получены ДНК-пробы.

Таблица 2

Результаты распознавания объектов на изображении двухцветного FISH хромосом *M. xanthosomus* с ДНК-зондами из хромосом *M. xanthosomus* 1 и 2

Типы усреднения сигнала	X_1	X_2	E_1	E_2
Средний сигнал	53	17	0,1726	0,0239
Средний максимальный сигнал	21	7	0,0684	0,0098

Примечание. Обозначения как в табл. 1. Всего на изображениях было 1018 хромосом, из них 307 содержали ДНК, специфичную хромосомам, из которых были получены ДНК-пробы.

анализируемой хромосомы снижена, так что ею можно пренебречь. Метод также может быть использован для улучшения результатов двухцветной FISH хромосомоспецифических ДНК-проб как с супрессией, так и без супрессии гибридизации повторенных последовательностей. Дальнейшей перспективой развития предложенного метода является использование данного подхода для анализа 24-цветной FISH, выполненной без супрессии гибридизации повторенных последовательностей.

На наш взгляд, основными недостатками предложенного нами метода являются его чувствительность к импульсному шуму и зависи-

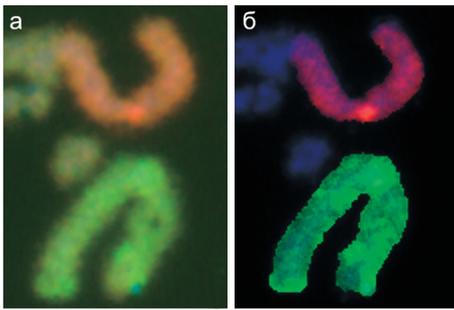


Рис. 4. Двухцветный FISH хромосом *M. xanthosomus* с ДНК-зондами из хромосом *M. xanthosomus* 1 (красный) и 2 (зеленый).

а – исходное изображение; б – результаты применения метода.

мость от количества объектов на изображении. Кроме того, при работе с хромосомами человека возникли проблемы с классификацией некоторых С-позитивных районов хромосом при проведении двухцветной FISH с ДНК-пробами хромосом, контрастными по содержанию LINE- и SINE-повторов. Наиболее контрастной по этому параметру парой являются хромосомы 18 и 19 человека (рис. 6). Однако эта особенность метода при его небольшой модификации может быть использована для анализа закономерностей распределения в хромосомных районах различных типов диспергированных повторовных последовательностей.

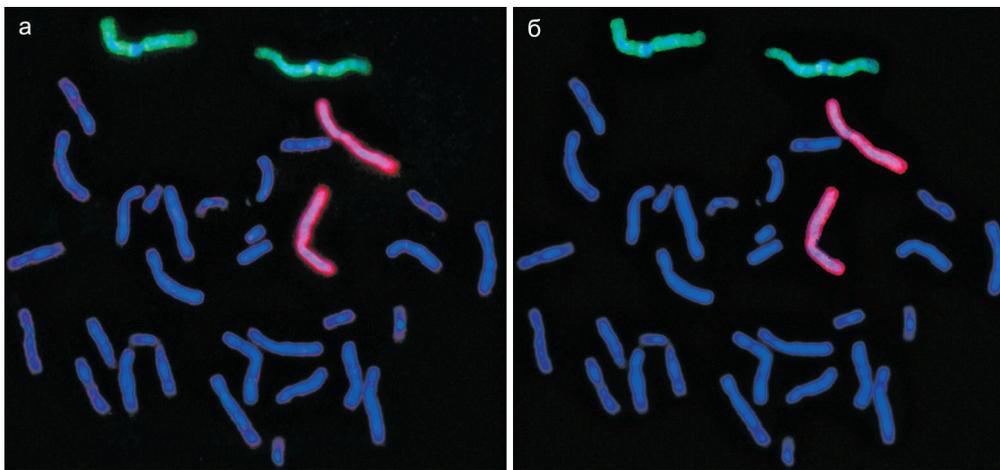


Рис. 5. Двухцветный FISH хромосом человека с ДНК-зондами из хромосом человека 1 (красный) и 2 (зеленый) и с использованием CISS-гибридизации.

а – исходное изображение; б – результаты применения метода.

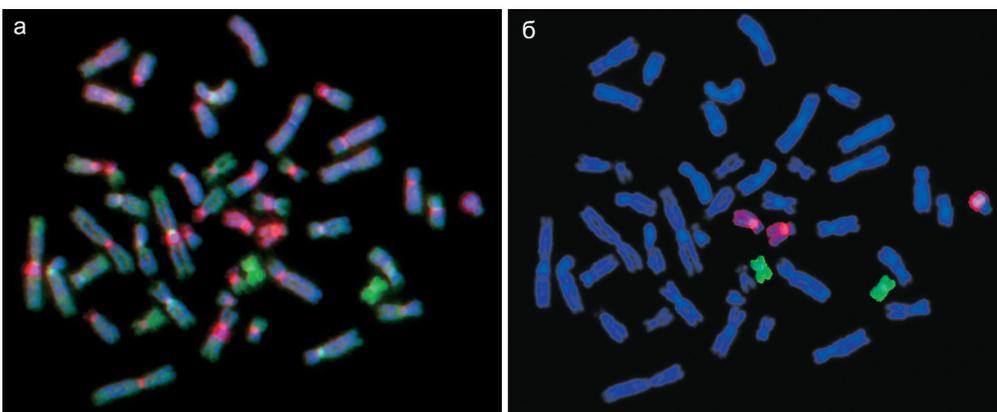


Рис. 6. Двухцветный FISH хромосом человека с ДНК-зондами из хромосом человека 18 (красный) и 19 (зеленый).

а – исходное изображение; б – результаты применения метода.

Литература

- Гонсалес Р., Вудс Р. Цифровая обработка изображений. М.: Техносфера, 2005. С. 350–351, 989–991.
- Журавель И.М. Краткий курс теории обработки изображений. 2012. Доступен на: <http://matlab.exponenta.ru/imageprocess/book2/index.php>.
- Карамышева Т.В., Матвеева В.Г., Шорина А.Р., Рубцов Н.Б. Клинический и молекулярно-цитогенетический анализ редкого случая мозаицизма по частичной моносомии 3p и частичной трисомии 10q у человека // Генетика. 2001. Т. 37. № 6. С. 811–816.
- Рубцов Н.Б., Карамышева Т.В., Гайнер Т.А. Современные методы молекулярно-цитогенетического анализа и диагностика хромосомных патологий // Геномика – медицина. М.: Академкнига, 2005. С. 219–235.
- Рубцов Н.Б., Карамышева Т.В. Многоцветие современной цитогенетики или multicolor FISH today // Информ. вестник ВОГиС. 2000. № 1. С. 13–15.
- Софьер В.А. Компьютерная обработка изображений. Ч. 2. Методы и алгоритмы // Сорос. образоват. журнал. 1996. № 3. С. 111.
- Третьяк Л.Н. Обработка результатов наблюдений. Оренбург: ГОУ ОГУ, 2004. С. 44–45.
- Шапиро Л., Стокман Дж. Компьютерное зрение. М.: БИНОМ, 2006. С. 87, 120–124.
- Calvard S., Ridler T.W. Picture thresholding using an iterative selection method // IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics. 1978. V. 8. No. 8. P. 630–632.
- Henegariu O., Heerema N., Wright L. *et al.* Improvements in cytogenetic slide preparation: controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing // Cytometry. 2001. V. 43. P. 101–109.
- Ji L. Intelligent splitting in the chromosome domain // Pattern Recognition. 1989. V. 22. No. 5. P. 519–532.
- Lichter P., Cremer T., Borden J. *et al.* Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by *in situ* suppression hybridization using recombinant DNA libraries // Hum. Genet. 1988. V. 80. No. 3. P. 224–234.
- Morozkin E.S., Loseva E.M., Karamysheva T.V. *et al.* A method for generating selective DNA probes for the analysis of C-negative regions in human chromosomes // Cytogenet. Genome Res. 2011. V. 135. No. 1. P. 1–11.
- Otsu N. A threshold selection method for gray-levels histograms // IEEE Trans. on Pat. Anal. and Machine Int. 1979. V. 13. P. 583–598.
- Rubtsov N., Riemann I., Trifonov V. *et al.* Chromosome microdissection using NIR femtosecond laserpulses and generation of band specific DNA-libraries with DOP-PCR // Cell Mol. Biol. 2000. V. 46. Abstr. 200.
- Zack G.W., Rogers W.E., Latt S.A. Automatic measurement of sister chromatid exchange frequency // J. Histochem. Cytochem. 1977. V. 25. No. 7. P. 741–753.
- Zadesenets K.S., Karamysheva T.V., Katokhin A.V. *et al.* Distribution of repetitive DNA sequences in chromosomes of five opisthorchid species (Trematoda, Opisthorchiidae) // Parasitol. Internat. 2012. V. 61. No. 1. P. 84–86.

**VISUALIZATION OF CHROMOSOME-SPECIFIC DNA SEQUENCES
BY FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION
OF MICRODISSECTION DNA PROBES WITH METAPHASE CHROMOSOMES**

A.G. Bogomolov¹, K.S. Zadesenets¹, T.V. Karamysheva¹, N.L. Podkolodnyi^{1,2}, N.B. Rubtsov^{1,3}

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

² Institute of Computational Mathematics and Mathematical Geophysics, SB RAS,
Novosibirsk, Russia;

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

Presently, suppression of repetitive DNA sequences (chromosomal *in situ* suppression hybridization, CISS-hybridization) is used to improve the results of fluorescence *in situ* hybridization (FISH). However, in some cases the suppression cannot be performed, because sufficient amounts of DNA of some species are not available. This article presents a new approach, which allows visualization of a signal from chromosome-specific DNA sequences by means of computer-assisted analysis of FISH images.

Key words: *Opisthorchis felinus*, *Metorchis xanthosomus*, *Homo sapiens*, meiotic chromosomes, interspersed repetitive DNA, chromosome-specific DNA sequences, fluorescence *in situ* hybridization (FISH), chromosomal *in situ* suppression hybridization (CISS-hybridization), image analysis.

УДК 575.174.015.3:575.2:577.21

**ПОЛИМОРФИЗМ И МЕЖВИДОВАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ
НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА
СУБЪЕДИНИЦЫ I ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ (COI)
У ВИДОВ-ДВОЙНИКОВ А И В *ANOPHELES MESSEAE*
И *AN. BEKLEMISHEVI* (DIPTERA: CULICIDAE)**

© 2012 г. О.В. Ваулин¹, Ю.М. Новиков²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия, e-mail: Oleg.v.vaulin@mail.ru;

² Томский государственный университет, Томск, Россия, e-mail: novikov@bio.tsu.ru

Поступила в редакцию 12 февраля 2012 г. Принята к публикации 1 марта 2012 г.

Методом PCR-RFLP ITS2 определена видовая принадлежность 159 особей комплекса *Anopheles maculipennis* из 5 локальностей Урала и Сибири. Изучена последовательность ДНК фрагмента гена COI для 124 особей из этих локальностей. Последовательности COI, относящиеся к группе *Anopheles messeae*, сопоставлены с таковыми из базы данных ДНК. Исследована и количественно оценена изменчивость (меры H и π) нуклеотидной последовательности COI криптических видов А и В *An. messeae* и *An. beklemishevi*. Установлено, что изменчивость COI не позволяет дискриминировать криптические виды А и В *Anopheles messeae* и не имеет географической упорядоченности для этих двух видов. Сделан вывод о том, что полиморфизм по COI, наряду с инверсионным полиморфизмом видов А и В *An. messeae*, является для них общим и возник задолго до дивергенции их предка. Подтверждена диагностическая значимость межвидовой изменчивости ITS2.

Ключевые слова: *Anopheles maculipennis*, *messeae*, *beklemishevi*, криптические виды, ITS2, COI, изменчивость, полиморфизм.

Введение

В связи с дифференциальной способностью к переносу малярии виды комплекса *Anopheles maculipennis* являются важными объектами в популяционных и эволюционных исследованиях. Филогенетическая близость видов придает их изучению значимость и представляет особый интерес с эволюционной точки зрения. На основе исследования природных популяций *An. messeae*, полиморфного по 5 парацентрическим инверсиям, сделан вывод о том, что внутри *An. messeae* существуют два криптические вида, условно названных «хромосомными формами А и В» (Новиков, 1978, 1984). Позже их видовой статус был подтвержден на молекулярно-генетическом уровне: методом таксонопринта показано, что эти формы дискретно

различаются на уровне высокоповторенной геномной ДНК (Новиков, Шевченко, 2001). Установлено, что эти виды также различаются по пяти парам нуклеотидов в повторах ITS2 генов рРНК, причем различия по ITS2 между видами носят полуколичественный характер: для А характерно присутствие обоих вариантов полиморфной последовательности в геноме, для В – только одного (Шевченко, Новиков, 2004). Одновременно на основе анализа ITS2 из вида *An. messeae* был выделен новый вид – *An. daciae* (Nicolescu *et al.*, 2004), однако, по нашему мнению (Ваулин, Новиков, 2010), этот вид тождествен виду *An. messeae* А. Вследствие полуколичественности различий последовательностей ITS2 в группе *An. messeae s.l.* часть исследователей усомнилась в валидности *An. daciae* как вида (Bezzhonova, Goryacheva,

2008). В результате проведенного нами анализа изменчивости ядерной последовательности ITS2 и фрагмента митохондриального гена COI, представленных в базе данных ДНК DDBJ под видовыми названиями *An. messeae* и/или *An. daciae*, по ITS2 выявлены два четких кластера образцов, соответствующих разным видам, однако по COI такой картины не показано (Ваулин, Новиков, 2010). Не исключено, что этот факт был обусловлен присутствием в базе данных последовательностей COI, полученных только от криптического вида *An. messeae* А.

В настоящей работе мы представляем результаты анализа изменчивости фрагмента митохондриального гена COI в ряде популяций малярийных комаров из регионов совместного обитания обоих видов *An. messeae* и еще одного вида комплекса *Anopheles maculipennis* – *An. beklemishevi*.

Материалы и методы

Материалом для выполнения работы служили выборки личинок *Anopheles* 3-го и 4-го возрастов, отловленных в природных популяциях Урала и Сибири (табл. 1). Материал фиксировали в 96 %-м этаноле. Выделение ДНК проводили индивидуально по стандартной методике с модификациями (Bender *et al.*, 1983). Видовую принадлежность особей определяли с помощью рестрикции ПЦР-продукта ITS2: одна характерная виду А пара нуклеотидов ITS2 из 5 пар, различающих виды А и В *An. messeae*, входит в состав сайта узнавания рестриктазой *BstF5I*, такой же сайт есть и в геноме *An. beklemishevi*, однако размер ПЦР-продукта ITS2 *An. beklemishevi* существенно больше, чем у видов *An. messeae* (рис. 1).

ПЦР и рестрикционный анализ ITS2

Для ПЦР использовали праймеры состава: 5'-TGTGA-ACTGC-AGGAC-ACAT-3' (прямой) и 5'-TATGC-TTAAA-TTCAGGGGGT-3' (обратный).

Состав реакционной смеси для ПЦР ITS2: 1×PCR-buffer; 4 mM MgCl₂; 0,4 mM каждого dNTP; 1 mM каждого праймера и 1 ед. Taq-полимеразы. Температурный режим ПЦР: денатурация при 94 °С – 1 мин; отжиг при 50 °С – 1 мин; полимеризация при 72 °С – 1 мин; в последнем цикле стадия полимеризации продолжалась 5 мин при 72 °С.

Для рестрикционного анализа брали на реакцию: 2 мкл ПЦР-продукта, 1 ед. фермента *BstF5I*, 2 мкл 10-кратного SE-буфера Y фирмы «Сибэнзим»; объем реакционной смеси – 20 мкл. Время рестрикции – 3 ч. Продукты реакции разделяли в 2 %-м агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Гель фотографировали в ультрафиолетовом свете (рис. 1).

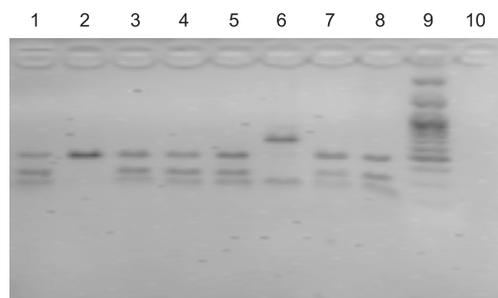


Рис. 1. Фрагмент электрофореграммы продуктов PCR-RFLP ITS2 *Anopheles*.

Дорожки: 1, 3, 4, 5, 7 и 8 соответствуют *An. messeae* А; 2 – *An. messeae* В; 6 – *An. beklemishevi*; 9 – маркер молекулярных масс 100 bp+1,5+3 kb (фирма «Медиген», Новосибирск); 10 – негативный контроль.

Таблица 1

Характеристика исследованных выборок видов *Anopheles*

Локальность, дата сбора, условное обозначение	Географические координаты	Изучено особей
г. Миасс, Челябинская область 17.08.2010 (М)	55° 01' N, 60° 06' E	52
г. Новосибирск 30.07.2010 (N)	54° 52' N, 84° 03' E	7
с. Чаинск, Томская область 23.08.2010 (Ch)	57° 56' N, 82° 36' E	57
г. Асино, Томская область 01.08.2010 (А)	57° 00' N, 86° 08' E	42
с. Черга, Республика Алтай 16.08.2010 (Chr)	51° 36' N, 85° 34' E	1

ПЦР COI

Для ПЦР COI использованы праймеры следующего состава, подобранные нами по последовательности мтДНК *An. quadrimaculatus* (номер последовательности в базе данных – L04272): 5'-CGAGG-AATAG-TAGGA-ACTTC-3' (прямой) и 5'-CTGTA-AATAT-GTGAT-GAGCT-C-3' (обратный). Условия ПЦР идентичны таковым для ITS2. Секвенирование COI и ITS2 проведено с использованием ресурсов ЦКП «Секвенирование ДНК» СО РАН (г. Новосибирск, <http://sequest.niboch.nsc.ru>).

Полученные нами последовательности ДНК представлены в базе данных ДНК под номерами: HE659576-HE659585 – *An. beklemishevi*, COI; HE659586-HE659699 – *An. messeae*, COI; HE659700, HE659701 – *An. beklemishevi*, ITS2; HE659702-HE659708 – *An. messeae*, ITS2.

Обработка данных

Для полученных последовательностей COI с помощью программы NETWORK 4.6.0.0. построены медианные сети (Bandelt *et al.*, 1999), значения нуклеотидной изменчивости (мера π) рассчитаны с помощью программы MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007), значения меры H (gene diversity) (Nei, 1973) – вручную.

Для последовательности COI проведено сравнение результатов, полученных в настоящей работе, с образцами *An. messeae s. l.* из

базы данных (табл. 2). Отметим, что последовательности, представленные в базе данных, существенно короче определенных нами (522 и 767 п.н. соответственно).

Результаты

Определена видовая принадлежность 159 образцов ДНК, индивидуально выделенной из особей всех изученных выборок (табл. 3). В четырех локальностях численно преобладал вид *An. messeae*. Его доля варьировала от 0,65 в Чаинске до 0,93 в Асино. В выборке из Чаинска отмечен вид *An. beklemishevi* с частотой 0,16. К этому же виду относится и единичный образец из Черги.

Распределение особей, изученных секвенированием COI, по выборкам приведено в табл. 4. В связи с тем что секвенирование представляет собой дорогостоящую процедуру, для него была отобрана только часть особей, идентифицированных в выборках. Мы стремились включить в анализ до 25–26 особей каждого вида из каждой выборки. Так как виды *An. messeae* и *An. beklemishevi* были относительно редки и их количество в любой из выборок было менее 25, то все образцы, относящиеся к этим видам, были включены в изучение изменчивости по гену COI.

В ходе исследования также были просеквенированы последовательности ITS2 7 особей *An. messeae* (рис. 2) и двух особей *An. beklemi-*

Таблица 2

Номера и географическое происхождение последовательностей COI из базы данных ДНК

Географическая локальность	Названия образцов	Номера образцов в базе DDBJ
Великобритания	UK	AY258175, AY258176, AY258177
Италия	It	AY258169, AY258170, AY258171, AY258172, AY258173, AY258174, AY258183, AY258184, AY258185, AY258186, AY258187
Греция	Gr	AF342723, AF342724
Черногория	MN	AY258178, AY258179, AY258180, AY258188, AY258189
Казахстан (Павлодар)	Kz ^{Pa}	AY258181, AY258182
Румыния	Ro	AY757922, AY757923, AY757924, AY757925, AY757926, AY757927, AY757928, AY757929, AY757930, AY757931, AY757932, AY757933, AY757934, AY757935, AY757936, AY757937, AY757938, AY757939, AY757940, AY757941, AY757942, AY757943, AY757944, AY757945, AY757946, AY757947, AY757948, AY757949, AY757950, AY757951, AY757952, AY757953, AY757954

Таблица 3

Абсолютные числа и доли (в скобках) особей разных видов в выборках по результатам PCR-RFLP ITS2

Локальности	Виды		
	<i>An. messeae</i> А	<i>An. messeae</i> В	<i>An. beklemishevi</i>
Миасс	36 (0,692)	16 (0,308)	0 (0)
Новосибирск	6 (0,857)	1 (0,143)	0 (0)
Чаинск	37 (0,649)	11 (0,193)	9 (0,158)
Асино	39 (0,929)	3 (0,071)	0 (0)
Черга	0 (0)	0 (0)	1 (1)
Всего	118	31	10

Таблица 4

Числа особей, изученных секвенированием фрагмента гена COI

Локальности	Виды		
	<i>An. messeae</i> А	<i>An. messeae</i> В	<i>An. beklemishevi</i>
Миасс	25	16	0
Новосибирск	6	1	0
Чаинск	26	11	9
Асино	26	3	0
Черга	0	0	1
Всего	83	31	10

11133
44446
15722

Ch-1 wwyAC
N-06 wwyAC
A-1 wwyAC
M-50 wwyAC
M-35 TTCGG
Ch-2 TTCGG
A-22 TTCrs

Рис. 2. Вариабельные сайты просеквенированных последовательностей ITS2.

Образцы: Ch-1 – Чаинск, вид А; N-06 – Новосибирск, вид А; A-1 – Асино, вид А; M-50 – Миасс, вид А; M-35 – Миасс, вид В; Ch-2 – Чаинск, вид В; A-22 – Асино, вид В с промежуточным положением по двум последним заменам.

shevi. У одной из этих особей (A-22 из Асино, последовательность HE659708) выявлен своеобразный «промежуточный» вариант последовательности *An. messeae*: если по первым трем диагностическим сайтам он соответствует виду В и не несет минорных пиков, свойственных виду А, то в четвертом и пятом диагностических сайтах, по которым криптические виды различаются дискретно, этот образец имеет наложение пиков, соответствующих обоим видам *An. messeae*. Отсутствие каких-либо плав-

ных переходов между видами *An. messeae* по продуктам рестрикции ITS2 ферментом *Bst*F51 позволяет считать PCR-RFLP ITS2 надежным методом определения вида в этой группе. На этом основании мы относим образец А-22 к виду В, но вместе с тем считаем необходимым проведение дополнительного исследования названного феномена. В результате детального сравнения нуклеотидных последовательностей ITS2 *An. beklemishevi* (образцы: Ch-22, Чаинск; Chr-28, Черга соответственно последовательности HE659700 и HE659701) с последовательностями, представленными в базе данных под номерами AJ511876 и AY593958, выявлен внутригеномный ITS2-полиморфизм у этого вида. У полученных нами последовательностей ITS2 *An. beklemishevi* в позициях 270, 416 и 422 относительно образца AY593958 обнаружено «наложение пиков», соответствующих разным нуклеотидам. Последовательность AJ511876 существенно короче, и многие ее нуклеотиды определены неоднозначно.

Полученные результаты позволили оценить изменчивость нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI в группах изученных образцов. Такая оценка проведена посредством расчета значений мер H и π (табл. 5) (Nei, 1973; Tamura *et al.*, 2007). Мера H фактически является эквивалентом средней расчетной гетерозиготности применительно к тем случаям, когда

Таблица 5

Значения мер изменчивости H (верхняя строка) и π (нижняя строка)
для рассматриваемых групп

Локальность	<i>An. messeae</i> A	<i>An. messeae</i> B	<i>An. beklemishevi</i>	Для всех видов
Миасс	0,93 0,008 ± 0,002	0,89 0,009 ± 0,002	–	0,93 0,008 ± 0,002
Новосибирск	0,78 0,012 ± 0,003	–	–	0,82 0,012 ± 0,003
Чаинск	0,94 0,011 ± 0,002	0,83 0,008 ± 0,002	0,89 0,005 ± 0,002	0,96 0,022 ± 0,004
Асино	0,94 0,012 ± 0,003	0,33 0,016 ± 0,004	–	0,94 0,012 ± 0,002
По объединенным данным	0,93 0,011 ± 0,02	0,94 0,010 ± 0,02	0,86 0,005 ± 0,002	–

Примечание. Для меры π приведена стандартная ошибка. Оценка объединенных мер негенетического разнообразия для *An. beklemishevi* отличается от таковой для выборки из Чаинска. Это связано с учетом при анализе единичного образца из Черги.

в принципе гетерозиготность исключена. Эта мера может иметь значение от 0 (полная мономорфность) до 1 (если в выборке бесконечно большой численности каждый вариант встречается один раз). Значения меры H для всех групп исследованных нами образцов велики и близки к 0,9. Исключение составляет группа образцов вида B из Асино со значением H , равным 0,33. Столь низкое ее значение, очевидно, обусловлено малым числом образцов в группе. Отметим, что для выборки из Миасса, где встречаются только виды *An. messeae*, причем с высокими частотами, значение меры H для группы из двух видов оказалось сопоставимым с таковым для каждого из видов по отдельности.

Мера π показывает, какой долей нуклеотидных позиций в среднем различаются два случайно взятых образца. Значения меры π для всех групп *An. messeae* оказались близкими к 0,01, т. е. для участка гена длиной 767 п.н. два образца *An. messeae* в среднем по изученному фрагменту гена COI различаются 7–8 парами нуклеотидов. В выборке из Чаинска, включающей *An. beklemishevi*, значение π составило 0,022, что обусловлено большой степенью нуклеотидной дивергенции между парой видов *An. messeae*, с одной стороны, и *An. beklemishevi* – с другой.

Знание последовательностей нуклеотидов фрагмента гена COI в группах образцов ДНК из разных локальностей позволило охарактери-

зовать изменчивость последовательностей аминокислотных остатков во фрагментах полипептидов, соответствующих изученным фрагментам гена. Проведенный анализ показал, что за единственным исключением (*An. messeae* A, образец А-25 из популяции Асино; последовательность HE659695) для изученных образцов характерно полное единообразие последовательностей аминокислотных остатков. Структура образца А-25 указала на замену лейцина на изолейцин в 146-й позиции фрагмента последовательности аминокислотных остатков молекулы полипептида, соответствующего просеквенированному фрагменту ДНК. Таким образом, все выявленные замены нейтральны на уровне функциональной значимости продукта, малое количество несинонимичных замен можно интерпретировать как свидетельство высокой адаптивности существующей последовательности аминокислотных остатков в молекуле цитохромоксидазы I.

В результате анализа нуклеотидных замен в исследованных образцах фрагмента гена COI для всех 3 видов установлено преобладание транзиций над трансверсиями. Так, для вида A отношение числа транзиций к трансверсиям составляет $8,5 \pm 2,9$, для вида B – $14,0 \pm 6,3$, для *An. beklemishevi* – $3,3 \pm 1,7$. Известное для многих групп организмов преобладание транзиций над трансверсиями можно объяснить

более высокой вероятностью преобразования пуринов или пиримидинов внутри классов оснований или селективными ограничениями. В соответствии с правилом вырожденности генетического кода транзиции значительно реже трансверсий приводят к заменам аминокислотных остатков в молекулах полипептидов (Fields *et al.*, 2007).

Медианные сети, построенные по последовательностям фрагмента гена COI образцов, принадлежащих к видам А и В *An. messeae* (рис. 3) и *An. beklemishevi* (рис. 4), соответствуют результатам оценок мер генетического разнообразия. Данные, представленные на рис. 3 и 4, свидетельствуют о том, что числа гаплотипов велики, по этой причине варианты последовательности, имеющие даже наиболее высокие частоты, могут быть встречены в популяциях

с небольшими вероятностями. Для *An. messeae* какой-либо выраженной связи между COI-ДНК-гаплотипами и видовой принадлежностью не выявляется. Отсутствует также и выраженная дифференциация между выборками по представленности вариантов COI.

В результате сравнения изученных нами последовательностей фрагмента гена COI с последовательностями, представленными в базе данных, между ними было установлено два дискретных различия, которые приходились на концы последовательностей, приведенных в базе данных (позиции 15 и 521 соответственно). Самое простое объяснение таким различиям – это методическая ошибка: включение праймеров в анализируемую последовательность с учетом того что получение ПЦР продукта и проведение секвенирования возможны и при

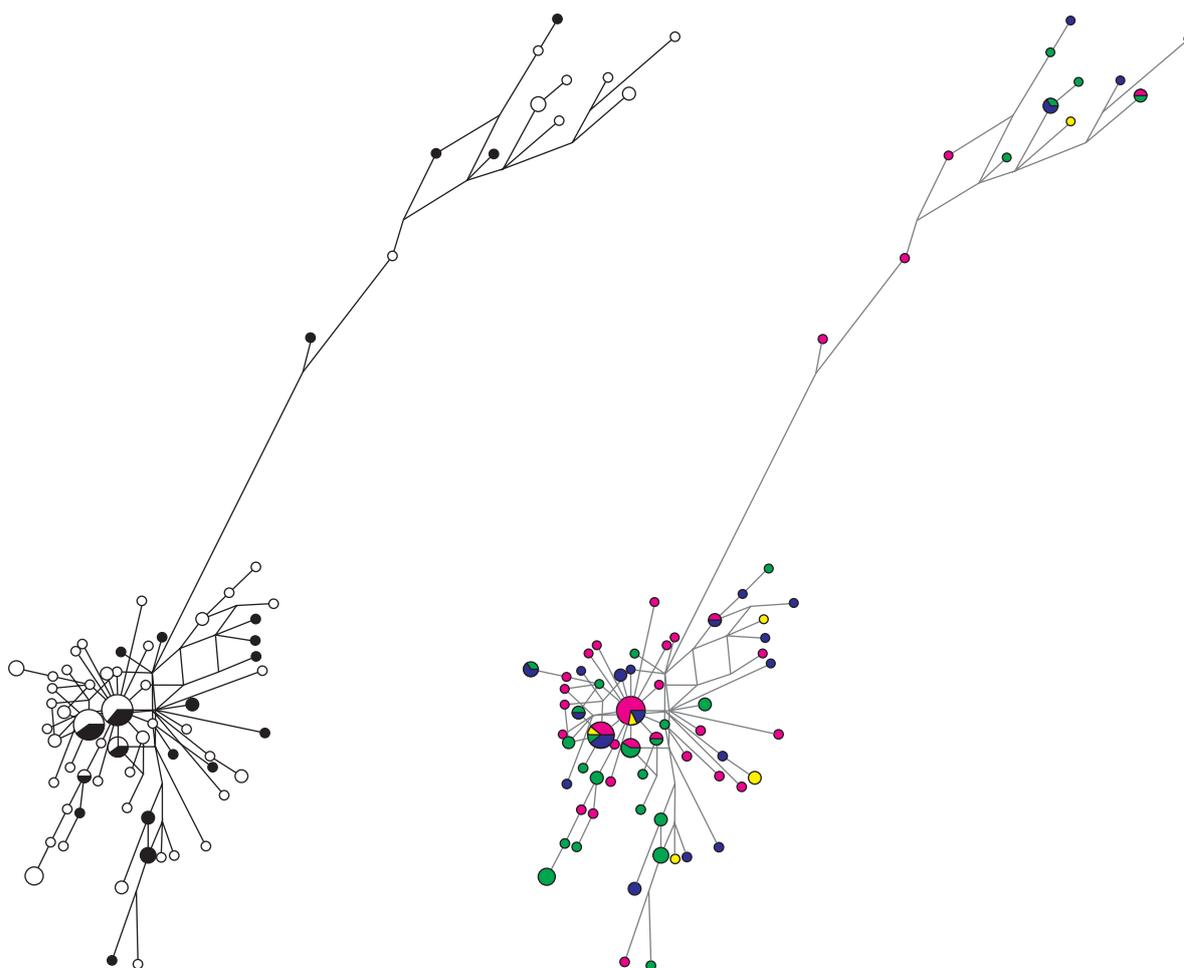


Рис. 3. Медианные сети гаплотипов мтДНК *An. messeae s.l.* по изученному фрагменту гена COI.

а – по видовой принадлежности (белый цвет – вид А, черный – вид В); б – по географической принадлежности (фиолетовый цвет – Миасс, желтый – Новосибирск, зеленый – Чаинск, синий – Асино).

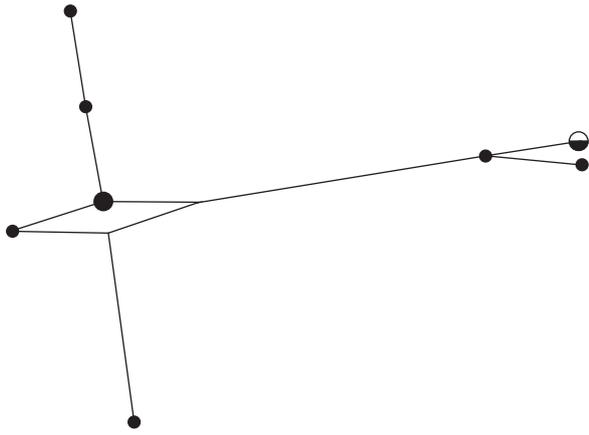


Рис. 4. Медианная сеть гаплотипов мтДНК *Anopheles beklemishevi* по изученному фрагменту гена COI.

Белым цветом выделен образец из Черги.

неполной комплементарности праймеров и соответствующих этим праймерам фланкирующих участков изучаемой ДНК. Приняв это допущение, мы исключили из анализа концы последовательностей, вероятно, приходящиеся на области сайтов посадки праймеров, и по-

строили медианную сеть на основе образцов как изученных нами, так и представленных в базе данных. Нетрудно убедиться в том, что уменьшение длины анализируемого участка с 767 до 480 п.н., сопровождающееся исключением вероятных ошибок, существенно изменяет форму сети (рис. 5). Обратим внимание на одно обстоятельство: в базе данных представлены последовательности *An. messeae*, за единственным исключением относящиеся к европейским популяциям (табл. 2), а все последовательности, изученные нами, получены из азиатских популяций. Однако каких-либо существенных различий между группами европейских и азиатских образцов не прослеживается (рис. 5).

Обсуждение

Группа *An. messeae* представляет собой пару очень близких видов, сохраняющих предковые инверсионные полиморфизмы. Случаи, когда несколько видов имеют перекрывающиеся хромосомные полиморфизмы, описаны также для пары сиблингов *An. gambiae s.s.* и двух «хро-

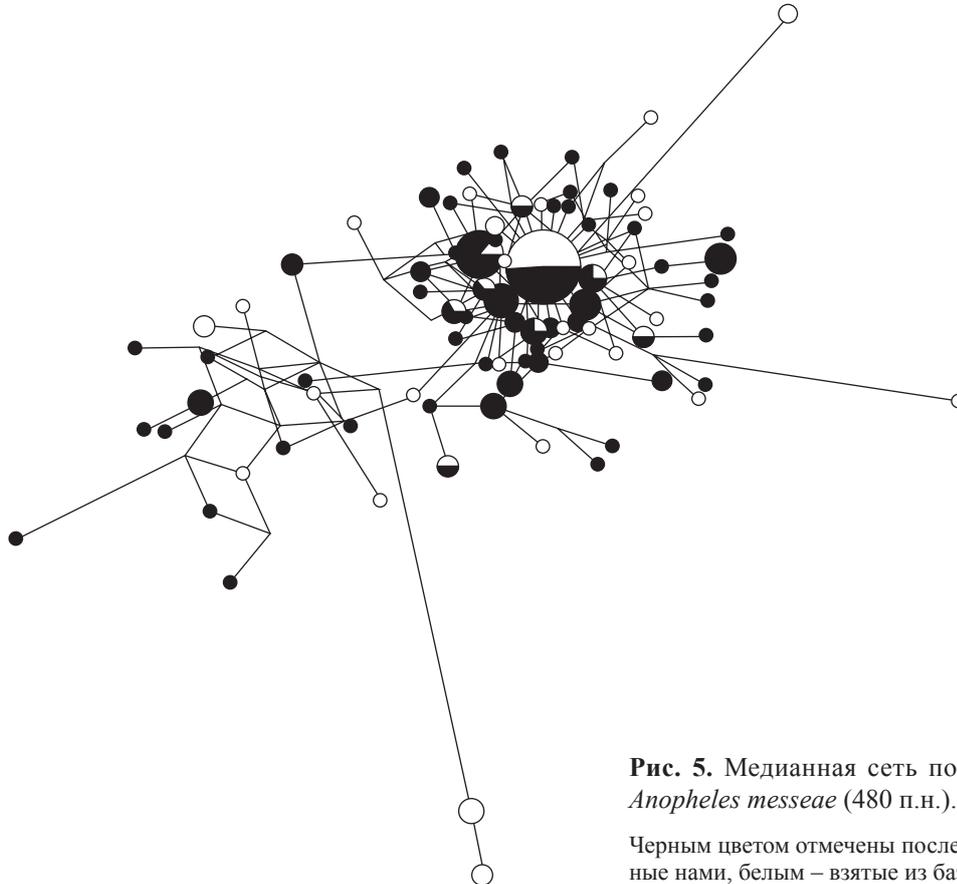


Рис. 5. Медианная сеть по фрагменту гена COI *Anopheles messeae* (480 п.н.).

Черным цветом отмечены последовательности, полученные нами, белым – взятые из базы данных ДНК.

мосомных форм» (т. е. видов) *An. funestus* (della Torre *et al.*, 2001; Cohuet *et al.*, 2004; Mishel *et al.*, 2005). Очевидно, что такие примеры редки скорее вследствие трудности их выявления, нежели из-за реально низкой встречаемости в природе. Поэтому подобные группы видов привлекательны для выяснения молекулярно-генетических механизмов эволюции и поиска надежных критериев вида на молекулярном уровне.

Повторенную последовательность ITS2 рДНК часто используют в качестве маркера в молекулярно-генетических исследованиях. На примере различных комплексов видов *Anopheles* можно увидеть большое разнообразие как длин этой последовательности, так и собственно порядка нуклеотидов (Beebe *et al.*, 1999; Marinucci *et al.*, 1999; Harbach, 2004). Такое разнообразие можно интерпретировать как высокую степень нейтральности последовательности ITS2 в отношении естественного отбора. Несмотря на нейтральность и адекватную для надвидовых филогенетических посторений изменчивость, есть и некоторые проблемы при использовании этого маркера для уточнения родственных отношений между видами.

ITS2, как и другим повторам, присуща согласованная эволюция (унификация в пределах генома каждого вида) (Dover, Flavell, 1984). Гибридизация групп особей, различающихся по последовательности ITS2, и, как следствие, комбинирование ее вариантов в геномах, должны вызвать довольно быструю утрату исходных межгрупповых различий. Иными словами, феномен согласованной эволюции повторов является естественной основой их видовой уникальности и внутривидовой однородности. Действительно, выполняя настоящую работу, мы убедились в том, что особей всех трех видов-двойников можно надежно и точно идентифицировать по электрофореграммам продуктов PCR-RFLP ITS2 (рис. 1). В то же время в геноме ряда видов, входящих в группы видов-двойников, так же, как и у *An. messeae* А, присутствуют по несколько вариантов последовательности ITS2, встречающихся со сравнимыми частотами (Beebe *et al.*, 2001; Wilkerson *et al.*, 2004). Для видов *Anopheles* выявлен также полиморфизм по отдельным клонированным копиям ITS2 (Bezzhonova, Gorgyacheva, 2008; Alquezar *et al.*, 2010). Достаточно обоснованных представлений

о механизмах поддержания в геноме нескольких встречающихся со сравнимыми частотами вариантов ITS2 нам не известно. Возможно, отсутствие изогенизации объясняется тем, что часть генов рРНК транслоцирована с хромосомы X на одну из аутосом, что реально имеет место у некоторых видов Culicidae (Kumar, Rai, 1990). Таким образом, в соответствии с этой гипотезой у криптического вида *An. messeae* А часть рДНК транслоцирована на аутосому, что и служит причиной наличия у него двух дискретных фракций повторов.

Отметим особенности последовательности ITS2 образца А-22 из нашего исследования, занимающей промежуточное положение между ее вариантами, характерными для видов А и В (рис. 2). Такие варианты ITS2 для *An. messeae*, по-видимому, являются довольно редкими. Примером может быть названа последовательность образца ITS2 AM409782, представленная в базе данных ДНК, варибельные сайты которой представлены нуклеотидами, идентичными таковым образца А-22. Изучение таких редких случаев представляет собой отдельную важную задачу, решение которой в сочетании с экологическими и цитогенетическими исследованиями может привести к очень значимым выводам.

Анализируя изменчивость COI, прежде всего обратим внимание на отсутствие выраженной межвидовой дифференциации в группе *An. messeae*. Поскольку мтДНК наследуется как единое структурно-функциональное образование, то отсутствие межвидовой дифференциации, возможно, имеет место не только в отношении исследованного гена, но и по другим генам митохондриальной ДНК этой пары видов. Отсутствие дивергенции последовательностей мтДНК на две ветви, соответствующих «хромосомным формам», отмечено и у *An. funestus* (Michel *et al.*, 2005). Незначительное различие криптических видов по мтДНК, а также сходство значений мер их генетического разнообразия могут свидетельствовать в пользу большой многочисленности тех групп особей, в которых происходила дивергенция форм, а также в пользу отсутствия связи между изменчивостью мтДНК и событиями, приведшими к видообразованию. С одной стороны, если бы один из видов обособился изначально как популяция с ограниченной численностью, то следовало бы ожидать резкого

уменьшения его генетического разнообразия по COI. С другой стороны, появление, закрепление в популяции и распространение среди особей вновь возникшего вида нового варианта повтора ITS2 были бы весьма затруднены в том случае, если группа основателей нового вида была бы представлена более чем единичными особями.

Результаты, полученные в работе, уместно обсудить в контексте гипотезы «молекулярных часов эволюции». Если не учитывать делеции, а неполную замену принять за эволюционное событие, то по ITS2 *An. beklemishevi* и *An. messeae s.l.* отличаются 56 заменами, а виды А и В между собой – 5 (т. е. на порядок величин). Исключение из анализируемой последовательности инсерций и делеций укоротит ее длину до 390 п.н. В этом случае значение дистанции Джукса–Кантора (Jukes, Cantor, 1969) будет равным 0,159 для пары *An. messeae s.l.* и *An. beklemishevi* и 0,013 – для пары А и В *An. messeae*. Сопоставим полученные оценки генетических расстояний с дивергенцией по COI. В связи с отсутствием выраженной дифференциации по COI внутри *An. messeae* соотносить генетические расстояния, рассчитанные по этой последовательности, можно только внутри *An. messeae s.l.* (относительно отдельных вариантов последовательности без привязки к конкретным видам), а также между *An. beklemishevi* и *An. messeae s.l.* На медианной сети COI *An. messeae* образец М-5 (Миасс; последовательность HE659590) принадлежит к одному из вариантов последовательности, наиболее часто встречающихся у обоих криптических видов. На медианной сети *An. beklemishevi* образец Ch-22 (последовательность HE659700) занимает положение, близкое к центру. Варианты фрагмента гена COI длиной 767 п.н. образцов М-5 и Ch-22 различаются по 31 позиции, а наиболее различающиеся варианты этого же фрагмента образцов *An. messeae* Ch-20 и А-8 (последовательности HE659651 и HE659678) – по 16 позициям. Генетическое расстояние Джукса–Кантора между М5 и Ch22, которое условно можно принять в качестве расстояния между *An. messeae s.l.* и *An. beklemishevi*, равно 0,042, а между образцами *An. messeae* Ch-20 и А-8 – 0,021. Отношение значений генетических расстояний в паре видов *An. messeae* и в паре *An. messeae s.l./An. beklemishevi* по ITS2 состав-

ляет 0,082, а по COI – 0,500. Эти числа различаются в 6 раз. Таким образом, время дивергенции по COI в группе *An. messeae* примерно в 6 раз больше времени дивергенции по видоспецифическому маркеру (ITS2) видов А и В. Таким образом, на основе концепции молекулярных часов можно сделать вывод о том, что COI-полиморфизм у *An. messeae* возник значительно раньше того, когда произошла дивергенция таксона на два новых вида.

Между *An. messeae s.l.* и *An. beklemishevi* по последовательности ITS2 при использованном нами методе выравнивания существуют 22 различия по инсерциям/делециям. Так как частоты возникновения инсерций и делеций фрагментов ДНК в силу ряда причин сложно соотнести с частотами нуклеотидных замен, то при филогенетическом анализе вариации такого типа часто не учитывают (Лукашов, 2009). Вместе с тем их учет уменьшил бы расчетное время дивергенции видов *An. messeae* по отношению ко времени дивергенции их последнего общего предка и *An. beklemishevi* и, следовательно, увеличил бы разницу между временем формирования предкового COI-полиморфизма и дивергенцией видов *An. messeae*. Особо отметим адекватность полученных нами оценок только в пределах допущений концепции молекулярных часов эволюции. Однако допущения эти не бесспорны. Например, известно, что скорость накопления нуклеотидных замен в митохондриальной ДНК может различаться в несколько раз даже у представителей одного вида (Алтухов, Салменкова, 2002; Даниленко, Давыденко, 2003). Другим допущением, которое не всегда удается верифицировать, является отсутствие связи между используемыми маркерами и приспособленностью особей с разными их вариантами. Каких-либо сведений о селективных ограничениях на вариацию последовательности ITS2 в литературных источниках нет. Эта последовательность может значительно варьировать по размеру даже в пределах группы близкородственных видов, в частности, это установлено у представителей комплекса *An. crucians*. Длина ITS2 в этой группе видов варьирует от 195 до 1006 п.н. (Wilkerson *et al.*, 2004). Что касается изменчивости изученного фрагмента гена COI, то, как уже упоминалось, все (за единичным исключением) изученные

нами образцы различаются по синонимичным заменам. Учет только синонимичных сайтов при наблюдаемых значениях изменчивости и длин последовательностей не внесет сколь угодно существенных изменений в соотношения генетических расстояний. Можно отметить, что на построенной нами медианной сети *An. messeae* по COI имеется два «сгущения» – в нижней и верхней части, которые включают образцы из обоих видов (рис. 3, а). Образование структуры такого типа, а также отсутствие существенного расхождения образцов видов А и В по COI могут быть объяснены только предковым полиморфизмом, который сформировался задолго до дивергенции предкового вида. Полученные данные могут указывать на факт близости размаха внутри- и межвидовой дифференциации по мтДНК видов комплекса *An. maculipennis* и ее относительной независимости в процессе преобразований геномов, связанных с видообразованием.

Заключение

1. Рестрикционный анализ повторенной последовательности ITS2 является надежным методом дискриминации особей видов-двойников А и В *Anopheles messeae* и *An. beklemishevi*.

2. Последовательность COI у видов А и В *An. messeae* и *An. beklemishevi* демонстрирует высокую внутри- и межвидовую изменчивость; изменчивость по COI в таксоне *An. messeae* s.l. географически не упорядочена и не позволяет дискриминировать криптические виды, входящие в его состав.

3. С позиции концепции молекулярных часов эволюции COI-полиморфизм у *An. messeae* так же, как и инверсионный полиморфизм, возник значительно раньше того момента, когда произошла дивергенция таксона на два новых вида.

4. Близость размаха внутри- и межвидовой дифференциации по мтДНК видов комплекса *An. maculipennis* свидетельствует об отсутствии, а дискретность отличий близких видов по ITS2 – о наличии прямой или косвенной связи с процессом видообразования.

Работа частично финансировалась Российским фондом фундаментальных исследований № 12-04-01319-а и программой фундаменталь-

ных исследований Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития», проект № 30.30.

Авторы выражают признательность Шаршовой Александру Анатольевичу, сотруднику ИЦиГ СО РАН, за помощь в сборе материала.

Литература

- Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике // Генетика. 2002. Т. 38. № 9. С. 1173–1195.
- Ваулин О.В., Новиков Ю.М. Географическая изменчивость ITS2 рДНК и COI мтДНК и криптические виды малярийного комара *Anopheles messeae* Fall. (Diptera: Culicidae) // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 3. С. 546–557.
- Даниленко Н.Г., Давыденко О.Г. Миры геномов органелл. Минск: Тэхналогія, 2003. 498 с.
- Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 256 с.
- Новиков Ю.М. Влияние ассортативного скрещивания на популяционную структуру малярийного комара *Anopheles messeae* // 14-й Междунар. генет. конгр. Секционные заседания. М., 1978. Ч. 1. С. 471.
- Новиков Ю.М. *Anopheles messeae* – два вида in statu nascendi // Макроэволюция. Матер. 1 Всесоюз. конф. по проблемам эволюции. М.: Наука, 1984. С. 67.
- Новиков Ю.М., Шевченко А.И. Инверсионный полиморфизм и дивергенция двух криптических форм таксона *Anopheles messeae* (Diptera, Culicidae) на уровне повторяющихся элементов геномной ДНК // Генетика. 2001. Т. 37. № 7. С. 915–925.
- Шевченко А.И., Новиков Ю.М. Криптические виды *Anopheles messeae* (Diptera, Culicidae): хиатус и связи на молекулярно-генетическом уровне // Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития. III Съезд ВОГиС, Москва, 6–12 июня 2004. М.: Изд-во УРСС, 2004. С. 230.
- Alquezar D.E., Hemmerter S., Cooper R.D., Beebe N.W. Incomplete concerted evolution and reproductive isolation at the rDNA locus uncovers nine cryptic species within *Anopheles longirostris* from Papua New Guinea // BMC Evol. Biol. 2010. 10: 392. doi:10.1186/1471-2148-10-392.
- Beebe N.W., Ellis J.T., Cooper R.D., Saul A. DNA sequence analysis of the ribosomal DNAITS2 region for the *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes // Insect Mol. Biol. 1999. V. 8. No. 3. P. 381–390.
- Beebe N.W., Maung J., van den Hurk A.F. et al. Ribosomal DNA spacer genotypes of the *Anopheles bancroftii* group (Diptera: Culicidae) from Australia and New Guinea // Insect Mol. Biol. 2001. V. 10. No. 5. P. 407–414.
- Bandelt H.-J., Forster P., Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. No. 1. P. 37–48.
- Bender W., Spierer P., Hognes D.S., Chambon P. Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from *Ace* and *rosy* loci of *bithorax* loci in *Drosophila melanogaster* // J. Mol.

- Biol. 1983. V. 168. No. 1. P. 17–33.
- Bezzhonova O.V., Gorryacheva I.I. Intragenomic Heterogeneity of rDNA Internal Transcribed Spacer 2 in *Anopheles messeae* (Diptera: Culicidae) // J. Med. Ent. 2008. V. 45. No. 3. P. 337–341.
- Cohuet A., Dia I., Simard F. *et al.* Population structure of the malaria vector *Anopheles funestus* in Senegal based on microsatellite and cytogenetic data // Insect Mol. Biol. 2004. V. 13. No. 3. P. 251–258.
- Dover G., Flavell R. Molecular coevolution: DNA divergence and the maintenance of function // Cell. 1984. V. 38. Issue. 3. P. 622–623.
- Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. *et al.* Fields Virology. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams and Wilkins. 2007. 317 p.
- Harbach R.E. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships // Bull. Entomol. Res. 2004. V. 94. No. 6. P. 537–553.
- Jukes T.H., Cantor T.R. Evolution of protein molecules // Mammalian protein metabolism / Ed. H.N. Munro. N.Y., USA: Acad. Press, 1969. P. 21–123.
- Kumar A., Rai K.S. Chromosomal localization and copy number of 18s + 28s ribosomal RNA genes in evolutionarily diverse mosquitoes (Diptera, Culicidae) // Hereditas. 1990. V. 113. No. 3. P. 277–289.
- Michel A.P., Guelbeogo W.M., Grushko O. *et al.* Molecular differentiation between chromosomally defined incipient species of *Anopheles funestus* // Insect Mol. Biol. 2005. V. 14. No. 4. P. 375–387.
- Marinucci M., Romi R., Mancini M. *et al.* Phylogenetic relationships of seven palearctic members of the *maculipennis* complex inferred from ITS2 sequence analysis // Insect Mol. Biol. 1999. V. 8. No 4. P. 469–480.
- Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. No. 12. P. 3321–3323.
- Nicolescu G., Linton Y.-M., Vladimirescu A. *et al.* Mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* group (Diptera: Culicidae) in Romania, with the discovery and formal recognition of a new species based on molecular and morphological evidence // Bull. Ent. Res. 2004. V. 94. No. 6. P. 525–535.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol. Biol. Evol. 2007. V. 24. No. 8. P. 1596–1599.
- della Torre A., Fanello C., Akogbeto M. *et al.* Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa // Insect Mol. Biol. 2001. V. 10. No. 1. P. 9–18.
- Wilkerson R.C., Reinert J.F., Li C. Ribosomal DNA ITS2 sequences differentiation six species in the *Anopheles crucians* complex (Diptera: Culicidae) // J. Med. Entomol. 2004. V. 41. No. 3. P. 392–401.

**POLYMORPHISM AND INTERSPECIFIC VARIABILITY
OF CYTOCHROME OXYDASE SUBUNIT I (COI) GENE
NUCLEOTIDE SEQUENCE IN SIBLING SPECIES
OF A AND B *ANOPHELES MESSEAE* AND *AN. BEKLEMISHEVI*
(DIPTERA: CULICIDAE)**

O.V. Vaulin¹, Yu.M. Novikov²

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

² Tomsk State University, Tomsk, Russia, e-mail: novikov@bio.tsu.ru

Summary

Species identification of 159 individuals of the *Anopheles maculipennis* complex from 5 localities of Ural and Siberia was conducted by PCR-RFLP ITS2. The DNA sequences of a COI gene fragment were determined in 124 individuals from the localities. The *Anopheles messeae* group COI sequences were compared with those from a DNA database. Variability of COI nucleotide sequences (measures H and π) of the cryptic species A and B *Anopheles messeae* and *An. beklemishevi* was investigated and quantitatively estimated. It was found that the COI variability did not allow discrimination of the cryptic species A and B *Anopheles messeae*. Neither did it show any geographic regularity for these species. It is concluded that the COI polymorphism of the A and B *Anopheles messeae* species is common for them, as well as the chromosomal inversion polymorphism. It arose long before their divergence. The diagnostic importance of interspecific ITS2 variability is confirmed.

Key words: *Anopheles maculipennis*, *messeae*, *beklemishevi*, cryptic species, ITS2, COI, variability, polymorphism.

УДК 576.356.5:636.934.57:591.3

ЕСТЕСТВЕННЫЙ МУТАЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС КАК ВОЗМОЖНЫЙ ПРИЧИННЫЙ ФАКТОР ВОЗНИКНОВЕНИЯ ОБЛИГАТНОЙ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ДИАПАУЗЫ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ (ГИПОТЕЗА)

© 2012 г. Г.К. Исакова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: isakova@math.nsc.ru, isakova@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 22 марта 2012 г. Принята к публикации 22 апреля 2012 г.

Явление облигатной эмбриональной диапаузы (задержанной имплантации) у млекопитающих было открыто более 150 лет назад, однако до сих пор нет четкого представления об его происхождении и биологическом значении. На основании анализа имеющихся данных цитогенетики, эмбриологии, эволюционной морфологии и эволюционной экологии предполагается, что облигатная эмбриональная диапауза могла возникать у отдельных особей в пределах разных таксономических групп вследствие хромосомной мутации, вызванной изменением во внешней среде и затрагивающей экспрессию генов, контролирующих тайминг эмбриогенеза.

Ключевые слова: млекопитающие, облигатная эмбриональная диапауза, задержанная имплантация, происхождение и биологическое значение облигатной диапаузы.

Памяти академика Д.К. Беляева посвящается

Явление облигатной эмбриональной диапаузы (задержанной имплантации) у млекопитающих состоит в том, что зародыши прикрепляются к стенке матки не сразу после их перехода из яйцевода в полость матки. Достигнув стадии бластоцисты, они остаются свободно плавающими на срок от нескольких дней до 10 месяцев в зависимости от вида животного. Впервые задержка имплантации на длительный срок была замечена в 1854 г. у косули (цит. по: Hansson, 1947). В настоящее время известно, что это свойство эмбриогенеза присуще по крайней мере 53 видам животных из 7 отрядов и 10 семейств. Больше всего видов с диапаузой обнаружено в отряде хищных (Carnivora) – в семействе куньих (Mustelidae), к которому относятся куница, норка, соболь, хорь, скунс, выдра и др. Свойства диапаузы (ее продолжительность, гормональный контроль и др.) отличаются у видов в пределах семейств, подсемейств и родов (Mead, 1989; Sandell, 1990).

Существует множество гипотез о происхождении и биологическом значении облигатной диапаузы. Суть всех гипотез состоит в обосновании единого представления о том, что задержка имплантации – это репродуктивная стратегия вида, направленная на отсрочку рождения потомства до сезона, наиболее благоприятного для его выживания. Предполагается также, что диапауза возникала один или несколько раз в прошлые геологические периоды из-за резкого изменения климата и что она эволюционирует (Mead, 1989; Sandell, 1990; Ferguson *et al.*, 1996; Renfree, Shaw, 2000; Thom *et al.*, 2004). Однако четкого представления о механизме возникновения этого свойства онтогенеза, так же, как и его предполагаемой эволюции, до сих пор нет. Не вполне убедительными также кажутся аргументы в пользу прямой связи между сезонной диапаузой и видовой адаптацией. В природе существуют такие виды животных, как морская выдра *Enhydra lutris*, которая имеет облигатную

диапаузу, но может дать потомство в любое время года. В связи с этим Р. Мид предположил, что диапауза могла иметь адаптивное значение в прошлом, но в настоящее время она существует как свойство, нейтральное для существования вида (Mead, 1989).

Имеется довольно много данных об активности репродуктивной системы матери во время облигатной диапаузы (Hansson, 1947; Mead, 1995; Renfree, Shaw, 2000). Однако об активности эмбрионального генома известно крайне мало. Было установлено, что в течение диапаузы бластоцисты увеличиваются приблизительно от 0,25 до 2 мм в диаметре. Изучение гистологических срезов нескольких бластоцист начального периода диапаузы у соболя, норки, морского котика и алтайского крота показало угнетение митоза и отсутствие заметных морфологических изменений в зародышах по мере их роста. Подсчет клеток в нескольких ранних зародышах соболя и норки из-за его высокой вариабельности не позволил выяснить, увеличивается ли число клеток во время диапаузы. В бластоцистах некоторых других видов было отмечено медленное увеличение числа клеток трофобласта, но число клеток собственно зародыша (внутренней клеточной массы, ВКМ) было неизменным. Авторадиографическое изучение синтеза ДНК и РНК на тотальных препаратах бластоцист морского котика и норки показало слабое включение метки (Mead, 1989). На основании этих немногочисленных и не вполне убедительных данных было принято считать облигатную эмбриональную диапаузу стадией эмбрионального покоя.

Для того чтобы уточнить данные о состоянии эмбриогенеза во время диапаузы, мы применили цитогенетический подход. На суспензионных монослойных препаратах, приготовленных по специально разработанному методу для бластоцист куньих, мы изучили активность генома у зародышей норки *Mustela vison*, имеющей диапаузу длительностью в среднем 20 дней, в течение всего этого периода, т. е. от начала диапаузы до начала имплантации. Было установлено, что за это время диаметр бластоцист увеличивается от 0,25 до 2 мм, а число клеток в них – от ~200 до ~20 тыс. В клетках ВКМ угнетены митоз и синтез нуклеиновых кислот. В клетках трофобласта тоже подавлен митоз, но идет синтез

ДНК и рРНК, образование крупных эндополиплоидных клеточных ядер и деление некоторых из них немитотическим (амитотическим) путем (Исакова, Жоголева, 1997; Исакова и др., 2001; Исакова, Шилова, 2000, 2003). Такую же картину (т. е. инактивацию генома в клетках ВКМ, но синтез ДНК и рРНК и амитотическое деление крупных клеток трофобласта) мы обнаружили в диапаузных бластоцистах соболя *Martes zibellina* и западного пятнистого скунса *Spilogale putorius latifrons*, относящихся к другим родам семейства куньих и имеющих диапаузу длительностью в среднем 245 и 220 дней соответственно (Исакова, 2004; Isakova, Mead, 2004). Эти данные, а также сообщения о наблюдавшихся угнетении митоза и образовании гигантских клеток трофобласта в диапаузных бластоцистах косули *Capreolus capreolus* (Aitken, 1974) и алтайского крота *Talpa altaica* (Баевский, 1967), относящихся к другим семействам млекопитающих, позволяют полагать, что в основе возникновения облигатной диапаузы мог лежать механизм, общий для разных таксонов.

В бластоцистах животных без облигатной диапаузы клетки трофобласта делятся митозом. Мы установили, что у лабораторной мыши *Mus musculus*, не имеющей облигатной диапаузы и амитоза в доимплантационных бластоцистах, тоже происходит амитотическое деление клеток трофобласта, но начиная с перимплантационной стадии (Исакова, Скворцова, 2003). Из этих данных следует, что явление облигатной диапаузы состоит не только в задержке имплантации, но и во временном сдвиге всех событий (тайминге) эмбриогенеза.

Как мог произойти этот сдвиг? Поскольку облигатная диапауза – наследуемое видовое свойство, то ее возникновение должно быть связано с изменением в ДНК животного предкового вида. Есть основание полагать, что одним из таких изменений могла быть хромосомная мутация. Известно, что доминирующим механизмом эволюционной реорганизации кариотипа у млекопитающих является Робертсоновская транслокация, т. е. разрыв в районе центромер и последующее слияние двух акроцентрических хромосом (Searle, 1998; Rieseberg, 2001). Это верно и в отношении семейства куньих (Wurster, Benirschke, 1968; Hsu, Mead, 1969; Mandahl, Fredga, 1980). Хромосомные перестройки со-

проводятся изменениями в локализации и количестве гетерохроматина (ГХ) (Mandahl, Fredga, 1980; Wayne *et al.*, 1987; Graphodatsky, 1989). Изменения в паттерне ГХ в свою очередь могут вызвать изменения в экспрессии генов в пределах всего генома (Прокофьева-Бельговская, 1986; Жимулев, 1993; Zhimulev, 1998). Таким образом, хромосомная перестройка через изменение в паттерне ГХ может вызвать изменение в экспрессии генов, контролирующих тайминг эмбриогенеза. В таком случае должен возникнуть новый наследуемый вариант тайминга.

В настоящее время складывается представление, что изменения в ГХ и в хронологии эмбриогенеза лежат в основе эволюционных преобразований (Gould, 1982; Raff, Kaufman, 1983; Creighton, Strauss, 1986; Graphodatsky, 1989; Стегний, 1993; Gilbert *et al.*, 1996; Корочкин, 2002а, б). В обширных исследованиях природных популяций животных было обнаружено, что появление потомков с новыми наследуемыми морфофизиологическими свойствами связано со сдвигом в тайминге эмбриогенеза. Естественный отбор, действующий не только в постнатальном, но и в эмбриональном периодах, ведет к возникновению субпопуляции особей, имеющих селективное преимущество в новых условиях внешней среды, т. е. к внутривидовой дивергенции (Schwarz, 1977; Шварц, 1980).

Таким образом, данные эмбриологии, цитогенетики, эволюционной морфологии и эволюционной экологии позволяют сформулировать следующую гипотезу о происхождении и биологическом значении явления облигатной эмбриональной диапаузы. В кариотипе животного вида-предшественника может произойти хромосомная перестройка, затрагивающая экспрессию генов, контролирующих тайминг эмбриогенеза. Результатом этого события должно быть возникновение наследуемого изменения в этом тайминге. Изменения в структуре ДНК и в тайминге эмбриогенеза вызовут увеличение соответственно генетического и морфофизиологического разнообразия в потомстве, а естественный отбор приведет к внутривидовой дивергенции.

Данная гипотеза о мутагенном происхождении облигатной диапаузы поддерживается следующими фактами. 1. Задержка не только имплантации, но и других событий онтогене-

тического развития. У норки (Hansson, 1947), соболя, куницы (Старков, 1947) и горностая (Hansson, 1947; Терновский, Терновская, 1994) обнаружен значительный сдвиг во времени овуляции и полового созревания самок по сравнению с видами куньих без диапаузы. 2. Чрезвычайно высокий уровень генетического разнообразия на хромосомном уровне у норки. В наших кариологических исследованиях ~ 15 % имплантированных эмбрионов имело хромосомную конституцию $3n$, $2n/3n$, или $2n, XX/2n, XY$ и ~ 10 % новорожденных щенков были химерами $2n/3n$ или $2n, XX/2n, XY$ (Belyaev, Isakova, 1984; Исакова, 1987; Isakova, 1989). Кроме того, с частотой до 4,5 % встречались монохориальные (считающиеся монозиготными) пары эмбрионов, имевших разные кариотипы (Исакова, 2007). В литературе имеются только единичные сообщения как об эуплоидных химерах, так и о генетически неидентичных монозиготных близнецах у млекопитающих. Анализ ожидаемых и наблюдаемых частот встречаемости химер $2n/3n$ с разными сочетаниями половых хромосом в $2n$ и $3n$ клеточных линиях при различных возможных нарушениях процесса оплодотворения у норки *Mustela vison* и курицы *Gallus domesticus* показал, что основной причиной возникновения эуплоидного химеризма являются нарушения процесса оплодотворения (дигиния и полиспермия) (Fechheimer *et al.*, 1983; Фечхеймер и др., 1984). Ранее было показано, что причиной этих нарушений является задержка овуляции, которая ведет к перезреванию яйцеклеток и изменению свойств их мембран (Beatty, 1957). 3. Высокая частота встречаемости эмбрионов с морфологическими аномалиями у норки. В сотрудничестве с А.П. Дыбаном и его сотрудниками мы провели морфологический анализ 50 имплантированных эмбрионов норки. Четыре из них (8 %) имели нарушения в развитии, что превышает частоту встречаемости эмбрионов с морфологическими аномалиями у лабораторной мыши по меньшей мере в 10 раз. 4. Чрезвычайно высокий уровень разнообразия по антигенам сывороточных белков у видов животных, имеющих облигатную диапаузу по сравнению с видами без диапаузы в семействе куньих (Баранов, 1987; Baranov, 1988).

В предлагаемом сценарии возникновения стадии эмбриональной диапаузы недостает све-

дений о естественных факторах, вызывающих перестройки в кариотипе. Зоологи и палеонтологи все больше находят свидетельств тому, что ведущим фактором биологической эволюции на Земле являются экологические катастрофы, вызванные тектоническими и температурными перестройками (Красилов, 1977; Черепанов, 1986; Kanygin, 2008; Каныгин, Розанов, 2008). Генетики накапливают данные о том, что смена условий внешней среды может индуцировать генные и хромосомные мутации через изменение в гормональной системе организма (Сапунов, 1980). Показано, что вновь возникающие агенты внешней среды (промышленные химикаты, попадающие в воздух и продукты питания) могут влиять на экспрессию генома, вызывая молекулярный драйв в мультигенных семействах (Dover, 1986; Nebert, Carvan, 1997). Итак, полный сценарий эволюционного процесса мог быть таким: изменение внешней среды (изменение в самой среде или смена животными места обитания) → хромосомная мутация, вызывающая изменение тайминга эмбриогенеза → повышение генетического и морфофизиологического разнообразия в потомстве → естественный отбор → внутривидовая дивергенция → видообразование.

Следует заметить, что пути влияния хромосомных перестроек на экспрессию генов, контролирующих тайминг эмбриогенеза, должны отличаться у разных видов животных из-за различий в организации их кариотипов и геномов. Из этого следует, что реорганизация генома, затрагивающая генетический контроль тайминга эмбриогенеза, могла быть механизмом, лежащим в основе возникновения того огромного разнообразия в проявлении эмбриональной диапаузы и физиологии репродукции, которое существует в природе.

Благодарности

Исследования, на основании результатов которых была сформулирована данная гипотеза, были поддержаны РФФИ (94-04-12652, 96-04-50152, 00-04-49484, Мас 01-04-06510) и НИИ (HD 34247). Автор благодарен профессору Р.А. Миду (R.A. Mead) за сотрудничество и конструктивное обсуждение проблемы явления задержанной имплантации.

Литература

- Баевский Ю.Б. Цито- и кариометрические исследования бластоцист крота (*Talpa altaica*) периода диапаузы // Докл. АН СССР. 1967. Т. 176. № 5. С. 1198–1200.
- Баранов О.К. Иммуногенетические системы норки: проблемы эволюции // Генетика. 1987. Т. 23. С. 1026–1037.
- Жимулев И.Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск: Наука, 1993. 490 с.
- Исакова Г.К. Об активности эмбрионального генома соболя на стадии задержанной имплантации (цитогенетическое исследование) // Докл. АН. 2004. Т. 397. С. 128–130.
- Исакова Г.К. Цитогенетические исследования американской норки (*Mustela vison*), разводимой в условиях звероводческих хозяйств // Генетика. 1987. Т. 23. № 6. С. 1007–1013.
- Исакова Г.К. Три типа близнецовости в эмбриогенезе у норки (*Mustela vison*) // Генетика. 2007. Т. 43. № 2. С. 280–283.
- 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. С. 822–830.
- Исакова Г.К., Захаренко Л.П., Абрамова М.П. Активность эмбрионального генома норки во время диапаузы (цитогенетический анализ). Ядрышкоковый и внеядрышкоковый синтез РНК // Онтогенез. 2001. Т. 32. С. 302–308.
- Исакова Г.К., Скворцова Т.Э. Механизмы и частота деления ядер клеток трофобласта и децидуа в течение постимплантационного эмбриогенеза у мыши // Онтогенез. 2003. Т. 34. С. 472–477.
- Исакова Г.К., Шилова И.Э. Размножение «почкованием» клеток трофобласта в имплантирующихся бластоцистах норки // Докл. АН. 2000. Т. 371. 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. Сер. биол. 2003. № 4. С. 395–398.
- Каныгин А.В., Розанов А.Ю. Козволюция абиотических и биотических событий // Происхождение и эволюция биосферы: важнейшие результаты 2004–2007 гг. / Ред. Н. Добрецов и др. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2008. С. 86–119.
- Красилов В.А. Эволюция и биостратиграфия. М.: Наука, 1977. 256 с.
- Корочкин Л.И. Онтогенез, эволюция и гены // Природа. 2002а. № 7. С. 10–19.
- Корочкин Л.И. Связь онто- и филогенеза в генетическом освещении. Проблема макромутаций (морфологический и молекулярный аспекты) // Генетика. 2002б. Т. 38. С. 727–738.
- Прокофьева-Бельговская А.А. Гетерохроматические районы хромосом. М.: Наука, 1986. 431 с.
- Сапунов В.Б. О роли эндокринной системы в процессе возникновения мутаций // Журн. общ. биологии. 1980. Т. 41. С. 192–199.
- Старков И.Д. Биология и разведение соболей и куниц. М.: Междунар. книга, 1947. 92 с.

- Стегний В.Н. Архитектура генома. Системные мутации и эволюция. Новосибирск: Изд-во НГУ, 1993. 110 с.
- Терновский Д.В., Терновская Ю.Г. Экология куницеобразных. Новосибирск: Наука, 1994. 222 с.
- Фечхеймер Н.С., Исакова Г.К., Беляев Д.К. Механизмы спонтанного возникновения диплоид-триплоидного химеризма у норок и кур // Генетика. 1984. Т. 20. С. 2048–2055.
- Черепанов В.В. Эволюционная изменчивость водных и наземных животных. Новосибирск: Наука, 1986. 239 с.
- Шварц С.С. Экологические закономерности эволюции. М.: Наука, 1980. 278 с.
- Aitken R.J. Delayed implantation in roe deer (*Capreolus capreolus*) // J. Reprod. Fert. 1974. V. 39. P. 225–234.
- Baranov O.K. The organization and evolution of the immunogenetic systems in the American mink // J. Anim. Breed. Genet. 1988. V. 105. P. 91–102.
- Beatty R.A. Parthenogenesis and Polyploidy in Mammalian Development. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1957.
- Belyaev D.K., Isakova G.K. Spontaneous chimaeras at the early postnatal period in mink // Proc. 3rd Int. Sci. Congr. Fur Anim. Prod. Versailles, 1984. V. 2. P. 1–7.
- Creighton G.K., Strauss R.E. Comparative patterns of growth and development in cricetine rodents and the evolution of ontogeny // Evolution. 1986. V. 40. P. 94–106.
- Dover G.A. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated // Trends Genet. 1986. V. 2. P. 159–162.
- Fechheimer N.S., Isakova G.K., Belyaev D.K. Mechanisms involved in the spontaneous occurrence of diploid-triploid chimerism in the mink (*Mustela vison*) and chicken (*Gallus domesticus*) // Cytogenet. Cell Genet. 1983. V. 35. P. 238–243.
- Ferguson S.H., Virgl J.A., Larivière S. Evolution of delayed implantation and associated grade shifts in life history traits of North American carnivores // Ecoscience. 1996. V. 3. P. 7–17.
- Gilbert S.F., Opitz D.M., Raff R.A. Resynthesizing evolutionary and developmental biology // Dev. Biology. 1996. V. 173. P. 357–372.
- Gould S.J. Change in developmental timing as a mechanism of macroevolution // Evolution and Development / Ed. J.T. Bonner. Berlin, Heidelberg. N.Y.: Springer-Verlag, 1982. P. 333–346.
- Graphodatsky A.S. Conserved and variable elements of mammalian chromosomes / Ed. C.R.E. Halnan Oxon. Willingford: CAB Intern., 1989. P. 95–123.
- 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.
- Hsu T.C., Mead R.A. Mechanisms of chromosomal changes in mammalian speciation // Comparative Mammalian Cytogenetics / Ed. K. Benirschke. N.Y.: Springer-Verlag, 1969. P. 9–17.
- Isakova G.K. Cytogenetics of domestic mink (*Mustela vison*) // Cytogenetics of Animals / Ed. C.R.E. Halnan. Oxon/Willingford: CAB Intern., 1989. P. 133–149.
- 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.
- Kanygin A.V. Ecological revolution through Ordovician biosphere (495 to 435 Ma ages): start of the coherent life evolution // Biosphere Origin and Evolution / Eds N. Dobretsov *et al.* Berlin; Heidelberg; N.Y.: Springer, 2008. P. 245–254.
- Mandahl N., Fredga K. A comparative chromosome study by means of G-, C-, and NOR-banding of the weasel, the pygmy weasel and the stoat (*Mustela*, Carnivora, Mammalia) // Hereditas. 1980. V. 93. P. 75–83.
- 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.
- Nebert D.W., Carvan M.J. Ecogenetics: from ecology to health // Toxicology and Industrial Health. 1997. V. 13. No. 2/3. P. 167–192.
- Raff R.A., Kaufman T.C. Timing of developmental events: evolution through heterochrony // Embryos, Genes, and Evolution. N.Y., London: Macmillan Publ. Co., Inc. (New York); Collier Macmillan Publ. (London), 1983. P. 173–198.
- Renfree M.B., Shaw G. Diapause // Annu. Rev. Physiol. 2000. V. 62. P. 353–375.
- Rieseberg L.H. Chromosomal rearrangements and speciation // Trends Ecol. Evol. 2001. V. 16. P. 351–358.
- Sandell M. The evolution of seasonal delayed implantation // Quart. Rev. Biol. 1990. V. 65. P. 23–42.
- Schwarz S.S. The evolutionary ecology of animals. N.Y., London: Consultants Bureau, 1977. 292 p.
- Searle J.B. Speciation, Chromosomes, and Genomes // Genome Res. 1998. V. 8. P. 1–3.
- Thom M.D., Johnson D.P., Macdonald D.M. The evolution and maintenance of delayed implantation in the Mustelidae (Mammalia: Carnivora) // Evolution. 2004. V. 58. P. 175–183.
- Wayne R.K., Nash W.G., O'Brien S.J. Chromosomal evolution of the Canidae // Cytogenet. Cell Genet. 1987. V. 44. P. 123–141.
- Wurster D.H., Benirschke K. Comparative cytogenetic studies in order Carnivora // Chromosoma (Berl.). 1968. V. 24. P. 336–382.
- Zhimulev I.F. Polytene chromosomes, heterochromatin, and position effect variegation // Adv. Genetics. 1998. V. 37. 566 p.

**NATURAL MUTAGENESIS AS A POSSIBLE CAUSAL FACTOR
FOR OCCURRENCE OF OBLIGATE EMBRYONIC DIAPAUSE IN MAMMALS
(A HYPOTHESIS)**

G.K. Isakova

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

Summary

The phenomenon of obligate embryonic diapause (delayed implantation) in mammals has been discovered more than 150 years ago. Nevertheless, there is not the distinct idea on its origin and biological significance till now. Available data of cytogenetics, embryology, evolutionary morphology, and evolutionary ecology allow to believe that the obligatory stage of embryonic diapause might occur in single individuals within different taxonomic groups in consequence of chromosome mutation caused by alteration in the environment and affected the expression of genes controlling the timing of embryogenesis.

Key words: mammals, obligate embryonic diapause, delayed implantation, origin and biologic significance of obligate diapause.

УДК 636.013:599.742.4

ОПЫТ ДОМЕСТИКАЦИИ РЕЧНОЙ ВЫДРЫ (*LUTRA LUTRA* LINNAEUS, 1758)

© 2012 г. **О.В. Трапезов, Л.И. Трапезова, Л.А. Семенова**

Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск,
e-mail: trapezov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 21 мая 2012 г. Принята к публикации 6 июня 2012 г.

В Институте цитологии и генетики СО РАН в ходе экспериментальной domestikации речной выдры (*Lutra lutra*) было показано, что для интродукции в неволю решающим фактором является отбор животных на стрессоустойчивость в условиях антропогенной среды. В ходе domestikации речной выдры действует движущий отбор на увеличение числа особей с отсутствием реакции страха на человека.

Ключевые слова: речная выдра, *Lutra lutra*, domestikация, стрессоустойчивость, Д.К. Беляев.

Введение

В ходе исторического одомашнивания человеком диких животных в условиях неволи могли жить и размножаться лишь те особи, которые не только обладали поведением, допускающим сосуществование их с человеком на расстоянии его вытянутой руки, но и выдерживали с ним непосредственный контакт. Определенно можно сказать, что это был неосозанный, или стихийный, отбор человеком животных по поведению. У организмов, вовлекаемых в сферу domestikации, в течение исторически кратчайшего времени возник огромный спектр наследственных изменений, не свойственных видам в природе, произошла наследственная реорганизация многих признаков и функций, сложившихся за века предшествующей эволюции под влиянием стабилизирующего отбора. Механизмы такой реорганизации загадочны, ведь у диких видов нет наследственного разнообразия по возникшим *de novo* в ходе их domestikации признакам, что исключает возможность прямого эффекта отбора.

В конце 1950-х – начале 1960-х гг. Дмитрий Константинович Беляев сформулировал представление о том, что наиболее жесткий отбор, который происходил на самом раннем этапе одо-

машнивания диких животных, мог действовать на особые, специфические для domestikации, локусы, определяющие способность животных адаптироваться к неосвоенному в их предшествующей эволюционной истории фактору среды – человеку.

Для подтверждения этого представления был поставлен длительный эксперимент по селекционному созданию типа серебристо-черных лисиц (*Vulpes vulpes*), сходного по своему поведению с домашней собакой (*Canis lupus familiaris*). Результаты эксперимента подтвердили обоснованность исходной гипотезы, для проверки которой он был организован: у наиболее domestikцированных (в смысле поведения) животных дестабилизованными оказались сезонные гормональные профили, что немедленно затронуло систему сезонного размножения; дестабилизация затронула и цикл линьки, и экстерьерные признаки (положение ушей, хвоста), и окраску волосяного покрова, и даже кариотипические характеристики. Отбор по поведению, движущий по форме, оказался по существу *дестабилизирующим*; он в кратчайшие сроки сломал сложившуюся систему онтогенеза и вызвал громадную изменчивость многих признаков и свойств, сформированных у вида под действием стабилизирующего отбора.

Д.К. Беляев особо подчеркивал, что дестабилизирующая функция отбора не ограничивается доместикацией животных. Она должна проявляться в той или иной степени всегда, когда вид попадает в такие условия, при которых особое значение приобретает *отбор на стрессоустойчивость*. Поскольку такой отбор сопряжен с изменением нейрогормональных характеристик или реакцией органической системы на гормоны, то он приобретает дестабилизирующую функцию (Беляев, 1962, 1968, 1972, 1974, 1979, 1981–1983; Belyaev, 1969, 1979; Belyaev, Borodin, 1982; Belyaev, Trut, 1982; Беляев, Трут, 1989).

В 1982 г. в ответах на вопросы редакции журнала «Вестник Академии наук СССР» академик Д.К. Беляев подчеркивал: «Эксперименты по доместикации лисиц вскрыли, во-первых, один из коренных механизмов доместикационных изменений, которым оказался отбор животных по поведению. Во-вторых, они показали, что сам по себе отбор может порождать изменчивость и дестабилизировать даже те признаки организмов, которые не проявляют внутривидового наследственного разнообразия (например строгая сезонность размножения). Что же касается представления о дестабилизирующей функции отбора, то, как мне кажется, оно имеет большое значение для теории селекции, особенно в связи с серьезными изменениями систем содержания животных, обусловленными созданием крупных животноводческих ферм. В теоретическом же плане концепция дестабилизирующего отбора по-новому ставит проблему двух коренных факторов эволюции – отбора и изменчивости, а также стресса, прежде всего психоэмоционального стресса и сопряженных с ним нейроэндокринных характеристик, их значения в эволюционном процессе» (Беляев, 1982).

Предложенная Д.К. Беляевым концепция была новой, а точнее сказать, это была новая парадигма в изучении процесса доместикации и эволюции, ориентированная на выявление механизмов, которыми реализуется действие отбора по поведению – на интеграцию теории искусственного отбора с современными представлениями о функциях мозга.

В то же время Д.К. Беляев допускал, что у представителей разных таксонов, на разных уровнях по сложности организации послед-

ствия отбора на доместикационное поведение также будут разными. Предполагалось, что у тех групп животных, которые расширяют диапазон приспособительных реакций и овладевают разнообразной средой, реакция поведения входит в сложную систему фенотетических корреляций, которые обеспечивают стабилизацию и максимальную устойчивость формообразования в условиях изменчивой среды.

В последовавших экспериментах был поставлен вопрос: приведет ли доместикация к разным или аналогичным эффектам для таких представителей Carnivora, как лисица, американская норка и речная выдра, характеризующихся разной экологической пластичностью? «У речной выдры должны быть те же мутации окраски волосяного покрова, что и у американской норки», – неоднократно говорил Д.К. Беляев. И в 1984 г. в Институте цитологии и генетики СО АН СССР начался эксперимент по доместикации на представителе семейства куньих – речной выдре (*Lutra lutra*) (Трапезов, 1992, 1996, 1997а, б, 1998; Trapezov, 1995, 1996, 1998; Trapezov, Trapezova, 2000а, б).

Речная выдра

Выдра – один из представителей семейства, называемых куньими (Mustelidae). Куница, соболь, калан, горностай, колонок, барсук – ее родня. Крайние по размерам тела в этом семействе – большой и сильный зверь росомаха, а также самый маленький на Земле хищник – ласка.

В России выдру раньше кое-где называли «порешня» (поречня), т. е. живущая по рекам. Знаменитый Брэм назвал выдру одним из самых интересных животных Европы, а у индейцев Аляски выдра считается самым почитаемым животным, исключая разве что ворона.

Выдры ранее водились повсюду, где в водоемах имелась рыба – от крайнего севера до крайнего юга (исключая Антарктиду и Австралию). В Европе и Азии это был обычный зверь. Выдр истребляли, видя в них конкурентов при рыболовстве и рыбоводстве, но главным образом из-за ценного меха.

Однако главный удар по зверю нанесло загрязнение вод и, как следствие этого – исчезновение рыбы. Зверь, легко приспособившийся жить вблизи человека (выдр встречали в черте

Берлина и Петербурга), был обречен всюду, где исчезала рыба. Сегодня во многих местах Европы и Азии выдра стала до крайности редкой. В то же время на чистых таежных речках Европейского Севера, в Сибири и на Аляске зверь по-прежнему не является редкостью.

Согласно статистическим данным, всего в мире насчитывается приблизительно 88 тыс. выдр, что составляет лишь пятую часть от ее общей численности в середине XVIII в. В 2000 г. выдра обыкновенная (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758) была внесена в красный список Всемирного союза охраны природы (IUCN) как «уязвимый» (vulnerable) вид.

Отлов в природе и естественный отбор в условиях неволи

При создании вольерной популяции речной выдры потребовалось разработать стратегию наиболее эффективного метода управления этой популяцией, чтобы добиться минимальной утраты приспособленности и минимальных потерь. Ведь изъятая из природы популяция выдр, попав в новые условия, проходит через «бутылочное горлышко» естественного отбора. Это приведет к тому, что аутбредный в нормальном состоянии вид испытает воздействие инбредной депрессии (Franklin, 1980; Groen *et al.*, 1995; Berg, 1996).

Методом проб и ошибок специалисты по селекции животных выяснили, какая крайняя степень инбридинга терпима для домашних животных, т. е. при каком его максимальном проявлении линия еще сохраняет продуктивность и плодовитость. Пример можно взять из практики клеточного пушного звероводства: выдающееся по своим качествам стадо лисиц из подмосковного зверосовхоза «Пушкинский» на 50 % происходит от одного самца (Беляев, Куличков, 1968; Куличков и др., 1978). Или другой пример из соболеводства. Родоначальниками всех разводимых в настоящее время в нашей стране соболей являются несколько десятков зверей (Портнова, 1941, 1966; Куличков, Портнова, 1967; Мишуков, 1998). Но это все же те случаи, когда инбридинг применяется для очистки конкретной группы особей от нежелательных генов и закрепления нужных. Поскольку одомашненные популяции были

частично освобождены от неблагоприятных генов в течение тысячелетий, они способны выносить более высокие степени инбридинга, чем аутбредные виды, обитающие в природе. Специалисты в подходе к диким животным считают, что максимально допустимая степень инбридинга в одном поколении не должна превышать 1 %, и называют этот уровень «основным правилом природоохранной генетики» (Franklin, 1980; Frankel, Soule, 1981).

Отлов животных для интродукции в неволю. Сахалинская популяция выдр в условиях естественной саморегуляции численности стабильна и незначительно колеблется вокруг относительно неизменной средней величины. Различия в среднем возрасте самцов и самок отсутствуют. В популяции выдр 55–58 % составляют самцы, молодых животных в возрасте до года – 19–22 %. В объединенной выборке по самцам и самкам распределение особей по возрастным группам подчиняется нормальному закону. Средняя продолжительность жизни отдельной особи составляет около 5 лет, а полностью популяция обновляется в течение 24 лет (Вшивцев, 1972).

Несмотря на огромную территорию распространения речной выдры – от Западной Европы до Восточной Азии, – она уже к началу 1970-х годов стала в западной части своего ареала редка и местами оказалась на грани исчезновения (Вшивцев, 1972; Илюшкин, 1989; Ansonge, Stubbe, 1995).

Животных для интродукции в неволю отлавливали в южной части о-ва Сахалин в 1983–1985 гг. с сентября по октябрь. В результате была собрана коллекция из 43 выдр – самцов и самок разного возраста. Как видно из табл. 1, при отлове в специальные ловушки из популяции изымаются в основном молодые неполовозрелые животные (46 %), а также старые и больные (24 %). На долю взрослых условно здоровых зверей приходится 30 %. От общей численности вида на Сахалине, определяемой в 5500 голов (Вшивцев, 1972), эта выборка составила 0,8 %.

Естественный отбор в условиях пленения. Первый этап доместикации (в данном случае интродукции отловленных в дикой природе выдр) был, несомненно, стрессорирующим для абсолютного большинства особей. Селективная

Таблица 1

Естественный отбор в условиях пленения

Группа	Отловлено в дикой природе				Выживаемость в неволе									
	Самки		Самцы		Погибли в первые дни		Погибли в первые 2–3 мес.		Прожили до 1 года		Достигли половой зрелости		Размножались	
	n	%	n	%	♀♀	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀	♂♂
~ 2–3 мес	1	5					1							
Неполовозрелые, 1–2 года	10	47	9	41	1		1	3			8	6	5	4
Взрослые	5	24	8	36		1			1	3			2	1
Старые	3	14	3	14										
Больные	1	5	2	9		1	1	1						
С патологией	1	5							1					
Итого	21	100	22	100	1 (9%)	2 (14%)	3 (19%)	4 (22%)	2 (14%)	3 (18%)			7 (33%)	5 (23%)

роль стресса проявлялась сразу же после пленения зверей, несмотря на то что они были обеспечены водой, кормом и витаминами *ad lib*.

Как видно из табл. 1, в момент отлова и сразу же после отлова погибли 9 % самок и 14 % самцов. В течение первых 2–3 месяцев после пленения погибли еще 19 % самок и 22 % самцов. У этих животных наблюдалась характерная для стресса стадия тревоги: потеря веса, несмотря на свободный доступ к корму и воде, взъерошенность и тусклость волосяного покрова, пугливость, расстройство деятельности желудочно-кишечного тракта, вследствие угнетения иммунной системы у большинства зверей развивались легочные заболевания и воспаление лимфатических желез. Ветеринарные процедуры, как правило, эффекта не давали. Довольно значительный отход наблюдался также в течение всего года после пленения. В этот период погибли еще 14 % самок и 18 % самцов. Однако на этом селективное действие стресса не закончилось – размножались и внесли вклад в следующее поколение только 33 % самок и 23 % самцов.

В целом за весь 15-летний период содержания в неволе выращено четыре поколения животных. Темпы обновления вольерной популяции в сравнении с обновлением популяции в природных условиях удвоились и составили 12 лет. Средний возраст отдельной особи у самок составил 3,2 года, у самцов – 3,7 года

вместо 5 лет в природе. Соотношение по полу – 54 % самок и 46 % самцов. По сравнению с природной саморегулирующейся популяцией в распределении частот по возрасту преобладают молодые 3-летние неполовозрелые особи.

Кормление

Питание в природе. Стихия выдры – вода, рыболовство. Исключительно быстрый пловец (обтекаемое уплощенное тело, подвижный мощный хвост, перепонки на лапах), она способна угнаться за любой пресноводной рыбой. Выдра – охотник азартный – ловит больше, чем может съесть. Ловит рыбу любую – крупную и мелкую. Мелочь поедает в воде, с крупной выходит на берег, в укромное место. Случалось, едва надкушенных рыб жители приречных лесных деревенек собирали утром на берегу.

Зайчонок, крыса, кладка утиных яиц и сама утка, плотно сидящая на гнезде, также могут стать добычей выдры.

Кормление в условиях вольерного содержания. Кормление выдры в условиях вольерного разведения, подобно другим зверям клеточного пушного звероводства – двукратное – утром и вечером. Тип кормления мясо-рыбный. Рацион на самом первом этапе доместики для животных, доставленных из природы, состоял из качественных компонентов, приготовленных в виде фарша (1 г/100 ккал

обменной энергии корма): мускульное мясо – 30, печень – 5, субпродукты мягкие – 20, субпродукты костные – 7, рыба морская – 15, творог – 5, экструдированное зерно – 5, овощи – 3, дрожжи пекарские – 5. Ежедневно в кормовую смесь добавлялись витамины (из расчета на 1 голову/сутки): А – 3 тыс. ИЕ; вит. В₁ и В₂ – по 2 мг, фолиевая кислота – 1 мг, аскорбиновая кислота – 40 мг (Трапезов, 1992, 1996).

Среднегодовая суточная потребность зверей в обменной энергии составляет по самкам 600–900 ккал, по самцам 1200–1800 ккал.

Растущему молодняку необходимо вводить в рацион свободный жир.

О проявлении у речной выдры тиаминазной болезни

Проявление тиаминазной болезни при проживании в природных условиях. У некоторых отловленных в природе животных наблюдались признаки тиаминазной болезни. Одна такая выдра (самка) пала вскоре после поступления в питомник.

Протокол вскрытия

Животное *выдра*, пол *самка*, возраст ? масса тела *4,2 кг*, дата гибели *12 дек. 1984 г.*, дата вскрытия *13 дек. 1984 г.*

Данные макроскопического анализа. Тушка резко истощенного животного – подкожная жировая клетчатка отсутствует. Жировая ткань не обнаружена также в переднем средостении, большом и малом сальниках, в брыжейке и окологпочечной рыхлой соединительной ткани. Трахея и крупные бронхи проходимы на всем протяжении, просвет их свободен, слизистая бледная, блестящая. Плевральные полости свободны, париетальная и висцеральная плевро гладкая, бледно-розовая, блестящая. Консистенция легких тестоватая, уплотнений в ткани нет. Левое легкое бледно-розовое, в правом легком в верхней и средней долях видны участки ткани, окрашенные в ярко красный цвет. На разрезе ткань легких сухая, в местах красной окраски несколько спавшаяся, но достаточно воздушная. Лимфоузлы средостения и корня легких макроскопически не определяются. Вилочковая железа отсутствует. Щитовидная железа образована двумя отдельными долями ланцетовидной формы и темно-бурой окраски. Доли щитовидной железы расположены по обе стороны трахеи каудальнее перстовидного хряща гортани. Сердце весом 27,4 г расположено и сформировано правильно. Мышца сердца упругая, окрашена равномерно, полости желудочков не расширены, очаговые изменения отсутствуют. В брюшной полости сухо, париетальный и висцеральный листки брюшины гладкие, блестящие бледно-розовые. Петли кишечника лежат свободно. Печень весом 71,8 г, поверхность ее гладкая, края острые. На разрезе окраска печени равномерная, обычная, вены несколько полнокровны. Селезенка весом 4,9 г дрябловатая, уплощенная, с разреза соскоб ножом получить не удается. Почки обе весом 26,6 г дольчатые, капсула их полупрозрачна. На разрезе ткань почек темно-багровая, слои видны нечетко. Мочевой пузырь сокращен, мочи не содержит. Поджелудочная железа имеет хорошо выраженную голову и хвост, тело железы имеет полурассыпное строение. Ткань железы плотная серовато-бледная. Надпочечники неправильной формы, плотные, на разрезе четко видны корковый и мозговой слои. Матка двурогая, рога длинные, нитевидные, яичники по размеру соответствуют копеечной монете, плотные, с закругленными слоями. Пищевод и глотка покрыты оболочкой бледно-розового цвета, поверхность ее гладкая, без дефектов. Желудок правильной формы, несколько сокращен. Слизистая желудка образует высокие складки, бархатистая, без изъязвлений. Желудок пустой. Слизистую оболочку покрывает скудная вязкая прозрачная слизь. Просвет 12-перстной кишки, тонкого и толстого отделов кишечника не содержит пищевых и каловых масс. В толстом отделе присутствует дегтевидная масса пастообразной консистенции. Слизистая кишечника на всем протяжении не имеет видимых изменений. Общая длина кишечника от пилоруса желудка до ануса равна 218 см. Мускулатура нижних, верхних конечностей и спины на разрезах выглядит обычно. Мозг весом 39,6 г покрыт прозрачной мозговой оболочкой. Ткань головного мозга упругая, на разрезе блестящая, умеренно полнокровная. Желудочки мозга симметричные, щелевидные. Очаговые изменения в ткани всех отделов мозга и мозжечка не обнаружены. Гипофиз имеет сердцевидную форму, боковые доли аденогипофиза одинаковы по форме и размерам. Паховые, брыжеечные, медиастенальные и подчелюстные лимфоузлы визуальнo не определимы. Слюнные железы без особенностей.

Данные микроскопического исследования

Головной мозг: острая гибель одиночных ганглиозных клеток при отсутствии глиальной реакции.

Сердце: полнокровие капилляров миокарда, полное отсутствие гранулярного гликогена в кардиомиоцитах, острые очаговые некробиотические и дистрофические изменения – эозинофилия цитоплазмы и контрактура миофибрилл I–III степени. В наружном и внутреннем слоях миокарда левого желудочка множественные субсегментарные контрактуры, которые свидетельствуют о фибрилляции желудочков.

Легкие: множественные микро- и макротелезктазы (спадение альвеол и полнокровие капилляров их стенок).

Печень: отсутствие гранулярного гликогена, малые размеры гепатоцитов, гемосидерин в купферовских клетках.

Почки: умеренная пролиферация мезангиальных клеток в почечных клубочках, пылевидные скопления гемосидерина в цитоплазме эпителиоцитов проксимальных канальцев.

Селезенка: редукция лимфоидных фолликулов, массивный гемосидероз.

Поджелудочная железа: строение без особенностей.

Щитовидная железа: фолликулы расширены и заполнены плотным коллоидом, эпителий фолликулов низкий, малая активность железы).

Яичник: в корковом слое видны немногочисленные примордиальные фолликулы и созревающие граафовы пузырьки, а также белые тела.

Надпочечники: резкое полнокровие капилляров при сохранности микроскопического строения коркового и мозгового слоев.

Желудок: строение всех слоев обычно, обращает внимание разреженность лимфоидных фолликулов в подслизистом слое стенки желудка.

Двенадцатиперстная кишка, тонкий отдел кишечника – поверхностный посмертный аутолиз верхушек ворсин слизистой оболочки, отсутствие лимфоидной ткани в подслизистом слое и явлений пищеварительного лейкоцитоза. В стенке толстого кишечника встречаются мелкие скопления лимфоидных клеток.

Диафрагма и межреберные мышцы: множественные микротрубочки, очажки скопления гликозаминогликанов и очаговые некротические изменения мышечных волокон.

Мышца бедра: множественные распространенные фокусы некроза мышечных волокон на фоне более старых рубцовых и гранулематозных изменений, являющихся следствием разновременного возникших микронекрозов мышечной ткани.

Морфологический диагноз

Кахексия, очаговые дистрофические изменения мышечных клеток сердца, фибрилляция желудочков сердца; рубцы и рубцующиеся гранулемы в скелетной мускулатуре, распространенный коагуляционный некроз мышечных волокон бедра задних конечностей. Дистрофические изменения паренхиматозных органов; гемосидероз селезенки, эпителия почечных канальцев, печени; редукция лимфоидной ткани.

Заключение

По данным вскрытия и последующего микроскопического исследования было сделано заключение: у павшей самки в течение последних нескольких месяцев жизни несколько раз возникали очаговые некрозы в поперечно-полосатой соматической мускулатуре. Мышца сердца была вовлечена в некробиотический процесс при последней волне некротизации мышечной ткани. Дистрофические очаговые изменения кардиомиоцитов привели к возникновению фибрилляции желудочков сердца, что явилось причиной непосредственной гибели выдры. Инволюция жировой ткани, лимфоидных фолликулов, анемии (гемосидероз селезенки, печени, почек), дистрофические изменения паренхиматозных элементов в сочетании с некрозами мышечной ткани составляли совокупность признаков, указывавших на наличие тиаминазной болезни, протекающей на фоне полного отказа животного от пищи.

Между тем зоологическая литература наполнена информацией о том, что в рационе речной выдры значительное место занимают пресноводные виды рыб: лещ, окунь, плотва (Mason, Macdonald, 1986). Но из практики клеточного пушного звероводства хорошо известно, что ткани и внутренние органы этих видов речных рыб содержат фермент тиаминазу, разрушающую в кормовой смеси тиамин, что приводит к авитаминозу В₁ и, как следствие, развитию тиаминазной болезни (Перельдик и др., 1972; Худякова, Кириллов, 1974).

Возникло предположение, что в природных условиях, видимо, не все выдры (возможно, по состоянию здоровья) способны обеспечить себя нетиаминазными пищевыми ресурсами.

Проявление тиаминазной болезни в условиях вольерного содержания. С целью выяснения вопроса – действительно ли в природных условиях в рационе физически полноценной и здоровой речной выдры тиаминазные виды пресноводных видов рыб занимают незначительное место, был поставлен специальный опыт на группе взрослых животных (5 самок и 10 самцов) в летний период с 1 июля по 20 августа (Семенова, Трапезов, 1993).

Звери получали в виде фарша «тиаминазный» рацион (г/100 ккал обменной энергии корма): лещ – 10, плотва – 10, окунь – 10, судак – 5, голец – 5, кальмар – 5, субпродукты мясо-костные – 20, творог – 5, экструдированная пшеница – 8, дрожжи пекарские – 5. Витаминный премикс из расчета 2 грамма на 1 голову в сутки. В опыте использовалась выловленная в р. Оби свежемороженая рыба.

Через месяц опытного кормления у животных появились характерные признаки гиповитаминоза В₁: резко ухудшилась поедаемость корма, а спустя 5 суток некоторые особи от него полностью отказались. Началось развитие признаков тиаминазной болезни: у отдельных животных отмечали паралич задних конечностей, судорожное запрокидывание головы. У многих зверей кал приобрел черный цвет, дегтеобразный по консистенции. Два самца с паралитической формой заболевания пали.

Проявления признаков тиаминазной болезни удалось легко снять внутримышечной инъекцией 6 %-го раствора тиаминбромида в дозе 2 мл. Спустя два часа после обработки явления

паралича у животных уменьшились, а через сутки – животные стали поедать корм. На пятый день кал приобрел нормальную консистенцию и окраску, а еще через 10 дней звери восстановили свою прежнюю упитанность.

Заключение ветеринарной экспертизы, основанной на клинических симптомах, было подтверждено патоморфологическим исследованием органов и тканей павших животных, у которых обнаружены множественные очаговые некрозы в поперечно-полосатой мускулатуре и миокарде. Поражение последнего привело к фибрилляции желудочков сердца, что явилось непосредственной причиной гибели выдр. Инволюция жировой ткани и лимфоидных фолликулов, анемия (гемосидероз селезенки, печени, почек), дистрофические изменения паренхиматозных органов в сочетании с некрозами мышечной ткани (рис. 1–12) составляют совокупность морфологических признаков, свойственных тиаминазной болезни, протекающей на фоне полного отказа от пищи.

Размножение

Размножение в природе. В природе выдры ищут партнера для спаривания, издавая свистящий звук и оставляя на речном берегу дуги следов. Беременность самки, как теперь установлено, по длительности может быть разной. Оплодотворенное яйцо на определенной стадии зиготы пребывает в латентной стадии (как бы «спит»). Внешний сигнал (фотопериод) дает толчок к пробуждению и дальнейшему развитию эмбриона и он быстро растет. Выдрята (от одного до четырех, реже пять) рождаются в логове слепыми и беспомощными. Мать их долго воспитывает – учит охотиться, плавать и искать спасение в воде при опасности. В первую зиму без материнского опыта отыскать пищу самостоятельно молодой не смог бы. Но даже и с матерью зимой приходится, кроме рыбы, есть лягушек, водяных крыс, жуков. Лакомство – раки! Мать учит выводок коллективной охоте (одни рыбу гонят, другие – в засаде), учит ударом хвоста выгонять рыбу из убежища под берегом, учит бдительно высматривать из воды только нос – глотнуть воздуха. Став взрослыми, выдры ищут себе участок охоты и ревниво его охраняют, метят границы пометом.

**Патоморфологические проявления тиаминозной болезни у выдр
(иллюстрации к протоколам исследования)**

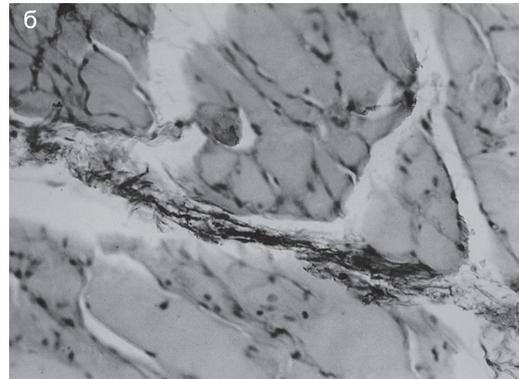
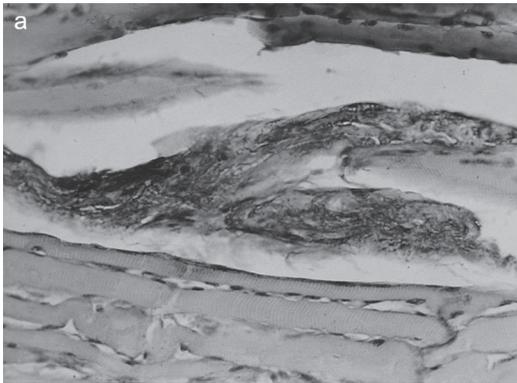


Рис. 1. Острый неврит: отек, деструкция и накопление гликозаминогликанов в нервных стволах межреберной и бедренной мышц (а – самка, б – самец). Окраска коллоидным железом-ШИК-гематоксилином, $\times 320$.



Рис. 2. Выдра-самка. Межреберная мышца: очаг созревающей рубцовой ткани в месте некроза мышечных волокон. Окраска коллоидным железом-ШИК-гематоксилином, $\times 320$.

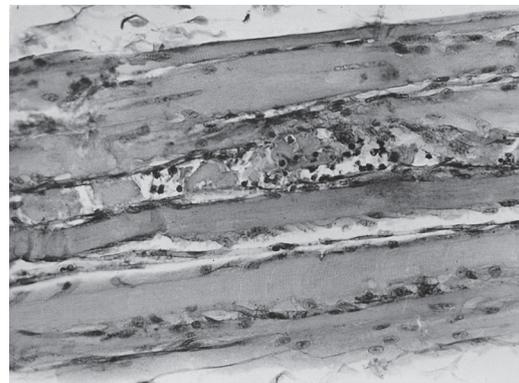


Рис. 3. Выдра-самец. Межреберная мышца: в центре снимка некротизированное волокно, разрушаемое макрофагами. Остальные мышечные волокна не изменены. Окраска коллоидным железом-ШИК-гематоксилином, $\times 320$.



Рис. 4. Выдра-самка. Мышца диафрагмы: очаговый коагуляционный некроз мышечных волокон и мелкие рубцы. Окраска коллоидным железом-ШИК-гематоксилином, $\times 320$.

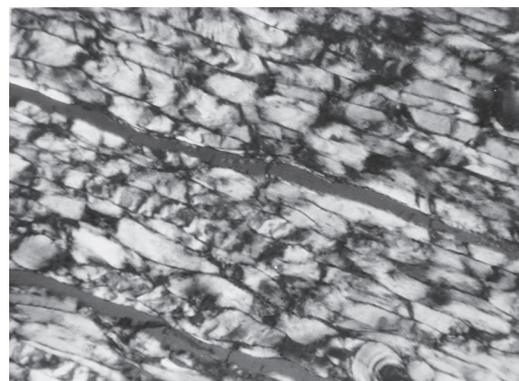


Рис. 5. Распространенные острые некротические и некробиотические повреждения мышцы бедра – картина в поляризованном свете: контрактуры и глыбчатый распад миофибрилл, исчезновение поперечной исчерченности. Окраска гематоксилином-эозином, $\times 320$.



Рис. 6. Выдра-самец. Один из очагов старых, рубцовых изменений (а) и более молодой, клеточный рубец в миокарде левого желудочка сердца (б). Окраска гематоксилином-эозином, $\times 320$.

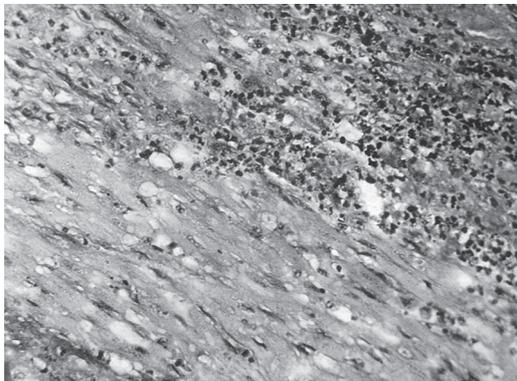


Рис. 7. Выдра-самец. Край инфарктоподобной зоны некроза миокарда левого желудочка сердца с массивной макрофагально-лейкоцитарной инфильтрацией. Окраска гематоксилин-эозином, $\times 320$.

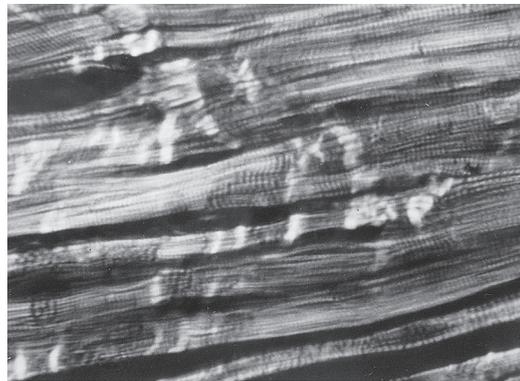


Рис. 8. Миокард выдры-самки: субсегментарные контрактуры миофибрилл в субэндокардиальном слое левого желудочка сердца – признак фибрилляции желудочков. Окраска гематоксилин-эозином, съемка в поляризованном свете, $\times 800$.

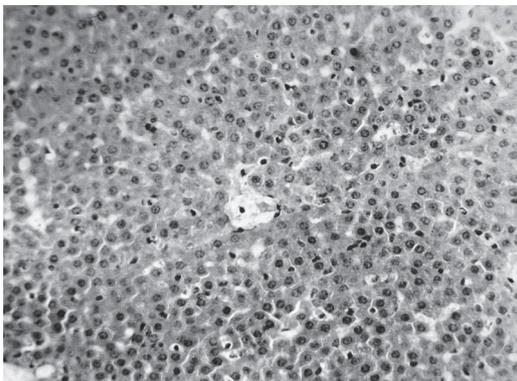


Рис. 9. Печень выдры-самки. Размеры гепатоцитов уменьшены за счет уменьшения объема цитоплазмы (результаты длительного отказа от пищи). Окраска гематоксилин-эозином, $\times 320$.

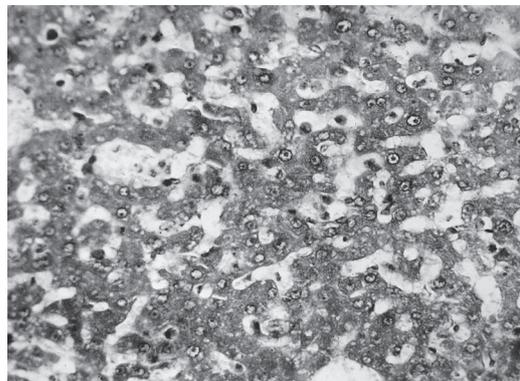


Рис. 10. Печень выдры-самца. Гепатоциты значительно крупнее за счет уменьшения объема цитоплазмы (результаты длительного отказа от пищи). Окраска гематоксилин-эозином, $\times 320$.

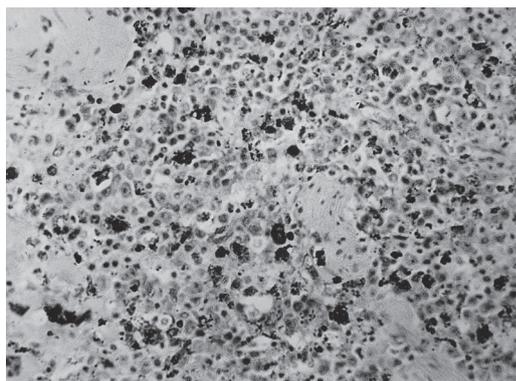


Рис. 11. Селезенка выдры-самки. Редукция лимфоидных фолликулов. Окраска гематоксилин-эозином, $\times 320$.



Рис. 12. Редукция лимфоидных фолликулов в селезенке выдры-самца с выраженным гемосидерозом. Окраска гематоксилином и эозином в сочетании с реакцией Перлса на железо, $\times 320$.

Размножение в условиях вольерного содержания. Половозрелость у речной выдры в условиях вольерного разведения наступает в возрасте 21 месяца. Звери приходят в охоту и покрываются в период с апреля по октябрь. Готовность самок к покрытию можно определять тремя методами: 1) по состоянию вагинальных мазков (рис. 13–18, табл. 2); 2) по состоянию внешних половых органов самок («петли»); 3) по готовности самки к спариванию путем подсадки к ней самца.

Продолжительность коитуса составляет в среднем 20–30 минут. Перекрытие самок производят на 2-й день. На 10–12-й день (считая от первого покрытия) возможно повторное спаривание (второй цикл) и, наконец, еще через 10–12 дней – по третьему. Спаривания

регистрируются с апреля по сентябрь. В среднем через 70–72 суток рождается потомство. Самые поздние щенения проходят в декабре. Количество щенков в помете 1–4. Масса щенков при рождении 70–120 г., длина тела 120–200 мм. Материнский инстинкт у выдр развит сильно, они хорошо принимают чужих щенков.

Уровень фактической плодовитости среди выдр с положительной реакцией на человека составил $3,0 \pm 0,2$ детеныша на одну самку, в то время как среди животных с реакцией страха на человека – $0,7 \pm 0,5$.

В возрасте 20 дней выдрята начинают поедать подкормку. В 30 дней у них открываются глаза. Отсадку молодняка от матерей производят в зависимости от сезона года: в 45 суток в летне-осенний период, в 60 суток – зимой (рис. 19).

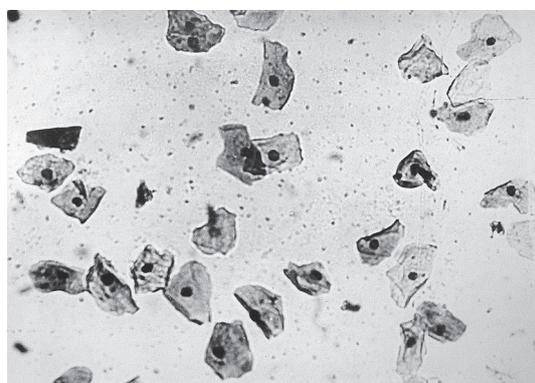
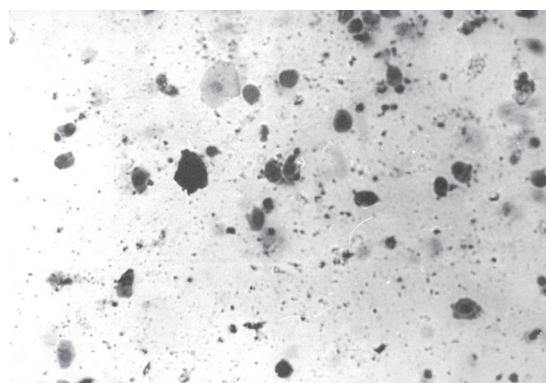


Рис. 13. Состояние слизистой эндотелия влагалища в состоянии покоя (слева) и в состоянии эструса (справа).

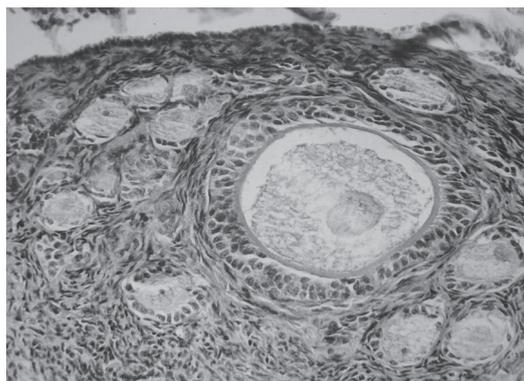


Рис. 14. Кортикальный слой яичника в период покоя: множественные примордиальные фолликулы и созревающий фолликул. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 320$.

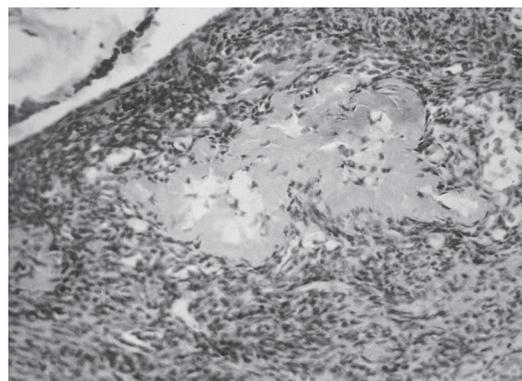


Рис. 15. Белое тело. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 320$.

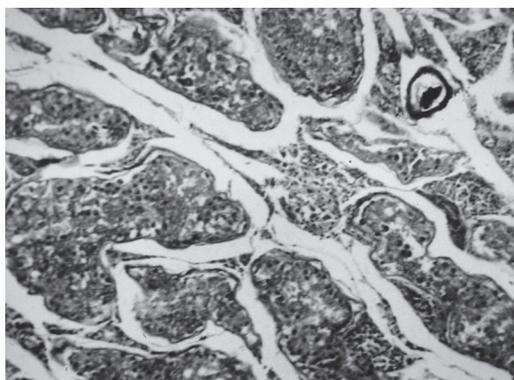


Рис. 16. Семенник: участок среза ткани с нормальным строением – семенные каналцы окружены узкими прослойками интерстициальной ткани. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 320$.

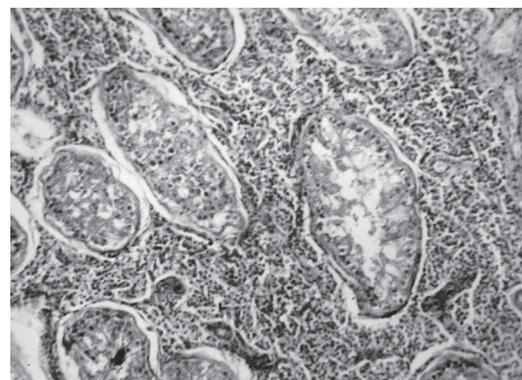


Рис. 17. Зона пролиферации интерстиция, который заполняет пространства между семенными каналцами. Окраска та же, $\times 125$.

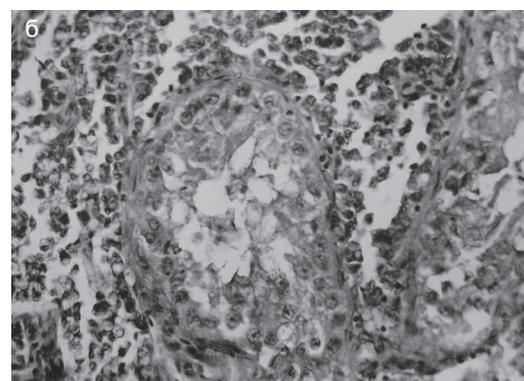
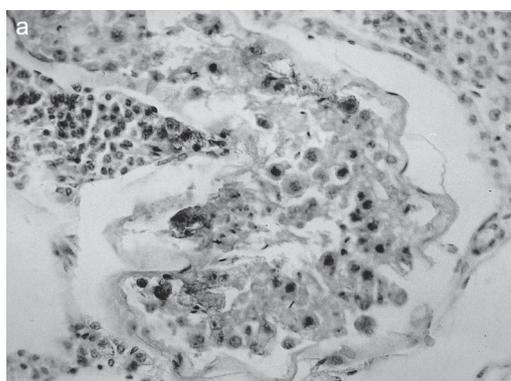


Рис. 18. а – слабо выраженный сперматогенез в семенных каналцах из зон с обычным строением органа и участков с пролиферацией интерстициальной ткани (сезонные изменения) (б). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 320$.

Таблица 2

Показатели размножения выдр с разной реакцией на человека в условиях неволи

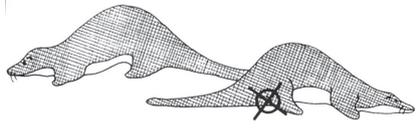
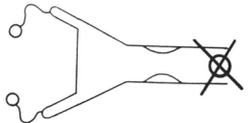
Показатели размножения		Реакция на человека	
		Реакция страха, %	Ручные, %
	Отсутствие стремления к спариванию	70	0
	Аборт, мертворожденные щенки	10	4
	Подавление лактации	30	2
	Неполноценный материнский уход за новорожденными	25	5
	Неонатальная гибель потомства	10	0
	Инфантицид новорожденных	2	0
Фактическая плодовитость (кол-во щенков на 1 самку)		$0,72 \pm 0,5$	$3,01 \pm 0,1$



Рис. 19. Отсадку выдрят от матерей производят в возрасте 50–60 дней. У 10 % выдрят при рождении в вольерных условиях присутствует страх (!) при внезапном попадании в воду. Плавая «по-собачьи», они в панике отчаянно стараются выбраться из воды.

Масса тела молодняка при отсадке 1300–1500 г. по самцам и 1000–1300 г. по самкам.

Живая масса взрослых особей при оптимальных условиях кормления и содержания составляет по самцам 10–13 кг, по самкам 6–8 кг.

Начиная с третьего поколения выдр стали содержать в специализированных звероводческих сооружениях – шедах.

Характеристика мехового покрова выдры

Волосной покров речной выдры состоит из очень густой ненамокающей подпуши и прикрывающей его ости. Линька у выдры диффузная. Остевой волос на вентральной поверхности туловища серебристого цвета. Площадь серебристого волоса сильно варьирует, нередко серебристая ость распространяется на боковую поверхность туловища, доходя до спинного ремня, придавая опушению особый колорит.

Мех речной выдры не только красивый, он еще и эталон прочности – его носкость принимается за 100 % (табл. 3). В былые времена шубу из меха выдры носили до тридцати сезонов, поэтому не случайно народы Севера подбивали им края одежды (чтобы не вытиралась).

На рис. 20 представлена сравнительная картина продольных гистосрезов остевого волоса у соболя, американской норки и речной выдры, дополняющая характеристики из табл. 3.

Самым ценным мехом среди всех видов выдр обладают выдры Аляски. В процессе изготовления из меха выдры модельного изделия грубая ость частично эпилируется, остается короткая, густая и нежная подпушь.

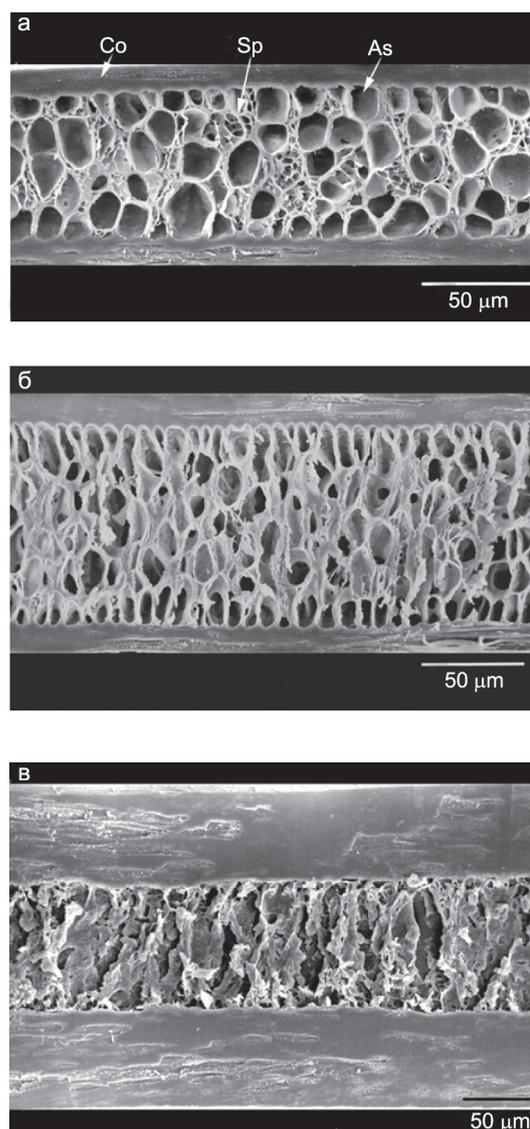


Рис. 20. Продольные разрезы остевого волос у соболя (а), американской норки (б) и речной выдры (в) (Kondo *et al.*, 2004). Co – корковый слой, Sp, As – секторы, наполненные воздухом.

Таблица 3

Характеристики волосяного покрова у речной выдры в сравнении с некоторыми другими представителями семейства Mustelidae

Вид зверя	Носкость по шкале Паркера	Число волос в пучке, шт	Число пучков на 1 см ² кожи	Густота волос, тыс. шт./см ²
Выдра речная	100	34,2 ± 0,7	1714 ± 33	58,6
Американская норка	70	26,3 ± 1,1	1283 ± 16	33,72
Соболь	80	12,4 ± 0,4	1037 ± 39	12,86

Изменение поведения и появление некоторых фенотипических изменений в ходе разведения в неволе

В экспериментальной работе с популяцией выдры вмешательство человека было связано только с контролем за подбором пар для размножения, чтобы свести к минимуму влияние инбридинга и генетического дрейфа. Коэффициент отбора в условиях, когда селекционером выступает стрессирующая антропогенная среда, составил в F_0 : по самкам – 67 %, по самцам – 77 %, в F_1 : по самкам – 64 %, по самцам – 61 %. При этом особи с реакцией страха на человека были не в состоянии успешно размножаться и вносили незначительный вклад в генетический фонд.

В ходе экспериментальной domestikации речной выдры действовал движущий отбор на увеличение числа особей с отсутствием реакции страха на человека, происходит адаптация, выражающаяся в изменении частот поведенческих фенотипов, дающих преимущество для выживания в средовых условиях, созданных человеком.

При специальном изучении оборонительной реакции на человека в исходном (отловленном в дикой природе) поколении было выделено три типа животных: с реакцией страха на человека (80 %); агрессивные (10 %); спокойные звери с положительной реакцией на человека (10 %).

Первые оценки изменения частотности поведенческих фенотипов трансформировались в сторону увеличения числа особей с положительной реакцией на человека. Доля таких животных через 13 лет составила 37 %. На долю агрессивных животных и особей с реакцией страха на человека приходилось 11 и 52 % соответственно.

Преобразование поведения даже за эти три поколения разведения в неволе сопровождалось некоторыми, пока еще незначительными девиациями от стандартного фенотипа в окраске волосяного покрова. В норме выдра характеризуется темно-коричневой спиной, окраска вентральной части тела серебристая, пуховой волос бежевого цвета. Большинство особей на нижней губе имеют небольшие по площади пегости от 1 до 5 см². В первом и втором поколениях domestikации речной выдры с большой частотой,

составляющей 1×10^{-1} , было зарегистрировано появление особей с неспецифическими пегостями, которые локализовались на кончике хвоста. Ни у одного из размножавшихся в F_0 животных этого признака не было.

Заключение

Приведенные данные демонстрируют, что отбор на первом этапе domestikации действует крайне жестко, и самое существенное последствие естественного отбора в условиях неволи состоит в том, что в ряду поколений сохраняются генотипы, обеспечивающие повышенную стрессоустойчивость в новой для них антропогенной среде. Иными словами, в условиях неволи эмоциональный стресс превращается в отбирающий фактор, который выявляет генотипическое разнообразие особей в популяции, ведет к ее дифференциации, способствует ускорению темпа эволюционных и селекционных преобразований.

Литература

- Беляев Д.К. О некоторых проблемах коррелятивной изменчивости и их значении для теории эволюции и селекции животных // Изв. СО АН СССР. 1962. № 10. С. 111–124.
- Беляев Д.К. Биологические аспекты domestikации животных // Генетика и селекция новых пород сельскохозяйственных животных. Матер. Всесоюз. совещ. 24–26 октября 1968 г., Алма-Ата. Алма-Ата: Наука, 1970. С. 30–44.
- Беляев Д.К. Генетические аспекты domestikации животных. Проблемы domestikации животных и растений. М.: Наука, 1972. С. 39–45.
- Беляев Д.К. О некоторых вопросах стабилизирующего и дестабилизирующего отбора. История и теория эволюционного учения. Л.: Наука, 1974. С. 76.
- Беляев Д.К. Дестабилизирующий отбор как фактор изменчивости при domestikации // Природа. 1979. № 2. С. 36–45.
- Беляев Д.К. Дестабилизирующий отбор как фактор domestikации. Генетика и благосостояние человечества. М.: Наука, 1981. С. 53–66.
- Беляев Д.К. Генетика животных – одна из трудных проблем // Вестн. Академии наук СССР. 1982. № 4. С. 96–100.
- Беляев Д.К. Дестабилизирующий отбор // Развитие эволюционной теории в СССР (1917–1970 гг.) / Ред. С.Р. Микулинский, Ю.И. Полянский. Л.: Наука. Ленингр. отд-ние. 1983. С. 266–277.
- Беляев Д.К., Куличков Б.А. Улучшить племенную работу в лисоводстве // Кролиководство и звероводство. 1968. № 5. С. 37–39.

- Куличков Б.А., Полунина М.М., Карченков А.Г. Главное в селекции – целеустремленность и преемственность // Кролиководство и звероводство. 1978. № 3. С. 6–9.
- Беляев Д.К., Трут Л.Н. Конвергентный характер формообразования и концепция дестабилизирующего отбора // Вавиловское наследие в современной биологии. М.: Наука, 1989. С. 155–169.
- Вшивцев В.П. Выдра Сахалина (Биология и хозяйственное использование). Новосибирск: Наука, 1972. 107 с.
- Илюшкин А.Н. Современное состояние ресурсов речной выдры на Камчатке // Промысловая фауна Северной Пацифики: Сб. науч. тр. ВНИИ охоты и звероводства им. проф. Б.М. Житкова. Киров, 1989. С. 85–97.
- Куличков Б.А., Портнова Н.Т. Русский соболь. М.: Колос, 1967.
- Мишуков Л.К. С чего началось соболеводство? // Кролиководство и звероводство. 1998. № 5/6. С. 15.
- Перельдик Н.Ш., Милованов Л.И., Ерин А.Т. Кормление пушных зверей. М.: Колос, 1972. 344 с.
- Портнова Н.Т. Опыт работы соболиной фермы Пушкинского звероводческого совхоза // Кролиководство и звероводство. 1941. № 6. С. 7–9.
- Портнова Н.Т. Наш опыт разведения соболей // Кролиководство и звероводство. 1966. № 4. С. 15–16.
- Семенова Л.А., Трапезов О.В. Чувствительность к дефициту витамина В₁ // Кролиководство и звероводство. 1993. № 4. С. 7.
- Трапезов О.В. Клеточное разведение выдр // Кролиководство и звероводство. 1992. № 5. С. 13.
- Трапезов О.В. Питомник речной выдры // Кролиководство и звероводство. 1996. № 6. С. 15–16.
- Трапезов О.В. Опыт одомашнивания представителей семейства кунцеобразных: Американской норки (*Mustela vison* Schreber, 1777) и речной выдры (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758) // Современные концепции эволюционной генетики. Ч. II. С. 350–352. Матер. Междунар. конф., посвящ. 80-летию со дня рождения академика Д.К. Беляева. Новосибирск, 9–12 сентября 1997 г. Новосибирск, 1997а.
- Трапезов О.В. Одомашнивание как один из возможных путей сохранения биоразнообразия (на примере речной выдры *Lutra lutra* Linnaeus, 1758) // Генетика. 1997б. Т. 33. № 8. С. 1162–1167.
- Трапезов О.В. Об одомашнивании речной выдры // Кролиководство и звероводство. 1998. № 2. С. 10.
- Худякова А.А., Кириллов А.К. Авитаминоз В₁ у норки при кормлении атлантической сельдью и меры его предупреждения // Проблемы пушного звероводства и кролиководства. Науч. тр. НИИПЗК. Т. XIII. М., 1974. С. 179–186.
- Ansorge H., Stubbe M. Nonmetric skull divergence in the otter – assessing genetic insulation of populations // IUCN Otter Spec. Group Bull. 1995. V. 11. P. 17–30.
- Belyaev D.K. Domestication of animals // Sci. J. (UK). 1969. No. 5. P. 47–52.
- Belyaev D.K. Destabilizing selection as a factor in domestication // J. Heredity. 1979. V. 70. P. 301–308.
- Belyaev D.K., Borodin P.M. The influence of stress on variation and its role in evolution // Biol. Zentralbl. 1982. V. 100. P. 705–714.
- Belyaev D.K., Trut L.N. Accelerating evolution // Science in the USSR. 1982. No. 5. P. 24–64.
- Berg P. The effect of inbreeding on reproduction traits in mink // Proc. of the VIth Intern. Sci. Congr. in Fur Animal Production (August 21–23): Appl. Sci. Reports. Warszawa, 1996. V. 27. P. 57–62.
- Franklin I.R. Evolutionary change in small populations // Conservation Biology: An Evolutionary-Ecological Perspective / Eds M.E. Soule, B.A. Wilcox. Univ. California; San Diego: Stanford Univ. Sinauer, 1980. P. 135–149.
- Frankel O.H., Soule M.E. Conservation and Evolution. L.; N.Y.: Cambr. Univ. Press. 1981. 279 p.
- Groen A.B., Kennedy B.W., Eissen J.J. Potential bias in inbreeding depression estimates when using pedigree relationships to access the degree of homozygosity for loci under selection // Theor. Appl. Genet. 1995. V. 91. P. 665–671.
- Kondo K., Ninomiya Y., Ichikawa H. *et al.* Hair density and morphology of medulla in Mustelidae // VIIIth Intern. Sci. Congr. in Fur Animal Production. 15–18 September 2004, De Ruvenberg, 's-Hertogenbosch, The Netherlands. SCIENTIFUR, 2004. V. 28. No. 3. V: Fur Properties. P. 283–287.
- Mason C.F., Macdonald S.M. Otters: Ecology and Conservation. Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1986. 136 p.
- Trapezov O.V. Selection for tameness towards man increased resistance to pneumonia in the river otter (*Lutra lutra*). Fourth Intern. Veterinary Immunology Symp. July 16–21. 1995. University of California, Davis. 1995.
- Trapezov O.V. The river otter (*Lutra lutra* L., 1758) as a new fur farming animal // Proc. of the VIth Intern. Sci. Congr. in Fur Animal Production. Applied Sci. Rep. August 21–23. 1996. Warsaw. Poland. 1996. V. 29. P. 215–219.
- Trapezov O.V. Behavioral aspects of the river otter (*Lutra lutra*) and the sea otter (*Enhydra lutris*) breeding in captivity // VIIth Intern. Otter Colloquium. March 14–19. 1998. Trebon. Czech Republic. 1998. P. 7.
- Trapezov O.V., Trapezova L.I. Fifteen years of otter breeding // Proc. of the VIIth Intern. Sci. Congr. in Fur Animal Production. V. IV: Contributed papers. B: Behaviour and Welfare. September 13–15. 2000. Kastoria. Macedonia. Greece. 2000a. P. 126–128.
- Trapezov O.V., Trapezova L.I. Fifteen years of river otter (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758) breeding in captivity // Adv. in Ethology Suppl. No. 35 to «Ethology». Contributions to the 3rd Intern. Symp. on Physiology and Ethology of Wild and Zoo Animals. Berlin, Germany, 4–7 October 2000. Edited by Matthias Lechner-Doll, Heribert Hofer. Institute for Zoo Biology and Wildlife Research (IZW), Berlin Alfred-Kowalke-Strasse 17, D-10315 Berlin, Germany. Blackwell Wissenschaft-Verlag Berlin Vienna. 2000b.

**AN EXPERIMENT ON RIVER OTTER
(*LUTRA LUTRA* LINNAEUS 1758) DOMESTICATION**

O.V. Trapezov, L.I. Trapezova, L.A. Semenova

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

A cage population of river otters (*Lutra lutra*) has been obtained in an experiment of domestication of the species conducted at the Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk. It is shown that the crucial factor in introduction of the species to captive breeding is selection for stress resistance in an anthropogenic environment. River otter domestication is accompanied by balancing selection for increase in the number of individuals lacking fear-induced response toward humans.

Key words: river otter, *Lutra lutra*, domestication, stress resistance, D.K. Belyaev.

УДК 541.144.8

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТАТА-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА С ТАТА-ЭЛЕМЕНТОМ ПРОМОТОРА ГЕНА *NOS2A* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА

© 2012 г. **И.А. Драчкова, С.В. Шеховцов, С.Е. Пельтек, П.М. Пономаренко,
Т.В. Аршинова, М.П. Пономаренко, Т.И. Меркулова,
Л.К. Савинкова, Н.А. Колчанов**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: savinkl@mail.ru

Поступила в редакцию 26 февраля 2012 г. Принята к публикации 28 марта 2012 г.

Взаимодействие ТАТА-связывающего белка (ТВР) с ТАТА-боксом и образование комплекса ТВР/ТАТА являются первым шагом в сборке транскрипционного комплекса и центральным событием в регуляции транскрипции. Известно, что некоторые однонуклеотидные замены (SNP – single nucleotide polymorphism) в ТАТА-боксе и его фланках ассоциируются с повышенным риском возникновения различных патологий человека (Савинкова и др., 2009). Данные об изменении взаимодействия ТВР/ТАТА, приводящем к повышенному риску возникновения какой-либо патологии, в литературе практически отсутствуют. В этой работе изучали влияние SNP (–21t>c), прилегающего к ТАТА-боксу промотора гена *NOS2A*, на взаимодействие с ТВР человека с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на биосенсоре ProteOn XPR36. Из полученных сенсограмм видно, что замена 21t>c в последовательности, прилегающей к ТАТА-боксу, практически не влияла на константу скорости ассоциации ТВР с ТАТА-содержащим олигонуклеотидом, а константы реакции диссоциации отличались примерно в два раза. Таким образом, эксперименты, проведенные с использованием метода SPR и классического метода EMSA, показали, что при иммобилизации ТВР на декстрановой поверхности микрочипа не происходит изменения аффинности его взаимодействия с ТАТА-содержащими олигонуклеотидами.

Ключевые слова: ТАТА-связывающий белок, ТАТА-бокс, сродство, метод поверхностного плазмонного резонанса, сенсограммы, NO-синтаза 2A.

Введение

Экспрессия генов, считываемых РНК-полимеразой II, регулируется главным образом на стадии инициации транскрипции. Взаимодействие ТАТА-связывающего белка (ТВР) с ТАТА-боксом и образование комплекса ТВР/ТАТА являются первым шагом в сборке транскрипционного комплекса, необходимого для начала транскрипции. ТВР взаимодействует с ДНК специфически, отличие от других базальных транскрипционных факторов (за исключением ТFIIB), взаимодействие ТВР/ТАТА является центральным событием

в регуляции транскрипции (Juven-Gershon, Kadonaga, 2010).

Известно, что несмотря на большую вариабельность последовательности ТАТА-бокса (консенсус ТАТАААА), некоторые однонуклеотидные замены (SNP – single nucleotide polymorphism) в ТАТА-боксе и его фланках ассоциируются с повышенным риском возникновения различных патологий человека (Савинкова и др., 2009). Данные об изменении взаимодействия ТВР/ТАТА, приводящем к повышенному риску возникновения какой-либо патологии, в литературе практически отсутствуют. В связи с этим в данной работе изучали влияние SNP (–21t>c),

прилегающего к ТАТА-боксу промотора гена *NOS2A*, на взаимодействие с ТВР человека.

Ген синтазы окиси азота (NO-синтазы) расположен в хромосоме 17. Показано, что генетические вариации внутри 5'-области влияют на его экспрессию (Barcellos *et al.*, 2008; Burgner *et al.*, 2003). Ген кодирует один из изоферментов NO-синтазы – NOS2A. Это одна из индуцируемых синтаз, которая продуцируется при различных патологических состояниях организма (например, воспалительный процесс), обнаружена во многих клетках: гладкомышечных и эндотелиальных клетках сосудов, моноцитах, макрофагах и др. (Barcellos *et al.*, 2008). Уровни NO, производимой клетками эндотелия сосудов, влияют на состояние стенок сосудов, размножение клеток гладких мышц сосудов, предотвращают агрегацию тромбоцитов и адгезию лейкоцитов к эндотелию, участвуют в различных процессах нервной и иммунной систем. Показано (Burgner *et al.*, 2003), что проксимальная область промотора гена *NOS2A* содержит несколько SNPs, в том числе SNP –21t>c, рядом с ТАТА-боксом, который ассоциируется с предрасположенностью к таким заболеваниям, как гипертония, стенокардия, рассеянный склероз и др.

Изучение взаимодействия ТВР с олигонуклеотидом, идентичным ТАТА-боксу промотора гена *NOS2A* в норме и при содержании SNPs во фланкирующей последовательности, проводили с применением метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR – Surface Plasmon Resonance) на ProteOn XPR 36 с использованием микрочипа GLN с карбоксилированной поверхностью. Сравнение результатов, полученных с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса и классического метода «задержки ДНК в геле», показало их соответствие друг другу, и что при иммобилизации на декстрановой поверхности микрочипа ТВР не теряет аффинности при взаимодействии с ТАТА-содержащим олигонуклеотидом.

Материалы и методы

Получение рекомбинантного hТВР

В работе использовали ТВР человека (hТВР), экспрессированный в клетках *Escherichia coli* BL21(DE3) с плазмиды pAR3038-hТВР (любезно предоставлен проф. В. Puhg, Center for Gene

Regulation, Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA), выделение которого описано в работе И.А. Драчковой с соавт. (2010). Препарат ТВР по результатам электрофореза в ПААГе и окраски Кумасси R-250 был гомогенен. Концентрацию активных молекул ТВР в полученном препарате определяли титрованием меченым ³²P ODN (Соколенко и др., 1996).

Получение меченых

³²P олигодезоксирибонуклеотидов

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

Определение равновесных констант диссоциации комплексов ТВР/ТАТА с помощью метода EMSA

Для определения равновесных констант диссоциации комплексов (K_D) hТВР с ТАТА-содержащими олигонуклеотидами, соответствующими «нормальным» и SNP-содержащим вариантам ТАТА-боксов, использовали традиционный подход, включающий титрование hТВР в фиксированной концентрации (0,34 nM активный ТВР) ТАТА-содержащим ODN в возрастающей концентрации (Драчкова и др., 2010).

Эксперименты по связыванию hТВР с ODN проводили при 25 °C в буфере следующего состава: 20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 100 µg/ml BSA, 0,01 % NP-40, 5 % глицерин до установления равновесия. Для отделения комплексов «hТВР-ODN» от несвязавшегося ODN использовали метод EMSA, описанный в работе И.А. Драчковой с соавт. (2010).

Кинетический анализ взаимодействия ТВР/ТАТА с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса

Изучение взаимодействия hТВР с олигонуклеотидами, идентичными ТАТА-боксу промото-

ра гена *NOS2A* в норме и при содержании SNP, проводили с использованием метода SPR на биосенсоре ProteOn XPR 36.

Поверхностный плазмонный резонанс – физический эффект, который возникает в случае резонанса частоты падающего на поверхность микрочипа электромагнитного поля (фотонов) с собственной частотой колебаний электронов (плазмонов) поверхностного слоя золотой пленки микрочипа (Navratilova *et al.*, 2006; Bronner *et al.*, 2010). При этом взаимодействии генерируется электромагнитное поле, которое распространяется, экспоненциально затухая, вдоль поверхности микрочипа и вглубь, выходит за поверхность золотой пленки, захватывая слой декстрана с иммобилизованными молекулами лиганда и свободной среды в проточной кювете. Изменение диэлектрической проницаемости среды и коэффициента отражения в результате взаимодействия вводимого аналита с иммобилизованным на декстрановой поверхности чипа лигандом вызывает сдвиг резонансного сигнала, который примерно линейно пропорционален коэффициенту оптического преломления в зоне измерения и массе аналита (Nahshol *et al.*, 2008; Abbas *et al.*, 2011). Это позволяет в режиме реального времени регистрировать взаимодействие hTBP/ODN, которое выражается в резонансных единицах (RU).

Для работы мы использовали микрочип GLN с высокой плотностью посадки белка. hTBP в концентрации 37 мкг/мл был иммобилизован на чип до плотности ~ 13000 RU в условиях, обеспечивающих как взаимодействие с декстрановой поверхностью чипа, так и нативность hTBP (pH = 7,6 < pI = 10,25). Обработку GLN до и после связывания проводили согласно инструкции к прибору. Кинетические характеристики взаимодействия hTBP/TATA получали при температуре 25 °C в буфере следующего состава: 20 mM Hepes-KOH, pH = 7,6, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂. Каждый эксперимент включал диапазон концентраций ODN от 10⁻⁷ M до 10⁻⁶ M. Контролем служил референсный канал, не содержащий hTBP. Полученные результаты анализировали с использованием программы, приложенной к прибору.

Стратегия регенерации поверхности микрочипа нами не использовалась, так как hTBP не отмывался от карбоксилированной поверхности

микрочипа ввиду ковалентного связывания, а при отмыве ODN инактивировался.

Как известно (Bronner *et al.*, 2010; Rich, Myszka, 2010), для получения достоверных и качественных данных на любом биосенсоре необходимо высокое качество используемых реагентов. Основная наша проблема заключалась в получении ODN необходимого качества. Это достигалось дополнительной очисткой ODN электрофорезом в ПААГе.

Результаты и обсуждение

Взаимодействие между иммобилизованным на поверхности микрочипа hTBP и ODN регистрируется как изменение поверхностного плазмонного резонанса в RU. На рис. 1 и 2 приведены сенсограммы кинетического анализа взаимодействия hTBP с ODN, идентичным TATA-элементу промотора гена *NOS2A* здорового человека и содержащего замену -21t>c соответственно.

Из сенсограмм, полученных при разных концентрациях ODN, видно, что hTBP и ODN сохраняют активность в течение времени, необходимого для проведения эксперимента. Используемое в экспериментах время инъекции ODN достаточно для того, чтобы наблюдать искривление в изотермах связывания, свидетельствующее о выходе реакции связывания на плато. Как видно из приведенных на рис. 1 и 2 значений, константы скорости ассоциации (k_a) для комплексов hTBP/TATA здорового человека и содержащего замену -21t>c практически не отличаются – $7,11 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ и $6,72 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ соответственно. Примерно в два раза выше константа реакции диссоциации (k_d) комплексов hTBP с ODN, содержащим замену во фланке TATA-бокса. Образующиеся комплексы очень стабильны (время полураспада более 60 мин), фазы диссоциации проводились достаточное время для регистрации необходимого количества сигналов распада. Полученные из кинетических констант расчетные значения равновесных констант, характеризующих сродство hTBP к TATA-элементу дикого типа и содержащего замену -21t>c, также различаются примерно в два раза. Все полученные сенсограммы свидетельствуют о соответствии модели взаимодействия hTBP/ODN 1 : 1.

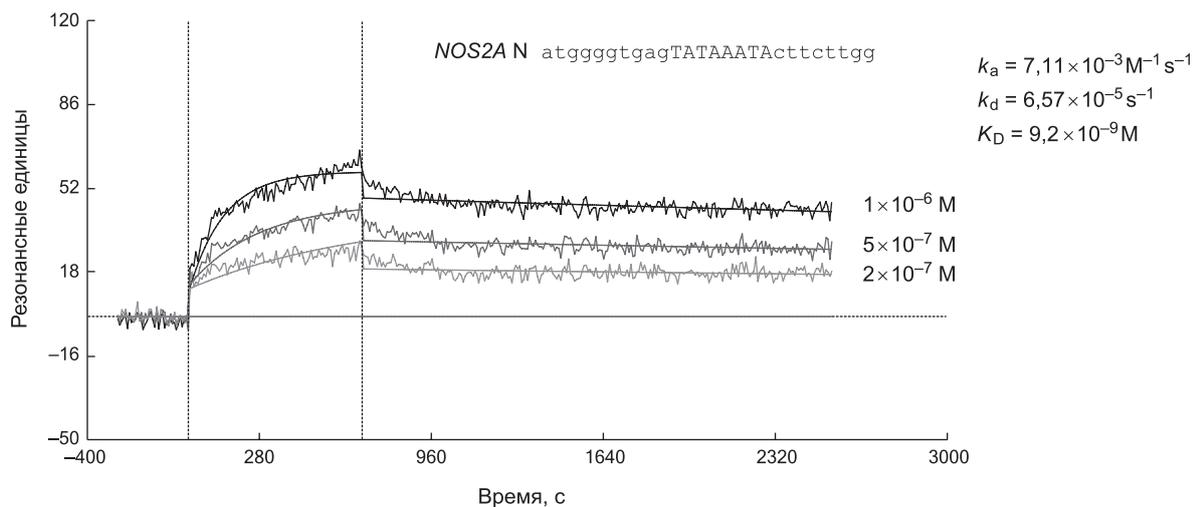


Рис. 1. Кинетический анализ взаимодействия ODN, идентичного TATA-боксу промотора гена *NOS2A* здорового человека, с hTBP, иммобилизованным на чипе GLH, с использованием метода SPR на биосенсоре ProteOn XPR36.

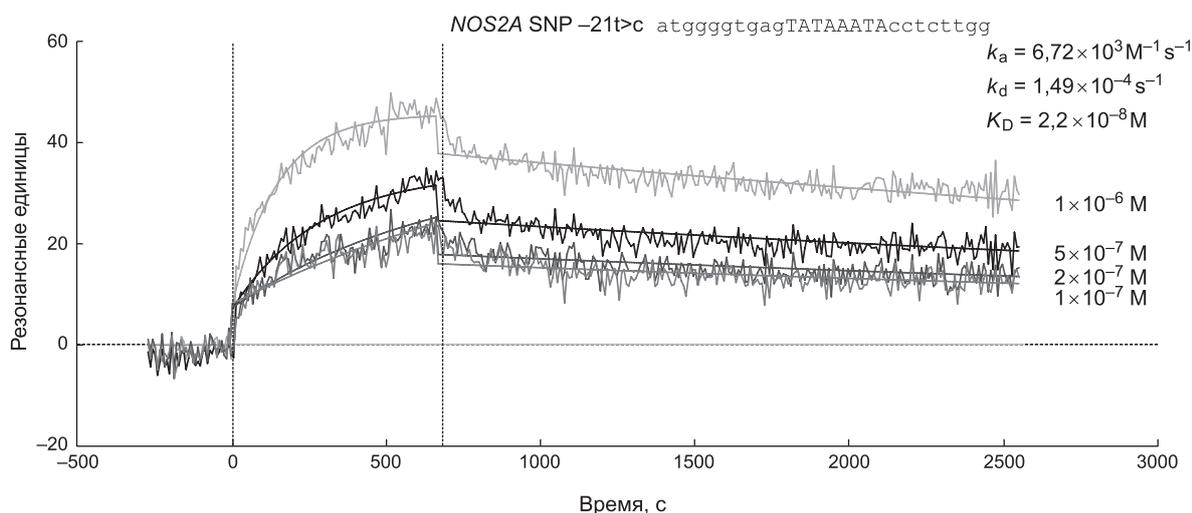


Рис. 2. Кинетический анализ взаимодействия ODN, идентичного TATA-боксу промотора гена *NOS2A* с SNP -21t>c, с hTBP, иммобилизованным на чипе GLH, с использованием метода SPR на биосенсоре ProteOn XPR36.

Так как метод SPR с использованием биосенсора требует иммобилизации белка на карбоксилированном декстрани микрочипе, необходимо убедиться, что процесс иммобилизации (в нашем случае иммобилизация происходит через лизинные остатки hTBP, не принимающие участия в связывании с TATA-боксом (Kim *et al.*, 1993; Strahs *et al.*, 2003)) не изменяет аффинности взаимодействия hTBP/ODN. Для этого эксперименты повторили с использованием классического метода «задержки ДНК в геле» (рис. 3), в следующих условиях: 20 mM Hepes-KOH,

pH 7,6, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,01 % NP40, 100 µg/ml BSA, 5 %-й глицерин.

Как видно, экспериментальные значения равновесных K_D для дикого и мутантного ODN, полученные с использованием метода «задержки ДНК в геле», между собой различаются незначительно. Небольшая разница между сродством TBP к ODN, содержащему TATA-элемент дикого типа и TATA-элемент с заменой -21t>c, объясняется тем, что эта замена расположена во фланкирующей TATA-боксовую последовательности и поэтому мало влияет на его взаимодействие

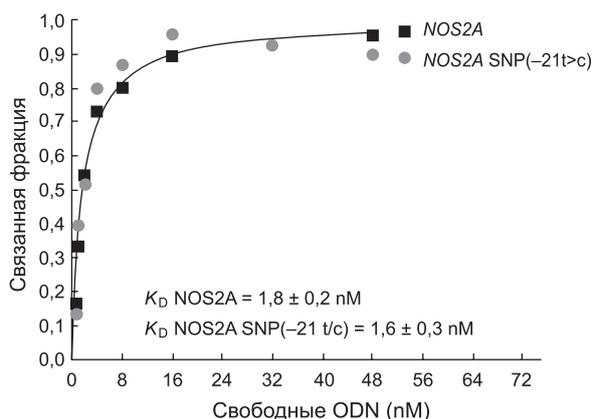


Рис. 3. Определение равновесных K_D комплексов hTBP с ODN, идентичными ТАТА-боксу промотора гена *NOS2A* здорового человека и с SNP -21t>c, с помощью метода EMSA (OriginPro 8).

с hTBP, хотя и делает вклад в ряд полигенных заболеваний человека (Burgner *et al.*, 2003; Савинкова и др., 2009).

Различия между определенными разными методами расчетными и экспериментальными значениями равновесных K_D (в 5 и более раз) являются рабочими для подобных экспериментов: совпадение в пределах одного порядка величин считается хорошим (Kim *et al.*, 1993; Abdiche *et al.*, 2011). В нашем случае отклонения в значениях, полученных с использованием методов SPR и EMSA, могут быть обусловлены еще и качеством ODN. К сожалению, используемые в работе коммерческие препараты синтетических олигонуклеотидов даже при дополнительной очистке не всегда удовлетворяли необходимым требованиям для получения количественных характеристик комплексообразования. Таким образом, полученные результаты показывают, что hTBP, иммобилизованный на микрочипе, не изменяет термодинамических параметров взаимодействия с ODN.

Итак, мы показали использование сенсорной технологии для определения количественных характеристик взаимодействия hTBP с ТАТА-содержащими ODN в норме и при содержании замены в последовательности, фланкирующей ТАТА-букс. Конечно, условия проведения экспериментов могут и дальше оптимизироваться. Требование высокого качества ODN является ограничением для получения количественных характеристик комплексов hTBP/ODN, позво-

ляющих делать выводы о механизме взаимодействия. Преимуществами ProteOn, как и всех современных сенсорных приборов, являются «быстрота» анализа, возможность использования немеченых ODN нескольких концентраций одновременно, быстрое выявление аффинных и мутантных белков и олигонуклеотидов из их смесей.

Работа выполнена при поддержке: РФФИ, грантов № 10-04-00462; № 11-04-01888 проекта 119 СО РАН; проекта РАН Б.27 «Биологическое разнообразие»; программы президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (ФНМ 23).

Литература

- Драчкова И.А., Аршинова Т.В., Пономаренко П.М. и др. Влияние полиморфизмов ТАТА-боксов промотора гена β -глобина человека, ассоциированных с β -талассемией, на взаимодействие ТАТА-связывающего белка // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 4. С. 698–705.
- Савинкова Л.К., Пономаренко М.П., Пономаренко П.М. и др. Полиморфизмы ТАТА-боксов промоторов генов человека и ассоциированные с ними наследственные патологии // Биохимия. 2009. Т. 74. № 4. С. 149–163.
- Соколенко А.А., Сандомирский И.И., Савинкова Л.К. Взаимодействие дрожжевого ТАТА-связывающего белка с короткими участками промоторов // Молекуляр. биология. 1996. Т. 30. № 2. С. 279–285.
- Abbas A., Linman M.J., Cheng C. New trends in instrumental design for surface plasmon resonance-based biosensors // Biosens. Bioelectron. 2011. V. 26. No. 5. P. 1815–1824.
- Abdiche Y.N., Lindquist K.C., Pinkerton A. *et al.* Expanding the proteOn XPR36 biosensor into a 36-ligand array expedites protein interaction analysis // Analyt. Biochem. 2011. V. 411. P. 139–151.
- Barcellos L.F., Ramsay P.P., Caillier S.J. *et al.* Genetic variation in nitric oxide synthase 2A (*NOS2A*) and risk for multiple sclerosis // Genes Immun. 2008. V. 9. P. 493–500.
- Bronner V., Denkberg G., Peled M. *et al.* Therapeutic antibodies: Discovery and development using the ProteOn XPR36 biosensor interaction array system // Analyt. Biochem. 2010. V. 406. P. 147–156.
- Burgner D., Rockett K., Ackerman H. *et al.* Haplotype relationship between SNP and microsatellite markers at the *NOS2A* locus in two // Genes Immun. 2003. V. 4. P. 506–514.
- Juven-Gershon T., Kadonaga J.T. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery // Dev. Biol. 2010. V. 339. No. 2. P. 225–229.
- Kim Y., Geiger J.H., Hahn S., Sigler P.B. Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex // Nature. 1993. V. 365. P. 512–520.
- Nahshol O., Bronner V., Notcovich A. *et al.* Parallel kinetic

- analysis and affinity determination of hundreds of monoclonal antibodies using the ProteOn XPR36 // *Anal. Biochem.* 2008. V. 383. No. 1. P. 52–60.
- Navratilova I., Dioszegi M., Myszka D.G. Analyzing ligand and small molecule binding activity of solubilized GPCRs using biosensor technology // *Analyt. Biochem.* 2006. V. 355. P. 132–139.
- Rich R.L., Myszka D.G. Grading the commercial optical biosensor literature-Class of 2008: ‘The Mighty Binders’ // *Mol. Recognit.* 2010. V. 23. P. 1–64.
- Strahs D., Barash D., Qian., Schlick T. Sequence-dependent solution structure and motions of 13 TATA/TBP (TATA-box binding protein) complexes // *Biopolymers.* 2003. V. 69. P. 216–243.

SURFACE PLASMON RESONANCE STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN THE HUMAN TATA-BOX BINDING PROTEIN AND THE TATA ELEMENT OF THE *NOS2A* GENE PROMOTER

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

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

Summary

Interaction of the TATA-binding protein (TBP) with the TATA box and formation of the TBP/TATA complex is the first step in the transcription complex assembly and the central event in transcription regulation. It is known that some single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human TATA box and its flanks are associated with elevated risk of various disorders (Savinkova *et al.*, 2009). Little is known about changes in the TBP/TATA interaction leading to the elevated risk of any disease. Thus, we have studied the influence of SNP (–21 t>c), adjoining to the TATA box of the *NOS2A* promoter, on the interaction by surface plasmon resonance (SPR) on biosensor ProteOn XPR36 (BioRad). The sensograms obtained in the experiment indicate that the constant for the interaction with TATA bearing SNP –21 t>c differ little from the constant with the wild-type box and the dissociation constants differ approximately twofold. Experiments utilizing the SPR method and classical EMSA have shown that TBP immobilization on the microchip dextran surface does not alter its affinity to TATA-containing oligonucleotides.

Key words: TATA-binding protein, TATA box, affinity, surface plasmon resonance, sensogram, NO synthase 2A.

УДК 577.213:612.419:576.3:569.323.4

ИНТЕРНАЛИЗАЦИЯ ЭКЗОГЕННОЙ ДНК ВО ВНУТРЕННИЕ КОМПАРТМЕНТЫ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ

© 2012 г. Е.В. Долгова¹, В.П. Николин¹, Н.А. Попова¹,
А.С. Проскурина¹, К.Е. Орищенко¹, Е.А. Алямкина¹, Я.Р. Ефремов¹,
Е.Р. Черных², А.А. Останин², Е.М. Малкова³, О.С. Таранов³,
В.А. Рогачев¹, С.В. Сидоров⁴, С.С. Богачев¹, М.А. Шурдов⁵

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия, e-mail: gorbi@bionet.nsc.ru;

² Институт клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, Россия;

³ ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирск, Россия;

⁴ Муниципальное бюджетное учреждение здравоохранения
«Городская клиническая больница № 1», Новосибирск, Россия;

⁵ ООО «Панаген», Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 11 января 2012 г. Принята к публикации 21 февраля 2012 г.

Инъекции экзогенной ДНК в сочетании с обработкой кросслинkerующим цитостатиком циклофосфаном (ЦФ) приводят к болезни и гибели экспериментальных мышей – эффект «отсроченной смерти». Установлено, что фрагменты экзогенной ДНК в течение 1–5 минут после инъекции достигают костномозгового пространства и проникают в клетки костного мозга (ККМ). ККМ, сгенерированные экстракорпорально, также захватывают фрагменты экзогенной ДНК, присутствующие в культуральной среде. При совместной инкубации фрагментированной экзогенной ДНК с ККМ мышей фрагменты ДНК интернализируются во внутренних компартментах клеток, сохраняя исходный размер. Одновременно в каждой клетке культуры экстракорпорально сгенерированных ККМ, обработанной фрагментированной экзогенной ДНК, может присутствовать до 1800 т.п.н. экзогенного материала нуклеиновых кислот. Фрагменты ДНК, доставленные в культивируемые *ex vivo* ККМ как интактных мышей, так и мышей, находящихся под воздействием ЦФ, замыкаются в кольцо. В случае интактных мышей в экспериментах *in vivo* фрагменты экзогенной ДНК могут формировать высокомолекулярные структуры. Предполагается возможность интеграции экзогенных фрагментов, локализующихся в ядре, в тело хромосом(ы) реципиентного генома мышей, находящихся под воздействием ЦФ и экзогенной ДНК.

Ключевые слова: клетки костного мозга, фрагменты экзогенной ДНК, эписома, конкатамеризация.

Введение

Эффект «отсроченной смерти» проявлялся в результате инъекций экзогенной ДНК на фоне действия циклофосфана (ЦФ) (Долгова и др., 2011). Известно, что ЦФ в первую очередь оказывает действие на активно пролиферирующие клетки организма (Abrams *et al.*, 1981; Fleming, 1997; Mazur, Czyzewska, 2001; Salem *et al.*, 2010). Это предполагает, что гибель мышей связана с поражением активно пролиферирующих кле-

ток, формирующих физиологические системы организма, в результате попадания в эти клетки экзогенной ДНК на фоне действия ЦФ.

В пионерской работе А.С. Likhacheva с соавт. (2007) был проведен анализ радиопротекторного действия фрагментированной экзогенной ДНК на облученных летальной дозой γ -излучения мышей.

Общеизвестно, что препараты цитостатической группы губительно воздействуют на клетки костного мозга (ККМ), и в частности

на стволовые клетки крови (СКК), вызывая тяжелую эритро- и лейкопению. Также известно, что облучение γ -радиацией приводит к тяжелой лейко- и эритропении и связано с гибелью ККМ, и в частности СКК (Лихачева и др., 2008; Долгова и др., 2009).

При этом гибель СКК связана с апоптозом, индуцированным в этих клетках некорректной репарацией множественных двуцепочечных разрывов (ДЦР), возникших в результате облучения мышей жестким γ -излучением.

Экспериментально показано, что стволовые клетки, растущие в культуре, способны захватывать экзогенную ДНК, которая в конечном итоге локализуется в ядрах этих клеток (Likhacheva *et al.*, 2007). Исходя из этого было сделано следующее предположение: если стволовые клетки в принципе способны захватывать экзогенную ДНК, то ее инъекции в организм смертельно облученных мышей приводят к появлению экзогенных фрагментов в ядрах ККМ. В последующем эти фрагменты могут использоваться в качестве субстрата для репаративной рекомбинации в СКК, получивших многочисленные ДЦР, что спасет часть популяции СКК от апоптоза. Сохранившиеся СКК могут мигрировать и заселять лимфоидные органы, такие, как лимфатические узлы, селезенку, тимус. Дальнейшая дифференцировка СКК в периферических лимфоидных органах будет способствовать восстановлению кроветворения и сохранению жизни мышей. Предполагалось, что дифференцированные потомки СКК, сохранившие свою жизнеспособность после облучения и терапии экзогенной ДНК, сформируют селезеночные колонии, которые легко визуализировать и присутствие которых будет свидетельствовать о спасении части СКК.

Проведенные в этом направлении исследования показали, что при терапии сублетально облученных мышей экзогенной ДНК в селезенках экспериментальных животных формируются колонии, содержащие лимфоциты, представляющие собой потомков выживших СКК (Likhacheva *et al.*, 2007). Полученные результаты предполагали, что ККМ и составляющие их СКК могут являться одной из основных мишеней воздействия чужеродных фрагментов при введении экзогенной ДНК в организм экспериментального животного.

ККМ составляют одну из систем активно пролиферирующих клеток организма наряду с клетками эпителиев, волосных фолликул, мезенхимальных стволовых клеток и аналогичных им активно делящихся клеток и могут представлять удобную модель для анализа происходящих в клетке молекулярных процессов. Выбор системы ККМ для оценки молекулярных процессов, индуцируемых сочетанием воздействия ЦФ и экзогенной ДНК, был обусловлен тремя обстоятельствами. Во-первых, как уже было отмечено, система ККМ является одной из основных клеточных систем организма млекопитающих, на которую в первую очередь воздействует цитостатик ЦФ, и является важным звеном в развитии иммунной и кроветворной систем организма. Разрушение этой системы клеток приводит к гибели животного. Во-вторых, полученные ранее экспериментальные данные свидетельствовали о том, что фрагменты экзогенной ДНК достигают ККМ при ее интраперитонеальных инъекциях. В-третьих, система ККМ мышей удобна в экспериментальных процедурах, легко переводится во временную культуру и в значительной мере изучена. Если в системе ККМ происходят изменения, ведущие к гибели этих клеток, то можно предположить, что все активно пролиферирующие клетки организма будут подвержены аналогичному воздействию. И, таким образом, систему ККМ можно использовать в качестве модельной отвечающей системы клеток организма для изучения описываемого эффекта «отсроченной смерти». При этом с большой долей уверенности можно ожидать, что одновременно с воздействием на систему ККМ аналогичное воздействие будет оказано на другие системы клеток, что может привести к гибели этих клеток и следующему за этим разрушению функциональных систем организма.

Было сделано предположение, что эффект гибели мышей при совместном воздействии ЦФ и экзогенной ДНК связан с гибелью или трансформацией ККМ, происходящими в результате индукции ДЦР, являющихся специфическими интермедиатами репарации межцепочечных сшивок (МЦС), и одновременным появлением в ядрах этих клеток фрагментов экзогенной ДНК (Долгова и др., 2011). Это означает, что попадание экзогенной ДНК в ядро

активно пролиферирующих ККМ и ее участие в репаративном процессе при репарации МЦС, вызванных действием кросслинkerующего цитостатика, может составлять молекулярную основу описываемого эффекта «отсроченной смерти».

Материалы и методы

Приготовление меченых зондов

Для получения зонда *Alu*-повтора человека были подобраны два специфических праймера: Pr.9 и Pr.11. Далее матрицу геномной ДНК амплифицировали в присутствии одного Pr.11. После проведения первого раунда ПЦР полученный материал амплифицировали в новом раунде ПЦР в присутствии двух праймеров при указанном температурном режиме.

Используемые специфические для человеческого генома праймеры:

Pr.9 CGAGGCGGGAGGATCACTTGAGCCC;

Pr.11 GCGCGGCCACCACGCCCGGC.

Для амплификации специфических фрагментов генома использовали следующий температурный режим: 94 °С – 2 мин – 1 цикл, (94 °С – 30 с, 72 °С – 1,5 мин) – 35 циклов, 4 °С – хранение.

Биотинилированная ДНК *Alu*-повтора человека, используемого в качестве зонда при проведении FISH, была получена при амплификации матрицы ДНК *Alu*-повтора размером ~290 п.н. в присутствии биотинилированного предшественника.

Для приготовления меченого зонда и амплификации гена каспазы 3 человека были подобраны специфические для человеческого генома праймеры: **Pr.3** AGCACATTACTTAGCCTCA; **Pr.4** TTTTATAACTGTTGTCCAGGGA.

Для амплификации специфических фрагментов человеческого генома использовали следующий температурный режим: 95 °С – 2 мин – 1 цикл (95 °С – 30 с, 56 °С – 40 с, 72 °С – 1 мин) – 35 циклов; 72 °С – 5 мин – 1 цикл, хранение при 10 °С.

Для приготовления ³²P меченого умеренного рыбьего повтора *HpaI* матрицу геномной ДНК спермы лосося амплифицировали в присутствии двух специфических праймеров (Murata *et al.*, 1993):

Pr.HpaI for GCACTGTTACCACATAGTTAG;

Pr.Hpa rev ATAACAACCTCAAGCAGCACT.

Для амплификации специфических фрагментов рыбьего генома использовали следующий температурный режим: 94 °С – 2 мин – 1 цикл, (94 °С – 30 с, 52 °С – 40 с, 72 °С – 30 с) – 35 циклов, 10 °С – хранение.

Амплификацию проводили на приборе Mastercycler personal (Eppendorf, США).

Приготовление препаратов ядер ККМ для проведения гибридизации *in situ*

Из трубчатых костей мыши вымывали красный костный мозг фосфатно-солевым буфером (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 8 мМ Na₂HPO₄, 1,5 мМ KH₂PO₄). Клетки центрифугировали при 150 g в течение 5 мин при 4 °С. Супернатант сливали и к осадку добавляли десятикратный избыток (7–8 мл) предварительно нагретого до 37 °С 7,5 мМ KCl (0,56 г/л). Клетки аккуратно ресуспендировали, инкубировали 5–7 мин при 37 °С. Затем добавляли 1 мл холодного фиксатора метанол : ледяная уксусная кислота (3 : 1), инкубировали 10–15 мин при 4 °С и центрифугировали при 150 g в течение 5 мин также при 4 °С. Супернатант сливали, медленно по стенке добавляли 5–6 мл холодного (хранившегося при –20 °С) фиксатора. Инкубировали 30 мин при –20 °С и центрифугировали при 150 g в течение 5 мин при 4 °С. Супернатант сливали, добавляли холодный фиксатор в том объеме, в котором получается нужная концентрация ядер ККМ при последующем нанесении на препарат. В таком состоянии материал может храниться при –20 °С в течение 4 недель (Stanyon, Galeni, 1991). Каплю фиксированного материала (~10–15 мкл) наносили на влажное обезжиренное предметное стекло и высушивали на воздухе. На последней стадии препарат обрабатывали экзонуклеазой III *E. coli*.

Гибридизация и детекция сигналов *in situ* гибридизации ядер ККМ экспериментальных мышей

Гибридизацию и детекцию сигналов проводили согласно методике, описанной в статье D. Pinkel с соавт. (1986). Флюоресцентную микроскопию проводили на микроскопе Axioskop 2

Plus с использованием программы AxioVision. Время экспозиции составляло 2–3 с.

ПЦР на предметных стеклах

PRINS-анализ был выполнен как описано у J. Gosden, D. Lawson (1995). Материал ядер ККМ, используемый для проведения ПЦР на стекле, был получен по методике приготовления препаратов для гибридизации *in situ*. Выявление специфических сигналов PRINS проводилось аналогично протоколу детекции, используемому для гибридизации *in situ*.

Выделение ДНК из ядер ККМ экспериментальных мышей

ККМ мышей вымывали из трубчатых костей физиологическим раствором (0,9 % NaCl), ресуспендировали в 0,5 мл лизирующего буфера (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 50 mM NaCl, 10 mM ЭДТА, 0,15 mM спермин, 0,15 mM спермидин) с 0,5 % Тритона X-100 и инкубировали 10 мин на льду (Roberts, 1986). Смесь наслаивали на 1 мл раствора 10 %-й сахарозы в лизирующем буфере и центрифугировали при 600 g в течение 15 мин при 4 °С. Супернатант (цитоплазматическую фракцию) отбирали. Осадок ядер промывали буфером, повторно центрифугировали и ресуспендировали в соответствующем объеме воды. Ядра лизировали 0,5 % SDS и обрабатывали протеиназой К. Депротеинизация проводилась экстракцией фенол/хлороформ в соотношении 1 : 1. ДНК переосаждали 0,6 объемами изопропанола из 0,3 M NaAc pH = 5,2 и растворяли в соответствующем объеме воды.

Выделение ДНК клеточных компартментов

К суспензии ядер добавляли до 2 M NaCl, 50 mM ЭДТА и 1 % SDS и инкубировали при 65 °С в течение 1 ч без какого-либо встряхивания, после чего центрифугировали при 52 000 g в течение 30 мин при 30 °С. Из супернатанта, представляющего собой внехромосомную фракцию ядра («ядерный сок»), осаждали ДНК изопропанолом. Осадок является хроматиновой фракцией. Образцы (осадок хроматина, ДНК

внехромосомной фракции ядра и цитоплазматической фракции) фракционировали электрофорезом в 0,7 %-м агарозном геле. Агарозный гель высушивали под струей горячего воздуха и экспонировали с рентгеновской пленкой.

Количественная дот-блот-гибридизация

Продукты ПЦР фракционировали в 2 %-м агарозном геле. Гель денатурировали и переносили по Саузерну на мембрану Zeta-Probe Genomic Tested Blotting Membrane (Bio-Rad) (Murata *et al.*, 1993), или же ДНК, выделенную из ядер ККМ экспериментальных и контрольных мышей, в количестве от 0,1 до 5000 нг денатурировали кипячением в 0,4 N NaOH и непосредственно наносили на мембрану. Предварительно данная ДНК была обработана панкреатической РНК-азой 10 мкг/мл в течение 30 мин при 37 °С и депротеинизирована экстракцией фенол/хлороформ в соотношении 1 : 1. ДНК переосаждали из 0,3 M NaAc, pH 5,2 0,6 объемами изопропанола. Концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре Nanodrop (Eppendorf, США). Мембранные фильтры гибридизовали с ³²P меченым в ПЦР *Alu*-фрагментом ДНК человека по методике, предложенной в инструкции к мембране. Мембранные фильтры экспонировали с рентгеновской пленкой или проводили засветку на Molecular Imager FX Pro+ (Bio-Rad). Количество меченого материала относительно контролей определяли при помощи программы Quantity One.

Заливка ядер в блоки легкоплавкой агарозы

Вымытые физиологическим раствором ККМ осаждали центрифугированием при 4 °С, 400 g в течение 5 мин. Затем промывали небольшим объемом физиологического раствора и осаждали таким же образом. Осажденные клетки заливали в блоки легкоплавкой агарозы (Low Melt Ultra-Pure DNA Grade Agarose, Bio-Rad) в 1 %-м TAE буфере объемом 80 мкл и обрабатывали лизирующим буфером (50 mM ЭДТА, 1 % N-Lauroylsarcosine (Serva) и 1 мг/мл протеиназы К) два раза по 12 ч при 50 °С (Sambrook *et al.*, 1989). Затем блоки переносили в 0,5 M ЭДТА и хранили при 4 °С. Перед электрофорезом

ядра, фиксированные в агарозе, отмывали в ТЕ буфере (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1 mM ЭДТА) в течение 2 ч.

Инкубирование экстракорпорально сгенерированных ККМ с препаратом ДНК

Из трубчатых костей мышей вымывали ККМ средой MEM-Glasgow (GibcoBRL, Великобритания), содержащей раствор незаменимых аминокислот, глутамин, 0,1 mM β-меркаптоэтанол, 1000 ед/мл LIF. Клетки осаждали центрифугированием при 400 g в течение 5 мин, 4 °C. Затем считали клетки в камере Горяева и инкубировали в 500 мкл 20–30 млн клеток с предварительно подготовленной ДНК. Для этого использовали меченый в ПЦР продукт *Alu*-повтора человека размером 300 п.н., кольцевую форму плазмиды pEGFP-N1, а также линейную форму pEGFP-N1, гидролизованную рестриктазами *HindIII* или *SmaI*. В соответствующих экспериментах ДНК плазмиды EGFP-N1 метили ³²P-dATP достраиванием по липкому концу при помощи реакции с фрагментом Кленова. По окончании инкубации клетки собирали, промывали два раза этой же средой, заливали в блоки легкоплавкой агарозы и в случае добавления ³²P меченой ДНК блоки считали на счетчике 1209 Rackbeta (Wallac, Финляндия). Затем фракционировали материал электрофорезом и, в зависимости от эксперимента, либо высушивали гель и проводили засветку на Molecular Imager FX Pro+, либо переносили по Саузерну на мембрану Zeta-Probe Genomic Tested Blotting Membrane (Bio-Rad) и проводили гибридизацию с ³²P меченой ДНК.

Анализ количества материала, доставленного в ККМ

В программе Quantity One оценивали процент засветки, приходящийся на размер добавленного фрагмента по отношению ко всему меченому материалу, вошедшему в гель или оставшемуся на старте. При известных силах радиоактивного сигнала добавленной к клеткам меченой ДНК и блока, содержащего определенное количество этих клеток вычисляли количество чистых фрагментов, доставленных в клетку.

Результаты

Интернализация экзогенной ДНК в ККМ экспериментальных мышей

Первоначально была проведена серия *in vivo* экспериментов, демонстрирующих тот факт, что в указанный промежуток времени (введение ДНК через 18 ч после инъекции ЦФ) синтетические процессы в анализируемых ККМ полностью остановлены. Мышам внутрибрюшинно вводили ЦФ и препарат фрагментированной экзогенной ДНК (суммарно 2–5 мкг) в промежуток времени 18–30 ч после инъекции ЦФ. ККМ экспериментальных животных выделяли согласно процедуре, описанной в разделе «Материалы и методы», и заливали в блоки легкоплавкой агарозы. Материал ядер, фиксированный в блоках легкоплавкой агарозы, лизировали в присутствии детергента и подвергали депротеинизации протеиназой К в течение 2 суток. ДНК ядерного хроматина фракционировали пульс-электрофорезом. Общая картина электрофоретической разгонки свидетельствует о присутствии двух высокомолекулярных фракций в образцах хроматина ядер экспериментальных животных. Одна из фракций не входит в агарозный блок и, по видимому, представляет ДНК хромосом ККМ. Вторая фракция с молекулярной массой более 1 млн п.о. постоянно присутствует в экспериментах и не является продуктом деградации, связанным с процедурой выделения материала ядерной фракции ККМ (рис. 1).

Не обнаружено включения меченого материала (*Alu*-повтор человека, *HpaI*-повтор лосося, dATP) в состав хроматина ККМ в экспериментальных группах мышей после введения ЦФ (рис. 1, дорожки 1, 3, и 7). При этом в контрольной группе (введение только меченого субстрата) явно прослеживается появление меченого материала в составе хроматина (рис. 1, дорожки 2, 4, 6 и 8). Такая картина поведения меченого материала предполагает полную остановку репликации в любой форме и отсутствие инкорпорации в хроматин продуктов деградации интродуцированной в организм мышей экзогенной меченой ДНК. В этой связи наличие незначительного количества меченого материала на старте 5-й дорожки может сви-

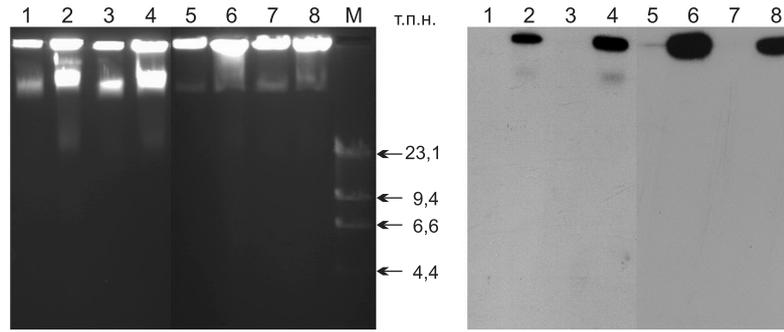


Рис. 1. Электрофореграмма (слева) и рентгенограмма (справа) геномной ДНК ККМ мышей после внутрибрюшинного (в/б) введения меченых фрагментов ДНК на фоне инъекции ЦФ (нечетные дорожки) и в виде монопрепарата (четные дорожки).

Alu-повтор человека (1,2), *HpaI*-повтор лосося (3,4), плазмида pEGFP-N1 (5,6), меченый dATP (7,8). М – маркер молекулярного веса λ HindIII.

детельствовать в большей мере об ассоциации экзогенных фрагментов с хроматином ядра, нежели о ресинтезе с использованием меченых мономеров, образовавшихся в результате деградации экзогенной ДНК. Это заключение подтверждают эксперименты, описанные в следующих разделах настоящей работы. Также в описываемых далее экспериментах показано, что меченый материал, обнаруживаемый на старте образцов ДНК, выделенных из ККМ нативных мышей, представляет собой хроматин реципиентного ядра после инкорпорации меченых предшественников, образованных в процессе деградации в организме животного.

Далее были проведены эксперименты, характеризующие распределение материала экзогенной ДНК, доставленного во внутриклеточные компартменты. Экспериментальным мышам в хвостовую вену вводили 3–5 мкг меченой ^{32}P суммарной ДНК человека, фрагментированной до размеров 200–6000 п.н. Через полчаса животных забивали, выделяли ККМ, которые впоследствии разделяли на ядерную и цитоплазматическую фракции. Ядерную фракцию в свою очередь разделяли на хроматин и внехромосомную фракцию (см. раздел «Материалы и методы»). С полученными образцами проводили электрофорез в агарозном геле. Гель высушивали и экспонировали с рентгеновской пленкой (рис. 2).

При анализе распределения экзогенной ДНК в различных фракциях ККМ экспериментальных мышей было обнаружено, что экзогенная ДНК на момент выделения ККМ (через полчаса

после инъекции) присутствует во внутриядерном пространстве ККМ. В цитоплазматической фракции ККМ меченый материал полностью отсутствует. Размер меченых фрагментов, обнаруживаемых в ядерной фракции, свидетельствует об объединении в высокомолекулярную структуру материала ДНК, доставленного в ядерный компартмент.

Для подтверждения того факта, что экзогенная ДНК доставляется *in vivo* в ядра ККМ мышей в виде фрагментов определенного размера, была проведена серия экспериментов с использованием Cycling PRINS и ПЦР амплификации материала, принадлежащего ядру. Мышам после инъекции ЦФ (200 мг/кг) в/б вводили ДНК человека (6 мг в течение 12 ч) и через 8 ч после последней инъекции выделяли ККМ. Выделенные ядра ККМ фиксировались на стеклах. Анализ проводился с использованием в качестве праймеров человеческой ДНК в виде фрагментов размером от 20 до 500 п.н. Предполагалось, что если во внехромосомном пространстве ядра присутствуют фрагменты человеческой ДНК, то существует возможность обнаружить продукты PRINS амплификации. На рис. 3 представлены результаты такого анализа, в котором выявляются четкие сигналы, свидетельствующие о специфичности PRINS. Результаты проведенного PRINS анализа демонстрируют тот факт, что в ядрах ККМ присутствуют фрагменты ДНК человеческого происхождения.

Для конечного решения вопроса о проникновении экзогенной ДНК человека в ядра ККМ

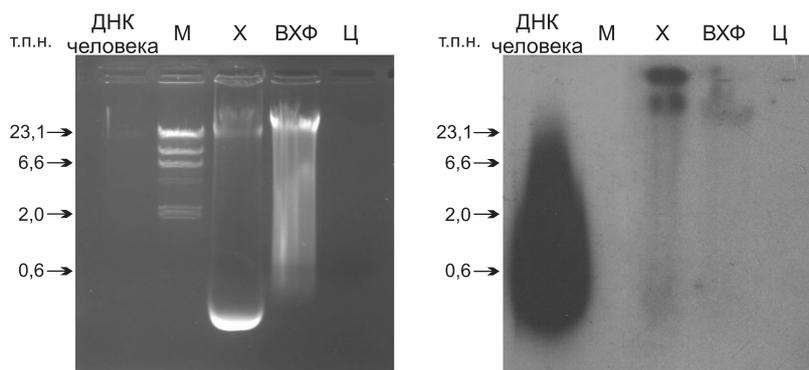


Рис. 2. Распределение экзогенной ДНК по фракциям ККМ экспериментальных мышей.

Электрофореграмма (слева) и рентгенограмма (справа) агарозного геля с нанесенными образцами: ДНК человека – экзогенная ДНК, которую внутривенно вводили экспериментальным животным; М – маркер молекулярного веса λ HindIII; Х – хроматин ККМ; ВХФ – внехромосомная фракция; Ц – цитоплазматическая фракция. Яркая светящаяся полоса в нижней части геля во фракции «хроматин (Х)» представляет собой остаточное количество SDS.

мышей *in vivo* мы провели ПЦР анализ с праймерами на уникальный ген каспазы 3 человека (рис. 4).

Анализ полученных результатов демонстрирует присутствие фрагментов человеческой ДНК в ядерной фракции ККМ мышей. Как следует из рис. 4, размер этих фрагментов составляет не менее 260 п.н. Появление специфического сигнала гибридизации свидетельствует о присутствии в образце видоспецифической матрицы человеческого происхождения, используемой в ПЦР и представляющей собой фракцию ядерной ДНК ККМ мыши после инъекции ЦФ и человеческой ДНК.

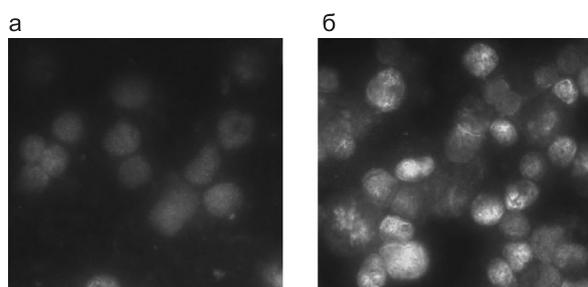


Рис. 3. ПЦР на предметном стекле с биотин-мечеными нуклеотидами и с использованием ДНК человека, фрагментированной до размеров 20–500 п.н., в качестве праймера.

Ядра ККМ интактных мышей (а) и после 12-кратного (через 18 ч после введения ЦФ) ежесекундного в/б введения 0,5 мг ДНК человека (б).

Для определения времени нахождения экзогенной ДНК в ядерном пространстве ККМ мышей была проведена серия дополнительных экспериментов. Через определенные промежутки времени (3 мин, 1, 3, 5, 7, 9, и 13 сут после последней инъекции ДНК человека) ядра ККМ

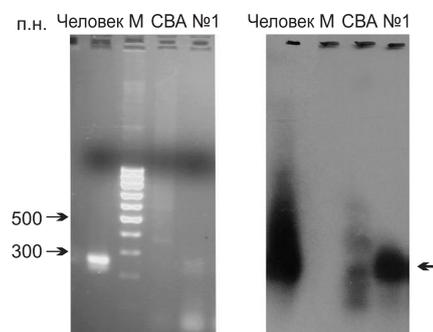


Рис. 4. Электрофореграмма (слева) и рентгенограмма (справа) продуктов ПЦР с праймерами на уникальный ген каспазы 3 человека с использованием в качестве матрицы ДНК человека, ДНК клеток костного мозга мышей СВА и ДНК ядерной фракции клеток костного мозга мышей, выделенных через 8 ч после 12-кратного (через 18 ч после введения ЦФ) ежесекундного в/б введения 0,5 мг ДНК человека (№ 1). В качестве зонда для гибридизации использовали фрагмент ~260 п.н., меченный в ПЦР с праймерами на ген каспазы 3 человека и матрицей ДНК человека; 2 %-й агарозный гель.

М – маркер молекулярного веса (100 п.н.). Стрелка обозначает гибридизующийся фрагмент, соответствующий продукту ПЦР с праймерами на ген каспазы 3.

мышей, которым вводили ЦФ 200 мг/кг и ДНК человека по 0,5 мг (каждый час в промежутки времени 18–30 ч после ЦФ), выделяли и дополнительно очищали в сахарозном градиенте. ДНК, выделенную из этих ядер, использовали в качестве матрицы в ПЦР с праймерами на уникальный ген каспазы 3 человека (рис. 5).

Несмотря на то что продукт ПЦР-амплификации виден только в начальных точках (3 мин–5 сут), результаты гибридизации, которая является более чувствительным методом детекции, чем окраска бромистым этидием, свидетельствуют о том, что специфический фрагмент присутствует в ядерном пространстве ККМ мышей во всех анализируемых точках вплоть до 13 сут.

В другой серии экспериментов для выявления факта присутствия экзогенной ДНК в ККМ мышей после инъекции ЦФ (200 мг/кг веса) и многократного введения ДНК человека (ДНК человека вводили в промежутки времени 18–30 ч с момента инъекции ЦФ, каждый час по 0,5 мг), была проведена серия гибридизаций *in situ*

ККМ экспериментальных мышей с меченой биотином ДНК *Alu*-повтора человека. Препараты из ядер ККМ приготавливали спустя 38 ч после инъекции ЦФ. Проведенный анализ свидетельствует о том, что гибридизация встречается в небольшом количестве клеток, при этом обнаруживаются 1–2 зоны гибридизации. В среднем встречаемость клеток, содержащих сигнал гибридизации с *Alu*-повтором, составила 2 % (рис. 6).

Полученные в данном разделе результаты с использованием различных экспериментальных подходов подтверждают факт доставки экзогенной ДНК в форме фрагментов размером не менее 260 п.н. в ядерное пространство ККМ мышей. Доставленный материал удерживается в ядерном пространстве в виде стабильно присутствующих структур вплоть до 13 сут с момента последней инъекции экзогенной ДНК. На цитологических препаратах выявляются 1–2 зоны гибридизации при использовании в качестве зонда ДНК *Alu*-повтора человека.

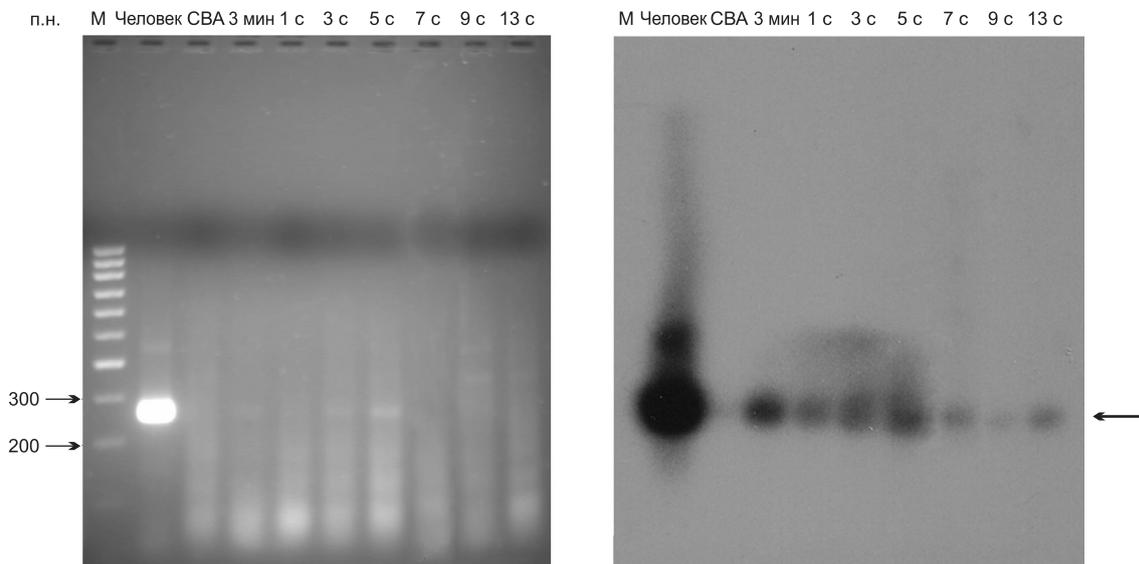


Рис. 5. Электрофореграмма (слева) и рентгенограмма (справа) продуктов ПЦР с праймерами на уникальный ген каспазы 3 человека с использованием в качестве матрицы ДНК человека, ДНК клеток костного мозга мышей СВА и ДНК ядерной фракции ККМ экспериментальных мышей, выделенных через определенные промежутки времени после последней инъекции препарата ДНК. В качестве зонда для гибридизации использовали фрагмент ~260 п.н., меченный в ПЦР с праймерами на ген каспазы 3 человека и матрицей ДНК человека; 2 %-й агарозный гель.

М – маркер молекулярного веса (100 п.н.). Стрелка обозначает гибридизующийся фрагмент, соответствующий продукту ПЦР с праймерами на ген каспазы 3.

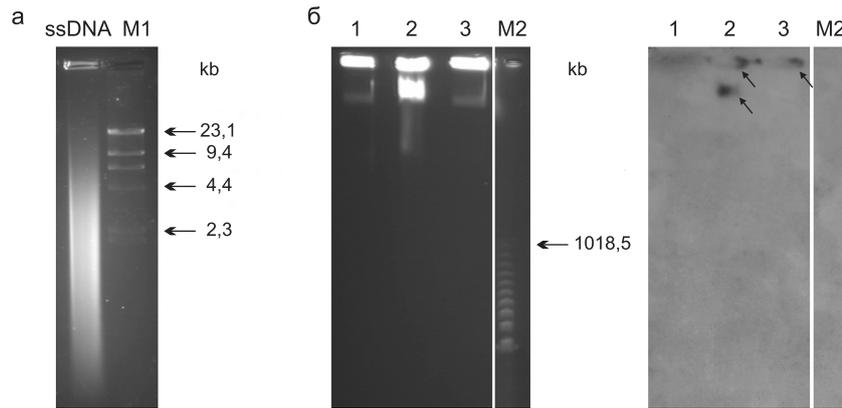


Рис. 7. Препарат ДНК лосося, использованный для инъекций мышам в ходе эксперимента (а); б – электрофореграмма (слева) и рентгенограмма (справа) материала ДНК ядер ККМ мыши после введения: 1 – ЦФ (200 мг/кг); 2 – ДНК лосося в виде монопрепарата; 3 – ДНК лосося на фоне инъекции ЦФ.

M1 – маркер молекулярного веса λ HindIII, M2 – маркер молекулярного веса 50–1000 т.п.о. В качестве зонда для гибридизации использовали ДНК ^{32}P меченого *HpaI*-повтора рыбы. Стрелками указаны сигналы гибридизации.

монопрепарата ДНК ядерной фракции ККМ экспериментальных животных достоверно по сравнению с контролем (с вероятностью $> 0,99$) содержит больше последовательностей, гомологичных *HpaI*-повтору лосося (рис. 8).

Для того чтобы охарактеризовать материал ядер ККМ, имеющий гомологию с экзогенной ДНК и нефракционирующийся в агарозе, была предпринята серия попыток рестрикционного

анализа ядерной ДНК ККМ экспериментальных мышей. Результаты проводимых далее гибридизаций со специфическими зондами различного происхождения не выявили четких сигналов гибридизации. Это могло свидетельствовать о гетерологичности доставляемых в ядра экзогенных фрагментов.

Для того чтобы оценить состояние экзогенной ДНК в ядре ККМ мышей, обработанных

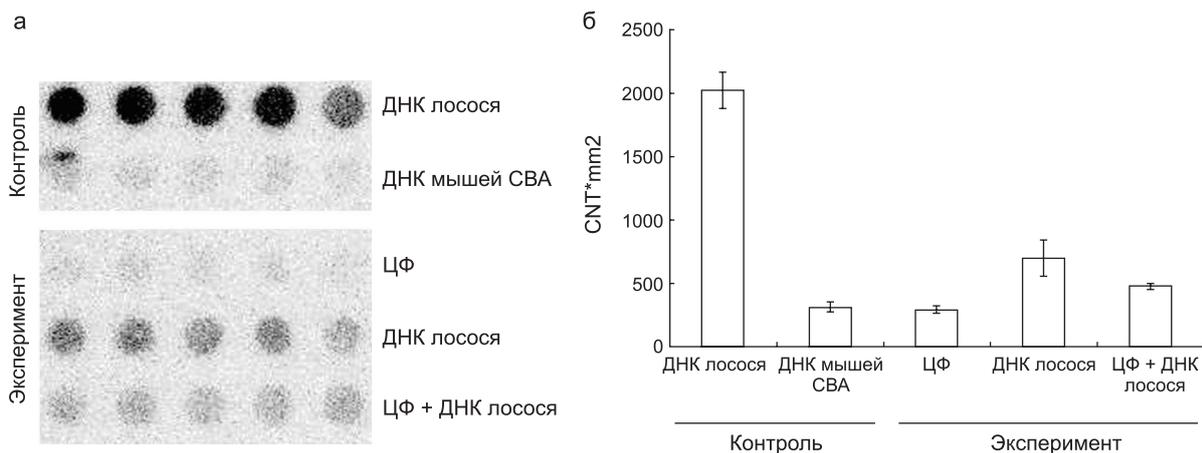


Рис. 8. Рентгенограмма мембраны, гибридизованной с ДНК ^{32}P меченого *HpaI*-повтора (а). В каждой точке нанесено по 0,5 мкг ДНК: контроль – ДНК лосося и ДНК мышей СВА, эксперимент – ДНК ядер ККМ мышей после инъекций ЦФ и экзогенной ДНК лосося. Количественная оценка интенсивности гибридизационного сигнала после сканирования на Molecular Imager FX Pro+ (б).

CNT*mm² – относительные единицы, характеризующие силу радиоактивного сигнала мембраны на единицу площади, подсчитанные в программе Quantity One.

как ЦФ, так и экзогенной ДНК, не фракционирующейся в агарозном геле, была выделена частично деградированная в результате протекающего апоптоза ядерная фракция, в которой целые ядра не детектировались. При окраске по Гимза в таких препаратах выявлялись блоки свободно лежащего хроматина. Полученный таким образом препарат хроматина также заливали в блоки легкоплавкой агарозы и после обработок фракционировали в агарозном геле в системе пульс-электрофореза. Результаты проведенной гибридизации с *Alu*-повтором человека представлены на рис. 9.

Результаты проведенного анализа фракции хроматина ядер ККМ после инъекций экзогенной ДНК дают основание предполагать, что фрагменты экзогенной ДНК достигают внутренних компартментов клеток, выделенных как из необработанных ЦФ мышей, так и мышей, обработанных двумя препаратами. Гомологичные экзогенной ДНК структуры, определяемые в ядерной фракции ККМ, представлены четкими индивидуальными бэндами, которые более медленно мигрируют в агарозном блоке по сравнению с исходной ДНК. Такой эффект как правило связан с увеличением линейных размеров фрагментов. Наблюдаемое увеличение размера по сравнению с исходной ДНК может свидетельствовать о сшивании между собой экзогенных фрагментов, свободно присутствующих в ядерном пространстве (рис. 9, дорожка 1, 2).

Нуклеазы крови в течение 5 минут полностью деградируют любую незащищенную ДНК, введенную в организм экспериментальных мышей (Алямкина и др., 2009, Долгова и др., 2009). Это создает трудности в интерпретации полученных данных по интернализации радиоактивно меченых фрагментов экзогенной ДНК в ядра ККМ. При использовании радиоактивных ДНК зондов главной трудностью является невозможность отличить экзогенную ДНК, доставленную в ядро, от ДНК хозяина как интактной, так и деградированной после ресинтеза с радиоактивными мономерами, возникшими в результате деградации в крови или непосредственно в клетке экзогенной меченой ДНК. Для решения данного вопроса мы разработали процедуру экстракорпоральной генерации ККМ, их совместной инкубации с индивидуальными

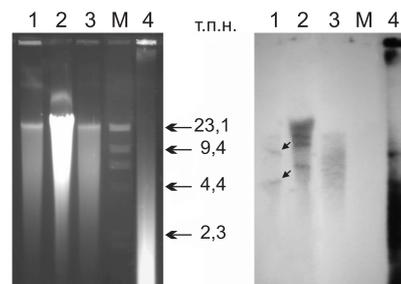


Рис. 9. Электрофореграмма (слева) после проведения пульс-электрофореза и рентгенограмма (справа) материала ДНК из ядер ККМ мыши после введения: 1 – экзогенной ДНК человека на фоне инъекции ЦФ; 2 – экзогенной ДНК человека в виде монопрепарата; 3 – ЦФ в дозе 200 мг/кг. М – маркер молекулярного веса λ *Hind*III; 4 – препарат ДНК человека, используемый для инъекций в эксперименте. В качестве зонда для гибридизации использовали меченый в ПЦР *Alu*-повтор человека.

радиоактивно мечеными фрагментами ДНК и анализа материала этих клеток после заливки в блоки легкоплавкой агарозы.

Были выполнены две серии экспериментов с фрагментом ДНК, синтезированным в ПЦР, и фрагментом ДНК, меченным по липкому концу (гидролизованная рестриктазой *Hind*III плазида рEGFP-N1). Также были проведены блот-гибридизации геномной ДНК ККМ после инкубации с ДНК немеченой плазмиды, где в качестве гибридизационного зонда использовали ПЦР-продукт гена GFP той же плазмиды. Результаты экспериментов представлены на рис. 10, 11 и 13.

Оказалось, что оба типа фрагментов в недеградированном состоянии доставляются как в нативные ККМ, так и в находящиеся под действием ЦФ. Фрагмент, полученный в ПЦР, присутствует в клеточном пространстве после 2 часов инкубации все еще в исходном виде (не образует конкатамеров). Второй фрагмент (меченая плазида) начинает замыкаться в кольцо к 7 часам инкубации в ККМ, выделенных из мышей обеих групп. В обоих экспериментах наблюдаются быстрое конечное насыщение меченым материалом клеток, находящихся под воздействием ЦФ, и непрерывное увеличение количества меченого материала в клетках, выделенных из необработанных ЦФ мышей (рис. 12).

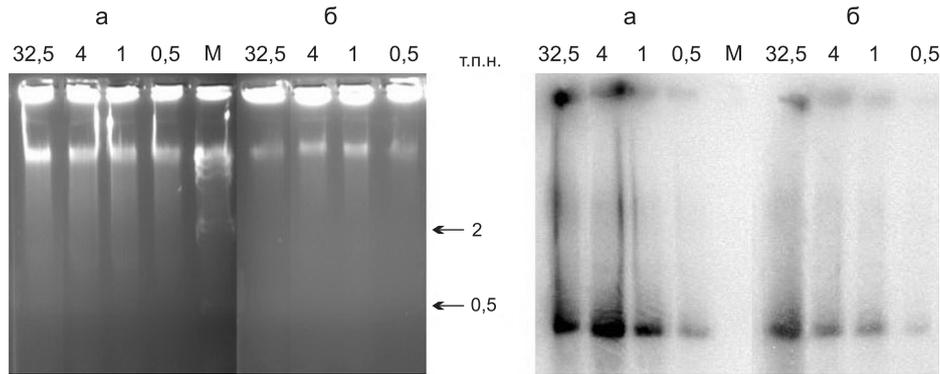


Рис. 10. Электрофореграмма (слева) и рентгенограмма (справа) после заливки в блоки легкоплавкой агарозы и электрофореза ядер ККМ мыши, выделенных через 18 ч после воздействия ЦФ (а), и интактной мыши (б). ККМ инкубировали с фрагментом ДНК – *Alu*-повтором 300 п.н., синтезированным и меченым в ПЦР в количестве от 0,5 до 32,5 мкг.

М – маркер молекулярного веса λ *Hind*III.

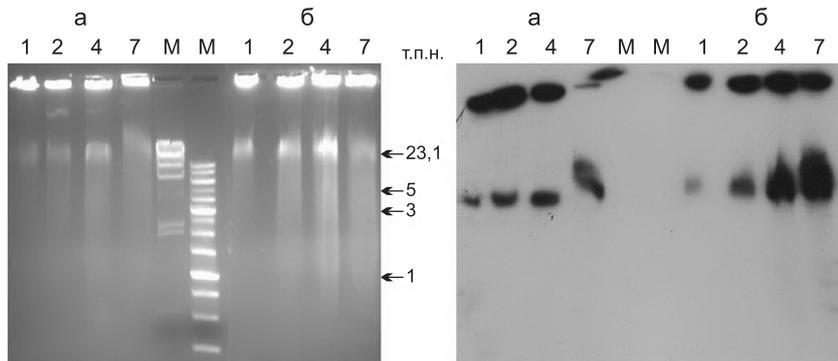


Рис. 11. Электрофореграмма (слева) и рентгенограмма (справа) после заливки в блоки легкоплавкой агарозы и электрофореза ядер ККМ мыши, выделенных через 18 ч после воздействия ЦФ (а), и интактной мыши (б). ККМ инкубировали с плазмидой pEGFP-N1, гидролизованной рестриктазой *Hind*III и меченой по липкому концу, в течение различного времени – 1, 2, 4 и 7 ч.

М – маркеры молекулярного веса.

В экспериментах по гибридизации (рис. 13) было обнаружено, что, как и в предыдущей серии экспериментов, в ККМ мышей происходит замыкание молекул плазмиды в мономерное или мультимерное кольцо после 7 ч инкубации. В кольцо замыкаются молекулы как с тупыми, так и липкими концами. В случае мышей, обработанных одним ЦФ, эффект лигирования более выражен, при этом удивительным оказался факт увеличения линейных размеров циклической формы плазмиды, также используемой в эксперименте. Не менее интригующим оказался факт обнаружения гибридизующегося материала, находящегося на старте образцов ДНК,

полученных из ККМ мышей, обработанных ЦФ и экзогенной ДНК. Причем в аналогичных образцах ДНК, полученных из ККМ мышей, не обработанных ЦФ, такой гибридизации обнаружено не было. Этот факт, в совокупности с результатами, полученными в других сериях экспериментов настоящего исследования, может свидетельствовать о ковалентном объединении экзогенных молекул и ДНК хромосом реципиентного ядра (см. раздел «Обсуждение») в ККМ, находящиеся под воздействием цитостатика.

В серии экспериментов, в которых использовалась плазида, для полной уверенности в том, что выявляемый меченый материал образован

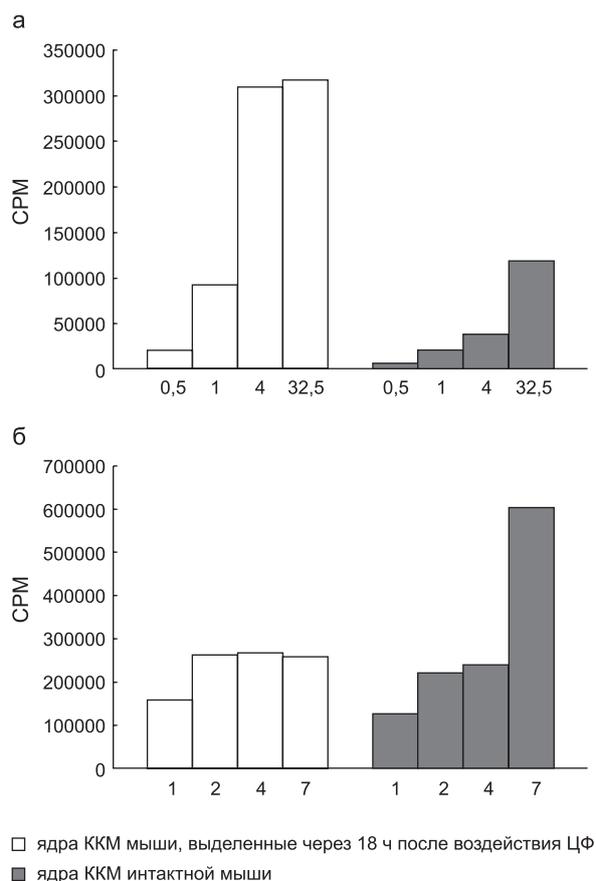


Рис. 12. Количество меченого материала, определенное по рентгенограмме ядер ККМ мыши, выделенных через 18 ч после воздействия ЦФ, и ядер ККМ интактной мыши, инкубированных в присутствии меченого материала: а – *Alu*-повтора 300 п.н., синтезированного и меченого в ПЦР, в количестве от 0,5 до 32,5 мкг; б – плазмиды pEGFP-N1, гидролизованной рестриктазой *Hind*III и меченой по липкому концу, в течение различного времени – 1, 2, 4 и 7 ч.

плазмидной ДНК, доставленной из внеклеточного пространства, была осуществлена трансформация компетентных клеток *Escherichia coli* материалом хроматина клеток, выделенных как из обработанных, так и необработанных ЦФ мышей, полученного в результате центрифугирования в градиенте концентрации хлорида натрия. Полученный результат свидетельствовал о том, что в ядерной фракции анализируемых клеток присутствует исходная форма плазмиды.

Было оценено количество доставляемой в ККМ ДНК и рассчитано количество фрагментов, присутствующих в клетке. Оценку проводили по количеству меченого материала, однозначно

трактуемого как доставленный из околоклеточного пространства (исходный фрагмент, выявляемый при электрофоретическом анализе с учетом уровня его радиоактивности). Оказалось, что в ядросодержащих ККМ мыши одновременно может находиться до 1800 т.п.н. экзогенной ДНК в форме фрагментов. Причем количество фрагментов, находящихся во внутриклеточном пространстве, коррелирует с их размером.

Для оценки возможности мультимеризации линейаризованной плазмиды во внутриклеточном пространстве были проведены эксперименты по трансфекции клеток культуры фибробластов человека плазмидой pEGFP-N1 с использованием липофектамина. Плазмидная ДНК была линейаризована по сайту рестрикции *Sal*GI и в такой форме трансфецировалась в культуру фибробластов человека. Гибридизация фракционированного пульс-электрофорезом материала ДНК клеток культуры фибробластов с ³²P меченой ДНК исходной плазмиды продемонстрировала появление в клетках высокомолекулярных структур, гомологичных плазмидной ДНК размером около 45, 80 и 200 т.п.н. (рис. 14). Полученные факты предполагают, что плазмидная ДНК организуется в клетке в форму сшитых между собой линейных молекул исходной плазмиды. Такая конкатамеризация предполагает возможность формирования эписомоподобной структуры, которая может находиться в клетке длительное время.

ПЦР анализ с использованием стандартного набора праймеров показал, что материал ДНК хроматина ядерной фракции фибробластов, обработанных экзогенной ДНК, в своем составе содержит ДНК плазмиды, используемой для трансфекции. Такой же результат был получен при трансформации компетентных клеток *E. coli* материалом осадка хроматина ядерной фракции после градиентного центрифугирования в градиенте NaCl, последующих рестрикции *Sal*GI и лигирования. Были получены колонии, трансформированные плазмидной ДНК pEGFP-N1, по своей структуре не отличающейся от используемой для трансфекции. Следует отметить, что при трансформации материалом хроматина ядерной фракции без рестрикции и лигирования колоний, устойчивых к канамицину, а, значит, содержащих функциональную плазмиду pEGFP-N1, получено не было.

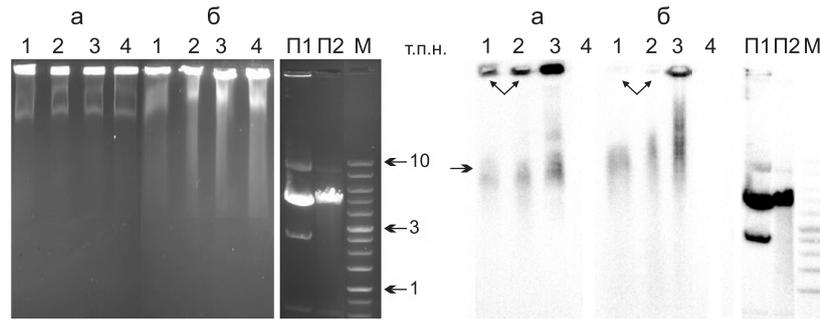


Рис. 13. Электрофореграмма (слева) и рентгенограмма (справа) после заливки в блоки легкоплавкой агарозы и электрофореза ядер ККМ мыши, выделенных через 18 ч после воздействия ЦФ (а), и интактной мыши СВА (б). ККМ инкубировали с ДНК плазмиды рEGFP-N1, гидролизованной рестриктазой *Sma*I (1), рестриктазой *Hind*III (2), суперскрученной формой плазмиды рEGFP-N1 (3) и в отсутствие экзогенной ДНК (4) в течение 7 ч.

П1 и П2 – ДНК плазмиды рEGFP-N1 суперскрученной и линейной формы, М – маркер молекулярного веса.

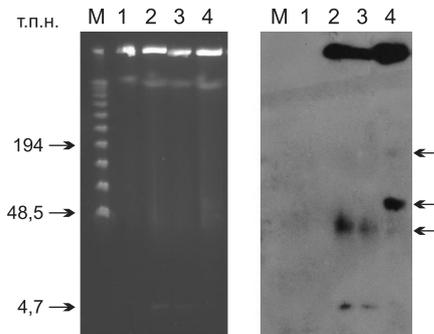


Рис. 14. Электрофореграмма (слева) и рентгенограмма (справа) ядер культуры клеток hT³, залитых в блоки легкоплавкой агарозы, фракционированных пульс-электрофорезом.

1 – исходная культура, 2 – обработанная липофектамином и трансфицированная линейной формой плазмиды рEGFP-N1, 3 – обработанная митомидином С и липофектамином и трансфицированная линейной формой плазмиды рEGFP-N1, 4 – обработанная липофектамином и трансфицированная плазмидой рEGFP-N1 (циклическая форма). М – маркер молекулярного веса. В качестве зонда для гибридизации использовали ³²P меченую в ПЦР плазмиду рEGFP-N1.

Обсуждение

Проведенный анализ свидетельствует о том, что при внутрибрюшинном и внутривенном введении препаратов экзогенной ДНК различного происхождения *in vivo* так же, как и при совместном культивировании в условиях *ex vivo*, в ККМ доставляется и присутствует

в форме фрагментов материал ДНК, исходно находящийся в околоклеточном пространстве. Фрагменты экзогенной ДНК обнаруживаются в ядерном пространстве ККМ вплоть до последней экспериментально подтвержденной точки – 13 сут после введения циклофосфана. Таким образом, получены достоверные свидетельства того, что экзогенная ДНК без помощи трансфицирующих факторов достигает внутренних компартментов ККМ. Количественный анализ интернализированной ДНК в форме неизменных фрагментов исходно экстраклеточной локализации показал, что до 1800 т.п.н. экзогенной ДНК может одновременно находиться во внехромосомном пространстве в форме фрагментов. Как следует из полученных результатов, фрагменты экзогенной ДНК подвергаются процессингу (замыкание в кольцо, мультимеризация) во внутренних клеточных компартментах ККМ, выделенных из костного мозга интактных мышей и мышей, обработанных препаратом ДНК через 18 ч после инъекции ЦФ.

Результаты гибридизации, выполненной с использованием плазмидного материала (рис. 13), а также результаты экспериментов по интернализации плазмидной ДНК, меченной ³²P (рис. 11, 12, б), свидетельствуют о том, что в ККМ, находящихся под воздействием ЦФ, и в необработанных клетках активированные молекулярные механизмы имеют общие свойства. Прослеживается, что линейные молекулы плазмиды замыкаются в кольцо в обоих типах

клеток. Однако в образцах ККМ, выделенных из не обработанных ЦФ мышей, не происходит какой-либо ассоциации плазмидной ДНК и реципиентного хроматина (рис. 13, дорожки 1, 2 старт). Наоборот, в ККМ, выделенных из обработанных ЦФ мышей, плазмидная ДНК ассоциируется с реципиентным хроматином ядра и колокализуется вместе с ним на старте агарозного геля. Сравнительный анализ двух типов событий предполагает активацию в ККМ, обработанных различным образом, аварийной лигирующей системы. По-видимому, эта система является более специфичной для ДЦР хромосом клетки, только в отсутствие которых происходит удаление из пространства ядра двуцепочечных концов, пришедших с экзогенными фрагментами ДНК. Этот эффект хорошо виден при анализе результатов, приведенных на рис. 11 и 13. Если в ядре присутствуют двуцепочечные разрывы хромосом, то система лигирования в первую очередь стремится удалить из пространства ядра именно эти повреждения. По-видимому, в этот процесс случайным образом попадают и экзогенные фрагменты, которые выявляются как ассоциированные с хроматином на старте агарозных блоков. В результате таких событий, протекающих в ядре, наблюдаются появление экзогенного материала, вероятно, ковалентно объединенного с ДНК хроматина, и одновременное снижение эффективности лигирования молекул плазмиды, свободно присутствующих в ядерном пространстве.

В дополнение к этому показано, что в исследуемой системе клеток меченый материал быстро (ко второму часу инкубации) насыщает фракцию хроматина и количество радиоактивного материала сохраняется на одинаковом уровне вплоть до 7 ч инкубации с экзогенной ДНК (рис. 11, 12, б). Такое поведение меченого материала также может свидетельствовать о возможности ковалентного объединения экзогенных меченых фрагментов с хроматином ККМ. Быстрое и конечное насыщение хроматина меченым материалом в таких клетках предполагает некое завершение определенных репаративных процессов, стабилизирующих доставку и ассоциацию с хроматином экзогенной ДНК. Как следует из работы (Долгова и др., 2011), в течение 10 мин после появления в организме мышей экзогенной фрагменти-

рованной ДНК происходит исчезновение из пространства клеток свидетеля ДЦР – гистона γ H2AX, что говорит о завершении репарации интермедиатов репарации МЦС ДЦР.

Если сопоставить следующие факты: присутствие меченого материала в ассоциации с хроматином ядра в момент времени, когда полностью остановлены синтетические клеточные процессы (рис. 1, дорожка 5); гибридизация плазмидной ДНК с фракцией хроматина в образцах ККМ, выделенных из мышей, обработанных ЦФ (рис. 13); быстрое и конечное насыщение фракции хроматина экзогенной ДНК (рис. 11, 12); немедленное удаление ДЦР, определяемых в клетке антителами к гистону γ H2AX (Долгова и др., 2011), то можно предположить следующую картину развития событий.

Когда в ККМ происходит репарация ДЦР, сформированных к 12 ч после воздействия ЦФ (Niedernhofer *et al.*, 2004; Долгова и др., 2010), идет подготовка к репаративной гомологичной рекомбинации образованных двуцепочечных концов с гомологичными последовательностями сестринских хроматид. После гомологичного спаривания и завершения кроссинговера должны произойти восстановление репликативной вилки и возобновление движения клетки по клеточному циклу (De Silva *et al.*, 2000; Helleday, 2003; Niedernhofer *et al.*, 2004; Saleh-Gohari *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Raynard *et al.*, 2008; Bhagwat *et al.*, 2009). В этот момент времени в ядерном пространстве таких клеток появляются фрагменты экзогенной ДНК. Известно, что свободные двуцепочечные концы активируют систему иерархических киназ, которые индуцируют остановку клеточного цикла (Zou, 2007; Лихачева и др., 2008). Одновременно с этим происходит активация специфической системы аварийного лигирования (Derbyshire *et al.*, 1994; Lees-Miller, Meek, 2003; Lee *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). Предположительно повторная активация иерархических киназ (если она действительно присутствует) и специфическое аварийное лигирование, индуцированное появлением свободных двуцепочечных концов интрадуцированных в ядро экзогенных фрагментов (как это наблюдается при разрывах, вызванных жестким γ -облучением (Lees-Miller, Meek, 2003)), встречаются с молекулярным механизмом деликатного репаративного процесса МЦС и, в частности,

конечной его фазы восстановления ДЦР путем прецизионной гомологичной рекомбинации (Niedernhofer *et al.*, 2004). Возникает молекулярный хаос, результатом которого могут быть следующие последствия.

1. Происходит стохастическое лигирование двуцепочечных концов, принадлежащих экзогенным фрагментам и ожидающих гомологичной рекомбинации двуцепочечных концов, сформированных вокруг МЦС. Полученные результаты дают основание предполагать, что репаративные факторы, появление которых индуцировано фрагментами экзогенной ДНК (Ku70/80, лигаза IV, лигаза III), в первую очередь и предпочтительно ассоциируются с двуцепочечными разрывами хромосом, лигируя разрывы. Поскольку обработка ЦФ индуцирует конечное количество МЦС (2000–2500) и, как следствие, появление конечного количества двуцепочечных концов, то факт быстрого конечного насыщения меченым материалом указанным образом обработанных ККМ может свидетельствовать о наличии такого рода лигирования. При этом должны возникнуть многочисленные химерные молекулы хромосом. Частным случаем таких событий будет интеграция экзогенных фрагментов в структуру хромосом реципиентного ядра. Результатом такого процесса являются непрекращающийся апоптоз ККМ и элиминация из организма лимфоцитарного ростка крови (Долгова и др., в печати).

2. Возможно, что одновременно происходит формирование эписомоподобных структур (Lin *et al.*, 1985; Thomas *et al.*, 1986; Hashizume, Shimizu, 2007), которые объединены с хромосомами ядра связями, не разрушающимися при обработке протеиназой К. Эписомы, образованные фрагментами экзогенной ДНК, могут вносить свой вклад в токсическое воздействие, оказываемое на клетку. Предполагается, что в этих структурах могут находиться эукариотические последовательности, функционально активированные формированием эписомы. Продукты синтеза с этих последовательностей (Filaci *et al.*, 2004), а также сами последовательности, если они относятся к структурным участкам генома (MAR/SAR), могут вносить дисбаланс в функционирование молекулярных механизмов клетки, что также может приводить к активации механиз-

мов запрограммированной гибели клеток (Wang *et al.*, 2005; Hashizume, Shimizu, 2007).

Таким образом, экзогенная ДНК при ее взаимодействии с ККМ интернализуется во внутренние компартменты клетки и, в частности в ядро. Присутствие экзогенных фрагментов в ядре ККМ в момент, когда в клетках этого типа индуцированы функциональные ДЦР, связанные или с процессом репликации или со специфическими репаративными процессами, может негативно влиять на функциональную целостность клеток, вызывая их гибель.

Благодарности

Авторы выражают благодарность О.В. Воробьевой и Н.А. Сердюковой за помощь в постановке FISH.

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

- Алямкина Е.А., Лихачева А.С., Николин В.П. и др. Действие экзогенной ДНК, ассоциированной с протамином, на рост экспериментальных опухолей мыши // Вопросы онкологии. 2009. Т. 55. № 6. С. 765–768.
- 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. Патологические изменения, возникающие в организме мышей, обработанных сочетанием циклофосфана и экзогенной ДНК // В печати.
- Долгова Е.В., Проскурина А.С., Николин В.П. и др. Характеристика временных параметров проявления эффекта токсического действия инъекций экзогенной ДНК на фоне предобработки цитостатиком циклофосфаном // Информ. вестник ВОГиС. 2011. Т. 15. № 4. С. 485–492.
- Долгова Е.В., Рогачев В.А., Николин В.П. и др. Лейкостимулирующее действие фрагментов экзогенной ДНК, защищенных протамином, при вызванной циклофосфаном миелосупрессии мышей // Вопросы 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.
- Abrams R.A., McCormack K., Bowles C., Deisseroth A.B. Cyclophosphamide treatment expands the circulating hematopoietic stem cell pool in dogs // J. Clin. Invest. 1981. V. 67. No. 5. P. 1392–1399.

- Bhagwat N., Olsen A.L., Wang A.T. *et al.* XPF-ERCC1 participates in the Fanconi anemia pathway of cross-link repair // *Mol. Cell Biol.* 2009. V. 29. No. 24. P. 6427–6437.
- 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. No. 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. No. 1. P. 156–169.
- Filaci G., Gerloni M., Rizzi M. *et al.* Spontaneous transgenesis of human B lymphocytes // *Gene Ther.* 2004. V. 11. No. 1. P. 42–51.
- Fleming R.A. An overview of cyclophosphamide and ifosfamide pharmacology // *Pharmacotherapy.* 1997. V. 17. P. 146–154.
- Gosden J., Lawson D. In situ cyclic amplification of oligonucleotide primed synthesis (cycling PRINS) // *PCR Application Manual* (Boehringer Mannheim Corp., ed.), *Boehringer Mannheim Corp.*, Mannheim, Germany. 1995. P. 115–118.
- Hashizume T., Shimizu N. Dissection of mammalian replicators by a novel plasmid stability assay // *J. Cell Biochem.* 2007. V. 101. No. 3. P. 552–565.
- Helleday T. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells // *Mutat. Res.* 2003. V. 532. No. 1/2. P. 103–115.
- 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. No. 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. No. 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.* 2007. V. 11. P. 305–314.
- Lin F.L., Sperle K., Sternberg N. Recombination in mouse L cells between DNA introduced into cells and homologous chromosomal sequences // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. No. 5. P. 1391–1395.
- 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. No. 2. P. 63–66.
- Murata S., Takasaki N., Saiton M., Okada N. Determination of the phylogenetic relationships among Pacific salmonids by using short interspersed elements (SINEs) as temporal landmarks of evolution // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 6995–6999.
- 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. No. 13. P. 5776–5787.
- Pinkel D., Straume T., Gray J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. No. 9. P. 2934–2938.
- Raynard S., Niu H., Sung P. DNA double-strand break processing: the beginning of the end // *Genes Dev.* 2008. V. 22. No. 21. P. 2903–2907.
- Roberts D.B. *Drosophila: a Practical Approach* / Ed. D.B. Roberts. Oxford-Washington, DC: IRL Press, 1986. 295 p.
- Saleh-Gohari N., Bryant H.E., Schultz N. *et al.* Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks // *Mol. Cell Biol.* 2005. V. 25. No. 16. P. 7158–7169.
- 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. No. 2. P. 134–143.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
- Stanyon R., Galleni R. A rapid fibroblast culture technique for high resolution karyotypes // *Ital. J. Zool.* 1991. V. 58. No. 1. P. 81–83.
- Thomas K.R., Folger K.R., Capecchi M.R. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome // *Cell.* 1986. V. 44. No. 3. P. 419–428.
- 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. No. 10. P. 4020–4030.
- Zhang N., Liu X., Li L., Legerski R. Double-strand breaks induce homologous recombinational repair of interstrand cross-links via cooperation of MSH2, ERCC1-XPF, REV3, and the Fanconi anemia pathway // *DNA Repair.* 2007. V. 6. No. 11. P. 1670–1678.
- Zou L. Single- and double-stranded DNA: building a trigger of ATR-mediated DNA damage response // *Genes Dev.* 2007. V. 21. No. 8. P. 879–885.

INTERNALIZATION OF EXOGENOUS DNA INTO INTERIOR COMPARTMENTS OF MURINE BONE MARROW CELLS

E.V. Dolgova¹, V.P. Nicolin¹, N.A. Popova¹, A.S. Proskurina¹,
K.E. Orishchenko¹, E.A. Alyamkina¹, Y.R. Efremov¹, E.R. Chernykh², A.A. Ostanin²,
E.M. Malkova³, O.S. Taranov³, V.A. Rogachev¹, S.V. Sidorov⁴,
S.S. Bogachev¹, M.A. Shurdov⁵

¹ Institute 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;

⁴ State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, Novosibirsk, Russia;

⁴ City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russia;

⁵ OOO Panagen, Novosibirsk, Russia

Summary

Injections of exogenous DNA in combination with a cytostatic agent cyclophosphamide (CP) cause illness and death of experimental mice. This phenomenon is referred to this as delayed death. It has been found that upon intraperitoneal injections fragments of exogenous DNA reach the bone marrow niche and enter the nuclei of bone marrow cells (BMCs). Also, fragments of exogenous DNA are captured from culture medium by BMCs generated *ex vivo*. Upon such treatment, the fragments are incorporated into cells in a non-degraded form. We estimate that under such conditions up to 1800 kb of exogenous DNA can be present in BMCs as fragments. After *ex vivo* incubation with BMCs, fragments of exogenous DNA internalized in cells of both intact and CP pre-treated mice become circularized. It has been shown that fragments of exogenous DNA can form high-molecular weight structures *in vivo*. Moreover, fragments localized in BMC nuclei are suggested to integrate into chromosome(s) of recipient mouse genomes when treated with CP and exogenous DNA.

Key words: bone marrow cells, fragments of exogenous DNA, episome, concatemerization.

УДК 577.322.2:004.94

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ МУТАНТНЫХ ФОРМ БЕЛКА БАРНАЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОГРАММНОГО КОМПЛЕКСА MOLKERN

© 2012 г. Э.С. Фомин, Н.А. Алемасов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: fomin@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 14 мая 2012 г. Принята к публикации 30 мая 2012 г.

Выполнено исследование термостабильности ряда мутантных форм белка барназы методом λ -динамики. Метод реализован в рамках программного комплекса MOLKERN. Для исследования выбраны мутации, включающие аминокислоты с ненулевым зарядом, точность расчетов которых в методе λ -динамики почти в 1/4 случаев существенно отличается от экспериментальных данных (> 10 кДж/моль). Предложены оригинальные модификации метода λ -динамики, связанные с построением λ -потенциалов и учетом эффектов изменения заряда. Результаты выполненных расчетов (для мутации R72G) показали лучшее согласие с экспериментальными значениями, чем результаты других авторов.

Ключевые слова: барназа, молекулярная динамика, λ -динамика, разность свободных энергий, термостабильность белков.

Введение

Среди задач, возникающих в приложениях биотехнологии и связанных с рациональным проектированием новых белков (обеспечение большей специфичности к заданному субстрату, изменение специфичности, растворимости или проницаемости и пр.), получение термостабильных (т. е. способных работать с высокой активностью при температурах до 100 °C и выше) белков-ферментов имеет огромное практическое значение. Данная проблема решается внесением мутаций в исходный белок-фермент дикого типа, затрудняющих процесс денатурации.

Для этого в экспериментальных исследованиях используются метод случайного мутагенеза и сравнительный анализ ферментов с более термостабильными аналогами (Lehmann, 2001). Метод случайного мутагенеза ограничен трудоемкостью получения большого числа мутантов, а методы, основанные на сравнении, не могут выйти за пределы тех наборов аминокислотных последовательностей, которые присущи тер-

мофильным организмам. По причине наличия подобных ограничений в экспериментальных подходах большой интерес вызывают альтернативные теоретические методы, основанные на изучении пространственной структуры белков и нахождении точечных аминокислотных замен, которые оптимизируют внутрибелковые взаимодействия в направлении повышения термостабильности, что включает:

1. Исследования структуры полипептидной цепи и повышение ее жесткости путем замены входящих в нее аминокислот на пролин, обладающий низкой конформационной энтропией (Серов и др., 2002), что приводит к понижению конформационной энтропии процесса денатурации.

2. Исследования структуры полипептидной цепи и удаление напряжений в ней, обусловленных сильным отталкиванием между боковыми цепями аминокислотных остатков из-за их неоптимального взаимного расположения (например, путем замены остатков на глицин (Серов и др., 2005), что делает цепь более устойчивой к тепловым воздействиям.

3. Анализ ионных взаимодействий и «конструирование» белков с повышенным содержанием заряженных остатков на их поверхности, что стабилизирует белок за счет снижения диэлектрической проницаемости воды при увеличении температуры (Полянский и др., 2004).

4. «Реконфигурацию» структуры белков либо для увеличения ароматических стэкинг-взаимодействий (Puchkaev *et al.*, 2003), либо для возможности введения дополнительных дисульфидных связей (Pikkemaat *et al.*, 2002).

5. Поиск термоллабильных областей в белках методами молекулярной динамики (Полянский и др., 2004; Meharena *et al.*, 2010) и локализацию мутаций в данных областях белка.

Рассмотренные выше методы позволяют дать достаточно надежное качественное предсказание того, как может повлиять точечная мутация на термостабильность белка, поскольку учитывают реальные физические внутрибелковые взаимодействия. Однако подобные методы не могут дать точное численное значение оцениваемой величины, особенно в ситуации разнонаправленного действия физических эффектов. Задача точного численного расчета эффекта влияния точечной мутации белка на его термостабильность является в настоящее время «вызовом» для биоинформатики.

Задача расчета термостабильности сводится к вычислению разности свободных энергий между различными состояниями моделируемой системы: например, расчет термостабильности мутантной формы белка требует вычисления величины двойной разности $\Delta\Delta G = \Delta G_3 - \Delta G_2$, где ΔG_3 – разность свободных энергий между нативной и денатурированной формой белка дикого типа, а ΔG_2 – разность свободных энергий между нативной и денатурированной формой мутанта (см. рис. 1). Расчет разностей ΔG_3 и ΔG_2 формально возможен, но в реальности он сталкивается с непреодолимыми вычислительными проблемами, обусловленными большим количеством конформаций, которые может принимать белок в процессе сворачивания в нативную структуру. Решение задачи по такому пути практически не отличается от решения задачи фолдинга белка, и вряд ли может быть получено в ближайшие годы.

Подход, позволяющий обойти данную проблему, основывается на том факте, что свобод-

ная энергия является функцией состояния и не зависит от пути, который проходит система. Решение получается через построение термодинамического цикла, который связывает четыре состояния белка: белок дикого типа, денатурированный белок дикого типа, белок-мутант и денатурированный белок-мутант. Сумма разностей свободной энергии Гиббса между этими состояниями удовлетворяет соотношению $\Delta G_1 + \Delta G_2 - \Delta G_4 - \Delta G_3 = 0$, где ΔG_1 – разность свободных энергий между денатурированным белком дикого типа и его мутантной формой, а ΔG_4 – разность свободных энергий между белком дикого типа и его мутантной формой. Из условия равенства нулю изменения свободной энергии вдоль всего цикла, следует, что искомая величина $\Delta\Delta G$ может быть рассчитана также через разность $\Delta\Delta G = \Delta G_1 - \Delta G_4$, где величины ΔG_1 и ΔG_4 могут быть получены без моделирования процессов фолдинга белка, однако требуют моделирования нефизического (т. е. не реализуемого в природе) непрерывного процесса «превращения» одних аминокислотных остатков в другие. Моделирование процесса подобных «превращений», называемых «алхимической» динамикой или λ -динамикой, получило популярность в последние годы (Knight *et al.*, 2009; Seeliger *et al.*, 2010). Решение подобной задачи требует вычислительных ресурсов на уровне не менее чем $10^4 \times 10^3 \times 10^9 = 10^{16}$ операций (произведение числа атомов, числа взаимодействий на атом и количества точек траектории) на одну точку λ -траектории, что могут обеспечить суперкомпьютеры петафлопного и выше уровня производительности.

Данная работа посвящена исследованиям термостабильности некоторых мутаций белка барназы методом λ -динамики, т. е. методом, ко-

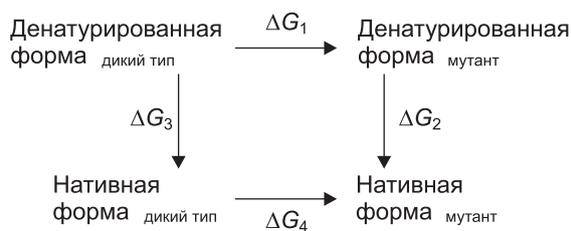


Рис. 1. Термодинамический цикл, который описывает процесс расчета термостабильности белка мутантной формы относительно его дикого типа.

торый в принципе позволяет достичь точности вычисления, сравнимого с точностью экспериментальных данных. Предлагаемый подход включает в себя выполнение молекулярной динамики белков в водном окружении в полно-атомном приближении и накопление обширной статистики для расчета средних по ансамблю физических величин. Для исследования выбраны мутации, включающие аминокислоты с ненулевым зарядом, точность расчетов которых в методе λ -динамики существенно снижена относительно мутаций с нейтральными аминокислотами (Seeliger *et al.*, 2010). В исследовании используются оригинальные модификации метода λ -динамики, связанные с построением λ -потенциалов и учетом эффектов изменения заряда. Представлена реализация метода в рамках программного комплекса MOLKERN, приведены и обсуждены результаты расчетов, сделано сравнение с экспериментальными данными и расчетами других авторов.

Объект исследования и методы

В качестве объекта исследования в рамках метода λ -динамики был выбран белок барназы. Барназа (бактериальная рибонуклеаза) – небольшой белок (110 аминокислот), который синтезируется в бактерии *Bacillus amyloliquefaciens*. Вместе с белком, который называется барстар (89 аминокислотных остатков), эти две биомолекулы образуют комплекс; барстар является внутриклеточным ингибитором активности барназы. Белок плавится при температуре 50 °C при pH от 5 до 9 (Hartley *et al.*, 1989). Имеется пространственная структура барназы, наилучшее разрешение которой составляет 1,5 Å (Martin *et al.*, 1999). Кроме того, известно свыше 400 мутантных форм белка, образованных как точечными, так и множественными заменами аминокислот (Kumar *et al.*, 2006).

Наиболее часто барназа присутствует в качестве объекта в исследованиях фолдинга (Bucroft *et al.*, 1990; Serrano *et al.*, 1992; Fersht *et al.*, 2002), поскольку обладает обратимым сворачиванием. Множество работ (Clarke *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1995; Pedersen *et al.*, 2002) посвящено исследованию факторов, влияющих на стабильность барназы, другие предусматривают комплексные исследования стабильности

мутантных форм этого белка. Причем среди последних встречаются как экспериментальные (Kellis *et al.*, 1989; Matouschek *et al.*, 1989; Horovitz *et al.*, 1992; Buckle *et al.*, 1993), так и теоретические (большая часть – компьютерные) исследования (Prevost *et al.*, 1991; Gilisa *et al.*, 1996).

Белок барназы является хорошо изученным объектом, в том числе и методом λ -динамики. Для большинства мутаций этого белка (более 70 %), изученных данным методом, расхождение рассчитанных данных с экспериментальными находится в пределах ± 4 кДж/моль, т. е. в пределах стандартной ошибки силового поля. Для мутаций, включающих заряженные аминокислотные остатки, точность рассчитанных данных существенно хуже: только 52 % находятся в пределах ± 4 кДж/моль от экспериментального значения, и для 24 % мутаций отклонение превышает 10 кДж/моль (Seeliger *et al.*, 2010).

Для исследования подобных мутаций в настоящей работе был использован метод λ -динамики, дополненный оригинальным методом учета эффектов изменения зарядового состояния аминокислотных остатков (Net-Q метод, см. Приложение 4). Метод реализован в рамках программного комплекса MOLKERN (Фомин *et al.*, 2006), предназначенного для эффективного выполнения основных задач молекулярного моделирования. MOLKERN использует силовые поля AMBER и GAFF. Он написан на языке C++ с использованием библиотек STL, BOOST, FFTW и др. Базовый код MOLKERN векторизован (через SSE и SSE2 расширения), использует многопоточность и выполняется в операционной системе Linux.

Выбор программного пакета MOLKERN для решения задачи исследования термостабильности оптимален также с точки зрения производительности. Например, на процессоре Intel(R) Core(TM)2 Quad CPU Q8400 2.66 GHz MOLKERN позволяет рассчитывать системы до 3 млн атомов, обеспечивая производительность до 0,1 млрд взаимодействий/с в 4-поточном исполнении. Эффективность реализации обусловлена как алгоритмической оптимизацией – все алгоритмы программы имеют вычислительную сложность, не превышающую $O(N \log N)$, так и использованием ряда оригинальных подходов

для обеспечения минимизации потока данных между глобальной памятью и CPU; а также автоматической подстройкой параметров в направлении предельной эффективности расчета при различных физических параметрах моделирования (Fomin, 2011).

При решении задачи термостабильности мутантов белка на вход MOLKERN подается файл формата PDB, содержащий координаты атомов белка дикого типа. В отличие от большинства существующих программных пакетов молекулярного моделирования MOLKERN позволяет выполнять точечные аминокислотные замены в белке, заданные в командной строке, автоматически; также автоматически строятся топология для λ -состояния комплекса и λ -потенциалы (см. Приложение 2). Далее происходят оптимизация структуры λ -состояния, заполнение заданной области моделирования молекулами воды, выполнение молекулярной динамики и накопление необходимой статистики. Дополнительный вызов MOLKERN с другими параметрами командной строки позволяет обработать полученные файлы статистики и получить термодинамические средние для физических величин, необходимых при расчете разностей свободных энергий ΔG методом термодинамического интегрирования (см. Приложение 1).

Модели белка барназы и методика расчетов

Модели белка. В работе использовались следующие модели белка барназы:

1. GXG – 3-аминокислотный пептид, который является моделью денатурированной формы белка (Seeliger *et al.*, 2010) и состоит из варьруемой между расчетами аминокислоты X, которая окружена остатками Gly.

2. BarnaseX – полноатомный белок барназы, являющийся моделью его нативной формы, в которой выполняются одиночные замены произвольной аминокислоты X.

Модель GXG разработана специально для расчета величины ΔG_1 , которая представляет собой разность свободных энергий между белком дикого типа и его мутантной формы в денатурированном состоянии (см. рис. 1). Данная модель позволяет обойти проблему, связанную с получением пространственной структуры

денатурированной формы белка и с расчетом ее конформационной энтропии. Применимость модели GXG для расчета величины ΔG_1 обусловлена тем, что в денатурированной форме все аминокислотные остатки белка в равной степени доступны растворителю, и в области любого остатка находится в среднем не более двух непосредственно связанных с ним соседей. При внесении мутации в белок пространственное окружение всех остатков, не связанных с мутацией, не меняется, и по этой причине они не дают вклада в величину ΔG_1 и могут быть выброшены из расчета. Применимость моделей, подобных GXG, создаваемых путем удаления всех незначимых для исследуемого явления атомов, обусловлена локальностью любых физических процессов, и использование подобных моделей является распространенным приемом (Messmer, 1979).

BarnaseX – полноатомный белок барназы, являющийся моделью его нативной формы, в которой производятся точечные замены аминокислоты X. Данная модель позволяет получить величину ΔG_4 (см. рис. 1), которая представляет разность свободных энергий между нативным белком дикого типа и его мутантной формой.

Методика расчетов. Все расчеты выполнялись со следующими параметрами:

1. Размер пространственной области моделирования – $30 \times 30 \times 30 \text{ \AA}^3$ (GXG модель) и $60 \times 60 \times 60 \text{ \AA}^3$ (BarnaseX модель); число молекул воды – 282 и 5577 соответственно.

2. Радиус обрезания потенциала – 10 \AA .

3. Число шагов оптимизации геометрии после построения системы – 100.

4. Используемый тип термодинамического ансамбля – NVT с температурой моделирования – 400 K.

5. Длина расчетных траекторий молекулярной динамики – 20 нс с шагом интегрирования – 2 фс.

6. Шаг интегрирования расширенной λ -траектории – от 1/8 до 1/10.

7. Период сохранения статистических величин – 1 пс.

8. Игнорируемый при расчетах ΔG_i диапазон траекторий молекулярной динамики – от 0 до 10 нс модельного времени; используемый для расчета ΔG_i диапазон траекторий – от 10 до 20 нс модельного времени.

Выбор параметров, таких, как шаги интегрирования МД траектории и λ -траектории, а также длина расчетных траекторий мотивировался необходимостью увеличения эффективности расчетов. За счет ограничения длины траекторий в расчетах происходит потеря точности, связанная с недооценкой энтропийного вклада (моделируемая система за заданное время не успевает обойти значимый объем конформационного пространства). Компенсация недооценки данного вклада осуществлялась повышением температуры моделирования до 400 °К. Увеличение температуры приводит к увеличению средней кинетической энергии молекул воды, чьи столкновения с атомами белка приводят к более частым поворотам ротамеров аминокислотных остатков, локализованных на поверхности белка. В результате система проходит большую часть пространства конфигураций за меньшее время моделирования, компенсируя негативный эффект ограничения длины расчетной траектории. Уравновешивание температуры выполнялось с помощью метода термостата Берендсена (Berendsen *et al.*, 1984).

Расчеты производились с использованием ресурсов ЦКП «Биоинформатика» СО РАН. Среди них вычислительный кластер, состоящий из: 64 двухпроцессорных серверов (Intel Xeon E5540), 48 двухпроцессорных серверов (Intel Xeon X5670) и параллельной файловой системы IBRIX для хранения данных: 4 шлюзовых сервера (HP DL380 G6), 4 дисковые полки (2 – HP MSA 2312sa DC, 2 – HP MSA 2000 DC) и сервер управления (HP DL360 G6). Расчеты оказались чрезвычайно затратны (до 400 ч на одну точку λ -траектории). Предположительно значительные затраты времени на расчеты обусловлены задержками файловой системы из-за необходимости сохранения большого объема статистических данных.

В силу существенных вычислительных затрат в работе решено было ограничиться только мутациями A32G и R72G. Данные мутации представлены по следующим их свойствам:

1. Мутация A32G затрагивает аминокислоты Ala и Gly, которые не обладают конформационной энтропией (остаток Ala – в силу симметрии группы CH_3 , а остаток Gly – в силу того, что он включает только атом H). Таким образом, в расчете ΔG отсутствует энтропийный вклад,

что в свою очередь позволяет ограничиться короткими траекториями динамики при наборе статистики. Расчет энергии данной мутации позволяет оценить корректность заложенных в MOLKERN базовых алгоритмов вычисления энтальпийного вклада в ΔG .

2. Мутация R72G включает аминокислоту Arg, которая обладает высокой конформационной энтропией, поскольку состоит из длинной цепи атомов $CH_2 - CH_2 - CH_2 - NH - C(NH_2)_2$. Расчет мутации R72G позволяет оценить корректность построения ансамбля конфигураций и расчета энтропийного вклада в ΔG . Дополнительным фактором, обусловившим выбор данной мутации, являлось то, что мутация R72G включает изменение зарядового состояния.

Результаты расчетов

Все расчеты термостабильности мутантных форм белка барназы относительно его дикого типа выполнены согласно формулам метода термодинамического интегрирования, описанного в Приложении 1. Основной величиной, которая необходима для расчетов, является величина $dH/d\lambda$. Совокупность этих величин собирается по всей траектории молекулярной динамики для каждого значения λ , характеризующего степень «превращения» белка дикого типа в мутантный. Среднее значение по ансамблю величины $\langle dH/d\lambda \rangle$ характеризует скорость изменения свободной энергии в точке λ согласно соотношению $\delta F = \langle dH/d\lambda \rangle \delta \lambda$.

На рис. 2 приведен график изменения величины $\langle dH/d\lambda \rangle$ вдоль λ -траектории в диапазоне $\lambda \in [0, 1)$ для перехода между диким типом и мутантом A32G для модели GXG денатурированного белка. Функция, отображенная на графике, построена с использованием ограниченного числа λ точек с шагом $d\lambda = 0,1$, и интерполяция между ними выполнена полиномами второго порядка. Для каждой точки показана теоретическая погрешность расчета, вычисленная согласно формулам Приложения 3.

Величина ΔG_1 вычислена путем интегрирования полученной функции на графике согласно формулам метода TI (см. Приложение 1), т. е.

$\Delta G_1 \approx \Delta F_1 = \int_0^1 \langle dH_1/d\lambda \rangle d\lambda$. Рассчитанное значение $\Delta G_1 = -37,6$ кДж/моль очень хорошо

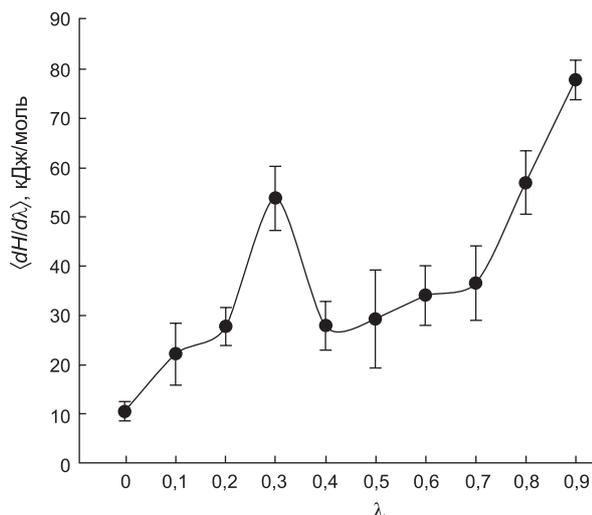


Рис. 2. Изменение величины $\langle dH/d\lambda \rangle$ вдоль λ -траектории для перехода между диким типом и мутантом A32G для модели GXG денатурированного белка.

(в пределах точности ± 4 кДж/моль силового поля AMBER) согласуется со значением $-36,1$ кДж/моль, полученным в работе Seeliger с соавт. (2010). Таким образом, для мутаций, в которых основной вклад в ΔG дает энтальпия, показано хорошее согласие получаемых MOLKERN результатов с расчетами других авторов.

На рис. 3 приведены графики изменения величины $\langle dH/d\lambda \rangle$ вдоль λ -траектории в диапазоне $\lambda \in [0, 1)$ для перехода между диким типом и мутантом R72G для модели GXG денатурированного белка (а) и модели нативного белка (б).

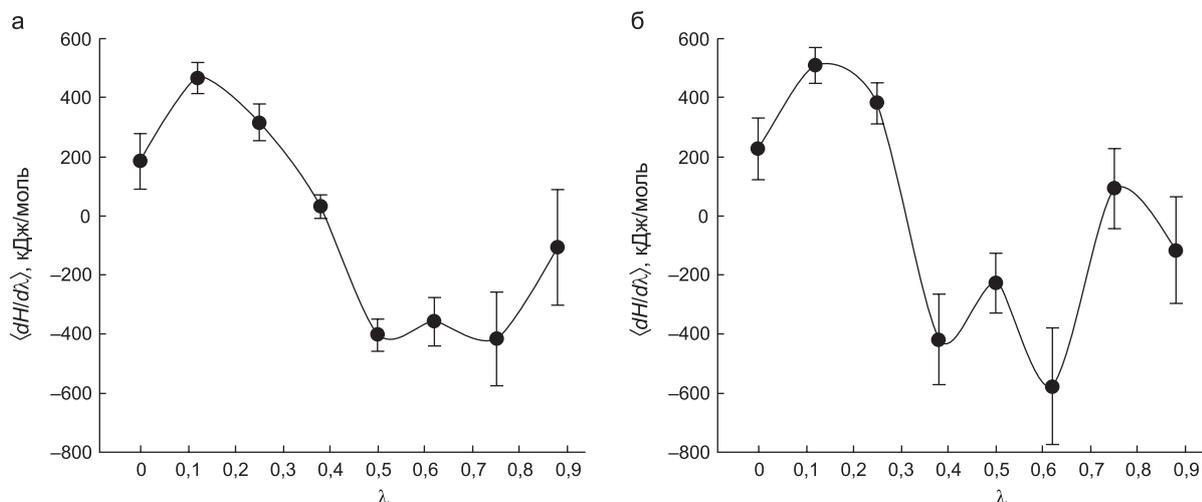


Рис. 3. Изменение величины $\langle dH/d\lambda \rangle$ вдоль λ -траектории для перехода между диким типом и мутантом R72G для модели GXG денатурированного белка (а) и для модели нативного белка BarnaseX (б).

Левый график позволяет рассчитать величину ΔG_1 , а правый график – ΔG_4 . Функции, отображенные на графике, построены с использованием ограниченного числа λ точек с шагом $d\lambda = 0,1$, и интерполяция между этими точками выполнена полиномами второго порядка. Для каждой точки показана теоретическая погрешность расчета, вычисленная согласно формулам Приложения 3.

Величины ΔG_1 и ΔG_4 , вычисленные согласно формулам метода ПИ, равны $\Delta G_1 = -36,6$ кДж/моль и $\Delta G_4 = -16,8$ кДж/моль, что в свою очередь дает значение для $\Delta\Delta G_{calc} = -19,8$ кДж/моль. Полученная величина $\Delta\Delta G_{calc}$ находится существенно ближе к экспериментальному значению $\Delta\Delta G_{exp} = -10,45$ кДж/моль (Kumar *et al.*, 2006), чем рассчитанная $\Delta\Delta G_{calc} = -57,67$ кДж/моль в работе Seeliger с соавт. (2010). Расхождение относительно экспериментального значения у Seeliger с соавт. (2010) составляет $-47,2$ кДж/моль против $-9,4$ кДж/моль в данной работе.

Значение величины $\Delta\Delta G_{exp} = -10,4$ кДж/моль для мутации R72G означает снижение термостабильности R72G мутантной формы белка барназы относительно его дикого типа. Поскольку аминокислота R72 локализована таким образом, что ее NH_2 -группы доступны воде и количество водородных связей в обоих случаях (денатурированный или нативный белок) одинаково для данной аминокислоты и не влияет на термостабильность, то основной эффект снижения термостабильности обусловлен энтропийным

вкладом. Действительно, аминокислотный остаток Arg представляет собой длинную цепочку, которая имеет большое число возможных конформаций в денатурированной форме белка. В нативной форме белка движение данной аминокислоты существенно ограничено. Это демонстрируется на рис. 4, где приведен фрагмент белка около аминокислотного остатка R72, причем остаток R72 на рисунке представлен в виде модели «шариков и проволочек». Существование белков с подобной мутацией, которая невыгодна с точки зрения термостабильности, должно быть обусловлено, с эволюционной точки зрения, и исследования механизмов функционирования белка с данной мутацией могут дать новую биологическую информацию.

Выводы

В работе выполнены исследования термостабильности мутаций A32G и R72G белка барназы методом λ -динамики. Исследование проведено с использованием программного комплекса MOLKERN, в котором реализован метод λ -динамики с оригинальными модификациями, связанными с построением λ -потенциалов и учетом эффектов изменения заряда. Результаты исследования для ограниченного числа мутаций

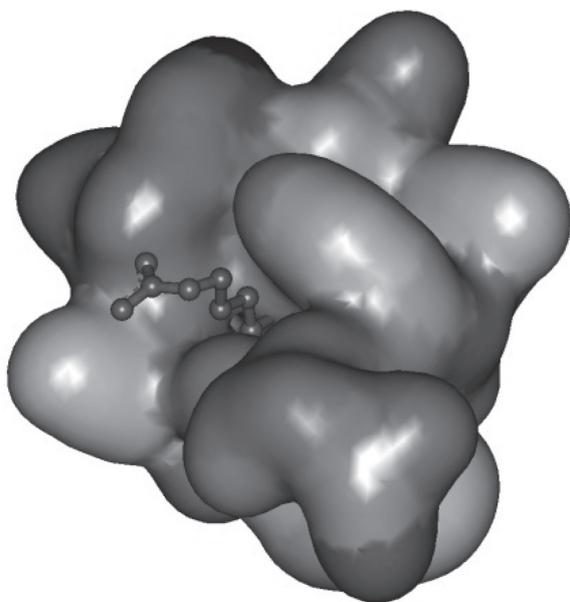


Рис. 4. Фрагмент белка барназы около аминокислотного остатка R72.

показали, что разработанный метод полностью согласуется с расчетами других авторов при расчете энтальпийного вклада в свободную энергию (мутация A32G) и дает более точные результаты при учете энтропийного вклада для мутаций с ненулевым зарядом (R72G), т. е. для случая, в котором отклонение от экспериментальных значений существенно (Seeliger *et al.*, 2010).

Благодарности

Данная работа поддержана грантами СО РАН (интеграционные проекты № 39, № 47, № 130), Министерством образования и науки РФ (Госконтракты № П857, № 07.514.11.4011), а также Программой Президиума РАН «Интеграция РАН 6.8 и НШ-5278.2012.4».

Приложения

1. Метод термодинамического интегрирования

Метод термодинамического интегрирования при расчете разностей свободных энергий используется не только в задачах определения термостабильности, но также в исследованиях связывания лигандов (Bash *et al.*, 1987; Kollman, 1993), при изучении стабильности белков (Dang *et al.*, 1989; Tidor *et al.*, 1991), ионного транспорта (Roux *et al.*, 1991), белкового фолдинга (Boczek *et al.*, 1995) и поверхностей свободной энергии (Bartels *et al.*, 1999; Simonson *et al.*, 2002).

Свободная энергия в каноническом (постоянные: N, V, T) ансамбле определяется термодинамическим потенциалом Гельмгольца: $F = -k_B T \ln Z$, где k_B – константа Больцмана, T – температура, Z – статистическая сумма. Для систем в жидкой фазе свободная энергия Гельмгольца F отличается от свободной энергии Гиббса G на величину pV , и их разности совпадают с хорошей точностью $\Delta G \approx \Delta F$, поскольку для жидкостей изменение $p\Delta V \approx 0$.

Статистическая сумма Z является функцией всех микросостояний $\{p, x\}$ системы, которые удовлетворяют условиям ансамбля, и выражается как:

$$Z = \int \exp \left[-\frac{H(p, x)}{k_B T} \right] dp dx, \quad (1)$$

где $H(p, x)$ – гамильтониан системы. При этом плотность вероятности $\rho(p, x)$ каждого микросостояния $\{p, x\}$ определяется как:

$$\rho(p, x) = \frac{1}{Z} \exp \left[-\frac{H(p, x)}{k_B T} \right], \quad (2)$$

что позволяет рассчитать значение среднего для любой физической величины $A(p, x)$:

$$\begin{aligned} \langle A \rangle &= \int \rho(p, x) A(p, x) dp dx = \\ &= \frac{1}{Z} \int \exp \left[-\frac{H(p, x)}{k_B T} \right] A(p, x) dp dx. \end{aligned} \quad (3)$$

Процессы перехода из одного состояния A в другое достаточно близкое состояние $B \approx A$ описываются значением относительной свободной энергии ΔF :

$\Delta F = F(B) - F(A) = -k_B T (\ln Z(B) - \ln Z(A))$, (4) где гамильтонианы $H(A)$ и $H(B)$ близких состояний A и B , входящие в статсуммы $Z(A)$ и $Z(B)$, непрерывным образом связываются друг с другом путем введения параметра λ , например, по такому соотношению:

$$H(A, B; \lambda) = (1 - \lambda)H(A) + \lambda H(B). \quad (5)$$

Введенный таким образом гамильтониан $H(\lambda) = H(A, B; \lambda)$ при $\lambda = 0$ совпадает с гамильтонианом системы A , а при $\lambda = 1$ совпадает с гамильтонианом системы B ; во всех промежуточных точках он соответствует некоторому физически нереализуемому (виртуальному) состоянию, являющемуся «смесью» состояний A и B .

Изменение свободной энергии $\delta F(\lambda)$ для «смешанной» системы при ее переходе из состояния λ в состояние $\lambda + \delta\lambda$ определяется соотношением:

$$\begin{aligned} \delta F &= \frac{dF}{d\lambda} \delta\lambda = -k_B T \delta\lambda \frac{d}{d\lambda} \ln Z = \\ &= \frac{\delta\lambda}{Z} \int \frac{dH}{d\lambda} \exp \left[-\frac{H}{k_B T} \right] = \left\langle \frac{dH}{d\lambda} \right\rangle \delta\lambda. \end{aligned} \quad (6)$$

Полное приращение свободной энергии ΔF между состояниями A и B выражается через сумму L приращений всех промежуточных переходов (поскольку свободная энергия является функцией состояния и не зависит от пути интегрирования):

$$\Delta F = \sum_{j=1}^{L-1} \Delta F(\lambda_j \rightarrow \lambda_{j+1}) = \int_0^1 \left\langle \frac{dH}{d\lambda} \right\rangle \delta\lambda. \quad (7)$$

Полученная формула является основной для метода термодинамического интегрирования (TI) (Kirkwood, 1935). Существуют различные

модификации рассмотренного подхода, например Free Energy Perturbation (Zwanzig, 1954) (FEP) и Bennett's Acceptance Ratio (Bennett, 1976) (BAR).

2. λ -потенциалы

В программном комплексе MOLKERN с каждой частицей i связано некоторое значение коэффициента λ_i как параметра силового поля, аналогичного таким параметрам, как масса m_i , заряд q_i , радиус ван-дер-ваальсового взаимодействия σ_i и силы этого взаимодействия ε_i , и определены правила комбинирования параметров $\lambda_i, \lambda_j, \dots, \lambda_n$ для взаимодействующих частиц i, j, \dots, n в виде произведения $\lambda_{ij\dots n} = \lambda_i \lambda_j \dots \lambda_n$. Для частиц, которые не являются виртуальными, т. е. которые не появляются и не исчезают в процессе динамики, значения параметра λ всегда равно 1.

Несвязующие парные (кулоновский и Ван-дер-Ваальса) потенциалы определены следующим образом:

$$V_{coul}(r_{ij}) = \frac{q_i \lambda_i q_j \lambda_j}{r_{ij}}; \quad (8)$$

$$V_{vdw}(r_{ij}) = 4\varepsilon_{ij} \lambda_i \lambda_j \left[\left(\frac{\sigma_{ij} \lambda_i \lambda_j}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij} \lambda_i \lambda_j}{r_{ij}} \right)^6 \right], \quad (9)$$

т. е. зависимость от параметров λ_i и λ_j для атомов i и j введена в параметры потенциалов как $q_i(\lambda) = q_i \lambda_i$, $\sigma_{ij}(\lambda) = \lambda_i \lambda_j \sigma_{ij}$ и $\varepsilon_{ij}(\lambda) = \lambda_i \lambda_j \varepsilon_{ij}$, где q_i и q_j – заряды атомов i и j , ε_{ij} и σ_{ij} – стандартные параметры силового поля, определяемые в соответствии с правилами комбинирования в используемом силовом поле, например, для AMBER по правилам $\varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j}$ и $\sigma_{ij} = (\sigma_i + \sigma_j)/2$.

Связующие потенциалы валентных связей $V_b(r, \lambda)$, валентных $V_a(\alpha, \lambda)$ и двугранных $V_t(\varphi, \lambda)$ углов и зависимость кинетической энергии $K_i(\lambda)$ атома i от λ определены следующим образом:

$$V_b(r, \lambda) = \lambda_i \lambda_j k_{ij} (r - r_0)^2 / 2; \quad (10)$$

$$V_a(\alpha, \lambda) = \lambda_i \lambda_j \lambda_k k_{ijk} (\alpha_{ijk} - \alpha_0)^2 / 2; \quad (11)$$

$$V_t(\varphi, \lambda) = \lambda_i \lambda_j \lambda_k \lambda_l \sum_m v_m (1 + \cos(\varphi_{nm} - \varphi_0)); \quad (12)$$

$$K_i(\lambda) = \frac{\lambda_i m_i V_i^2}{2}, \quad (13)$$

где $\lambda_i, \lambda_j, \lambda_k, \lambda_l$ – параметры λ для атомов, формирующих соответствующую связь, валентный или двугранный угол.

3. Точность вычислений в λ -динамике

Точность вычислений разностей свободных энергий между состояниями А и В системы, главным образом, зависит от величины отбрасываемого члена второго порядка $d^2H(\lambda)/d\lambda^2$ в разложении гамильтониана $H(\lambda)$ и может быть оценена следующим образом.

Из формального определения свободной энергии $F(\lambda)$ для промежуточного состояния λ расширенного термодинамического ансамбля:

$$F(\lambda) = -kT \ln Z(\lambda), \quad (14)$$

где $Z(\lambda)$ – статистическая сумма заданной системы по всем ее состояниям, k – константа Больцмана, T – абсолютная температура, следует, что разность свободных энергий $\delta F(\lambda) = F(\lambda + \delta\lambda) - F(\lambda)$ между двумя близкими состояниями, задаваемыми гамильтонианами $H(\lambda)$ и $H(\lambda + \delta\lambda)$, равна:

$$\delta F(\lambda) = F(\lambda + \delta\lambda) - F(\lambda) = -kT \ln \frac{Z(\lambda + \delta\lambda)}{Z(\lambda)}. \quad (15)$$

Подставив в данную формулу определение статистической суммы

$$Z(\lambda) = \iint \exp\left[-\frac{H(\lambda)}{kT}\right] dpdx \quad (16)$$

и разложив гамильтониан H в точке $\lambda + \delta\lambda$ до членов второго порядка

$$H(\lambda + \delta\lambda) = H(\lambda) + \frac{dH}{d\lambda} \delta\lambda + \frac{1}{2} \frac{d^2H}{d\lambda^2} \delta\lambda^2 + o(\delta\lambda^3), \quad (17)$$

получим:

$$\begin{aligned} \delta F(\lambda) &= -kT \ln \left[\frac{\iint \exp\left[-\frac{H(\lambda + \delta\lambda)}{kT}\right] dpdx}{\iint \exp\left[-\frac{H(\lambda)}{kT}\right] dpdx} \right] \approx \\ &\approx -kT \ln \left[1 - \frac{\delta\lambda}{kT} \left\langle \frac{dH}{d\lambda} \right\rangle + \frac{1}{2} \left(\frac{\delta\lambda}{kT} \right)^2 \left[\left\langle \left(\frac{dH}{d\lambda} \right)^2 \right\rangle - kT \left\langle \frac{d^2H}{d\lambda^2} \right\rangle \right] \right] \approx \\ &\approx \delta\lambda \left\langle \frac{dH}{d\lambda} \right\rangle + \frac{\delta\lambda^2}{2} \left[\left\langle \frac{d^2H}{d\lambda^2} \right\rangle - \frac{1}{kT} \left[\left\langle \left(\frac{dH}{d\lambda} \right)^2 \right\rangle - \left\langle \frac{dH}{d\lambda} \right\rangle^2 \right] \right], \quad (18) \end{aligned}$$

где величина в угловых скобках $\langle \dots \rangle$ означает усреднение по ансамблю, а последний переход от $\ln(1 - \delta) \approx -\delta$ обусловлен малостью величины δ . Точность расчетов δF определяется членом при $\delta\lambda^2$ в полученном выражении.

4. Net-Q метод учета изменения заряда

Эффективные методы для динамической оценки зарядового перераспределения в зависимости от геометрии локального окружения базируются на принципе выравнивания электроотрицательности атомов при образовании молекулы (Sanderson, 1951), при этом атомные заряды трактуются как количество заряда, переместившегося от менее электроотрицательных атомов к более электроотрицательным. Данный принцип используется в методах ЕЕМ (electronegativity equalization method) (Mortier *et al.*, 1986), fluc-q (dynamical fluctuating charge model) (Rick *et al.*, 1994), CPE (chemical poten-

tial equalization) (York *et al.*, 1996), QEq (charge equilibration) (Rappe *et al.*, 1991) и ряде других (Zhu *et al.*, 1991; Bayly *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2000; Oliferenko *et al.*, 2001).

В программном комплексе MOLKERN реализован оригинальный метод расчетов зарядового распределения, называемый Net-Q методом, основанный на минимизации энергии электростатического поля при ограничениях, связанных с уравниванием электроотрицательностей атомов и сохранением полного заряда молекул. Движение заряда в методе разрешено только вдоль ребер графа, представляющего молекулярную систему, тем самым автоматически вводятся ограничения на дви-

жения заряда согласно требованиям модели QTRIE (Morales *et al.*, 2001) (коррекция асимптотического поведения распределения зарядов при удлинении расстояния между атомами) и обеспечивается линейная вычислительная сложность $O(N)$ вычислений. Для обеспечения динамики заряда в методе Net-Q используется подход расширенного ансамбля, аналогичный подходу flux-q.

Модельный гамильтониан зарядовой подсистемы Net-Q метода определен в виде:

$$H(\mathbf{p}, \mathbf{q}) = \frac{1}{2} \sum_k M_k f_k(r_{ij}) I_k^2 + \sum_i \left[\tilde{\chi}_i q_i + \frac{1}{2} \eta_i q_i^2 \right] + \sum_{ij} J_{ij}(r_{ij}) q_i q_j, \quad (19)$$

где I_k – ток, протекающий по связи k между атомами i и j ; $M_k(r_{ij})$ – фиктивная «масса» тока I_k ; $f_k(r_{ij})$ – функция, ограничивающая перенос заряда, $\tilde{\chi}_i = \sum_j f_k(r_{ij})(\chi_i^0 - \chi_j^0)$ – модифицированная согласно Chen с соавт. (2007) электроотрицательность атома.

Модель определена на графе $G = (V, E)$, представляющем молекулярную систему, где V – множество атомов системы, E – множество пар атомов, между которыми разрешен перенос заряда (например, все пары атомов, соединенных химической связью), и ограничена следующими требованиями:

1. Разрешены токи I_k только по ребрам графа G , что позволяет существенно сократить число переменных I_k . Число элементарных токов N_I связано с числом зарядов N_q соотношением: $N_I = N_q - 1 + N_{cycle}$, где N_{cycle} – число простых циклов (например, ароматических колец) в системе.

2. Используется правило Кирхгофа $\sum_{cycle} I_i = 0$ для замкнутых циклов тока в графе G , что обусловлено необходимостью учета в методе ароматических колец молекул.

3. Обеспечено сохранение полного заряда в любом замкнутом подграфе (например, для любой молекулы, входящей в систему), т. е. $\sum_i q_i = 0$.

Гамильтониан зарядовой подсистемы Net-Q метода в канонической форме выглядит следующим образом:

$$H(\mathbf{P}, \mathbf{Q}) = \frac{1}{2} \mathbf{P} \mathbf{A} \tilde{\mathbf{M}}^{-1} \mathbf{A}^T \mathbf{P} + (\tilde{\boldsymbol{\chi}}, \mathbf{Q}) + \frac{1}{2} \mathbf{Q}^T \mathbf{J} \mathbf{Q}, \quad (20)$$

где $\mathbf{Q} = \{q_1, q_2, \dots, q_n\}$ и $\mathbf{P} = \{p_1, p_2, \dots, p_n\}$ – вектора зарядов и импульсов их движения, $\tilde{\mathbf{M}} = \mathbf{f}(\mathbf{r}_{ij}) \cdot \text{diag}\{m_1, m_2, \dots, m_n\}$ – диагональная матрица «масс» токов, \mathbf{A} – топологическая матрица графа молекулы, \mathbf{J} – матрица взаимодействий зарядов. Из гамильтониана следуют уравнения движения зарядовой подсистемы:

$$\dot{\mathbf{Q}} = \frac{\delta H}{\delta \mathbf{P}} = \mathbf{A} \tilde{\mathbf{M}}^{-1} \mathbf{A}^T \mathbf{P}, \quad (21)$$

$$\dot{\mathbf{P}} = \frac{\delta H}{\delta \mathbf{Q}} = -\{\tilde{\boldsymbol{\chi}} + \mathbf{J} \mathbf{Q}\}. \quad (22)$$

Поскольку полученные уравнения движения включают топологическую матрицу молекулярной системы \mathbf{A} , которая не требует обращения и является редкой, а матрица взаимодействий ограничена радиусом обрезания r_{cutoff} , то вычислительная сложность метода является линейной. Использование матрицы \mathbf{A} означает наличие принудительных запретов на перенос заряда между теми атомами, для которых соответствующий элемент матрицы \mathbf{A} равен нулю. Таким образом, матрица \mathbf{A} дает возможность компромисса между эффективностью расчетов и детальностью описания процессов переноса заряда. Ненулевые элементы матрицы \mathbf{A} разрешают перенос заряда по соответствующим связям, и ограничение переноса в этом случае, т. е. если длина связи превышает среднюю длину химической связи, выполняется функцией ограничения $f_k(r_{ij})$.

Литература

- Серов А.Е., Одинцева Е.Р., Упоров И.В., Тишков В.И. Использование карты Рамачандрана для повышения термостабильности бактериальной формиадегидрогеназы // Биохимия. 2005. Т. 70. Вып. 7. С. 974–979.
- Серов А.Е., Тишков В.И. Роль остатков пролина в стабильности прокариотических и эукариотических формиадегидрогенах // Вестник Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2002. Т. 43. № 6. С. 345–349.
- Полянский А.А., Косинский Ю.А., Ефремов Р.Г. Локальные температурные изменения подвижности в молекулах тиоредоксинов влияют на их термостабильные свойства // Биооргани. химия. 2004. Т. 30. № 5. С. 470–480.
- Фомин Э.С., Алемасов Н.А., Чирцов А.С., Фомин А.Э. Библиотека программных компонент MOKKERN для построения программ молекулярного моделирования // Биофизика. 2006. Т. 51. Вып. 7. С. 110–113.
- Bartels C., Schaefer M., Karplus M. Determination of equilibrium properties of biomolecular systems using multidimensional adaptive umbrella sampling // J. Chem. Phys. 1999. V. 111. No. 17. P. 8048–8068.

- Bash P.A., Singh U.C., Brown F.K. Calculation of the relative change in binding free energy of a protein inhibitor complex // *Science*. 1987. V. 235. No. 4788. P. 574–576.
- Bayly C.I., Cieplak P., Cornell W.D., Kollman P.A. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for determining atom-centered charges: The RESP model // *J. Phys. Chem.* 1993. V. 97. P. 10269–10280.
- Bennett C.H. Efficient estimation of free energy differences from Monte Carlo data // *J. Comput. Phys.* 1976. V. 22. No. 2. P. 245–268.
- Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., DiNola A., Haak J.R. Molecular dynamics with coupling to an external bath // *J. Chem. Phys.* 1984. V. 81. P. 3684–3690.
- Beutler T.C., Mark A.E., van Schaik R.C. *et al.* Avoiding singularities and numerical instabilities in free energy calculations based on molecular simulations // *Chem. Phys. Lett.* 1994. V. 222. No. 6. P. 529–539.
- Boczko E.M., Brooks C.L. First-principles calculation of the folding free energy of a three-helix bundle protein // *Science*. 1995. V. 269. No. 5222. P. 393–396.
- Buckle A.M., Henrick K., Fersht A.R. Crystal structural analysis of mutations in the hydrophobic cores of barnase // *J. Mol. Biol.* 1993. V. 234. No. 3. P. 847–860.
- Bycroft M., Matouschek A., Kellis J.T. Jr. *et al.* Detection and characterization of a folding intermediate in barnase by NMR // *Nature*. 1990. V. 346. No. 6283. P. 488–490.
- Chen B., Potoff J.J., Siepmann J.I. Adiabatic nuclear and electronic sampling Monte Carlo simulations in the gibbs ensemble: Application to polarizable force fields for water // *J. Phys. Chem. B*. 2000. V. 104. P. 2378–2390.
- Chen J., Martinez T.J. QTPIE: Charge transfer with polarization current equalization. A fluctuation charge model with correct asymptotics // *Chem. Phys. Lett.* 2007. V. 463. P. 315–320.
- Clarke J., Fersht A.R. Engineered disulfide bonds as probes of the folding pathway of barnase: Increasing the stability of proteins against the rate of denaturation // *Biochemistry*. 1993. V. 32. No. 16. P. 4322–4329.
- Dang L.X., Merz K.M. Jr., Kollman P.A. Free energy calculations on protein stability: Thr-157 → Val-157 mutation of T4 lysozyme // *J. Amer. Chem. Soc.* 1989. V. 111. No. 22. P. 8505–8508.
- Fersht A.R., Daggett V. Protein folding and unfolding at atomic resolution // *Cell*. 2002. V. 108. No. 4. P. 573–582.
- Fomin E.S. Consideration of data load time on modern processors for the verlet table and linked cell algorithms // *J. Comput. Chem.* 2011. V. 32. No. 7. P. 1386–1399.
- Gilisa D., Rooman M. Stability changes upon mutation of solvent-accessible residues in proteins evaluated by database-derived potentials // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 257. No. 5. P. 1112–1126.
- Hartley R.W. Barnase and barstar: two small proteins to fold and fit together // *Trends Biochem. Sci.* 1989. V. 14. No. 11. P. 450–454.
- Horovitz A., Matthews J.M., Fersht A.R. α -Helix stability in proteins. II. Factors that influence stability at an internal position // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 227. No. 2. P. 560–568.
- Johnson C.M., Fersht A.R. Protein stability as a function of denaturant concentration: The thermal stability of barnase in the presence of urea // *Biochemistry*. 1995. V. 34. No. 20. P. 6795–6804.
- Kellis J.T. Jr., Nyberg K., Fersht A.R. Energetics of complementary side chain packing in a protein hydrophobic core // *Biochemistry*. 1989. V. 28. No. 11. P. 4914–4922.
- Kirkwood J.G. Statistical mechanics of fluid mixtures // *J. Chem. Phys.* 1935. V. 3/5. P. 300–314.
- Knight J.L., Brooks C.L. III. Lambda-dynamics free energy simulation methods // *J. Comput. Chem.* 2009. V. 30. P. 1692–1700.
- Kollman P. Free energy calculations: Applications to chemical and biochemical phenomena // *Chem. Rev.* 1993. V. 93. No. 7. P. 2395–2417.
- Kumar M.D.S., Bava K.A., Gromiha M.M. *et al.* ProTherm and ProNIT: thermodynamic databases for proteins and protein-nucleic acid interactions // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34 (Database issue). P. D204–D206.
- Lehmann M., Wyss M. Engineering proteins for thermostability: the use of sequence alignments versus rational design and directed evolution // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001. V. 12. P. 371–375.
- Matouschek A., Kellis J.T. Jr., Serrano L., Fersht A.R. Mapping the transition state and pathway of protein folding by protein engineering // *Nature*. 1989. V. 340. No. 6229. P. 122–126.
- Martin C., Richard V., Salem M. *et al.* Refinement and structural analysis of barnase at 1.5 Å resolution // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 1999. V. 55. No. 2. P. 386–398.
- Mehareenna Y.T., Poulos T.L. Using molecular dynamics to probe the structural basis for enhanced stability in thermal stable cytochromes P450 // *Biochemistry*. 2010. V. 49. No. 31. P. 6680–6686.
- Messmer R.P. Cluster Model theory and its application to metal surface – adsorbate system // *The Nature of the Surface Chemical Bond* / Eds T.N. Rhodin, G. Ertl. Amsterdam, Noth-Holland Publ. Co., 1979. P. 51–111.
- Morales J., Martinez T.J. Classical fluctuating charge theories: The maximum entropy valence bond method and relationships to previous models // *J. Phys. Chem.* 2001. V. 105A. P. 2842–2850.
- Mortier W.J., Ghosh S.K., Shankar S.J. Electronegativity-equalization method for the calculation of atomic charges in molecules // *Am. Chem. Soc.* 1986. V. 108. P. 4315–4320.
- Oliferenko A.A., Palyulin V.A., Pisarev S.A. *et al.* Novel point charge models: reliable instruments for molecular electrostatics // *J. Phys. Org. Chem.* 2001. V. 14. P. 355–369.
- Pedersen J.S., Otzen D.E., Kristensen P. Directed evolution of barnase stability using proteolytic selection // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 323. No. 1. P. 115–123.
- Pikkemaat M.G., Linssen A.B., Berendsen H.J., Janssen D.B. Molecular dynamics simulations as a tool for improving protein stability // *Protein Eng.* 2002. V. 15. No. 3. P. 185–192.
- Prevost M., Wodak S.J., Tidor B., Karplus M. Contribution of the hydrophobic effect to protein stability: analysis based on simulations of the Ile-96-Ala mutation in barnase // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. No. 23. P. 10880–10884.
- Puchkaev A.V., Koo L.S., de Montellano P.R.O. Aromatic stacking as a determinant of the thermal stability of CYP119 from *Sulfolobus solfataricus* // *Arch. Biochem. Biophys.* 2003. V. 409. No. 1. P. 52–58.

- Rappe A.K., Goddard W.A. Charge equilibration for molecular dynamics simulations // *J. Phys. Chem.* 1991. V. 95. P. 3358–3363.
- Rick S.W., Stuart S.J., Berne B.J. Dynamical fluctuating charge force fields: Application to liquid water // *J. Chem. Phys.* 1994. V. 101. P. 6141–6156.
- Roux B., Karplus M. Ion transport in a model gramicidin channel. Structure and thermodynamics // *Biophys. J.* 1991. V. 59. No. 5. P. 961–981.
- Sanderson R.T. An interpretation of bond lengths and classification of bonds // *Science*. 1951. V. 114. P. 670–672.
- Seeliger D., de Groot B.L. Protein thermostability calculations using alchemical free energy simulations // *Biophys. J.* 2010. V. 98. No. 10. P. 2309–2316.
- Serrano L., Kellis J.T. Jr., Cann P. *et al.* The folding of an enzyme: II. Substructure of barnase and the contribution of different interactions to protein stability // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 224. No. 3. P. 783–804.
- Simonson T., Archontis G., Karplus M. Free energy simulations come of age: Protein-ligand recognition // *Accounts Chem. Res.* 2002. V. 35. No. 6. P. 430–437.
- Tidor B., Karplus M. Simulation analysis of the stability mutant R96H of T4 lysozyme // *Biochemistry*. 1991. V. 30. No. 13. P. 3217–3228.
- York D.M., Yang W. A chemical potential equalization method for molecular simulations // *J. Chem. Phys.* 1996. V. 104. P. 159–172.
- Zhu S.B., Singh S., Robinson G.W. A new flexible/polarizable water model // *J. Chem. Phys.* 1991. V. 95. P. 2791–2799.
- Zwanzig R.W. High-temperature equation of state by a perturbation method. I. Nonpolar gases // *J. Chem. Phys.* 1954. V. 22. No. 8. P. 1420–1427.

STUDY OF THE THERMAL STABILITY OF BARNASE PROTEIN MUTANTS WITH MOLKERN SOFTWARE

E.S. Fomin, N.A. Alemasov

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

Summary

A thermal stability study of several barnase mutants has been carried out by the λ dynamics method. The method has been implemented in the MOLKERN software package. Mutations of amino acids with non-zero charge are chosen for the study, because in this case λ dynamics gives results differing dramatically (> 10 kJ/mol) from experimental data in nearly one-fourth of cases. A new modification of λ potentials is proposed, which takes into account charge changes, as well as the Net-Q method, in order to obtain reliable charge distributions for charged amino acids. The results obtained for the R72G mutation show a better agreement with experimental values than the results of other authors.

Keywords: barnase, molecular dynamics, λ dynamics, free energy difference, protein thermal stability.

УДК 631.527; 575.22; 575.165

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ЭКСПРЕССНОЙ ОЦЕНКЕ ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ И ГЕНЕТИЧЕСКОЙ (АДДИТИВНОЙ) ДИСПЕРСИЙ СВОЙСТВ ПРОДУКТИВНОСТИ РАСТЕНИЙ

© 2012 г. В.А. Драгавцев, Г.А. Макарова, А.А. Кочетов,
Г.В. Мирская, Н.Г. Синявина

ГНУ Агрофизический научно-исследовательский институт Россельхозакадемии
Санкт-Петербург, Россия, e-mail: dravial@mail.ru

Поступила в редакцию 13 января 2012 г. Принята к публикации 21 марта 2012 г.

Впервые рассмотрены все существующие принципы быстрой оценки генотипической дисперсии, предложены теория и методы экспрессной оценки аддитивной дисперсии для прогнозирования трансгрессий при селекционном улучшении свойств продуктивности растений-самоопылителей.

Ключевые слова: количественные признаки, принципы экспрессной оценки генотипической и аддитивной дисперсий, прогнозы трансгрессий.

Введение

Селекционеру, приступающему к отбору лучших генотипов на ранних этапах селекционного процесса в расщепляющихся популяциях (в F_2 , M_2 или диких популяциях), очень важно знать величину генотипической изменчивости количественного признака продуктивности в данной популяции, т. е. генотипическую дисперсию (V_G). Если растения данного вида в производстве размножаются вегетативно, то знание V_G и наличие у селекционера экспрессных методов идентификации генотипов по фенотипам отдельных растений популяции F_2 уже гарантируют успешную селекцию. Если селекционер ведет селекцию растений-самоопылителей (например пшеница, ячмень, овес, томат и др.), которые размножаются семенами, то ему необходимо знать еще и величину генетической (аддитивной) изменчивости признака (V_A).

Из количественной генетики известно, что $V_{Ph} = V_G + V_E$, где V_{Ph} – фенотипическая дисперсия признака, видимая в популяции и легко оцениваемая по изменчивости фенотипических значений особей популяции; V_G – генотипическая дисперсия, имеющая следующую структуру: $V_G = V_A + V_D + V_I$, где V_A – генетическая (аддитивная) дисперсия, определяемая варьировани-

ем аддитивных вкладов полигенов в признак; V_D – дисперсия доминантных вкладов полигенов в признак и V_I – дисперсия эпистатических вкладов полигенов в признак. V_E – экологическая дисперсия признака, вызываемая различиями индивидуальных условий роста каждого растения в популяции (Falconer, 1961).

Если V_A близка по величине V_G и коэффициент наследуемости в узком смысле слова $h^2 = V_A/V_{Ph}$ достаточно высок (например, больше 0,4 для пшеницы) и близок по величине к коэффициенту наследуемости в широком смысле слова: $H^2 = V_G/V_{Ph}$, то отбор по плюсовым генотипическим отклонениям (при наличии надежных методов идентификации генотипов по их фенотипам) даст хороший селекционный сдвиг признака. Если h^2 низок, а H^2 высок, значит V_A много меньше V_G , т. е. аддитивная генетическая изменчивость низкая, и отбор не даст почти никакого генетического улучшения признака. В этом случае высокая V_G обусловлена неаддитивным разнообразием ($V_D + V_I$) и селекционный успех для данного вида может быть достигнут только на базе технологий гетерозисной селекции.

Если оба коэффициента (h^2 и H^2) низки, то ни отбор, ни гетерозисная селекция не приведут к генетическому улучшению признака. В этом

случае необходимо увеличить V_G и V_A искусственно (дальнейшая гибридизация, включая отдаленную, мутагенез, методы клеточной и генной инженерии и т. п.).

Информацию об уровнях V_G и V_A для научного управления селекционным процессом селекционер должен иметь перед проведением отборов в F_2 , т. е. ее необходимо получать экспрессно (без смены поколений).

В настоящее время для быстрой (экспрессной) оценки V_G селекционного признака существуют следующие подходы:

1. Принцип идеального выравнивания фона выращивания расщепляющейся популяции (Матвеев, 1966).

2. Принцип эталонов – сравнение изменчивости в популяции с изменчивостью в клонах или чистых линиях, полученных из этой популяции (Falconer, 1961).

3. Принцип Шриханди (Shrikhande, 1957; Sakai, Hatakeyama, 1963; Sakai, Mukaide, 1967).

4. Принцип фоновых признаков (Драгавцев, 1961, 1963, 1966, 2008; Драгавцев, Острикова, 1972; Драгавцев и др., 1981).

5. Принцип разнонаправленности эффектов 7 генетико-физиологических систем в двумерных признаковых координатах (Драгавцев, 1994, 2008).

Методы оценки V_G , основанные на последних трех принципах, наименее трудоемки (не требуют больших затрат сил и средств на идеальное выравнивание фона выращивания и создание эталонов). К сожалению, принцип Шриханди дает существенные ошибки при оценках V_G . Наименее затратную и наиболее надежную оценку V_G дают принципы 4 и 5 (Литун, 1982; Гронин, 2007).

Однако, имея только величину V_G и не зная величины V_A , селекционер не может выбрать верную стратегию работы с популяцией F_2 растений-самоопылителей, размножаемых семенами. Селекционер должен иметь адекватную оценку V_A признаков еще на этапе подбора родителей для суждения о вероятности возникновения трансгрессий в F_2 и для прогноза селекционного сдвига признака.

Все существующие в количественной генетике принципы оценки V_A (по ковариансе родитель–потомок: $COV_{PO} = 1/2 V_A$ и по ковариансе полусибов: $COV_{HS} = 1/4 V_A$) требуют

трудоемкого и обязательно связанного со сменой поколений эксперимента (Mather, 1964; Никоро, Васильева, 1974), при этом информация о величине V_A поступает к селекционеру с запозданием на год и более. Поэтому поиск возможностей экспрессной оценки V_A имеет огромной важности методическое и практическое значение.

Теория вопроса

При сопоставлении понятия «аддитивность» по Р. Фишеру (Fisher, 1918), широко используемого в количественной генетике, и понятия «аддитивность» в общем смысле, широко используемого в химии (Хит, 1972), обнаруживаются их принципиальные различия. Рассмотрим эти различия на простых моделях. На рис. 1 даны траектории онтогенеза по уровню количественного признака четырех абстрактных генотипов (1–4). Условно назовем эту совокупность генотипов популяцией. Рассечем эту популяцию в момент времени t_i . Если $V_G = V_A$, то гибриды $F_1(1 \times 2)$, $F_1(2 \times 3)$, $F_1(3 \times 4)$ должны занять промежуточное положение между родителями. Это значит, что аддитивная дисперсия, по Р. Фишеру, выражает изменчивость основных вкладов генов в признак в один момент времени и совершенно не выходит во временной градиент.

В химии и физиологии существует иное («нефишеровское») понятие аддитивности (Хит, 1972). В соответствии с ним, если, напри-

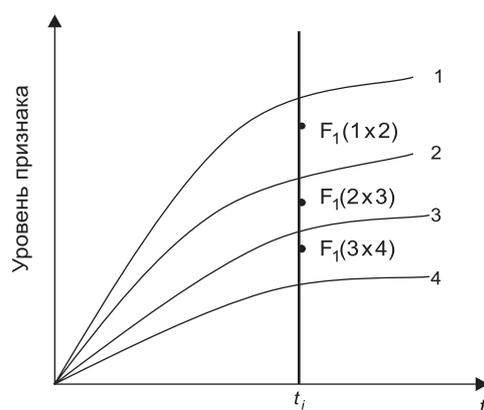


Рис. 1. Временные траектории генотипов, генотипические значения (уровни) признака и аддитивность, по Р. Фишеру, в момент времени t_i .

мер, некий фактор вносит аддитивный вклад в сложный многофакторный процесс, изображаемый некоторой кривой, то изъятие этого фактора сдвинет кривую процесса параллельно самой себе на величину аддитивного вклада фактора, т. е. процесс в присутствии аддитивного фактора будет симилярен процессу без этого фактора (рис. 2).

Применим это понятие аддитивности, по О. Хиту, к развитию количественного признака растения. Будем рассматривать количественный признак растения как сложный пул биохимических процессов любого типа: цепных, разветвленных, кольцевых и т. п. Пусть в этом пуле возникла мутация с отрицательным аддитивным вкладом, т. е. вкладом, снижающим уровень признака, но не вносящим никаких возмущений в остальной пул биохимических процессов. Тогда в метрической шкале динамика роста мутанта будет выглядеть так же, как нижний луч на рис. 3, так как вклад мутации в признак растёт по мере роста признака, т. е. обычно он мультипликативен. В логарифмической шкале траектории роста признака двух растений – исходного генотипа и генотипа, несущего мутацию с аддитивным вкладом в признак, – должны быть параллельны (если траектории – прямые линии) или симилярны (если траектории – кривые линии).

Если аддитивность по Р. Фишеру связана с аддитивностью по О. Хиту мы ожидаем обнаружить высокую положительную корреляцию между уровнем аддитивной дисперсии коли-

чественного признака и мерой симилярности его реакций у разных генотипов во временном или экологическом градиентах, на которых выращивается модельная популяция.

Если такая корреляция обнаружится, мы вправе ставить вопрос о срочной разработке метода экспрессной оценки аддитивной дисперсии (V_A), что существенно ускорит селекционный процесс и даст возможность прогнозировать появление трансгрессий в F_2 , анализируя степень симилярности реакции сортов (набор сортов – это модель популяции F_2) в коллекционном питомнике селекцентра и подбирая оптимальные пары родителей до проведения скрещиваний (т. е. оценивать V_A без смены поколений).

Получены факты наличия таких высоких положительных корреляций на очень большом экспериментальном материале кооперативной межведомственной программы ДИАС – около 5 млн замеров количественных признаков (Драгавцев, Аверьянова, 1979; Драгавцев и др., 1984б).

Обнаруженная нами связь между аддитивностью, по Р. Фишеру (т. е. аддитивностью в ряду поколений), и аддитивностью реагирования в градиенте лим-фактора (или временном градиенте) требует биологической интерпретации. Кроме того, лучевой характер реагирования разных генотипов (отличающихся по генам с аддитивными вкладами) в метрической шкале и параллельный (или симилярный) характер их реагирования в логарифмической шкале также требуют биологического объяснения.

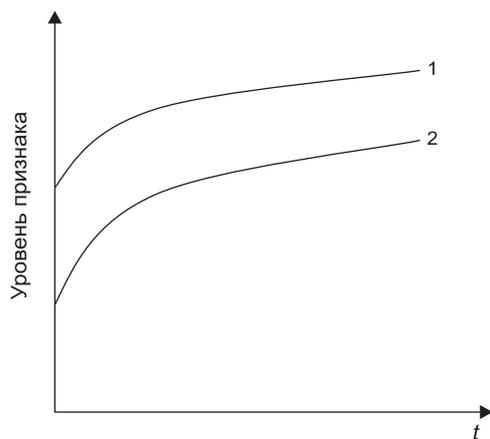


Рис. 2. Траектории нормальной системы (1) и системы без аддитивного фактора (2) во временной шкале (t).

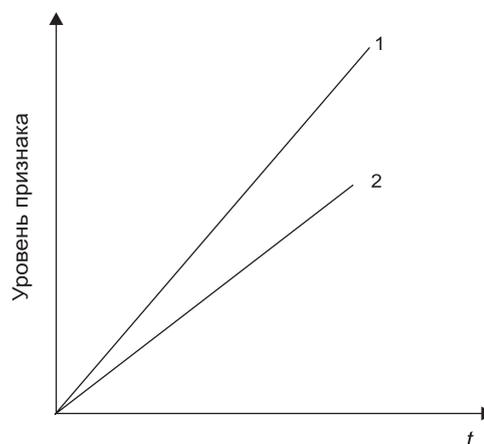


Рис. 3. Динамика роста дикого типа (1) и мутанта с аддитивным отрицательным вкладом мутантного гена (2) в метрической шкале во времени (t).

Мы считаем наиболее логичным следующий механизм этих феноменов.

Для ферментативного продукта каждого аддитивного структурного гена в температурном градиенте существует хорошо известная зависимость: $Q_{10} = (K_2/K_1)/(10/(T_2 - T_1))$ (Паттон, 1968), где Q_{10} – термический коэффициент скорости катализа, K_1 – коэффициент активности энзима при низкой температуре, K_2 – при высокой температуре, T_2 – более высокая температура, T_1 – более низкая.

Известно, что при повышении температуры на 10 °С скорость катализа возрастает примерно в 2 раза. Если вклад мутантного гена в признак при низкой температуре, например, 2, а нормального гена – 4, то при повышении температуры на 10 °С мутантный ген даст вклад $2 \times 2 = 4$, а при нормальной – $2 \times 4 = 8$, т. е. в метрической шкале норма и мутант дадут два луча. В логарифмической шкале эти лучи станут параллельными линиями.

Алгоритм экспрессной оценки V_A для любого компонента продуктивности (или урожая) некоторого набора сортов растений-самоопылителей сводится к следующему: сорта, несущие компоненты продуктивности, которые необходимо объединить в будущем сорте, выращиваются на градиенте (на 3–4 ступенях градиента) того лим-фактора, который более всего «срезает» продуктивность в данной зоне селекции в определенной фазе онтогенеза. Если компоненты реагируют симилярно, значит, в F_2 появятся трансгрессии, объединяющие нужные компоненты на многие годы выращивания нового сорта. По сумме этих компонент можно прогнозировать «прибавку» продуктивности у будущего нового сорта.

Рассмотрим возможности принципа 5 для экспрессной оценки V_A , например, для генетико-физиологических систем адаптивности и аттракции (Драгавцев, 1994).

И.Л. Савинский (1991) показал полную неприменимость алгоритмов диаллельного анализа для получения информации о генетической организации количественных признаков. По мнению Т.И. Аксенович (1999), генетику количественного признака невозможно изучать методами классической генетики по Г. Менделю и методами только молекулярной генетики. Таким образом, в период 1991–1999 гг. было

однозначно доказано отсутствие надежных методов генетического анализа количественных признаков.

Модель эколого-генетической организации количественного признака (МЭГОКП), (Драгавцев и др., 1984а) показала, что попытки изучить некоторую инвариантную («паспортную») генетику количественного признака в разные годы в одной точке и в разных точках в один год – бессмысленны. Конечно, в селекции существуют частные случаи, когда факторы среды из года в год фиксированы (тепличное и оранжерейное растениеводство). Кроме того, если создать алгоритмы типизации лет для разных культур в любой конкретной зоне селекции, то можно воспроизводить этот типичный год в камерах искусственного климата и многократно тиражировать его. Тогда переопределения генетических формул признака в онтогенезе будут многократно воспроизводиться и для данного типичного года генетическая «конструкция» количественного признака будет вполне однозначна.

В отличие от методов собственно «генетического анализа» количественных признаков (Falconer, 1961) и от методов «педигри-анализа» (Ginsburg *et al.*, 2006), мы предлагаем методы эколого-генетической инвентаризации генофонда. Для этого мы изучаем не признаки, а вклады в признак продуктивности каждой из 7 генетико-физиологических систем, с помощью которых селекционеры эмпирически улучшают виды по сложным количественным свойствам продуктивности. Эти генетико-физиологические системы таковы:

1) аттракции, обеспечивающая в период налива перекачку пластических веществ из соломы и листьев в колос (attr);

2) микрораспределений аттрагированных в колос пластических веществ между зерном и мякиной у колосовых или между лузгой и ядром семени у подсолнечника (mic);

3) адаптивности (морозо-, холодо-, засухо-, жаро-, солеустойчивость, устойчивость к рН и т. п. (ad);

4) полигенного (горизонтального) иммунитета (im);

5) «оплаты» единицы лимитирующего фактора почвенного питания (азот, фосфор, калий) (ef);

6) толерантности к загущению (tol);

7) вариабельности периодов онтогенеза (ont), например, у пшеницы принято выделять 12 фаз онтогенеза (по: Куперман, 1984).

Первые 6 систем генетически почти не изучены. Седьмая система более изучена по сравнению с остальными. Ее определяют *Vrn*- и *Ppd*-гены, а также некоторые системы генов адаптивности.

Очевидны два блока задач, стоящих перед исследователями в области МЭГОКП: 1) тщательное эколого-генетическое изучение каждой из 7 генетико-физиологических систем; 2) инвентаризация коллекций генотипов, оценка степени аддитивности «работы» каждой системы, выявление доноров ценных систем, подбор родительских пар для получения трансгрессий.

Для решения селекционных задач более важен второй блок. Имеющийся опыт показал, что и без наличия глубокой генетической информации об «устройстве» каждой системы можно успешно вести селекционный процесс, если найден мощный положительный сдвиг по любой из систем и если этот сдвиг аддитивен в некотором интервале средовых флуктуаций.

Рассмотрим для примера метод генотипической инвентаризации генетико-физиологических систем аттракции и адаптивности. На рис. 4 представлена двумерная система признаковых координат: «масса колоса главного стебля»–«масса соломины главного стебля». Исследователь может модифицировать координаты, например, «масса колосьев с растения»–«масса колосоносных стеблей на растении». Для вычленения фитоценологических эффектов можно работать и в такой системе координат: «масса колосьев с одного квадратного метра»–«масса соломы с одного квадратного метра».

Показано (Дьяков, Драгавцев, 1975; Драгавцев, 1994), что наряду с 7 генетико-физиологическими системами, которые обеспечивают в любой популяции генотипическую изменчивость количественных признаков, в этой же популяции существуют другие виды негенетической и генетической изменчивости (так называемые шумы), мешающие идентификации селекционно ценных генотипических сдвигов характеристик продуктивности и урожая.

Первый шум – экологическая дисперсия (V_E), вызываемая случайной пестротой микроэкологических ниш существования каждого растения. Если некоторое растение популяции попало в ямку с более влажной почвой, то у него увеличатся оба признака – «масса колоса» и «масса соломины», т. е. точка этого растения на графике сдвинется вправо и вверх. Если другое растение попало на сухой бугорок, то у него уменьшатся показатели обоих признаков и его точка на графике сместится влево и вниз. Таким образом, экологический шум обеспечивает в координатах на рис. 4 движение точек вдоль положительной линии регрессии, т. е. коварианса (взаимная изменчивость признаков), вызванная этим шумом, будет положительной ($COV_E +$).

Второй шум – дисперсия генотипической конкуренции (V_{com}), вызываемая разной генотипической агрессивностью растений. Если средовые микрониши одинаковы, но один генотип в популяции F_2 обладает способностью быстро расширять в стороны корневую систему и захватывать больший объем почвы, то тем самым он отбирает объем почвенного питания у соседа и, увеличивая свою массу, уменьшает массу соседа. Этот шум также порождает положительную ковариансу ($COV_{G_{com}} +$), так как агрессор будет увеличивать оба признака

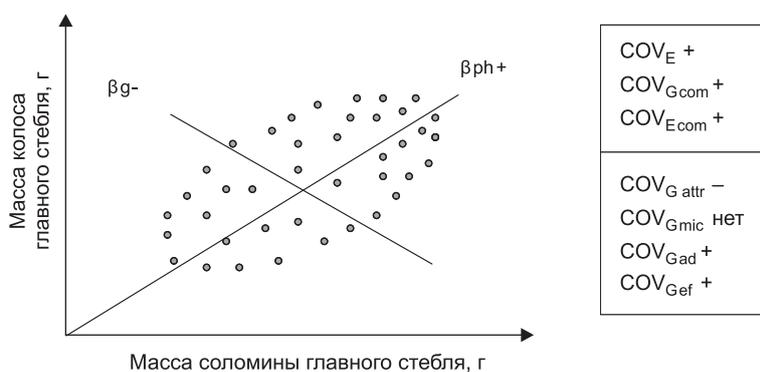


Рис. 4. Распределение отдельных растений расщепляющейся популяции F_2 пшеницы в двумерной системе признаковых координат.

одновременно, а слабый конкурент будет оба признака уменьшать.

Третий шум – дисперсия негенотипической (стартовой) конкуренции ($V_{E\ com}$), вызываемая в одинаковых экологических микронизах и между одинаковыми генотипами конкуренцией, возникшей за счет неодинаковых условий стартового роста семян (разная глубина заделки, разная ориентация семян в почве). Этот шум также вызывает положительную ковариансу между координатными признаками ($COV_{E\ com}^+$).

Не будем рассматривать здесь эколого-онтогенетический шум ($V_{E\ ont}$), который встречается не столь часто в реальных селекционных ситуациях.

Перейдем к рассмотрению коварианс, вызываемых селекционно значимыми компонентами генотипической изменчивости.

Генотипическое разнообразие по аттракции ($V_{G\ attr}$) индуцирует отрицательную ковариансу ($COV_{G\ attr}^-$), поскольку пластические вещества, «высасываемые» из соломины, переходят в колос. В системе координат на рис. 4 существует лишь одна причина, вызывающая отрицательную ковариансу признаков – это генотипическая изменчивость аттракции.

Генотипическое разнообразие по микро-распределениям аттрагированной «пластики» ($COV_{G\ mic}$). Это разнообразие вообще не проявляется в данной системе координат, поскольку колос взвешивается целиком, без разграничений на массу зерен и массу мякоти ($COV_{G\ mic}$ отсутствует).

Генотипическое разнообразие по системам адаптивности ($V_{G\ ad}$) вызывается теми генами адаптивности, которые «выходят» на оба признака на соответствующем провокаци-

онном фоне (засуха, холод, жара, засоление и т. п.). Однако можно организовать работу и без создания специального провокационного фона, тогда понятие «адаптивность» будет относиться просто к данному году и данному полю. Если эксперимент заложен в типичный для данной зоны и данного растения год, то генотипические сдвиги по адаптивности имеют прямое селекционное значение. Любые генотипические системы адаптивности вызывают положительную ковариансу ($COV_{G\ ad}^+$), поскольку повышенная адаптивность одновременно увеличивает оба признака.

Генотипическое разнообразие по системам эффективности «оплаты» лимитирующего фактора почвенного питания ($V_{G\ ef}$). Варьирование этой генетико-физиологической системы на фоне недостатка азота или фосфора (калия) вызывает положительную ковариансу между координатными признаками ($COV_{G\ ef}^+$). На рис. 4 в правом столбце компактно приведены все рассмотренные нами ковариансы. Для сокращения изложения опустим рассмотрение 6-й и 7-й систем – tol и ont , так как они ведут себя точно так же, как описанные системы.

Теперь рассмотрим, что произойдет с ковариансами, если на график будут нанесены не точки индивидуальных растений популяции F_2 , а средние величины делянок каждого сорта (рабочие коллекции селекционеров, коллекции генофонда ВИР и т. п.).

На рис. 5 показано преобразование общей картины коварианс по сравнению с рис. 4. COV_E исчезает, поскольку при усреднении признаков по 50–100 растениям элиминируются все отклонения, вызванные вариациями микрониз под каждым растением. $COV_{G\ com}$ тоже исчезает, поскольку при усреднении

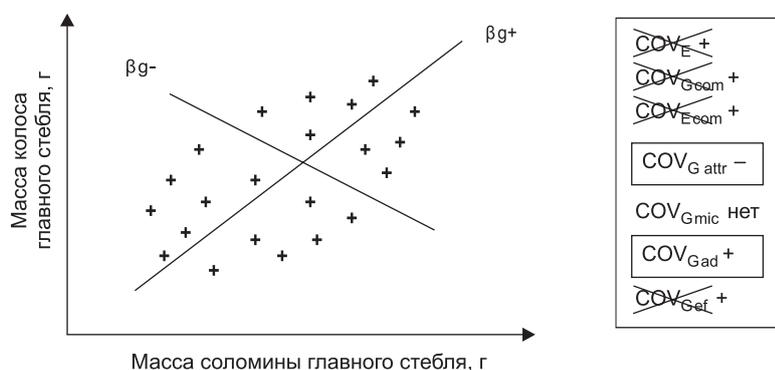


Рис. 5. Распределение средних значений сортов коллекционного питомника в двухмерной системе признаковых координат.

признаков все отклонения, вызванные генами конкурентоспособности, элиминируются. По тем же причинам исчезает $COV_{E\ com}$, $COV_{G\ attr}$ остается (с отрицательным знаком), $COV_{G\ mic}$ отсутствует изначально. Если мы внесли на делянки достаточные дозы N, P, K, то исчезает и $COV_{G\ ef}$.

Таким образом, при нанесении на график средних значений признаков сортов мы оставляем на графике всего две генетические причины изменчивости: разнообразие полигенов адаптивности «растягивает» эллипс корреляции по положительной линии регрессии, разнообразие полигенов аттракции – по отрицательной. Если по генам аттракции между сортами нет генотипических различий, то все точки средних значений признаков сортов лягут точно на положительную линию регрессии, если генотипические различия по генам аттракции есть, но их нет по генам адаптивности, то все точки средних значений признаков сортов лягут на отрицательную линию регрессии.

Если генотипическая изменчивость адаптивности сортов (по амплитуде) больше изменчивости по аттракции, мы получим на графике эллипс, вытянутый по положительной линии регрессии. Если изменчивость по системам аттракции больше, чем по системам адаптивности, эллипс вытянется по отрицательной линии регрессии. Если амплитуды изменчивости сортов по адаптивности и аттракции одинаковы, то эллипс превратится в круг, т. е. корреляция между массой колоса и массой соломины в таком наборе сортов станет равна нулю.

Можно видеть, что эта корреляция не определяется какими-либо биологическими механизмами, например, перераспределениями пластических веществ между органами (компенсационные отрицательные корреляции) или действием адаптивных полигенов на оба признака. Эта корреляция является ложной и зависит только от соотношений размахов изменчивости по генам адаптивности и аттракции. В случае если в наборе сортов эти размахи одинаковы, корреляция исчезает. Если же эта корреляция между координатными признаками высока (положительная или отрицательная), то ни в коем случае нельзя делать вывод о том, что, отбирая лучшие по адаптивности генотипы, мы будем параллельно генетически улучшать аттракцию.

Рассмотрим вопрос: под каким углом на графике должны располагаться линии регрессии? Если масса колоса равна массе соломины, то положительная линия регрессии пойдет под углом в 45 °С. Если соломина превышает по массе колос, то положительная линия регрессии будет наклоняться к оси абсцисс соответственно этому превышению. Линия отрицательной регрессии не может идти круче, чем под углом 45 °С. Такой угол будет обеспечен лишь в случае если процесс аттракции идет без затрат энергии, т. е. когда один грамм пластических веществ из соломы перешел в колос полностью сохраненным. В реальности процесс аттракции всегда идет с затратами энергии, так что от единицы пластики, «вышедшей» из соломины, до колоса доходит только часть этой единицы. Таким образом, чем сильнее отрицательная линия регрессии отклоняется от угла 45 °С к оси абсцисс, тем энергетически менее эффективно работают системы аттракции у данного набора сортов.

Можно видеть, что положительная и отрицательная линии регрессии могут быть ортогональны (перпендикулярны) друг другу только в теоретическом случае, когда обе они идут под углом к абсциссе в 45 °С.

В реальных ситуациях они пересекаются под углом, меньшим, чем 90 °С, а по отношению к оси абсцисс идут под углом, меньшим, чем 45 °С.

Рассмотрим вопрос: можно ли из графика на рис. 5 получить информацию о генетической связи между генами аттракции и генами адаптивности?

Нами предложен новый метод экспрессной оценки генотипической связи между системами аттракции и адаптивности (или любыми другими). Он основан на том факте, что экологическая линия регрессии координатных признаков отражает истинную (эталонную) реакцию двух признаков на улучшение или ухудшение условий роста данного генотипа. Каждая точка на графике есть генотипическое выражение средних величин двух признаков, рассчитанных по 50–100 растениям одного сорта. Для каждой точки графика рассчитываем свою экологическую регрессию (по 50–100 парным замерам признаков внутри каждого сорта). Затем усредняем все экологические регрессии

по правилам усреднения регрессий: отдельно усредняем числители (ковариансы) и отдельно знаменатели (дисперсии), затем, разделив усредненный числитель на усредненный знаменатель, получаем среднюю экологическую регрессию. Проведем эту линию регрессии через среднюю точку графика, которая уже получена нами при расчетах генотипической регрессии, и посмотрим, в какой степени накладываются линии генотипической и средней экологической регрессий друг на друга.

Если данные линии полностью совпадают, то это говорит о том, что между генетическими системами аттракции и адаптивности нет никакой связи, они обе работают совершенно независимо. Если генотипическая регрессия «наклонилась» по часовой стрелке вниз, то это означает, что «хорошие» полигены адаптивности генетически связаны с «плохими» полигенами аттракции, а «плохие» полигены адаптивности связаны с «хорошими» полигенами аттракции. Если генотипическая линия регрессии повернулась против часовой стрелки (вверх правой частью), то это означает, что с «хорошими» полигенами адаптивности генетически связаны «хорошие» полигены аттракции, а с «плохими» полигенами адаптивности – «плохие» полигены аттракции.

Следует подчеркнуть, что обнаруженная таким методом связь между полигенами аттракции и адаптивности есть генотипическая связь, обусловленная аддитивными и эпистатическими вкладками полигенов. Для прогнозирования трансгрессий необходимо знать степень аддитивной детерминации сдвигов по адаптивности и аттракции.

Ранее было показано (Драгавцев, Аверьянова, 1979), что существует очень высокая корреляция между величиной V_A признака, рассчитанной традиционным методом по ковариансе родитель-потомок, и симилярностью (степенью подобия) реагирования признака по градиенту лим-фактора или временному градиенту.

Это означает, что можно судить об аддитивной «работе» полигенов аттракции, если сдвиг по аттракции у данного сорта в относительно худших условиях роста равен сдвигу того же сорта в относительно лучших условиях роста. На графике (рис. 5) это должно выразиться в параллельности линии экологической регрессии

данного сорта усредненной линии экологической регрессии для всего набора сортов.

Поскольку опыт обычно закладывается в 3–4 повторностях, то на график следует нанести одну общую среднюю точку данного сорта и 3–4 точки по повторностям. В искусственном климате легко сделать градиент по любому стрессору и разместить повторности вдоль градиента. Если сдвиг по аттракции стабилен на всех точках градиента (линия, соединяющая средние величины сдвигов по аттракции, параллельна усредненной линии экологической регрессии), то полигены аттракции аддитивны и их можно объединить в будущем сорте с полигенами максимальной адаптивности.

Общий алгоритм анализа коллекций сортов на начальных этапах селекции

1. В камерах искусственного климата создается динамика лимитирующих факторов для типичного года конкретной зоны селекции. Изучается генотипическая изменчивость 7 генетико-физиологических систем, идентифицируются сорта, которые несут самые ценные плюсовые сдвиги по каждой системе в отдельности.

2. Выясняется природа трансгрессий для данного сочетания лим-факторов в их динамике по фазам онтогенеза (Драгавцев, 1994), подбираются на графиках пары для скрещивания с предварительной оценкой аддитивности действия объединяемых в будущем гибриде генетико-физиологических систем.

3. Скрещиваются отобранные пары, полученное F_2 анализируется на тех же графиках, но не по средним величинам признаков, а по признакам индивидуальных растений.

4. Идентифицируются трансгрессии в F_2 с использованием принципа фоновых признаков, если лим-фактор имеет собственную дисперсию и за него есть конкуренция в фитоценозе (например, пятна почвенной влаги, пятна азота), или идентифицируются трансгрессии визуально, если лим-фактор не имеет собственной дисперсии и за него нет конкуренции в фитоценозе (например, холод, жара). На фоне специфических лим-факторов (кислотность почвы и засоление), которые имеют собственную дисперсию, но за них нет конкуренции в

фитоценозе, используются фоновые признаки в сочетании с визуальной идентификацией.

5. В F_2 отбираются трансгрессивные особи и выращиваются семьи F_3 , которые опять проверяются на графиках, с нанесением на них средних величин семей. Лучшие семьи запускаются в экологические испытания. Это родоначальники будущего сорта.

На основе вышеприведенных разработок в Агрофизическом институте проведены многолетние эксперименты, в результате которых были получены прогнозируемые трансгрессии (Макарова, 1991; Макарова, Ермаков, 1992; Макарова, Нерушева, 1995; Кочетов, 2004).

Литература

- Аксенович Т.И. Генетический анализ: этапы развития, проблемы и перспективы // Информ. вестник ВОГиС. 1999. № 10. С. 4–7.
- Гронин В.В. Использование качественных и морфометрических признаков для обеспечения отличимости родительских линий и гибридов подсолнечника: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Краснодар: ВНИИ риса, 2007.
- Драгавцев В.А. Философские вопросы учения о формообразовании и теории наследственной информации // Усп. соврем. биологии. 1961. Т. 52. Вып. 3 (6). С. 347–361.
- Драгавцев В.А. Феногенетический анализ изменчивости в растительных популяциях // Вестн. АН КазССР. 1963. № 10 (223). С. 33–42.
- Драгавцев В.А. Метод оценки роли наследственности и среды в развитии признаков древесных растений, не требующий смены поколений // Ботан. журнал. 1966. Т. 51. № 7. С. 939–946.
- Драгавцев В.А. Алгоритмы эколого-генетической инвентаризации генофонда и методы конструирования сортов сельскохозяйственных растений по урожайности, устойчивости и качеству // Методические рекомендации (новые подходы). СПб: ГНЦ ВИР, 1994. С. 32–38.
- Драгавцев В.А. Основы будущих наукоемких селекционных технологий для генетического улучшения полигенных экономически важных свойств растений // Аграрная Россия. 2008. № 4. С. 2–10.
- Драгавцев В.А., Аверьянова А.Ф. О корреляции между уровнем аддитивной вариации и степенью симилярности реакции количественных признаков пшеницы // Генетика. 1979. Т. 15. № 3. С. 518–526.
- Драгавцев В.А., Литун П.П., Шкель Н. и др. Модель эколого-генетического контроля количественных признаков растений // Докл. АН СССР. 1984а. Т. 274. № 3. С. 720–723.
- Драгавцев В.А., Острикова В.М. Поиск фоновых признаков для экспрессной оценки генетической изменчивости в растительных популяциях // Генетика. 1972. Т. 8. № 4. С. 33–37.
- Драгавцев В.А., Погожев И.Б., Соколова Т.А. Количественные оценки генотипических значений признаков растений с учетом распределения экологических отклонений у фенотипов // Модели экосистем и методы определения их параметров. Новосибирск: Вычислительный центр СО АН СССР, 1981. С. 109–116.
- Драгавцев В.А., Цильке Р.А., Рейтер Б.Г. и др. Генетика признаков продуктивности яровых пшениц в Западной Сибири. Новосибирск: Наука, 1984б. 230 с.
- Дьяков А.Б., Драгавцев В.А. Конкурентоспособность растений в связи с селекцией. Сообщение 1. Надежность оценки генотипов по фенотипам у растений // Генетика. 1975. Т. 11. № 5. С. 11–22.
- Кочетов А.А. Генотипическая адаптация восточноазиатских подвидов *Raphanus sativus* при интродукции в Северо-Западный регион России // С.-х. биология. Сер. Биология растений. 2004. № 1. С. 83–91.
- Куперман Ф.М. Морфофизиология растений. М.: Высш. шк., 1984. 240 с.
- Литун П.П. Разрешающая способность современных схем селекционных отборов. Докл. на 4-м Всесоюзном съезде ВОГиС. 2 февраля 1982. г. Кишинев.
- Макарова Г.А. Рекомбинации фотопериодической реакции исходных сортов как основа прогнозирования скороспелости при селекции пшеницы // Докл. ВАСХНИЛ. 1991. № 4. С. 6–9.
- Макарова Г.А., Ермаков Е.И. Физиолого-генетические основы прогноза сроков колошения и управления формированием рекомбинантных линий пшеницы с заданной скороспелостью // Докл. АН. 1992. Т. 326. № 1. С. 189–193.
- Макарова Г.А., Нерушева Г.В. Прогноз длительности периодов онтогенеза у рекомбинантных по сроку колошения линий пшеницы // Докл. РАСХН. 1995. № 2. С. 10–12.
- Матвеев Н.Д. Об одном из путей совершенствования начальных этапов селекционного процесса // Генетика. 1966. № 4. С. 158–165.
- Никоро З.С., Васильева Л.А. Экспериментальная проверка возможности использования генетико-статистической модели для оценки неравновесных популяций // Генетика. 1974. Т. 10. № 10. С. 58–67.
- Паттон А. Энергетика и кинетика биохимических процессов. М.: Мир, 1968. С. 88–98.
- Савинский И.Л. Разрешающая способность метода генетического анализа количественных признаков по Хейману: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб: ВИР, 1991.
- Хит О. Фотосинтез. М.: Мир, 1972. 128 с.
- Falconer D.S. Introduction to Quantitative Genetics. Oliver-Boyd Publ., 1961.
- Fisher R.A. The correlation between relatives on the supposition of Mendelian Inheritance // Papers on Quant. Genetics and Related Topics. Dept. of Genetics. North Carolina State College. Raleigh. USA. Trans. Roy. Soc. Edinburg. 1918. P. 399–433.
- Ginsburg E., Malkin J., Elston R.S. Theoretical aspects of pedigree analysis. Ramot Publ. House – Tel-Aviv University. Israel, 2006. 224 p.
- Mather Wharton B. Principles of Quantitative Genetics. Bur-

- gress Publ., 1964. 152 p.
- Sakai K.I., Hatakeyama S. Estimation of genetic parameters in forest trees without raising progeny // *Silvae Genetica*. 1963. V. 12. No. 5. P. 152–160.
- Sakai K.I., Mukaide H. Estimation of genetic, environmental and competition variances in standing forest // *Silvae Genetica*. 1967. V. 16. No. 5/6. P. 159–168.
- Shrikhande V.J. Some considerations in designing experiments on coconut trees // *J. Indian Soc. Agric. Statistics*. 1957. P. 82–91.

PROXIMATE ESTIMATION OF GENOTYPIC AND GENETIC (ADDITIVE) VARIANCES OF PLANT PRODUCTIVITY TRAITS

V.A. Dragavtsev, G.A. Makarova, A.A. Kochetov, G.V. Mirskaya, N.G. Sinyavina

Agrophysical Research Institute, Russian Academy of Agricultural Sciences,
St. Petersburg, Russia,
e-mail: dravial@mail.ru

Summary

For the first time all existent approaches to proximate estimation of genotypic variance are considered. A theory and methods of rapid estimation of genetic (additive) variance for prediction of transgressions in the course of breeding of self-pollinated plants for productivity traits are proposed.

Key words: quantitative traits, rapid estimation of genotypic and additive variances, prediction of transgressions.

УДК 635.649:631.526.32

СКРИНИНГ *CAPSICUM ANNUUM* VAR. *ANNUUM* L. НА РАННЕСПЕЛОСТЬ

© 2012 г. О.О. Тимина

ГОУ Приднестровский государственный университет им. Т.Г. Шевченко,
Тирасполь, Приднестровская Молдавская Республика, e-mail: otimina@mail.ru

Поступила в редакцию 10 октября 2011 г. Принята к публикации 21 марта 2012 г.

Проведен скрининг генофонда *Capsicum annuum* var. *annuum* L., включающий более 350 культурных сортов, по длине вегетационного периода и выделены надежные и разнообразные доноры признака. Подтверждено преимущество сортотипа *Fasciculatum* Sturt по раннеспелости и дружности созревания. Уточнены коррелятивные зависимости между длинами фенофаз, завязываемостью и скоростью роста плодов как компонентных признаков раннего урожая. Выделенные доноры в популяциях сортотипов *Grossum* L. (Sendt), *Longum* D.C. и *Fasciculatum* дифференцированы по адаптивности признаков «ранний урожай» и «длина фенологических фаз». Определены фоновые параметры среды для селекции на урожайность и раннеспелость.

Ключевые слова: овощной перец, раннеспелость, селекционная ценность доноров, фоновые параметры среды.

Селекция на раннеспелость остается одним из приоритетных направлений и не теряет своей актуальности для подавляющего большинства культур, так как оказывается решающим условием устойчивого роста величины и качества урожая (Жученко, 1995). При этом успех практической селекции по этому направлению в сильной степени зависит от наличия разнообразных доноров признака. Целью наших исследований явился поиск источников и надежных доноров признака раннеспелости в генофонде *Capsicum annuum* var. *annuum*. В задачи исследований входили: оценка культурных сортов вида *C. annuum* var. *annuum* по раннеспелости, уточнение коррелятивных зависимостей между раннеспелостью и ее компонентными признаками, а также селекционной ценности доноров раннеспелости.

Материалы и методы

Растения выращивали в весенне-летнем и в зимне-весеннем оборотах в открытом грунте, пленочных необогреваемых и зимних остекленных теплицах согласно требованиям,

предъявляемым к культуре и ее селекции (Ершова, 1990; Методические указания ..., 1997). Выраженность раннеспелости определяли фенотипически по длинам фенофаз: продолжительность периода в днях: от массовых всходов до массового цветения (фенофаза 1), от массового цветения до технической спелости плодов (фенофаза 2) и от технической до биологической спелости плодов (фенофаза 3), а также по интегральному показателю – раннему урожаю. Урожай плодов учитывали весовым методом, завязываемость и интенсивность роста плодов – прямым методом, маркируя бутоны, подсчитывая и взвешивая маркированные плоды на дату учета. Повторность в опыте – 50-кратная, повторность вариантов – трехкратная. Данные обрабатывались 2-факторным дисперсионным анализом, подсчитывались множественная и частные фенотипические корреляции (Лакин, 1990). Определяли общую (ОАС_i) и специфическую (САС_i) адаптивность, стабильность (Sg_i) генотипов, их селекционную ценность (СЦГ_i), а также типичность (t_k) и относительную дифференцирующую способность среды (S_{ек}) по методу А.В. Кильчевского и Л.В. Хотылевой

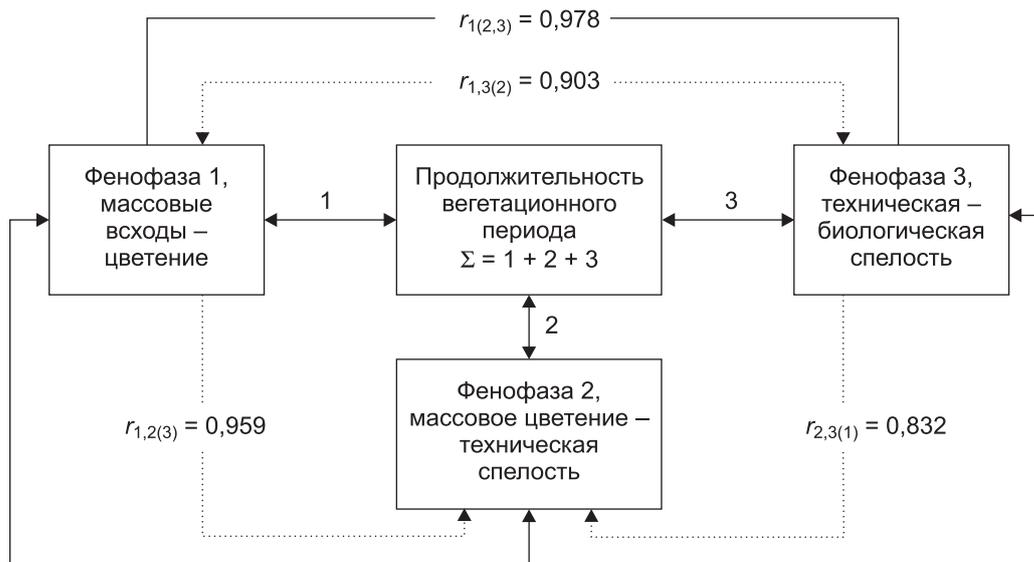


Рис. 1. Множественная и частные фенотипические корреляции у гибридов F_1 между составляющими показателями признака «продолжительность вегетационного периода», зимне-весенний оборот.

(1985). Генетическая терминология использована согласно Картелю с соавт. (1999), ботаническая номенклатура по Varal с соавт. (2002).

Результаты исследований и обсуждение

Фенологические наблюдения выявили, что при благоприятных условиях раннеспелость перца в условиях открытого грунта определялась длиной фенофаз 1 и 3. В условиях защищенного грунта вклад всех трех фенофаз в проявление раннеспелости в зимне-весенний и весенне-летний периоды оказался равнозначным (рис. 1). Выраженность раннеспелости коррелировала с завязываемостью плодов и интенсивностью их роста (рис. 2), которые, являясь ее компонентами, в конечном итоге определяли величину раннего урожая. Коэффициент множественной корреляции между ранним урожаем, завязываемостью и интенсивностью роста плодов оказался высоким и достоверным – $r_{x(yz)} = 0,71$ ($t_{\text{фак}} = 3,02$, $p \leq 0,05$) (рис. 2). Причем при постоянной величине завязываемости показатели раннего урожая и интенсивность роста плодов в средней степени положительно коррелировали ($r_{xz(y)} = 0,64$; $t_{\text{фак}} = 2,63$, $p \leq 0,05$). Однако при постоянной величине раннего урожая отмечалась невысокая отрицательная корреляция между показателями интенсивности

роста плодов и завязываемостью ($r_{yz(x)} = -0,27$). Полученные данные свидетельствуют о контроле раннеспелости группой генов, объединенной, в том числе и на основе плейотропного функционирования.

Оценка генофонда *S. annuum* var. *annuum* по длине вегетационного периода от массовых всходов до биологической спелости и составляющих его фенофаз выявила слабый размах изменчивости у представителей var. *annuum* по

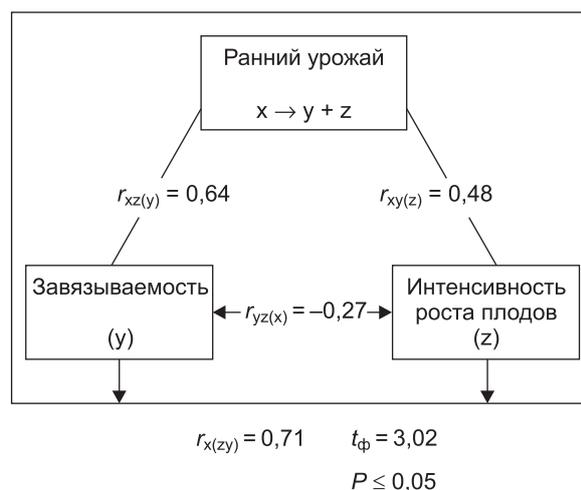


Рис. 2. Множественные и частные корреляции у гибридов F_1 между составляющими показателями признака «ранний урожай», весенне-летний оборот.

этим признакам (табл. 1). Тем не менее анализ результатов выявил преимущества по признаку скороспелости букетного сортотипа, у представителей которого одновременно укороченные первая и третья фазы созревания, а вторая – относительно короткая. Полученные результаты статистически доказуемы. Причем коэффициенты вариации длины трех фенофаз у этого сортотипа самые низкие, что свидетельствует и об относительной выравненности признака. Полученные данные подтверждают имеющиеся литературные сведения о скороспелости и дружности созревания сортотипа *Fasciculatum*. Болгарский сорт Букетен, предназначенный для сладкой паприки, выведенный с участием представителя этого сортотипа (Christov *et al.*, 1974), был использован в качестве донора с комплексом признаков: раннеспелости, дружности созревания, теневыносливости, а также толерантности к вертициллезному увяданию при создании отечественного варианта овощного перца Винни-Пух (Ильенко, Кузнецова, 1979). Винни-Пух в свою очередь в дальнейшем использовался в комбинативной селекции новых сортов букетного типа (Ильенко, Тимина, 1999; Тимина О.О., Тимин О.Ю., 2000). Популяция сортотипа *Grossum* представлена контрастными формами по продолжительности 1-й и 3-й фенофаз. Так, к этому сортотипу относятся образцы, которые по длительности 1-й фазы не уступают представителям букетного сортотипа

(табл. 1), и в то же время отмечается наличие и позднеспелых недружных форм с долговременными фенофазами 1 и 3. Такие образцы очень напоминают формы томатов с генами замедленного созревания *rin*, *nor* или *alkobako* и по аналогии с томатами могут представлять интерес в качестве исходного материала для создания сортов или гибридов с замедленным созреванием, предназначенных для хранения. Сортотип *Grossum* также характеризовался низкими коэффициентами вариации длины 1-й, 2-й и 3-й фенофаз. Раннеспелость данной популяции обуславливалась меньшей средней продолжительностью 1-й и 3-й фенофаз в сравнении с *Longum*.

У сортотипа длиннозаостренных перцев отмечалось наличие как раннеспелых, так и позднеспелых недружных форм с невысоким коэффициентом вариации по продолжительности фенофаз. Популяция этого сортотипа достаточно разнообразна и по другим важнейшим хозяйственно ценным признакам и может быть использована для удовлетворения потребностей всех направлений по селекции острого, полуострого перца, а также сортов и гибридов, предназначенных для получения сладкой и острой паприки.

Анализ имеющегося и созданного в дальнейшем селекционного материала по признаку «раннеспелость» показал, что более эффективно поддается улучшающему отбору продолжи-

Таблица 1

Продолжительность вегетационного периода у популяций сортотипов *C. annuum*, 1987–1998 гг. (необогреваемые пленочные теплицы)

Показатель	Сортотип					
	<i>Fasciculatum</i> Sturt		<i>Grossum</i> L. (Sendt)		<i>Longum</i> D.C.	
	Длина фенофазы $x_1 \pm m$	V %	Длина фенофазы $x_2 \pm m$	V %	Длина фенофазы $x_3 \pm m$	V %
Количество исследованных образцов	52		297		25	
Массовые всходы–цветение	82 ± 0,3	2,6	85,0 ± 0,2	3,9	85,8 ± 0,8	4,9
Массовое цветение–техническая спелость	30,2 ± 0,2	3,6	31,8 ± 0,1	7,3	31,1 ± 0,6	9,4
Техническая–биологическая спелость	22,7 ± 0,1	4,1	31,4 ± 0,1	5,6	32,9 ± 0,5	8,0
Массовые всходы–биологическая спелость	134,4 ± 0,6	3,4	148,0 ± 0,4	4,1	149,7 ± 1,2	4,0

тельность 1-й фенофазы. Так, в группе букетных удалось отселектировать линию Л-3/98, у которой цветение начиналось раньше на 3 дня по сравнению с сортом Винни-Пух. Данная линия представляет собой популяцию с преобладанием одноярусных растений. С увеличением количества ярусов в букетной группе отмечалось и удлинение всего вегетационного периода. Остальные фазы вегетационного периода характеризовались как более консервативные. За 10 лет напряженной селекционной работы с 1987 по 1998 гг. практически не удалось уменьшить параметры длины второй и третьей фенофаз у селекционного материала, полученного с использованием букетного и крупноплодного сортотипов. Однако создание изогенных линий, контрастных по длине первой и третьей фенофаз, на основе обоих сортотипов позволило получить новый результат: у двойных гибридов от скрещивания изогенных линий наблюдался сдвиг в сторону значительного уменьшения 2-й фенофазы. Полученные данные свидетельствовали о возможном резерве раннеспелости

за счет ускоренного роста плодов или высокой скорости плодообразования.

Таким образом, проведенная оценка выявила дифференцированную длину фенофаз у конкретных генотипов. Наиболее короткая 1-я фенофаза у линии Л-3/98, а также у сортов Винни-Пух, Венти, Калочанский V-1, гибрида Юбилейный Семко; непродолжительная 2-я фенофаза – у сорта Калочанский V-1, линий Л-3/98, 5/98, гибрида Юбилейный Семко, а также сортов Ермак, Венти, Прометей, Тополин; 3-я фенофаза, наиболее быстро текущая у сортов Винни-Пух, Ермак, Добрыня Никитич, Л-3/98, Л-5/98, Богатырь и гибрида Юбилейный Семко.

У сортов Тополин, Венти, Ласточка и Винни-Пух, зарекомендовавших себя надежными донорами раннеспелости, уточнили адаптивность признаков «длина фенофаз» и «ранний урожай» (табл. 2, 3). Поскольку адаптивность и продуктивность являются относительно независимыми признаками (Сюков и др., 2007), селекция по возможности должна проводиться на комплекс этих признаков, и необходимость

Таблица 2

Параметры адаптивности доноров раннеспелости овощного перца по длине первой и третьей фенофаз

Донор	Параметры адаптивности											
	1-я фенофаза						3-я фенофаза					
	X_p , сутки	ОАС	CAC_i	Sg_i , %	b_i	$СЦГ_i$	X_p , сутки	ОАС	CAC_i	Sg_i , %	b_i	$СЦГ_i$
Тополин Var. Grossum	84,2	-0,68	155,1	14,8	0,88	47,2	31,4	2,45	5,66	7,6	1,21	16,5
Ласточка Var. Grossum	84,8	-0,08	302,3	20,5	1,24	33,2	31,6	2,68	5,53	7,4	1,29	16,9
Венти Var. Longum	89,1	4,22	193,1	15,6	0,98	47,9	32,5	3,58	5,25	7	0,85	18,2
Винни-Пух Var. Fasciculatum	81,4	-3,45	180,2	16,5	0,9	41,6	20,2	-8,72	4,03	9,9	0,75	7,7

Таблица 3

Параметры адаптивности доноров раннеспелости перца сладкого по урожайности

Генотип	X_i , кг/м ²	OAC_i	CAC_i	Sg_i , %	b_i	$СЦГ_i$
Тополин	1,36	0,09	0,94	71,5	1,03	0,72
Ласточка	0,99	-0,28	0,9	95,7	1,05	0,36
Венти	1,28	0,01	1,07	80,6	1,14	0,6
Винни-Пух	1,45	0,18	0,65	55,5	0,77	0,92

в информации об адаптивности доноров имеет существенное значение для селекционного процесса. Идентифицированные доноры востребованы как для стабилизации выраженности признака в конкретных условиях среды с определенными неблагоприятными факторами, так и для создания сортов и гибридов с высокой продуктивностью. Адаптивность доноров изучали в трех условиях: открытом грунте, зимней оранжерее и пленочной необогреваемой теплицах. Дисперсионный анализ показателей урожайности, длины 1-й и 3-й фенофаз в 3 различных условиях выращивания выявил разницу между генотипами и отличия во взаимодействии генотипа и условий на 5 и 1 %-м уровнях значимости. Анализ показателей 2-й фенофазы у этих же сортов не выявил таких различий. Поэтому анализ адаптивности проводился у признака «урожайность» и у 1-й и 3-й фенофаз.

Полученные данные по длине фенофаз показали наилучшие результаты у сорта Винни-Пух (табл. 2). При условии, что отбор по раннеспелости направлен в сторону уменьшения длины фенофаз, низкие показатели OAC_i , SAC_i и $СЦГ_i$ в этом случае подтверждают большую выраженность признака у Винни-Пука на разных фонах. Донор характеризуется по признаку «длина 1-й фенофазы» нестабильной выраженностью и стабильной – по 3-й фенофазе ($Sg_i < 10\%$), слабой отзывчивостью ($b_i < 1$) и самой высокой селекционной ценностью. Показатели остальных доноров относительно равноценны, свидетельствуют о слабой отзывчивости за исключением Ласточки и характеризуются сравнительно одинаковой селекционной ценностью.

Полученные результаты показывают дифференциацию доноров по адаптивности признака «ранний урожай» (табл. 3). Наибольшей OAC_i среди сортов перца отличался Винни-Пух. Совокупность показателей «высокая продуктивность», «низкие варианты SAC_i и Sg_i », «слабая отзывчивость на изменение условий среды возделывания ($b_i < 1$)» позволила отнести этот донор к категории высокоадаптивных. Для него характерно наилучшее сочетание продуктивности и стабильности, что выразилось в большем показателе $СЦГ_i$. Этот донор может быть использован для создания раннеспелых полуинтенсивных сортов или гибридов, для

которых характерна высокая потенциальная экологически устойчивая продуктивность, обеспечивающая не максимальную, но стабильно высокую урожайность.

Сорта Тополин, Венти и Ласточка характеризовались как раннеспелые доноры интенсивного типа. Они высокоурожайные, со значительной отзывчивостью на улучшение условий выращивания ($b_i > 1$), но экологически нестабильны ($Sg_i > 10\%$). Лучшим по средней урожайности в различных условиях оказался сорт Тополин.

Выявленная в экспериментах изменчивость позволила дать оценку среде испытания (табл. 4). Высокая продуктивность среды (d_k) перца сладкого в оба года испытания отмечена в условиях зимних обогреваемых теплиц. Однако этот фон, оказавшись стабилизирующим, для ведения селекции на урожайность уступает анализирующему (пленочные теплицы и открытый грунт), на котором проявляется наибольшая дифференциация генотипов по этому признаку. Пленочные теплицы в оба года испытания имели также высокую типичность среды.

Равноценность показателей адаптивности у доноров по признаку «длина фенофаз» (отличия явные только по 3-й фенофазе) адекватно снизила относительную дифференцирующую способность среды по признаку «длина первой фенофазы» (табл. 5). Для данного набора генотипов наиболее типичным фоном для скрининга явились зимние обогреваемые теплицы. Фон пленочной необогреваемой теплицы дифференцировал генотипы по признаку «длина третьей фенофазы» ($Se_k > 20\%$), а зимней обогреваемой характеризовался как стабилизирующий с высокой типичностью. В связи с этим можно

Таблица 4
Фоновые параметры среды
для селекции на раннюю урожайность

Среда	X_{cp} , кг/м ²	d_k	S_{ek} , %	t_k
Зимние (1-й год)	2,36	1,09	18,2	0,8
Пленочные (1-й год)	0,65	-0,62	56,9	1
Открытый грунт (1-й год)	0,72	-0,55	30,5	0,8
Зимние (2-й год)	2,49	1,22	21	-0,2
Пленочные (2-й год)	0,87	-0,4	36	1
Открытый грунт (2-й год)	0,54	-0,73	33,6	1

Таблица 5

Фоновые параметры среды для селекции по длине первой и третьей фенофаз

Среда	Параметры среды							
	Первая фенофаза				Третья фенофаза			
	Хср, сутки	d _k	S _{ек} , %	t _k	Хср, сутки	d _k	S _{ек} , %	t _k
Зимние	99,6	14,7	5,5	1	26,9	-2,07	18,8	1
Пленочные	83,4	-1,46	2,7	0,09	29,1	0,23	24,1	0,8
Открытый грунт	71,7	-13,23	6,9	0,8	30,8	1,83	17,9	0,4

согласиться с предложением о необходимости подбора нескольких стандартов для каждого фона (Ващенко, 2011), различающихся по выраженности изучаемых признаков, включая продуктивность, что в конечном итоге облегчает дифференцировку сред и генотипов.

Таким образом, проведен скрининг популяции *S. annuum* var. *annuum*, включающий более 350 культурных сортов, по длине вегетационного периода и выделены надежные и разнообразные доноры признака. Уточнены коррелятивные зависимости между длинами фенофаз, завязываемостью и скоростью роста плодов как компонентных признаков раннего урожая. Определены селекционная ценность доноров раннеспелости и фоновые параметры среды для селекции на урожайность и раннеспелость.

Выражаю искреннюю благодарность к.с.-х.н. Л.В. Кривенкову, с.н.с. лаборатории экологической селекции Всероссийского НИИ селекции и семеноводства овощных культур за помощь в обработке данных по адаптивности признаков и их обсуждению.

Литература

А.с. № 33271 на сорт сладкого перца «Добрыня Никитич» / О.О. Тимина, О.Ю. Тимин. Зарегистрировано в государственном реестре селекционных достижений РФ, допущенных к использованию. 2000.

Ващенко В.В. Оценка сортов ячменя ярового по адаптивной стабильности // Селекция і насінництво. 2011. Вып. 100. С. 96–100.

Ершова В.Л. Возделывание перца сладкого в МССР: рекомендации. Кишинев: Молдагроинформреклама, 1990. С. 1–6.

Жученко А.А. Проблема адаптации в селекции, сортоиспытании и семеноводстве сельскохозяйственных культур // Генетические основы селекции сельскохозяйственных растений. М., 1995. С. 3–15.

Ильенко Т.С., Кузнецова Г.Н. Новое в селекции сладкого перца для защищенного грунта // Научно-технический прогресс в орошаемом земледелии и овощеводстве: Тез. докл. науч.-произв. конф., декабрь 1979. С. 35–36.

Картель Н.А., Макеева Е.Н., Мезенко А.М. Генетика. Энциклопедический словарь. Минск: Тэхналогія, 1999. 448 с.

Кильчевский А.В., Хотылева Л.В. Метод оценки адаптивной способности и стабильности генотипов, дифференцирующей способности среды. Сообщение 2. Числовой пример и обсуждение // Генетика. 1985. Т. 21. № 9. С. 1491–1498.

Лакин Г.Ф. Биометрия, М., Высш. шк., 1990. С. 1–352.

Методические указания по селекции сортов и гибридов перца, баклажана для открытого и защищенного грунта. М., 1997. С. 1–88.

Пат. № 0477. Сорт сладкого перца «Ермак» / Т.С. Ильенко, О.О. Тимина. Зарегистрировано в государственном реестре РФ охраняемых селекционных достижений 17.12.1999.

Сюков В.В., Захаров В.Т., Кривобочек В.Г. и др. Метод оценки гомеоадаптивности в системе экологической селекции яровой мягкой пшеницы // Метод. указания. Безенчук, 2007. С. 1–5.

Baral J.B., Bosland P.W. An updated synthesis of the *Capsicum* genus // Capsicum and Eggplant Newslett. 2002. No. 21. P. 11–21.

Christov S., Manuelyan K., Elenkov E., Kovachev A. Breeding of uniform ripening pepper varieties // Genetics and Breeding of Capsicum, Proc. of the Meeting EUCARPIA, Budapest, 1974. P. 205–210.

**TEST OF *CAPSICUM ANNUUM* VAR. *ANNUUM* L. ACCESSIONS
FOR EARLINESS****O.O. Timina**Shevchenko Transnistrian State University, Tiraspol, Transnistria,
e-mail: otimina@mail.ru**Summary**

Growing season duration was analyzed in more than 350 *Capsicum annuum* var. *annuum* L. cultivars to reveal diverse reliable donors of the character. The advantage of the *Fasciculatum* Sturt group was confirmed by its early and uniform ripening. Correlations between the durations of phenological stages, fruit set, and fruit growth rate as early harvest components were refined. Donors were isolated from populations of the *Grossum* L. (Sendt), *Longum* D.C., and *Fasciculatum* groups and differentiated according to the adaptive values of the “early harvest” and “phenological stage duration” traits. The background environment settings for breeding for crop yield and earliness were determined.

Key words: bell pepper, earliness, donor breeding value, background environment setting.

УДК 633.111:321 631.524.7

УСТОЙЧИВОСТЬ К ПРЕДУБОРОЧНОМУ ПРОРАСТАНИЮ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С *6Agⁱ(6D)*-ХРОМОСОМОЙ ОТ *AGROPYRON INTERMEDIUM*

© 2012 г. В.А. Крупнов, Г.Ю. Антонов, А.Е. Дружин, О.В. Крупнова

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

Поступила в редакцию 15 марта 2012 г. Принята к публикации 13 апреля 2012 г.

На краснозерных и белозерных рекомбинантных инбредных линиях (F7-F10 и старше) и почти изогенных линиях установлено значимое отрицательное влияние *6Agⁱ(6D)*-хромосомы от *Agropyron intermedium* на устойчивость к предуборочному прорастанию яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum*. Установлены также значимые различия по устойчивости к предуборочному прорастанию между краснозерными рекомбинантными инбредными линиями, содержащими эту хромосому, что, по-видимому, связано с эффектом генетического окружения. Причины негативного влияния *6Agⁱ(6D)*-хромосомы от *Agropyron intermedium* на устойчивость к предуборочному прорастанию яровой мягкой пшеницы неизвестны.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, *Agropyron intermedium*, красное зерно, белое зерно, покой, устойчивость к предуборочному прорастанию, *Lr19*-транслокация, *6Agⁱ(6D)*-хромосома.

Введение

Устойчивость к предуборочному прорастанию (УкП) – один из важнейших приоритетов в селекции пшеницы, так как при ее отсутствии такие факторы, как частые дожди, росы, резкие колебания температуры воздуха провоцируют прорастание зерна в колосе, что снижает урожай и качество зерна (Неттевич и др., 1986; Пухальский и др., 1986; Неттевич, 1999). Даже при едва заметном «наклеивании» зерна заметно снижается выход муки при помоле, резко ухудшаются физические свойства теста, которое становится клейким, недостаточно эластичным, выпекаемый хлеб имеет крайне низкое качество (Humphreys, Noll, 2002; Yang *et al.*, 2007). Особенно сильно страдают от предуборочного прорастания зерна белозерные сорта (Pukhalskiy, Iordanskaya, 1998; Соловов, 2003; Крупнов и др., 2006; Антонов, 2007). Поэтому во многих регионах предпочитают возделывать краснозерные сорта как более устойчивые. Однако и многие краснозерные сорта не обладают достаточной УкП (Крупнов и др., 2006), и выход

муки у них, как правило, значимо ниже, чем у белозерных сортов (Pike, MacRitchie, 2004). Прорастание зерна обусловлено активностью альфа-амилазы (*a-Amy-1*), которая разрушает крахмал в эндосперме (McIntosh *et al.*, 2009). В связи с тем что это явление может быть и в зерне без видимых признаков прорастания, то на мировом рынке широко используют такой показатель качества зерна, как «число падения» (Крупнова, 2009).

УкП контролируется, с одной стороны, генами покоя семян *Vp* (Viviparous), с другой – генами, которые находятся в различных *QPhsR*-локусах (McIntosh *et al.*, 2008). У мягкой пшеницы идентифицированы три *Vp-1* гена-гомеолога – *Vp-A1*, *Vp-B1* и *Vp-D1* (или *TaVp-A1*, *TaVp-B1* и *TaVp-D*), которые находятся, соответственно, в субгеномах А, В и D (McKibbin *et al.*, 2002) и локализованы в длинных плечах хромосом 3-й группы (3AL, 3BL и 3DL) на расстоянии примерно 30 сМ от *R*-локусов, контролирующих окраску семян (Bailey *et al.*, 1999). Во взаимосвязях между зародышем, эндоспермом и алейроном важную роль играют регуляторные

белки тиоредоксины – продукты гена(ов) *Trxs*, что продемонстрировано на трансгенных растениях ячменя и пшеницы (Wong *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2009; Shahpiri *et al.*, 2009).

На УкП влияют также морфофизиологические признаки: окраска зерна (Коваль и др., 1991, 2001), наличие на колосковых чешуях воскового налета, плотность прилегания чешуй к семени, угол наклона колоса и другие (Пеккер, Коваль, 1985; Соловов, 2003; Антонов, 2007). УкП зависит от резких колебаний температуры воздуха и других факторов внешней среды в период налива и созревания зерна (Biddulph *et al.*, 2008).

В последнее время для расширения зародышевой плазмы мягкой пшеницы широко используют генетический материал от различных сородичей, в частности от ржи посевной (*Secale cereale* L.), различных видов эгилопса и пырея (McIntosh *et al.*, 2008; Крупнова, 2010; Крупнов и др., 2010а). В Поволжье получили распространение сорта яровой мягкой пшеницы, содержащие *Lr19*-транслокацию (на хромосоме 7D) от *Agropyron elongatum* Host. (syn. *Lophopyrum elongatum*) и *6Agⁱ(6D)*-хромосому от *Agropyron intermedium* Host. (syn. *Thinopyrum intermedium*), заместившую *6D*-хромосому у мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) (Крупнова, 2010; Крупнов и др., 2010б). Благодаря использованию этих транслокаций повышена устойчивость пшеницы к листовой ржавчине и другим патогенам. Однако влияние *6Agⁱ(6D)*-хромосомы от *A. intermedium* и ее сочетания с *Lr19*-транслокацией (на хромосоме 7D) от *A. elongatum* на УкП пшеницы изучено недостаточно (Соловов, 2003; Антонов, 2007; Крупнов и др., 2010а).

Цель настоящей работы – изучить влияние *6Agⁱ(6D)*-хромосомы от *A. intermedium* на УкП краснозерных и белозерных линий яровой мягкой пшеницы.

Материал и методы

Для исследования использовали беккросные, рекомбинантные инбредные линии (F₇–F₁₀ и старше) и почти изогенные линии, созданные в лаборатории генетики и цитологии ГНУ НИИСХ Юго-Востока путем скрещивания двух неустойчивых к предуборочному прорастанию линий Л400R (белозерный генотип) и Мульти6R (М6R) (краснозерный генотип) с краснозерными

линиями (Л2032, Л583, Л503, Л505, Л1089), характеризующихся высоким уровнем УкП, а также с белозерной линией Л504 со слабой УкП (табл.). Линии Л400R и Мульти6R имеют *6Agⁱ(6D)*-хромосому от *A. intermedium* Host., заместившую *6D*-хромосому у мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) (Сибикеев и др., 2005). Во всех остальных родительских генотипах содержится *Lr19*-транслокация (на хромосоме 7D) от *A. elongatum* Host.

Рекомбинанты представляют собой отбор гомозигот из гибридных популяций, наиболее устойчивых к листовой ржавчине (*Puccinia triticina* Eriks. & E. Henn. = *P. recondita* f. sp. *tritici*) и другим патогенам, а также наиболее урожайных, с хорошим качеством зерна, однако в процессе создания рекомбинантов отбор на УкП не проводился. Среди рекомбинантов имеются пары почти изогенных линий по окраске зерна: 1) Л204 и Л205; 2) Л293 и Л688; 3) Л708 и Л709; 4) Л825 и Л585 (табл. 1). В качестве контроля служили также следующие почти изогенные пары: Л400S и Л400R – белозерные почти изогенные линии, которые, как уже отмечалось, различаются по содержанию *6Agⁱ(6D)*-хромосомы от *A. intermedium*, Л503 и Л504 различаются по окраске зерна, Л359S и Л359R различаются по содержанию *Lr19*-транслокации. Методика полевых исследований и условия их проведения изложены в работе Крупнова с соавт. (2010б).

Окраску зерна оценивали визуально 2–3 наблюдателя, независимо один от другого. В связи с тем что степень окраски зависит не только от количества *R*-генов (одна, две, три пары аллелей), но также от условий погоды, особенно от осадков, для оценки использовали 5 %-й-*NaOH* (водный раствор). Этот метод позволил четко (без противоречий) разбить все генотипы на две группы: белые (цвет соломы светло-золотистый) и красные. Однако не было полного согласия в разделении группы краснозерных генотипов на три подгруппы: светло-красные, красные и темно-красные.

В конце фазы восковой спелости зерна колосья срезали незамедлительно после полного пожелтения колосковых чешуй, с длиной соломины до 15–20 см, по 5 колосьев с каждой из четырех повторностей. Колосья подсушивали, обмолачивали и семена помещали на хранение

Таблица

Всхожесть физиологически зрелых красных (К) и белых (Б) семян линий, различающихся по содержанию *Lr19*-транслокации от *Agropyron elongatum* и *6Agⁱ(6D)*-хромосомы от *Agropyron intermedium* в 2003–2006 гг.

Генотип	Lr-транслокация	Окраска семян	Годы исследований				Среднее
			2003	2004	2005	2006	
Родители и контроли							
Л503	AgelLr19	К	22,0	13,5	21,5	10	19,0
Л504	AgelLr19	Б	84,5	48,0	71,0	–	67,8
Л505	AgelLr19	К	60,0	39,5	20,5	10,0	32,5
Л1089	AgelLr19	К	6,0	13,5	15,5	23,0	14,5
Л2032	AgelLr19	К	13,0	10,0	20,5	7,0	12,6
Л400R	<i>6Agⁱ(6D)</i>	Б	95,0	93,0	94,0	92,0	95,4
Л400S		Б	87,5	83,5	89,5	89,0	87,4
М6R	<i>6Agⁱ(6D)</i>	К	93,5	92,5	74,0	89,0	87,2
Л359R	AgelLr19	К	15,0	17,0	26,5	12,0	17,6
Л359S		К	15,0	16,5	22,0	13,0	16,6
Рекомбинантные инбредные линии							
Л204, Л400/Л1089	Agel+ <i>6Agⁱ(6D)</i>	К	96,0	92,0	90,0	90,0	92,0
Л205, Л400/Л1089	Agel+ <i>6Agⁱ(6D)</i>	Б	96,0	95,5	93,5	97,0	95,5
Л293, Л2032/Л400R	Agel+ <i>6Agⁱ(6D)</i>	К	49,0	40,0	73,0	75,0	59,2
Л688, Л2032/Л400R	Agel+ <i>6Agⁱ(6D)</i>	Б	96,0	88,0	85,5	89,0	89,6
Л708, Л505//Л400R	Agel+ <i>6Agⁱ(6D)</i>	К	–	80,0	85,0	76,0	80,3
Л709, Л505//Л400R	Agel+ <i>6Agⁱ(6D)</i>	Б	–	98,0	85,0	96,3	93,1
Л825, Л505//Л400R	Agel+ <i>6Agⁱ(6D)</i>	К	–	94,0	80,0	80,7	84,9
Л585, Л505//Л400R	Agel+ <i>6Agⁱ(6D)</i>	Б	–	95,0	94,0	95,3	94,8
Л386, 2032/Л400R	Agel+ <i>6Agⁱ(6D)</i>	К	89,0	72,0	81,0	–	80,6
Л680, 2032/Л400R,	Agel+ <i>6Agⁱ(6D)</i>	К	95,0	85,5	74,5	–	85,0
Л681, Л2032/Л400R	Agel+ <i>6Agⁱ(6D)</i>	К	98,0	91,5	76,5	–	88,6
Л735, Л2032/Л400R	Agel+ <i>6Agⁱ(6D)</i>	К	77,0	91,5	85,0	–	84,5
Л391, Л2032/Л400R	Agel+ <i>6Agⁱ(6D)</i>	К	49,0	33,5	37,5		
Л774, Л2032/Л400R	<i>6Agⁱ(6D)</i>	К	19,0	34,5	39,5	–	31,0
Л484, Л503/М6R	Agel+ <i>6Agⁱ(6D)</i>	К	93,0	94,0	81,0	–	89,3
Л785, Л504/Л400R	Agel+ <i>6Agⁱ(6D)</i>	Б	94,0	91,0	85,0	–	90,0
Л780, Л583/Л400R	<i>6Agⁱ(6D)</i>	Б	96,0	91,0	80,0	–	89,0
Л482, Л1089/М6R	<i>6Agⁱ(6D)</i>	К	39,5	45,0	50,5	–	45,0
Л483, Л2032*2/ М6R	<i>6Agⁱ(6D)</i>	К	43,7	47,5	38,5	–	42,8
Л487, Л2032*2/М6R	<i>6Agⁱ(6D)</i>	К	46,5	34,0	64,0	–	48,1
Л488, Л2032*2/М6R	<i>6Agⁱ(6D)</i>	К	90,5	30,0	31,0	–	50,5
F _{факт.}			33,4*	26,3*	44,3*	21,5*	
HCP _{0,05}			5,1	16,0	10,8	9,2	

* $P < 0,05$.

в морозильную камеру при температуре -20°C . В чашки Петри на фильтровальной бумаге помещали по 50 семян каждой повторности. Семена замачивали в водопроводной воде при температуре $20-21^{\circ}\text{C}$. Подсчет проросших семян производили на 7-е сутки после начала замачивания (Соловов, 2003; Антонов, 2007).

Полученные данные подвергли дисперсионному анализу по программе «AGROS-2.02».

Результаты

Годы исследований (2003–2006) были контрастными по температурному режиму, количеству и времени выпадения атмосферных осадков. 2003 г. был благоприятным по количеству осадков, времени их выпадения и температурному режиму воздуха. В период от колошения до уборки урожая было 14 дней с осадками, наблюдалась высокая доля зерна с черным зародышем.

2004 г. – засушливый в первой половине вегетации. После колошения осадков выпало выше среднего многолетнего, значимый ущерб от эпифитотии листовой ржавчины. В период от колошения до уборки урожая было 19 дней с осадками. После достижения физиологической спелости семян осадки выпадали трижды: 8 августа (2,6 мм), 13 августа (0,3 мм) и 14 августа (3,3 мм). Наблюдалась высокая доля зерна с черным зародышем.

2005 г. – средnezасушливый, ущерб от эпифитотии листовой ржавчины значимый, как и в предыдущем году. В период от колошения до уборки урожая было 14 дней с осадками, после достижения физиологической спелости семян осадки отсутствовали.

2006 г. – средnezасушливый, в период от колошения до созревания температурный режим был повышенным, в отдельные дни температура достигала 30°C . В период от колошения до уборки урожая было 10 дней с осадками, в том числе после достижения физиологической спелости – 6 дней, в результате зерно поблекло (19 июля).

Результаты изучения устойчивости линий к предуборочному прорастанию представлены в таблице.

Как видно из таблицы, во все годы как родительские генотипы, так и производные от них рекомбинантные линии статистически значимо ($P < 0,05$) различаются по УкП, измеряемой по

всхожести физиологически зрелых семян. При этом весьма четко просматриваются следующие особенности.

Все родительские генотипы, содержащие *Lr19*-транслокацию от *A. elongatum*, характеризуются достоверно более высоким уровнем УкП, чем генотипы, содержащие *6Agⁱ(6D)*-хромосому от *A. intermedium*.

Все производные рекомбинантные инбредные линии различаются по наличию комбинации чужеродных транслокаций. Из 21 рекомбинантного генотипа только 6 (линии Л774, Л780, Л483, Л487, Л488 и Л482) имеют всего лишь одну транслокацию – *6Agⁱ(6D)*-хромосому от *A. intermedium*, а у остальных 15 линий она сочетается с *Lr19*-транслокацией от *A. elongatum*.

Независимо от наличия у рекомбинантов одной *6Agⁱ(6D)*-хромосомы или ее сочетания с *Lr19*-транслокацией от *A. elongatum* все эти генотипы характеризуются более низким уровнем УкП, чем родители, не имеющие *6Agⁱ(6D)*-хромосомы.

Линии различаются не только по наличию транслокаций, но также по окраске зерна. У 6 рекомбинантов и 3 родителей семена белые, а у остальных – красные. У краснозерных рекомбинантов УкП колеблется в среднем от 31 (Л774) до 92 % (Л204), у белозерных – от 89 (Л780) до 95 % (Л205). Приближение краснозерной линии Л774 к линиям Л503 и Л2032 по уровню УкП дает основание предполагать, что путем селекции можно «смягчить» неблагоприятное влияние *6Agⁱ(6D)*-хромосомы от *A. intermedium* на этот признак и создать сорта, более устойчивые к прорастанию.

Анализ влияния окраски зерна на УкП почти изогенных пар линий показал, что во всех 5 парах почти изогенных линий краснозерные более устойчивы к предуборочному прорастанию, чем белозерные (табл.). В первой паре (Л503 и Л504) различия между sibсами статистически достоверные во все годы, во второй паре (Л293 и Л688) – только в 3 из 4 лет, в третьей паре (Л708 и Л709) – в 2 из 3 лет, в четвертой (Л825 и Л585) – также в 2 из 3 лет. У других рекомбинантных генотипов, имеющих сочетание двух чужеродных транслокаций, а также у линии Л780, которая имеет только одну из них – (*6Agⁱ(6D)*-хромосому от *A. intermedium*), УкП достоверно ниже, чем у соответствующего

устойчивого родителя. У беккроссных линий (Л483, Л487 и Л488) УкП также значимо ниже, чем у контроля (Л2032).

Обсуждение

Сравнение почти изогенных линий в парах Л503 и Л504, Л293 и Л688, Л708 и Л709, Л825 и Л585 свидетельствует о значимой связи УкП с окраской семян во все годы исследований. Однако этот признак не является главным, так как у многих других краснозерных генотипов, содержащих $6Ag^i(6D)$ -хромосому от *A. intermedium*, уровень УкП ниже, чем у белозерного стандарта Л504, имеющего транслокацию от *A. elongatum*. Уместно отметить, что в родословную линии М6R (Сибикеев и др., 2005) в отличие от Л400R и Л400S, входят только краснозерные генотипы (сорт Саратовская 29 и ее аналоги – Эгисар 29, АС12, а также сорта Московская 35 и Родина). Сорт Саратовская 29 высокоустойчив к предуборочному прорастанию (Соловов, 2003; Антонов, 2007), сорт Московская 35 и сорт Родина – среднеустойчивые (Неттевич и др., 1986).

Различия между краснозерными родительскими генотипами (Л503, Л505, Л1089 и Л2032) и производными краснозерными рекомбинантными линиями в УкП могут быть связаны с разными факторами (число *R*-генов и *QPhsR*), хотя обычно вклад *R*-дозы в УкП трудноуловим (Flintham, 2000). А относительно более высокий уровень УкП у краснозерных линий Л482 Л483, Л487, Л488 и особенно у Л774 (имеющих $6Ag^i(6D)$ -хромосому от *A. intermedium*) по сравнению с другими краснозерными может быть связан с эффектами каких-то других генов.

У мягкой пшеницы три гена-ортолога (*a-Amy-A1*, *a-Amy-B1* и *a-Amy-D1*) идентифицированы и локализованы на длинных плечах хромосом шестой группы (6AL, 6BL и 6DL) (McIntosh и др., 2009). Есть ли их ортолог в $6Ag^i(6D)$ -хромосоме от *A. intermedium* в рассматриваемых линиях, неизвестно. У мягкой пшеницы подавляющее большинство локусов *QPhsR* сосредоточено в хромосомах группы 3 и 4, и крайне редко они встречаются в хромосомах группы 6 (Крупнов и др., 2010а).

Кроме того, следует обратить внимание на то, что низкий уровень УкП наблюдается не только у линии Л400R с $6Ag^i(6D)$ -хромосомой,

но также у изогенной линии Л400S, у которой этой хромосомы нет. Это свидетельствует о том, что $6Ag^i(6D)$ -хромосома, по-видимому, вносит изменения в регуляцию устойчивости к предуборочному прорастанию уже в F_1 -гибридах.

В литературе нам не удалось найти информацию о результатах аналогичных исследований по влиянию хромосомы от *A. intermedium* на УкП пшеницы. Между тем на рекомбинантных генотипах от скрещивания устойчивого к предуборочному прорастанию синтетического гексаплоида Syn37 (*Aegilops tauschii/Triticum turgidum* L. ssp. *durum* var. Altar84) с неустойчивым сортом мягкой пшеницы Janz было показано, что в геноме сорта имеется фактор УкП, но он не экспрессируется из-за наличия супрессора в D-геноме (Imtiaz *et al.*, 2008).

Выводы

Все белозерные линии *T. aestivum*, содержащие $6Ag^i(6D)$ -хромосому от *A. intermedium*, не устойчивы к предуборочному прорастанию. Из четырех пар почти изогенных линий, содержащих $6Ag^i(6D)$ -хромосому от *A. intermedium*, но различающихся по окраске зерна, в трех парах краснозерные сибывы не устойчивы к предуборочному прорастанию, а в паре Л293 и Л688 краснозерная линия Л293 среднеустойчива. Установлены также значимые различия по устойчивости к предуборочному прорастанию между краснозерными рекомбинантными инбредными линиями, содержащими эту хромосому, что, по-видимому, связано с эффектом генетического окружения. Однако все без исключения краснозерные рекомбинантные линии, содержащие $6Ag^i(6D)$ -хромосому от *A. intermedium*, по УкП значимо уступают таким краснозерным контрольным линиям, как Л503 и Л2032. Результаты нашего исследования свидетельствуют об актуальности изучения генетического содержания $6Ag^i(6D)$ -хромосомы от *A. intermedium*, в частности, выяснения молекулярных механизмов ее влияния на устойчивость к предуборочному прорастанию *T. aestivum*.

Литература

Антонов Г.Ю. Источники устойчивости к предуборочному прорастанию и продуктивность яровой мягкой пшеницы: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Саратов: ФГОУ ВПО Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова, 2007. 20 с.

- Коваль С.Ф., Коваль В.С., Шаманин В.П. Изогенные линии пшеницы. Омск: Омскбланкиздат, 2001. 152 с.
- Коваль С.Ф., Ермакова М.Ф., Попова Р.К. Сравнительное изучение краснозерных и белозерных линий яровой пшеницы // Изогенные линии культурных растений: Матер. Первого Всесоюз. совещ. по использованию изогенных линий в селекционно-генетических экспериментах (Новосибирск, 27–29 марта 1990). Новосибирск, 1991. С. 140–148.
- Крупнов В.А., Антонов Г.Ю., Сибикеев С.Н., Крупнова О.В. Устойчивость к предуборочному прорастанию краснозерной и белозерной мягкой пшеницы // Современные проблемы почвозащитного земледелия и пути повышения устойчивости зернового производства в степных регионах: Сб. докл. междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 50-летию РГП «НПЦ зернового хозяйства им. А.И. Барасева». МСХ РК – Шортланды, 2006. Ч. 2. С. 87–92.
- Крупнов В.А., Сибикеев С.Н., Крупнова О.В. Генетический контроль покоя и устойчивости к предуборочному прорастанию семян у пшеницы // С.-х. биология. 2010а. № 3. С. 3–16.
- Крупнов В.А., Сибикеев С.Н., Крупнова О.В. и др. Эффекты взаимодействия транслокаций от пырея удлиненного и пырея промежуточного в генофоне мягкой пшеницы // Аграрный вестн. Юго-Востока. 2010б. № 1 (4). С. 11–14.
- Крупнова О.В. Влияние года, Lr-транслокаций и почернения зародыша на число падения у сортов и линий яровой мягкой пшеницы // Сб. матер. региональной науч.-практ. конф. 26–27 февраля 2009 г. Саратов. Ч. 1. С. 135–143.
- Крупнова О.В. Качество зерна яровой мягкой пшеницы с транслокациями от сородичей: Автореф. дис. д-ра биол. наук. Саратов: ГНУ НИИСХ Юго-Востока, 2010. 44 с.
- Крупнова О.В., Дружин А.Е., Воронина С.А., Крупнов В.А. Содержание и качество клейковины у рекомбинантных линий мягкой пшеницы с транслокацией Lr19(7D) от *Agropyron elongatum* Host. и 6Agi(6D)-хромосомой от *Agropyron intermedium* Host. // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 4. С. 641–646.
- Крупнова О.В., Сибикеев С.Н., Крупнов В.А. и др. Качество зерна у устойчивых и восприимчивых к предуборочному прорастанию генотипов пшеницы // Сб. науч. тр., посвящ. 135-летию со дня рождения Г.К. Мейстера и 100-летию со дня основания Аркадак. опыт. станции. ГНУ НИИСХ Юго-Востока Россельхозакадемии. Саратов: Ракус, 2009. С. 113–119.
- Неттевич Э.Д. Качество зерна яровой мягкой пшеницы в связи с устойчивостью к прорастанию на корню // Докл. РАСХН. 1999. № 6. С. 6–8.
- Неттевич Э.Д., Беркутова Н.С., Максименко М.И. Устойчивость сортов яровой пшеницы к прорастанию зерна в колосе и селекция на качество в условиях Нечерноземья // С.-х. биология. 1986. № 2. С. 3–7.
- Пеккер Е.Г., Коваль С.Ф. Ингибиторы прорастания краснозерных аналогов яровой пшеницы Новосибирская 67 // Физиология и биохимия культурных растений. 1985. Т. 17. С. 571–576.
- Пухальский А.В., Максимов И.Л., Черемисова Т.Д. Генетические ресурсы селекции озимой пшеницы на устойчивость к предуборочному прорастанию зерна // Докл. ВАСХНИЛ. 1986. № 2. С. 15–17.
- Сибикеев С.Н., Крупнов В.А., Воронина С.А., Бадаева Е.Д. Идентификация чужеродной хромосомы у линии мягкой пшеницы Мульти 6R // Генетика. 2005. Т. 41. № 8. С. 1084–1089.
- Соловов Д.П. Устойчивость яровой мягкой пшеницы к предуборочному прорастанию в Нижнем Поволжье: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Саратов: ГНУ НИИСХ Юго-Востока, 2003. 23 с.
- Bailey P.C., McKibbin R.S., Lenton J.R. *et al.* Genetic map locations for orthologous *Vp1* genes in wheat and rice // Theor. Appl. Genet. 1999. V. 98. P. 281–284.
- Biddulph T.B., Plummer J.A., Setter T.L., Mares D.J. Seasonal conditions influence dormancy and preharvest sprouting tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) in the field // Field Crops Res. 2008. V. 107. P. 116–128.
- Flintham J.E. Different genetic components control coat-imposed and embryo-imposed dormancy in wheat // Seed Sci. Res. 2000. V. 10. P. 43–50.
- Humphreys D.G., Noll J. Methods for characterization of preharvest sprouting tolerance in a wheat breeding program // Euphytica. 2002. V. 126. P. 61–65.
- Imtiaz M., Ogbonnaya F.C., Oman J., van Ginkel M. Characterization of quantitative trait loci controlling genetic variation for preharvest sprouting in synthetic backcross-derived wheat lines // Genetics. 2008. V. 178. P. 1725–1736.
- Li Y.-C., Ren J.-P., Cho M.-J. *et al.* The level of expression of thioredoxin is linked to fundamental properties and applications of wheat seeds // Mol. Plant. 2009. V. 2. P. 430–441.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J. *et al.* Catalogue of gene symbols for wheat: 2009. Supplement // Annu. Wheat Newslett., KSU, USA. 2009. V. 55. P. 256–278.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J. *et al.* Catalogue of Gene Symbols for Wheat. 2008. <http://www.grs.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/>
- McKibbin R.S., Wilkinson M.D., Bailey P.C. *et al.* Transcripts of *Vp-1* homeologues are misspliced in modern wheat and ancestral species // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 10203–10208.
- Pike P.R., MacRitchie F. Protein composition and quality of some new hard white winter wheats // Crop Sci. 2004. V. 44. P. 173–176.
- Pukhalskiy V.A., Iordanskaya I.V. Inheritance of pre-harvest sprouting tolerance in the *Triticum aestivum* L. Cultivar VIR 52548 // Proc. of the 9th Intern. Wheat Genet. Symp., Saskatoon, Saskatchewan, Canada 2–7 August 1998. P. 34–36.
- Shahpiri A., Svensson B., Finnie C. From proteomics to structural studies of cytosolic/mitochondrial-type thioredoxin systems in barley seeds // Mol. Plant. 2009. V. 2. P. 378–389.
- Wong J.H., Kim Y.B., Ren P.H. *et al.* Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleurone // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 16325–16330.
- Yang Y., Ma Y.Z., Xu Z.S. *et al.* Isolation and characterization of *Viviparous-1* genes in wheat cultivars with distinct ABA sensitivity and pre-harvest sprouting tolerance // J. Exp. Bot. 2007. V. 58. P. 2863–2871.

**PREHARVEST SPROUTING RESISTANCE
IN SPRING BREAD WHEAT CARRYING CHROMOSOME $6Ag^i(6D)$
FROM *AGROPYRON INTERMEDIUM***

V.A. Krupnov, G.Yu. Antonov, A.E. Druzhin, O.V. Krupnova

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

Summary

A significant adverse effect of chromosome $6Ag^i(6D)$ -from *Agropyron intermedium* on preharvest sprouting resistance was found in inbred lines (F_7 - F_{10} or senior) and near-isogenic lines of red-grain and white-grain common spring wheat. The red-grain recombinant inbred lines, carrying this substitution chromosome, varied significantly in this trait, probably, owing to the genetic background effect. The causes of the adverse effect of chromosome $6Ag^i(6D)$ from *Agropyron intermedium* on preharvest sprouting resistance are unknown.

Key words: *Triticum aestivum*, *Agropyron intermedium*, red grain, white grain, kernel color, dormancy, preharvest sprouting resistance, *Lr19* translocation, $6Ag^i(6D)$ chromosome.

УДК 633.112.:575.1.

ИЗМЕНЧИВОСТЬ КОМБИНАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ ВЫРАЩИВАНИЯ*

© 2012 г. В.С. Юсов, М.Г. Евдокимов, Б.М. Татина

Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Россельхозакадемии, Омск, Россия, e-mail: vc_ysov@rambler.ru

Поступила в редакцию 2 августа 2011 г. Принята к публикации 23 января 2012 г.

Проведено изучение изменчивости комбинационной способности сортов яровой твердой пшеницы в зависимости от условий выращивания в системе топкроссов. Выявлено, что детерминация изученных признаков определяется аддитивными эффектами генов и наибольшим влиянием условий среды подвержены варианты ОКС.

Ключевые слова: твердая пшеница, комбинационная способность, условия среды, эффекты ОКС, эффекты СКС.

Введение

Эффективность селекции во многом зависит от ценности родительских форм, включаемых в скрещивания. Эти компоненты подбираются с учетом требований, которые предъявляются к создаваемому сорту. Чем больше информации накоплено об исходном материале и о характере наследования селекционируемых признаков, тем надежнее подбираются компоненты для гибридизации. Для этой цели необходимо перед включением генотипов в гибридизацию изучить их по комплексу хозяйственно ценных признаков, определить характер наследования, основные генетические параметры в местных условиях. При этом нужно иметь в виду, что проявляется высокая степень изменчивости характера наследования под влиянием внешней среды (Цильке, 1975).

Ранее проведенные исследования методом диаллельного анализа показали, что по основным количественным признакам у твердой пшеницы также проявляется зависимость генетических параметров от условий выращивания (Абдуллаев, 1997, Евдокимов, 2006).

Эффекты общей комбинационной (ОКС) и специфической комбинационной способности (СКС) связаны с генетическим разнообразием конкретного селекционного материала, и они могут меняться в зависимости от условий выращивания. Следовательно, значения ОКС и СКС также подвержены экологической изменчивости.

Материалы и методика

Полевые опыты были заложены в 2006–2008 гг. по пару в селекционном севообороте лаборатории селекции твердой пшеницы СибНИИСХ. Посев проводился ручной сажалкой конструкции СибНИИСХ. Гибриды F_1 – F_2 и родительские формы высевались в 3-кратной повторности. В каждой повторности закладывалось по 20 зерен F_1 и по 40 зерен исходных сортов и F_2 с площадью питания 20×10 см. Срок посева – 17, 18 мая.

По характеру распределения осадков в критический период (июнь – 1-я декада июля) 2006 г. характеризуется как умеренно засушливый, 2007 г. – избыточно увлажненный, а 2008 г. – за-

* Работа была представлена на Международной научной конференции «Экология, генетика, селекция на службе человечества», Ульяновск, 2011.

Таблица 1

Изменчивость комбинационной способности признаков у гибридов яровой твердой пшеницы

Источник варьирования	Признак															
	количество колосков в колосе		число зерен в колосе		масса зерна главного колоса		масса 1000 зерен		продуктивная кустистость		длина стебля		длина верхнего междоузлия		длина колоса	
	ms	%	ms	%	ms	%	ms	%	ms	%	ms	%	ms	%	ms	%
ОКС ♀	0,08	7,07	4,53	5,35	0,01	3,85	2,41	3,16	0,10	16,90	3,78	6,75	4,75	10,89	0,05	6,20
ОКС ♂	0,22	20,98	14,93	17,63	0,08	24,19	7,88	10,34	0,01	1,88	11,21	20,03	6,39	14,65	0,25	30,52
СКС	0,05	4,98	4,37	5,16	0,01	3,04	1,79	2,35	0,04	6,71	2,14	3,82	1,03	2,35	0,02	2,06
Взаимодействие ОКС ♀ × год	0,28	26,79	21,58	25,49	0,09	28,14	30,08	39,45	0,22	35,81	16,67	29,80	12,18	27,93	0,17	20,47
Взаимодействие ОКС ♂ × год	0,28	25,95	30,25	35,73	0,09	29,14	25,22	33,07	0,03	4,99	15,72	28,09	13,27	30,44	0,26	32,42
Взаимодействие СКС × год	0,15	13,80	8,66	10,23	0,04	11,31	8,55	11,22	0,20	32,81	6,23	11,14	5,80	13,30	0,07	8,09
Случайные отклонения	0,01	0,42	0,34	0,40	0,01	0,34	0,32	0,42	0,01	0,90	0,20	0,36	0,19	0,43	0,01	0,23

Таблица 2

Эффекты общей комбинационной способности сортов твердой пшеницы

Сорта	Признак															
	количество колосков		число зерен в колосе		масса зерна главного колоса		масса 1000 зерен		продуктивная кустистость		длина стебля		длина верхнего междоузлия		длина колоса	
	ms	%	ms	%	ms	%	ms	%	ms	%	ms	%	ms	%	ms	%
Омская янтарная ♀	-0,13		-0,01		-0,02		-0,31		0,20		0,07		-1,03		-0,11	
Омский корунд ♀	-0,19		-0,79		-0,02		1,01		0,05		2,13		2,10		-0,15	
Жемчужина Сибири ♀	0,08		1,42		0,10		0,62		0,07		-0,17		-0,77		0,04	
Гор.95-139-3 ♀	-0,05		0,52		0,04		0,19		-0,14		-0,23		0,49		-0,05	
Гор.98-96-3 ♀	0,05		-1,98		-0,09		0,06		-0,31		-1,04		0,42		0,05	
Омский рубин ♀	0,25		0,84		-0,01		-1,58		0,13		-0,77		-1,21		0,21	
Омский кристалл ♂	0,12		-0,05		0,01		0,56		0,03		1,52		1,17		0,18	
Омская степная ♂	0,10		-1,55		-0,12		-1,32		0,02		-1,12		-0,79		0,05	
Безенчукская степная ♂	-0,22		1,60		0,11		0,76		-0,05		-0,40		-0,38		-0,22	
$\bar{g}_i - \bar{g}_i$	0,05		0,11		0,95		0,05		0,92		0,12		0,73		0,71	

Примечание. $\bar{g}_i - \bar{g}_i$ – ошибка попарного сравнения эффектов ОКС.

сушливый. Это же подтверждает и гидротермический коэффициент за вегетационный период: в 2006 г. – 0,94, 2007 г. – 1,64, 2008 г. – 0,75.

Таким образом, климатические условия в годы проведения исследований были довольно контрастными и полно отражали особенности данного региона.

В скрещиваниях по системе полных топкроссов в качестве материнских форм использовали следующие сорта: Омская янтарная, Омский корунд, Жемчужина Сибири, Гор. 95-139-3, Гор. 98-96-3, Омский рубин и отцовские формы: Омский кристалл, Омская степная, Безенчукская степная. Комбинационная способность по серии опытов рассчитывалась по методике Литуна (1980).

В связи с этим основной целью нашей работы было определить реакцию изменений эффектов ОКС и СКС под воздействием условий внешней среды.

Результаты и обсуждение

Проведенный дисперсионный анализ показывает, что значимость различий гибридов по средним генотипическим ценностям обусловлена существенными различиями средних (по пунктам испытания) вариантов ОКС и СКС (табл. 1). По всем изученным признакам: длина колоса, количество колосков, количество зерен в колосе, масса зерна главного колоса, масса 1000 зерен, продуктивная кустистость, длина верхнего междоузлия, длина стебля – проявляется высокое взаимодействие ОКС с условиями внешней среды от 20 до 39 %. Влияние условий среды на СКС проявляется в меньшей степени и составляет от 8 до 13 %.

Анализ комбинационной способности показал, что по всем признакам за исключением продуктивной кустистости наибольшее влияние оказали аддитивные эффекты отцовских форм, варианты меняются по годам, и в наибольшей степени это проявляется по признакам: «количество колосков», «масса зерна главного колоса», «масса 1000 зерен», «продуктивная кустистость», «длина верхнего междоузлия», и даже если учитывать влияние внешней среды, детерминация признака определяется аддитивными эффектами генов, которые закрепляются в процессе селекции.

Знание закономерностей варьирования количественных признаков играет важную роль в селекции растений при отборе ценных генотипов. В связи с этим были рассчитаны эффекты ОКС. В качестве доноров на признаковую селекцию по результатам оценки эффектов ОКС (табл. 2) рекомендуются следующие сорта: по количеству зерен в колосе – Жемчужина Сибири, Гор. 95-139-3, Омский рубин, Безенчукская степная; по массе зерна главного колоса – Жемчужина Сибири, Гор. 95-139-3, Безенчукская степная; по массе 1000 зерен – Омский корунд, Жемчужина Сибири, Омский кристалл, Безенчукская степная; по количеству колосков в колосе – Омский рубин, Омский кристалл, Омская степная; по продуктивной кустистости – Омская янтарная, Омский рубин, Жемчужина Сибири; по длине стебля – Омская янтарная, Жемчужина Сибири, Гор. 98-96-3, Омская степная, Безенчукская степная (сокращение), Омский корунд, Омский кристалл (увеличение); по длине верхнего междоузлия – Омская янтарная, Жемчужина Сибири, Омская степная, Безенчукская степная (сокращение), Омский корунд, Омский кристалл (увеличение); по длине колоса – Омский корунд, Безенчукская степная (сокращение), Омский рубин, Омский кристалл (увеличение).

Таким образом, установлено, что детерминация изученных признаков определяется аддитивными эффектами генов, наибольшим влиянием условий среды подвержены варианты ОКС.

В качестве доноров на признаковую селекцию по комплексу признаков можно использовать Жемчужину Сибири и Безенчукскую степную.

Литература

- Цильке Р.А. Принципы и методы селекции сельскохозяйственных культур // Селекция и семеноводство полевых культур в Западной Сибири: Сб. науч. тр. СибНИИСХ, 1975. Т. 25. С. 3–18.
- Литун П.П. Методические рекомендации по применению математических методов для анализа экспериментальных данных по изучению комбинационной способности / П.П. Литун, В.Г. Вольф. Харьков, 1980. 77 с.
- Абдуллаев К.К. Эколого-генетические основы селекции твердой пшеницы в Казахстане: Автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. Алмалык, 1997. 44 с.
- Евдокимов М.Г. Селекция яровой твердой пшеницы в условиях юга Западной Сибири: Автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. Омск: ОмГАУ, 2006. 32 с.

VARIABILITY OF COMBINING ABILITY IN DURUM WHEAT DEPENDING ON GROWTH CONDITIONS

V.S. Yusov, M.G. Evdokimov, B.M. Tatina

Siberian Agricultural Research Institute of SB RAAS, Omsk, Russia,
e-mail: vc_ysov@rambler.ru

Summary

The variability of combining ability depending on growing conditions was studied in spring durum wheat varieties in a topcross system. It was found that the manifestation of the traits under study was determined by additive effects of genes and general combination ability variances were most susceptible to environmental conditions.

Key words: durum wheat, combining ability, environmental conditions, general combination ability effects, specific combination ability effects.

УДК 633.112.1:631.527

СЕЛЕКЦИЯ ОЗИМОЙ ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ НА ПОВЫШЕНИЕ АДАПТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА И УРОЖАЙНОСТЬ*

© 2012 г. Г.В. Щипак¹, Р.А. Недоступов¹, В.Г. Щипак²

¹ Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН, Харьков, Украина,
e-mail: ppi@kharkov.ukrtel.net;

² Приморский опытно-селекционный участок ОАО им. Ильича, Мариуполь, Украина

Поступила в редакцию 2 августа 2011 г. Принята к публикации 26 февраля 2012 г.

Изложены основные этапы, результаты и методы многолетних исследований по созданию исходного материала для селекции озимой твердой пшеницы. Дана оценка новых сортов по урожайности, морозо- и зимостойкости, элементам продуктивности.

Ключевые слова: пшеница твердая озимая, отдаленная гибридизация, внутривидовые скрещивания, синтетические популяции, морозо- и зимостойкость, урожайность.

Твердая пшеница *Triticum durum* Desf. по своей значимости считается в странах СНГ второй после мягкой пшеницы культурой. Площадь ее посевов составляет 14–17 млн га, или 8 % от мягкой пшеницы, а валовое производство зерна – 30–35 млн т.

Русские твердые яровые пшеницы издавна славились прекрасными качествами зерна – стекловидностью и высокой белковостью, представляя незаменимый материал для производства муки-крупчатки, макарон, манной крупы, мучных кондитерских изделий. Именно за эти качества зерна твердые яровые пшеницы назывались жемчужиной России и оценивались на мировом рынке на 10–15 % выше, чем мягкие пшеницы. Наши твердые пшеницы вызывали восхищение на всех выставках. Например, на Лондонской всемирной выставке отмечены и награждены медалями керченская пшеница Белотурка в 1850 г., оренбургская Кубанка в 1862 г.

Россия и СССР являлись крупными производителями высококачественного зерна яровой твердой пшеницы. До второй мировой войны из 165 млн га посевов пшеницы в мировом земледелии на долю твердой пшеницы приходилось

около 10 %. Больше всего твердой яровой пшеницы высевалось в СССР. В 1940-х гг. ее посевы достигали свыше 4 млн га, в том числе в Украине – 645 тыс. га. В послевоенные годы посевы твердой пшеницы начали расширяться и достигли максимума в 1966 г. – около 8 млн га, или 11,4 % площадей посева пшеницы в стране. Внедрение продуктивных сортов мягкой пшеницы привело к резкому сокращению посевов яровой твердой как менее урожайной. Это вызвало значительное снижение производства зерна твердой пшеницы, а перерабатывающая промышленность стала использовать зерно мягкой пшеницы, изделия из которой не отличались высоким качеством. Решить эту проблему можно было созданием сортов озимой твердой пшеницы, которая бы обеспечивала урожайность, равную урожайности современных сортов озимой мягкой пшеницы.

Интерес к озимой твердой пшенице проявился относительно давно. Первое описание возделывания озимой твердой пшеницы Сары-Бугда в районе Дербента выполнено А.М. Бажановым (1856 г.). Эта пшеница вымерзала в бесснежные зимы и оказалась непригодной для возделывания в России. Попытки ввести твердую пше-

* Работа была представлена на Международной научной конференции «Экология, генетика, селекция на службе человечества», Ульяновск, 2011.

ницу в озимую культуру были предприняты в последней четверти 19 в. Обнаруженные формы и сорта озимой твердой пшеницы возделывались в южных районах страны.

С 1914 г. впервые в мировой практике Е.А. Кобальтова (1927, 1930) на Безенчукской опытной станции скрещивала озимую мягкую пшеницу с яровой твердой. Она доказала возможность получения типично озимой твердой пшеницы, создав две формы (Леукурум 1278 и 1320), которые зимовали на уровне среднезимостойких сортов озимой мягкой пшеницы.

На Краснодарской селекционной станции с 1931 г. П.П. Лукьяненко (1973) также применял метод межвидовой гибридизации озимой мягкой пшеницы с яровой твердой. Для повышения зимостойкости межвидовых гибридов он использовал возвратные скрещивания с озимой мягкой пшеницей, получил интересные гибридные формы (Гордеиформе 027/129 и др.), но работа была прекращена. Возобновление исследований с 1962 г. привело к созданию высокопродуктивных адаптированных к местным условиям сортов (Леукурум 21, Алена, Карат, Крупинка), способных конкурировать с озимой мягкой пшеницей и неуступающих по качеству зерна яровой твердой (Мудрова, Костин, 2001).

Селекция озимой твердой пшеницы в Зернограде (Всероссийский НИИСЗК) начата академиком ВАСХНИЛ И.Г. Калиненко в 1957 г. практически с нуля. Основным методом получения исходного материала была внутривидовая и межвидовая гибридизация с использованием в скрещиваниях твердой, тургидной и мягкой пшеницы (Самофалова и др., 2001). Выдающимся российским селекционером И.Г. Калиненко создана серия морозо- и зимостойких продуктивных сортов тургидной (Новинка, Новинка 2, Новинка 3, Новинка 4, Новинка 5, Донской янтарь, Терра) и твердой пшеницы (Дончанка, Жемчужина Дона, Гелиос, Аксинит, Амазонка). За счет продуктивной селекционной работы урожайность современных сортов тургидной озимой пшеницы (Донской янтарь, Терра) возросла в сравнении с исходной формой Губице 47–44 на 2,6 т/га. Рост урожайности связан с использованием в скрещиваниях хорошо адаптированных к условиям зоны сортов твердой пшеницы с высокой морозо- и зимостойкостью Харьковская 1 и Харьковская 909, созданием короткостебельных форм интен-

сивного типа. В сорте Донской янтарь удалось совместить короткостебельность с относительно высокой зимостойкостью и урожайностью (9,2 т/га на Целинском сортоучастке Ростовской области). Однако по морозо- и зимостойкости сорта тургидной озимой пшеницы донской селекции, как и сорта озимой твердой пшеницы других селекционных учреждений, все еще уступают лучшим сортам озимой мягкой.

В Украине работы по созданию озимой твердой пшеницы в условиях Одессы с 1945 г. развернул Ф.Г. Кириченко (1955, 1956, 1962), используя тот же метод гибридизации сортов озимой мягкой с яровой твердой пшеницей, но на других сортах. Наиболее ценные в хозяйственном отношении образцы выведены от повторных скрещиваний с высокозимостойкими сортами озимой мягкой пшеницы. Сорт Мичуринка районировали в 1960 г., а Новомичуринка – начиная с 1963 г. В дальнейшем выполнение программы создания комплексно ценных сортов с использованием в гибридизации доноров короткостебельности, морозо- зимостойкости позволило выделить целый ряд высокоурожайных, достаточно зимостойких, с отличными макаронными качествами короткостебельных сортов озимой твердой пшеницы (Парус, Коралл, Айсберг одесский, Алый парус и др.). Основным методом селекции морозо- и зимостойкой озимой твердой пшеницы остается применение прерывистых беккроссов на фоне внутривидовой и межвидовой гибридизации (Кириченко и др., 1980; Паламарчук, 1989, 2004).

В Харькове с 1950 г. велись исследования по созданию и селекции озимой твердой пшеницы под руководством А.Ф. Шулындина. Целью работ являлось получение высокозимостойких урожайных форм озимой твердой пшеницы для более суровых условий зимовки. Теоретические разработки и тщательное наблюдение над полученными межвидовыми гибридами позволили А.Ф. Шулындину сделать важные выводы и обобщения, значительно дополняющие данные предшествующих исследователей (Шулындин, 1954, 1957, 1966).

Впервые было показано, что наследование и темпы формирования свойства зимостойкости у межвидовых гибридов, наряду с выбором высокозимостойкого сорта озимой мягкой пшеницы, во многом зависят от особенностей

яровой твердой пшеницы. А.Ф. Шулындиным созданы новые формы озимой твердой пшеницы с продолжительностью яровизации 45–50 дней, превышающие по урожайности яровую твердую в 1,5–2 раза (табл. 1).

Среди многочисленных и разнообразных форм озимой твердой пшеницы первого этапа работ по морозо- и зимостойкости особенно выделялась Леукурум 456/3, отобранная из комбинации от скрещивания озимой мягкой пшеницы Алабасская с яровой твердой пшеницей Народная (рис. 1). Однако эта сравнительно позднеспелая, хорошо кустящаяся, высокорослая линия имела мелкие колос и зерно (масса 1000 семян – 27–30 г).

Мелкозерные формы озимой твердой пшеницы Леукурум 456/3, Гордеиформе 1, Гордеиформе 25 (харьковской селекции), Мичуринка и Новомичуринка (селекции СГИ) уступали стандартному сорту озимой мягкой пшеницы Безостая 1 на 30–40 %. Исключительно большой урон урожаю наносило полегание. Совершенно недостаточной была и зимостойкость крупнозерных форм твердой пшеницы. Решение этих проблем осуществлялось методами межвидовых и внутривидовых скрещиваний.

На втором этапе исследований А.Ф. Шулындин создал два новых сорта озимой твердой пшеницы – Харьковская 909 (отбор из комбинации Леукурум 456/3/ Гордеиформе 231) и Харьковская 1 в результате скрещивания той же Леукурум 456/3 с Гордеиформе 13. Сорта превзошли стандарт Новомичуринку по зимостойкости и урожайности. В среднем за 1966–1968 гг. Харьковская 909 опередила Новомичуринку на

Таблица 1
Урожай зерна первых сортов озимой твердой пшеницы (КСИ, ц/га) (Шулындин, 1966)

Культура, сорт	Урожай по годам			\bar{X}	в %
	1962	1963	1964		
Озимая твердая пшеница					
Леукурум 13	32,1	46,1	35,2	37,8	83,8
Леукурум 21	33,8	43,6	34,1	37,2	82,5
Леукурум 456/3	22,9	30,0	29,1	27,3	60,5
Мичуринка, ст.	27,6	30,1	30,8	29,5	65,5
Озимая мягкая пшеница					
Безостая 1	40,5	51,2	48,5	45,1	100
Одесская 3	29,7	35,6	43,9	36,4	80,7

11,4 ц/га, имела крупное высокостекловидное зерно (масса 1000 семян 49,7 г) янтарно-желтого цвета с хорошими технологическими показателями. Сорт был устойчив к поражению мучнистой росой и бурой ржавчиной.

Высокой урожайностью отличалась и Харьковская 1. В среднем за 3 года сорт обеспечил сбор зерна на 7,1 ц/га больший, чем стандарт Новомичуринка. Относительно высокая зимостойкость сочеталась с повышенной засухоустойчивостью и отличными технологическими качествами. Основной недостаток созданных сортов – склонность к полеганию (табл. 2).

Уникальное совмещение на оптимальном уровне ведущих хозяйственно ценных признаков у сортов озимой твердой пшеницы Харьковская 1 и Харьковская 909 в полной мере было

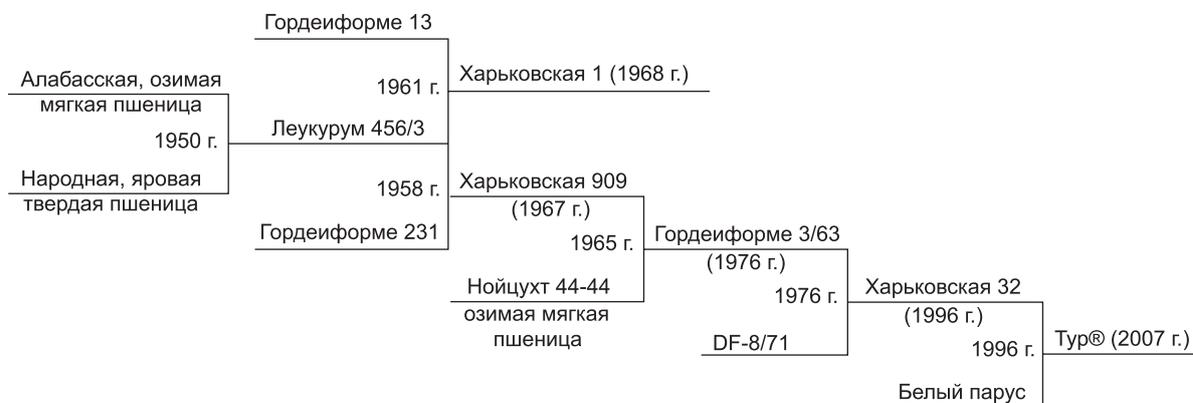


Рис. 1. Генеалогия сортов озимой твердой пшеницы.

Таблица 2

Результаты изучения озимой твердой пшеницы второго этапа селекции в конкурсном сортоиспытании (1966–1968 гг.) (Шулындин, Шевченко, 1970)

Показатели	Единица измерения	Новомичуринка, стандарт, \bar{X}	Харьковская 1		Харьковская 909	
			\bar{X}	\pm к ст.	\bar{X}	\pm к ст.
Урожай зерна	ц/га	22,6	29,7	+7,1	34,0	+11,4
Масса 1000 зерен	г	34,8	38,5	+3,7	49,7	14,9
Морозостойкость (–15 °С)	%	6,8	35,6	+28,8	72,2	65,4
Вегетационный период	дней	300	300	0	300	0
Высота растений	см	103	117	+14	113	+10
Устойчивость к полеганию	балл	5,0	3,7	–1,3	4,7	–0,3
Клейковина	%	28	32	+4	28	0
Белок	%	13,4	13,4	0	13,2	–0,2

Таблица 3

Сорта озимой твердой пшеницы, выведенные с участием образцов харьковской селекции (Щипак, 2008)

Исходные образцы	Полученные сорта	Оригинатор сорта	
Харьковская 1	Новинка 4 Новинка 5 Жемчужина Дона	ВНИИСЗК, зерноград	
	Леукурум 21 Алена	КНИИСХ, Краснодар	
	Парус Коралл Айсберг одесский Алый парус Дельта Дельфин	СГИ, Одесса	
	Прикумчанка	Прикумская с.-х. оп. ст., Буденновск	
	Харьковская 909	Карат Кахрабо	КНИИСХ, Краснодар
		Дурумко	НИПИО, Нови Сад, Югославия

в дальнейшем использовано селекционерами Одессы, Краснодара, Зернограда, Саратова и Нови Сад (табл. 3).

Следующий важный этап селекции урожайных и зимостойких твердых пшениц – выведение А.Ф. Шулындиным сорта Гордеиформе 3 (1203). Он получен методом межвидовой гибридизации озимой твердой пшеницы Харьковская 909 с озимой мягкой пшеницей Нойцухт 44-44 (ржа-

но-пшеничный гибрид). Скрещивание было осуществлено в 1965 г., элитное растение выделено в 1969 г., а передача в ГСИ – в 1976 г.

Гордеиформе 3 выделяется высокой морозо- и зимостойкостью растений. После промораживания в холодильной камере при температуре –15 °С (1974 г.) живых растений сохранилось у Новомичуринки 0 %, Харьковской 1 – 7,0 %, Гордеиформе 3 – 95 %. Подтвердилась повышен-

ная устойчивость сорта и в полевых условиях. В неблагоприятную зиму 1972 г. Харьковская 1 сохранилась на 0,3 балла, Гордеиформе 3 – 3,0 балла. В 1974 г. Харьковская 1 погибла, а у Гордеиформе 3 выжило 68,5 % растений. Однако Гордеиформе 3, как и предыдущие сорта харьковской селекции, отличалась неустойчивостью к полеганию, особенно в районах Кубани и при орошении (Шевченко, Щипак, 1997).

Для создания низкостебельных пшениц использовали полукарликовые формы озимой слабозимостойкой твердой пшеницы из Румынии. Во второй половине 1970-х гг. от внутривидовых скрещиваний Гордеиформе 3 и Гордеиформе 3/63 с румынскими сортами DF-8/71 и DF-14/71 были отобраны средне- и низкорослые биотипы с зимостойкостью растений на уровне стандартного сорта с крупным и хорошо выполненным зерном. «Полукарлики» харьковской селекции отличались большей зимостойкостью, чем краснодарские, формировали очень крупное зерно. Так, в 1980 г. короткостебельная линия F₄ (DF-8/71/Гордеиформе 3/63) в машинных посевах сформировала зерно массой 1000 шт. 50,2 г. В дальнейшем эта линия была передана в ГСИ под названием Харьковская 32. В среднем за 3 года государственного испытания (1993–1995 гг.) урожай зерна Харьковской 32 в степи составил 44,0, лесостепи – 51,2 ц/га. Зарегистрирован сорт с 1996 г.

Еще до передачи Харьковской 32 в ГСИ работа по селекции озимой твердой пшеницы в Институте растениеводства пошла на спад. А.Ф. Шулындин с середины 1970-х гг. основные силы переключил на селекцию тритикале. Масштабы работ с пшеницей резко снизились. Так, в 1980 г. все виды посевов озимой твердой пшеницы составили всего 1454 декары, в том числе в контрольном питомнике – только 28. Со смертью А.Ф. Шулындина (1983 г.) свертывание исследований ускорилось и впоследствии тема была закрыта.

С 1995 г. работа по селекции озимой твердой пшеницы была возобновлена нами в отделе тритикале Института растениеводства им. В.Я. Юрьева. Новый исходный материал создавался методами межвидовой и внутривидовой гибридизации. Использовали сорта озимой и яровой пшеницы зерноградской, одесской, запорожской, саратовской селекции и несколь-

ко образцов, созданных ранее сотрудниками Института растениеводства им. В.Я. Юрьева Н.С. Шевченко и В.Н. Чередниченко. Ежегодно получали 180–340 комбинаций F₁. Проработка популяций F₂–F₅, индивидуальные отборы и оценка линий F₄–F₈ осуществлялись в условиях острозасушливой степи (Мариуполь, Приморский опытно-селекционный участок) и лесостепи (Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева). К 2000 г. генофонд озимой твердой пшеницы насчитывал 4,5 тыс. линий, в 2009 г. объем всех видов питомников достиг 11,8 тыс. образцов. После очередного закрытия тематики по озимой твердой пшенице (2009 г.) исследования, связанные с созданием исходного материала этой культуры, в Институте растениеводства пришлось свернуть.

Перспективные по урожайным и адаптивным свойствам гибридные популяции получены скрещиванием линий и сортов Харьковская 23, Харьковская 32, Белый парус, Айсберг одесский, Карат, Василина. Морозо- и зимостойкие сортовые популяции, созданные объединением линий, отобранных из комбинации Харьковская 32/Белый парус, послужили основой для выведения сортов Тур (ПУ № 0746) и Макар (ПУ № 0846). При многократных промораживаниях в холодильных камерах выживаемость растений этих форм твердой пшеницы превышала стандарты на 17–32 %. Потенциальная урожайность новых сортов составляет более 9 т/га.

Разнообразный в морфобиологическом и хозяйственном отношении селекционный материал получен с привлечением в скрещивания линии озимой твердой пшеницы Кандиканс 1996/4, созданной ранее в результате межродовой гибридизации (рис. 2). Основные достоинства этой безостой твердой пшеницы – высокая зимостойкость, оптимальная высота растений (90–100 см), недостатки – позднеспелость, мелкое зерно. Сложное расщепление по морфобиологическим признакам и необычайно трудные условия перезимовки, сложившиеся в 2003 г., способствовали отбору существенно более морозо- и зимостойких, продуктивных генотипов, преимущественно разновидностей леукурум и гордеиформе, которые вошли в состав сортов многолинейного типа. Так, озимая твердая пшеница Афина (Кандиканс 1996/4 / Харьковская 32, ПУ № 0976) сочета-

ет относительно высокий для этой культуры уровень морозо- и зимостойкости с реальной урожайностью свыше 9 т/га. По устойчивости к низким температурам (средняя за 2001–2010 гг. критическая температура вымерзания состави-

ла $-16,5^{\circ}\text{C}$) среди сортимента продуктивных форм твердой пшеницы ей не было равных (табл. 4, 5).

Селекция пшеницы на совмещение короткостебельности, продуктивности и зимостойкости,

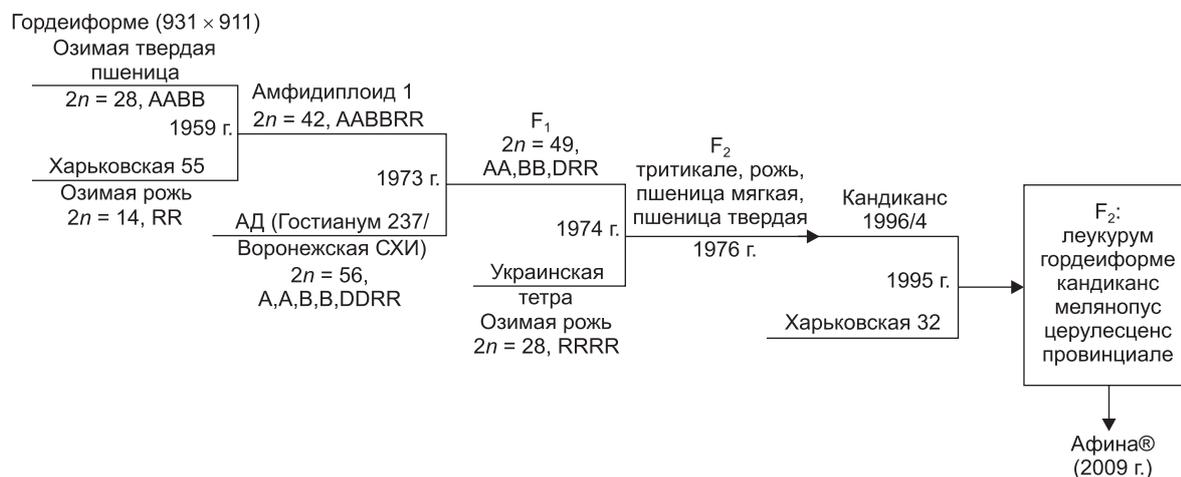


Рис. 2. Генеалогия сорта озимой твердой пшеницы Афина.

Таблица 4

Морозо- и зимостойкость сортов озимой твердой пшеницы (2001–2011 гг., \bar{X})

Сорт	Оригинатор	Перезимовка в полевых условиях, балл	Промораживание в холодильных камерах			Группа зимостойкости
			критическая температура вымерзания, $^{\circ}\text{C}$	общая оценка морозостойкости		
				%	балл	
Харьковская 32, ст.	ИР ¹	6,6	-15,3	55	5,0	средняя
Айсберг одесский, ст.	СГИ ²	6,1	-14,5	43	5,0	средняя
Тур	ИР	7,4	-15,5	65	6,0	средняя – выше средней
Афина	ИР	7,9	-16,5	75	6,5	выше средней
Макар	ИР	7,5	-15,5	67	6,0	средняя – выше средней
Шульдинка	ИР	7,4	-15,0	48	5,0	средняя
Донской янтарь	ВНИИСЗК ³	6,8	-15,0	44	5,0	средняя
Гелиос	ВНИИСЗК	6,8	-15,0	45	5,0	средняя
Жемчужина Дона	ВНИИСЗК	6,0	-13,5	40	4,0	средняя – ниже средней
Континент	СГИ	6,0	-13,0	36	3,0	ниже средней
Пассат	СГИ	5,5	-13,0	30	3,0	ниже средней
Крупинка	КНИИСХ ⁴	5,3	-13,0	27	3,0	ниже средней

Примечание. ¹ Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева (г. Харьков); ² Селекционно-генетический институт (г. Одесса); ³ Всероссийский научно-исследовательский институт селекции зерновых культур им. И.Г. Калининко (г. Зерноград); ⁴ Краснодарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко (г. Краснодар).

Таблица 5

Урожайность озимой твердой пшеницы в конкурсном сортоиспытании
(Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева, пар, 2001–2010 гг.)

Сорт	Оригинатор	2001	2002	2003	2004	2005	2007	2008	2009	2010	Среднее	± к ст.
Харьковская 32, ст.	ИР	3,05	4,83	0,83	3,53	5,66	4,02	3,15	5,90	0,33	3,48	0
Тур	ИР	4,25	5,25	1,26	4,75	5,62	4,51	4,73	7,33	0,73	4,27	+0,79
Афина	ИР	3,37	5,25	1,43	4,50	5,97	4,20	4,92	6,55	0,85	4,12	+0,64
Макар	ИР	3,33	6,60	0,89	5,63	5,61	4,37	5,10	7,15	0,88	4,40	+0,92
Шульдинка	ИР	–	–	–	–	–	4,49	5,86	7,48	0,63	4,62	+1,14
Белгородская янтарная	«Сатива» ¹ , ИР	–	–	–	–	–	4,57	5,60	7,53	1,00	4,68	+1,20
Айсберг од.	СГИ	1,54	3,75	0	4,00	4,68	3,10	4,31	6,75	0,22	3,15	–0,33
Континент	СГИ	–	–	–	–	–	–	4,95	7,20	0,25	4,13	+0,65
Донской янтарь ²	ВНИИСЗК	–	–	–	–	–	–	4,90	5,13	0,63	3,55	+0,07
Гелиос	ВНИИСЗК	–	–	–	–	–	–	5,75	6,98	0,30	4,34	+0,86
Жемчужина Дона	ВНИИСЗК	–	–	–	–	–	–	4,80	5,35	0,25	3,47	–0,01
Крупинка	КНИИСХ	–	–	–	–	–	–	4,48	6,08	0,20	3,59	+0,11
Озимая мягкая пшеница ³		4,12	4,82	0,34	4,20	5,50	4,96	6,53	6,01	0,91	4,15	+0,67
НСР ₀₅		0,61	0,54	–	0,57	0,44	0,53	0,50	0,39	–	0,51	

Примечание. ¹ ООО «Сатива» (г. Белгород); ² тургидная пшеница; ³ 2001–2005 гг. – Донецкая 48, 2007–2010 гг. – Одесская 267.

имеющих эволюционно сложившиеся обратные связи, сопряжена с большим объемом практических и методических поисков. Успешной в достижении поставленных целей следует признать оригинальную схему селекции, в основу которой положено сочетание методов отдаленной и внутривидовой гибридизации с привлечением различных по типу развития родительских форм и использованием контрастных фонов при широких экологических испытаниях. В соответствии с этой схемой создавались сорта нового морфотипа, с высотой растений 75–110 см, устойчивые к полеганию, с оптимальным соотношением морозо- и зимостойкости, длительности яровизации, темпов осенне-весеннего роста и развития, существенно влияющих на потенциал адаптивных свойств и урожайность. Из сортов, созданных объединением морфологически однородных линий, отобранных в комбинации от скрещивания яровой твердой пшеницы Харьковская 23 с озимой Тур, лучшие – Белгородская янтарная, Шульдинка и Приазовская 43. В конкурсном сортоиспытании за 4 года

эти сорта превзошли стандарт Харьковскую 32 по зимостойкости (+0,5–1,0 балл) и урожайности (+0,49–0,76 т/га).

В государственном испытании (2008–2009 гг.) средний урожай зерна сортов Макар и Афина составил 6,91 и 6,93 т/га, максимальный – 9,47–9,59 т/га на Винницкой ГЦЭСР. После первого года изучения (13 сортостанций, 2010 г.) урожайность зерна сорта Шульдинка варьировала в пределах 2,72–7,21 т/га, у стандарта Алым парус – соответственно 2,58 и 7,07 т/га. В 2011 г. (7 сортостанций) у Шульдинки сбор урожая колебался от 4,37 до 9,43 т/га; Алого паруса – 4,06–8,73 т/га. По зоне лесостепи урожай нового сорта достиг в среднем за 2 года 6,53 т/га, превысив урожай национального стандарта твердой пшеницы на 0,37 т/га.

Таким образом, методами отдаленных и внутривидовых скрещиваний с использованием оригинального исходного материала, применением широких экологических испытаний компонентов сортовых популяций в контрастных условиях созданы на многолинейной основе сорта озимой

Таблица 6

Характеристика сортов озимой твердой пшеницы по некоторым признакам
(ГСИ, 2008–2011 гг.)

Годы, показатели	Высота растений, см	Масса 1000 зерен, г	Урожайность, \bar{X} , т/га	
			Лесостепь + степь	Лесостепь
Озимая твердая пшеница				
Афина				
2008	87,3	42,6	6,91	7,39
2009	80,1	45,4	5,85	6,65
\bar{X}	83,7	44,0	6,38	7,02
Макар				
2008	86,8	45,2	6,93	7,40
2009	81,3	46,7	6,38	7,17
\bar{X}	84,1	46,0	6,66	7,29
Шулындинка				
2010	79,6	45,4	5,20	5,15
2011	79,4	47,4	6,69	7,90
\bar{X}	79,5	46,4	5,95	6,53
Алый парус, ст.				
2009	83,6	45,1	6,34	7,15
2010	81,0	47,5	5,31	4,83
2011	81,9	46,5	6,46	7,49
\bar{X} за 2010 и 2011	81,5	47,0	5,89	6,16
Озимая мягкая пшеница Едність, ст.				
2009	88,4	36,6	6,44	7,12
2010	79,2	36,8	6,10	6,11
2011	81,2	36,8	6,43	6,95
\bar{X} за 2010 и 2011	80,2	36,8	6,27	6,53

твердой пшеницы Афина, Макар, Белгородская янтарная и Шулындинка с повышенными адаптивными свойствами и урожайностью.

Литература

- Бажанов А.М. О возделывании пшениц с описанием пород, разводимых в России. М., 1856. Т. 1. 385 с.
- Кириченко Ф.Г., Кириченко М.С. Озимые формы твердой пшеницы // Докл. ВАСХНИЛ. 1955. Вып. 3. С. 13–19.
- Кириченко Ф.Г. Итоги работ по селекции зерновых культур // Селекция и семеноводство. 1956. № 5. С. 3–8.
- Кириченко Ф.Г. Методы создания зимостойких высокоурожайных и высококачественных сортов озимой мягкой и озимой твердой пшеницы // Методы селекции зимостойких пшениц. М.: Сельхозгиз, 1962. С. 5–23.
- Кириченко Ф.Г., Пыльнев В.М., Паламарчук А.И. Краткие итоги селекции озимой твердой пшеницы для степи УССР // Селекция пшеницы на юге Украины: Сб. науч. тр. Одесса: ВСГИ, 1980. С. 40–52.
- Кобальтова Е.А. Гибриды озимых пшениц // Работы селекционного отдела Безенчукской опытной станции за 1925 г. Самара, 1927. Вып. 1. С. 17–24.
- Кобальтова Е.А. Характеристика межвидового скрещивания // Тр. Всесоюз. съезда по генет., сел., сем. и плем. животноводству (10–14 января 1929 г.). Л., 1930. Т. 4. С. 159–175.
- Лукьяненко П.П. Селекция и семеноводство озимой пшеницы. Избр. тр. М.: Колос, 1973. 448 с.
- Мудрова А.А., Костин В.В. Селекция озимой твердой пшеницы на адаптивность и изменение сортов в результате селекционной работы // Матер. науч.-практ. конф. «Зеленая революция П.П. Лукьяненко». Краснодар: Сов. Кубань, 2001. С. 118–134.
- Паламарчук А.И. Селекция сортов озимой твердой пшеницы с высоким адаптивным потенциалом // Пути и методы повышения стабильности урожая озимой пшеницы в степи УССР. Сб. науч. тр. Одесса: ВСГИ, 1989. С. 43–53.
- Паламарчук А.И. Стан та перспективи селекції сортів твердої озимої пшениці на підвищення адаптивного по-

- тенціалу для агрокліматичних умов Степу України // Зб. наук. праць СГІ. Вип. 5 (45). Одеса, 2004. С. 35–56.
- Самофалова Н.Е., Иличкина Н.П., Ковтун Л.Н. Результаты селекции озимой тургидной пшеницы на продуктивность и адаптивность в условиях Дона // Матер. науч.-практ. конф. «Зеленая революция П.П. Лукьяненко». Краснодар: Сов. Кубань, 2001. С. 287–293.
- Шевченко Н.С., Щипак Г.В. Озимая твердая пшеница Харьковская 32 // Селекция и семеноводство. 1997. № 4. С. 42–44.
- Шулындин А.Ф. Повышение морозо- и зимостойкости твердых пшениц // Докл. АН СССР. 1954. Т. 98. № 5. С. 861–864.
- Шулындин А.Ф. Перспективы создания озимой твердой пшеницы // Вестн. с.-х. науки. 1957. № 7. С. 37–48.
- Шулындин А.Ф. Селекция и семеноводство озимой твердой пшеницы // Селекция и семеноводство. 1966. № 1. С. 23–30.
- Шулындин А.Ф., Шевченко Н.С. Озимая твердая пшеница при орошении на юге Украины // Вестн. с.-х. науки. 1970. № 12. С. 22–30.
- Щипак Г.В. Селекція сортів озимої твердої пшениці і тритикале з підвищеними адаптивними і урожайними властивостями // Зб. наук. пр.: Селекція польових культур. Харків, IP ім. В.Я. Юр'єва УААН, 2008. С. 42–88.

BREEDING DURUM WINTER WHEAT FOR IMPROVEMENT OF ADAPTIVE POTENTIAL AND YIELD

G.V. Shchipak¹, R.A. Nedostupov¹, V.G. Shchipak²

¹ Yuryev Plant Production Institute, Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kharkov, Ukraine,
e-mail: ppi@kharkov.ukrtel.net;

² Ilyich Seaside Breeding Site, Mariupol, Ukraine

Summary

Major results and methods of many-year research in the creation of starting material for winter durum wheat breeding are presented. The new cultivars are assessed for grain yield, frost resistance and productivity elements.

Key words: durum winter wheat, interspecific and intraspecific hybridization, synthetic population, winter and frost hardiness, yield.

УДК 631.524.83:631.524.85:633.112.1«324»

PRODUCTIVITY, ADAPTABILITY AND GRAIN QUALITY OF MODERN UKRAINIAN WINTER TRITICALE CULTIVARS*

© 2012 г. G.V. Shchipak¹, Yu.V. Tsupko², A.P. Petrova³, V.G. Shchipak¹

¹ Department of Breeding and Genetics of Winter Triticale, Yurjev Plant Production Institute of the Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kharkiv, Ukraine, e-mail: ppi@kharkov.ukrtel.net;

² Riverside Farm Institute, Kafue, Zambia, e-mail: tsupko@gmail.com;

³ Seaside Experimental Breeding Station, Yalta Village, Donetsk oblast, Ukraine

Поступила в редакцию 2 августа 2011 г. Принята к публикации 8 октября 2011 г.

Grain-type winter triticale cultivars were studied in comparative long-term (2000–2009) trials in two agroecological zones of Ukraine. Since 1977, 16 triticale cultivars have been enrolled into the register in Ukraine, and their potential productivity has increased by 1.52 t/ha. Specialized winter triticale cultivars with optimal combinations of productivity, adaptive properties and improved technological parameters of grain quality have been raised by intraspecific hybridization methods. High winter hardiness is observed in cultivars Amphidiploid 42, Amphidiploid 52, Amphidiploid 256, and Garne (scores 7.5–8.0), and improved drought tolerance, in Amphidiploid 44, Kapriz, Raritet, and Amphidiploid 256. New multi-line cultivars Garne and Raritet show relatively high baking quality and overpower standard cultivar Amphidiploid 256 by 79–192 % in flour strength, by 26–39 % in bread volume recovery, and by 180–190 % in the overall baking quality index.

Key words: triticale, breeding, adaptability, drought, winter hardiness, abiotic stress, tolerance, drought resistance index, baking quality.

Introduction

Significant achievement of modern genetics and plant breeding is the creation of triticale, cultivars of which successfully penetrate agricultural production. The increase of the sown area of the new grain and fodder crop is promoted by better compared to wheat (*Triticum aestivum* L.) adaptability, high and stable productivity, ample opportunities in grain use for food, technical and fodder purposes (Тритикале России, 2000).

Triticale cultivars are generally characterised by satisfactory baking properties (Борес, Раковська, 1990; Сокол и др., 2001; Tsvetkov, Stoeva, 2003; Сиволап и др., 2005). Winter cultivars, which at various times became widespread in Ukraine and Russia (Amphidiploid 206, Amphidiploid 3/5, Amphidiploid 60, Amphidiploid 42, Amphidiploid 256, ADM4, Papsuevske, Proryv, etc.) are distinguished

by high amylolytic activity, thus form weak gluten. Bakers reluctantly use triticale flour, as to manufacture good quality bread it is necessary to employ a long fermentation process with use of leaven, or to improve baking technologies for the purpose of moderated amylase inactivation.

Poor baking properties of many hexaploid triticale cultivars are attributed to complete or partial absence of D-genome chromosomes. Some octoploid and R/D substituted 42-chromosomal forms show relatively better technological properties (Федорова и др., 1988; Anon., 1989). Such relationship is detected in individual samples and does not exclude participation of alternative genetic factors in the control of technological and baking qualities of triticale, which determine optimal composition and quality of polysaccharides and gluten proteins.

Demand for competitive triticale cultivars for food production in regions where sturdy and fine

* Работа была представлена на Международной научной конференции «Экология, генетика, селекция на службе человечества», Ульяновск, 2011.

wheat cultivars are grown is still considered as problematic (Комаров и др., 2008). However, necessity of improvement of baking properties of wheat-rye amphidiploids has no doubts and stipulates search for new approaches to breeding of new cultivars, which would form grain with stably improved quality characteristics, thus strengthen role of the new grain crop in national economy. Comparative analysis of productivity, adaptive properties, morpho-anatomic and technologic features of winter triticale cultivars of different breeding periods was the purpose of the present study.

Material and Methods

Cultivars of triticale (\times *Triticosecale* Wittmack, $2n=6x=42$) Amphidiploid 3/5, Amphidiploid 42, Amphidiploid 44, Amphidiploid 51, Amphidiploid 52, Amphidiploid 60, Amphidiploid 206, Amphidiploid 256, Garne, Ratne, Raritet, Yunga, Kapriz, Stephan, Russia, Ladne, Kharroza, Proryv, Valentin 90, Cornet, Lamberto, Moderato, and Aist; soft wheat (*Triticum aestivum* L.) Donetskaya 48, Odesskaya 267, Kharus, and Kharkovskaya 26; and rye (*Secale cereale* L.) Kharkovskaya 98, Khasto and Saratov, developed at the Yurjev Plant Production Institute of the Ukrainian Academy of Agrarian Sciences (YPPI) and other regions were studied in competitive field trials of the Department of Breeding and Genetics of Winter Triticale of the YPPI. Seeds were sowed using SSFK-7 seed drill on 10 m² plots in six repetitions with a rate of 4.5 million germinating seeds per hectare. Ecological cultivar trials in eastern forest-steppe (YPPI, Kharkov) and acute arid steppe (Seaside Experimental Breeding Station of the Laboratory of Agrochemistry, Ilyich Public Corporation, Mariupol) zones of Ukraine were sowed manually on 1 m² plots in triple repetitions with norm of seeding of 3 million per ha. Soil types were chernozem (forest-steppe) and sandy loam (steppe), fallow land as a forecrop; planting dates optimal for each zone (5–15 September in forest-steppe, 1–10 October in steppe). Frost resistance and winter hardiness were estimated in field conditions and in freezing chambers KNT-1 (Юрьев, 1938); drought tolerance – both in the field and in a 50 m² drought shelter (steppe) made from polyethylene film (Мусяненко и др., 1985). Winter hardiness was evaluated on a 9-point scale (9 = most resistant, 1 = most susceptible; Prášilová

& Prášil, 2001). A drought resistance index (Dr) was calculated as the relation between the levels of a trait expression in the drought shelter to its expression on a natural background (Abdelmula *et al.*, 1999), and homeostaticity according to Khangil'din (Хангильдин, 1978). Morpho-anatomic measurements and calculations were done on 20–100 plants of each cultivar using a microscope Biolam under $\times 18$ –96 lens magnification. Competitive field trials were harvested with Sampo-130 plot harvester and ecological trials manually, together with roots (extraction of roots was carried out from sandy soil using trenches, from depth up to 1.35 m). Grain quality parameters were determined as defined by the State Testing Methodology (Методи визначення показників ..., 2000).

Results and Discussion

All YPPI-bred triticale cultivars of the first and the second generation, except for Amphidiploid 256, are created by a stepwise intergeneric hybridisation using the scheme: bread wheat ($2n=42$) / rye ($2n=14$) // triticale ($2n=42$). Cultivar Amphidiploid 256, as well as cultivars of the third generation registered during years 2004–2008, are created via intraspecific hybridisation at hexaploid level ($2n=42$). New triticale cultivars in comparative trials have significantly exceeded yield potential of cultivars-predecessors. The greatest gain of grain yield (1.65 t/ha) was demonstrated by the third generation cultivar Garne (Table 1). Growth of triticale productivity has occurred due to change of different components of the crop yield structure, mainly due to increased stalk density and a number of grains per head and per plant (data not shown). Among cultivars of the second generation, the highest number of grains per head (71) and per spikelet (2.49) has cultivar Amphidiploid 256. In comparison with the first generation cultivar Amphidiploid 206, homeostaticity of a head of Amphidiploid 256 is higher by 37 % (spikelets) to 170 % (grain). Triticale of the third generation are characterised by significantly higher productive tillering capacity (+4.3 to 14.2 %), number of grains per head (+6.9 to 45.1 %), its homeostaticity (+36.7 to 48.7 %), and mass of grain per plant (+2.2 to 25.8 %).

The higher survival rate of triticale is stipulated by a better (compared to that of wheat) tolerance to adverse environmental factors. During breeding of

Table 1
Productivity of winter triticale of different cultivar changes (YPPI, competitive cultivar trials)

Cultivar change	Cultivar	Year of registration	Grain yield by years*, t/ha										Increase from the previous cultivar change	
			2000	2001	2002	2003	2004	2005	2007	2008	2009	mean	t/ha	%
I	Amphidiploid 206	1977	6.2	4.8	5.2	2.9	4.0	5.7	5.2	5.4	4.8	4.91		
	Amphidiploid 60	1988	6.4	5.1	5.3	2.0	4.4	5.7	4.9	5.7	4.6	4.90		
	mean	–	6.3	4.9	5.3	2.5	4.2	5.7	5.1	5.6	4.7	4.91	n.a.	n.a.
II	Amphidiploid 42	1996	6.3	6.7	6.5	3.2	4.7	6.2	5.2	7.2	5.9	5.77		
	Amphidiploid 52	2000	7.3	5.7	6.4	3.1	4.5	5.9	6.2	5.3	5.7	5.57		
	Amphidiploid 256	2001	7.3	5.6	6.9	3.7	5.2	5.8	6.0	5.8	6.1	5.82		
	mean	–	7.0	6.0	6.6	3.3	4.8	6.0	5.8	6.1	5.9	5.72	0.81	16.5
III	Garne	2004	8.5	7.1	6.9	3.7	5.4	6.9	6.9	7.1	6.5	6.56		
	Ratne	2007	8.5	7.2	6.8	3.1	5.4	6.7	6.1	7.3	6.6	6.41		
	Raritet	2008	7.9	6.5	6.8	3.2	6.1	6.1	5.7	7.4	7.1	6.31		
	mean	–	8.3	6.9	6.8	3.3	5.7	6.6	6.2	7.3	6.7	6.43	0.71	12.4
Wheat**			5.0	4.1	4.8	0.3	4.2	5.5	5.0	6.5	6.0	4.60	n.a.	
Rye***			6.1	6.6	5.8	1.6	5.1	5.6	5.7	6.0	6.3	5.42	n.a.	
LSD _{0.05}			0.31	0.48	0.40	0.52	0.39	0.28	0.41	0.49	0.44	0.41	n.a.	

* Results of the 2006 season trials are excluded due to crops damage by hail; ** 2000–2005 – Donetskaya 48; 2007–2009 – Odesskaya 267; *** 2000–2005 – Kharkovskaya 98; 2007–2009 – Khasto.

more productive genotypes triticale, it was possible to preserve their adaptive potential, including frost and winter hardiness. Under conditions of 2003 season (ice crust, lowest temperature at tillering node -17°C), against the background of wheat winterkill, high winter hardiness (7.5–8.0 points) was demonstrated by cultivars Amphidiploid 42, Amphidiploid 52, Amphidiploid 256 and Garne. Cultivars Ratne and Raritet concede to these genotypes 0.5 points in their winter hardiness and $1.0\text{--}1.5^{\circ}\text{C}$ in frost resistance. It is remarkable that triticale created by hybridisation of winter forms with spring and facultative forms have high (Amphidiploid 256, Garne) and heightened (Amphidiploid 44, Ratne, Raritet) levels of frost and winter hardiness.

Among the complex of adaptive properties, that limit efficiency of triticale plants it is necessary to single out drought tolerance. Successful search for thermo-tolerant genotypes depends on many biotic and technological factors, e.g. presence of suitable provocative background, a method of creation and duration of study of an initial material, morphophysiological features of components of created breeding populations.

In terms of ear emergence, the first-generation triticale cultivars are relatively early maturing (period from resumption of the spring growth to ear emergence 53–58 days), and in terms of the duration of vegetative period are mid-ripening (285–292 days). In the process of breeding and selection, there was a lengthening of the period of active photosynthetic activity of triticale plants. In ecological study (seasons 2006–2007) in the conditions of steppe on a natural background cultivars Amphidiploid 60 and Amphidiploid 206 eared on 17–18 of May, the rest of triticale cultivars 1–7 days later, and winter wheat on 19–21 of May.

In a drought shelter, air temperature from a booting phase onwards was higher than ambient by 7.5°C to 15.0°C , which has accelerated plants development, and has affected their productivity and crop harvest structure. The period from ear emergence to full ripeness was within 38–44 days (on the average 41 days for triticale and 38 days for wheat), which is 3–5 days shorter compared to a natural background.

Under the conditions of an artificial drought, accumulation of the aboveground biomass of plants

has considerably decreased. Decrease in productive tillage capacity was 20.7 % for triticale, and 14.3 % for wheat. The height of triticale plants has decreased on average by 8.9 % with a variation from 3.3 % (Amphidiploid 60) to 16.7 % (Lamberto). Stalks shortening of wheat plants were between 4.0 % (Kharus) to 7.6 % (Odesskaya 267).

Ability of plants to develop vigorous root system in the lower layers of soil under water-deficit conditions is an important indicator of drought tolerance. Winter triticale are characterised by considerable differences in roots weight that influences the water status and plants productivity. Under natural conditions the weight of dried roots of one triticale plant (on the average for different cultivars) was 1.493 g. Corresponding value of the trait in the drought shelter was higher by 22.7 % and varied between 1.718 g (Amphidiploid 52) to 2.058 g (Raritet). Cultivars Amphidiploid 256, Raritet, Garne, Stephan, Kapriz and Odesskaya 267 had higher (by 29.9–38.4 %) roots weight. Cultivars Amphidiploid 42, Amphidiploid 52, Amphidiploid 60, Ratne and Yunga have increased underground weight by only 14.0–16.0 %. By the index of drought tolerance of root system stood out soft wheat Odesskaya 267 and triticale Raritet ($Dr = 0.72–0.73$). Drought sensitivity of the underground biomass of cultivars Amphidiploid 60 and Ratne was appreciably higher ($Dr = 0.86–0.88$).

Under drought-stressed conditions, thousand-kernel weight (TKW) of winter wheat has decreased by 5.4 % (Odesskaya 267) to 19.1 % (Kharus), while TKW of triticale has decreased on the average by 13.8 %. The TKW of triticale cultivars Amphidiploid 44, Amphidiploid 256, Raritet, Yunga and Kapriz has changed by only 4.0–7.5 % ($Dr = 1.06–1.08$). Shrivelled and lightweight grain was formed by cultivars Amphidiploid 51, Lamberto and Amphidiploid 52 (–24.3 % to –25.1 %, $Dr = 1.32–1.34$).

The grain yield of triticale in the drought shelter has averaged $315 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$, which is 18.1 % lower compared to a natural background. The drought-tolerant wheat cultivar Odesskaya 267 on a natural background had grain yield of $397 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ and has conceded to the best triticale Garne, Amphidiploid 256 and Kapriz accordingly by 11.8, 20.3 and 23.5 %. In the drought shelter differences have somewhat decreased (respectively $377 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ and 6.0, 14.1 and 18.4 %), which confirms high poten-

tial of drought and thermal tolerance ($Dr = 1.05$) of the wheat cultivar created by D.A. Dolgushin in the South of Ukraine. Improved drought tolerance of triticale Amphidiploid 44, Kapriz, Raritet and Amphidiploid 256 ($Dr = 1.08–1.13$) to a certain degree is stipulated by their origin: Kapriz was bred in a droughty zone of the Rostov region, Russia (Тритикале России, 2000), and the others are multi-linear cultivars, initial lines of which are selected in acute-droughty conditions of the Azov Sea region, Ukraine (Щипак, 2008).

In the drought shelter from action of high temperatures and water deficiency on sandy-loam soil have strongly suffered (especially during the period of grain setting and filling) cultivars Lamberto, Stephan, Amphidiploid 51, Ratne and Amphidiploid 206 (reduction of yield 24.5–28.8 %, $Dr = 1.32–1.40$). Decreased productivity of these cultivars is caused by insufficient water-retaining capacity of plants, vulnerability of their generative systems to extreme environmental conditions that has led to decreased number of grains per ear and to formation of shrivelled grain.

Investigated forms of triticale did not demonstrate close relationship of leaf size to productivity and adaptive properties. Flag leaf area of triticale cultivars averaged 24.1 cm^2 , wheat 18.4 cm^2 (Kharus) and 18.7 cm^2 (Odesskaya 267), and winter rye (Khasto) 8.3 cm^2 . With an exception of the another-region cultivar Kapriz with the flag leaf area of 17.3 cm^2 , highly productive genotypes, irrespective of growth conditions had large, dark green leaves with a thick waxy layer: Amphidiploid 256 – 28.1 cm^2 , Garne – 27.4 cm^2 , and Raritet – 28.1 cm^2 . Large flag leaf is also characteristic to the first grain triticale cultivar Amphidiploid 206 – 29.3 cm^2 . Among the small-leaved forms were available both drought-tolerant (Yunga, Amphidiploid 44; $15.7–20.0 \text{ cm}^2$) and drought-sensitive (Amphidiploid 52, Lamberto; $15.0–18.6 \text{ cm}^2$) cultivars.

Breeding of winter triticale for higher yielding potential is inseparably linked to perfection of the plant organism as a whole, including its fibro-vascular system. Studied triticale cultivars are non-uniform regarding the quantity of large fibro-vascular bundles, and the range of variation for this trait is considerably wider than in its parental crops. Tall triticale Amphidiploid 3/5, Amphidiploid 44, Ladne, Stephan and middle-height highly productive cultivars Garne and Kharroza develop

powerful conductive system comprising of 53–62 large bundles; cultivars Amphidiploid 60, Ratne, and Raritet have only 38–40 bundles. On average triticale have 49, winter wheat 45, rye Saratov 6 and Khasto between 48 to 56 bundles.

Bread-making qualities. Quality of triticale grain is studied at the YPPI for more than 35 years. To date was analysed about 7200 breeding lines and cultivars that were created mainly by methods of distant and intra-specific hybridisation. After intergeneric hybridisation and genetic «explosion» under the scheme [F_1 (wheat/rye)] // triticale, it was not possible to select complex-valuable forms with heightened baking properties. Reduction of negative influence of the R genome and better harmonisation of wheat and rye proteins in triticale was achieved by a method of stepwise intraspecific hybridisation with the subsequent lasting selection assessment. That has given the chance to derive wheat-rye amphidiploids with an alternative type of development with improved and stable levels of expression of some quality characteristics of flour, dough, bread, and mixing ability (Щипак, 1998). Out of populations derived from hybridisation of facultative and winter forms during consequent long-term selections were created winter cultivars and breeding lines of triticale, that are close to wheat regarding proportion of protein fractions. However, selections of individual elite plants did not yet result in creation of triticale cultivars with the high-level balanced gluten quality. In the meantime, it was proved possible to improve technological properties of synthetic cultivars, which were created by aggregation of the suitable lines selected from the same or different hybrid combinations (Щипак и др., 2009).

Search for the optimal line mixtures has led to creation of two multi-line cultivars with improved baking properties: Garne, which is included into the Register of Plant Cultivars of Ukraine (since 2003) and Russia (since 2009), and Raritet that is registered in Ukraine since 2008.

Cultivar Garne is created by aggregation of 260 morphologically similar lines that have been selected from two related hybrid populations derived from crossing of winter and spring triticale of a different origin: Malno (Poland), Kubanets (Russia), 2059 p¹¹ (USA), and Amphidiploid 3/5 (Ukraine). Improvement of technological properties of the cultivar Garne is caused by elasticity of

the gluten complex that has a higher gliadin and glutelin content, moderate activity of α -amylase because of prevalence in the population of lines with a falling number of 250–350 s.

Cultivar Raritet has in its pedigree the following hexaploid triticale: winter Amphidiploid 3/5, Amphidiploid 206, Amphidiploid 547 (Ukraine); facultative Amphidiploid 77, Amphidiploid 77/75, Amphidiploid 8/192 (Ukraine); spring 6TA 418 (USA), Kharkovskiy 41, and Aist (Ukraine). During field trials in conditions of forest-steppe and acute arid steppe (seasons 1993–2003) from the created hybrid population were selected 51 highly-adaptive lines with contrasting quality parameters: gluten deformation index (GDI) 45–120 units, falling number 236–394 s, dough elasticity 40–95 mm, and tensile strength 30–110 mm. Modification of technological properties and positive mixing effect occurs as the result of interaction of contrasting protein complexes, characterised by improved gluten elasticity of some lines and unique tensile strength of the other, in this case derived from the same hybrid combination. Since 2002 the genetic basis of the cultivar Raritet is comprised by lines with parameters of dough tensile strength of up to 79–86 mm, which has promoted formation of a balanced gluten complex (77 mm elasticity, 83 mm tensile strength of dough), improved flour strength (222–275 alveograph units) and production of high-quality bread (9 points). During quality tests all technological parameters of the multi-line cultivar Raritet were the best among triticale assortment of the YPPI and other breeding establishments (Tables 2 and 3). Cultivars Garne and Raritet exceed standard Amphidiploid 256 in their flour strength by 79–192 %, in volumetric bread recovery by 26–39 %, and in general baking rating by 180–190 %.

Conclusions

Application of methods of intraspecific hybridisation has provided for creation of specialised cultivars of winter triticale with an optimal combination of productivity, adaptive properties and improved technological parameters of grain quality. Substantial improvement of baking qualities of the new triticale cultivars Garne and Raritet is reached on a multi-line genetic basis by aggregation of purposefully selected morphologically

Table 2

Grain quality of triticale and wheat (2001–2008 average)*

Cultivar	Grain protein content, %	Gluten		Dough			Flour strength, alveograph units	Bread	
		Content in flour, %	GDI units	Elasticity (P), mm	Tensile strength (L), mm	P/L		Volume, mL	Overall bread making rating, points
Winter triticale									
Amphidiploid 256**	10.7	15.8	77	44	39	1.1	62	358	4.8
Raritet	11.2	18.3	47	66	76	0.9	181	498	9.0
Garne	10.7	20.2	70	50	61	0.8	111	452	8.5
Spring triticale									
Aist**	13.4	20.8	58	49	68	0.7	108	385	6.0
Winter wheat									
Kharus**	11.8	27.0	57	83	80	1.0	269	570	7.2
Spring wheat									
Kharkovskaya 26**	13.4	32.2	90	60	101	0.6	172	483	4.8

* Results of the 2006 season trials are excluded due to crops damage by hail; ** the national standard of Ukraine.

Table 3

Grain quality characteristics of winter triticale cultivars (competitive trial, average for 2008–2009 seasons)

Cultivar	Year of registration	Country	Grain-unit, g L ⁻¹	Content, %		Gluten quality, GDI units	Dough, mm		Flour strength, alveograph units	Bread volume recovery, mL	Baking evaluation, points
				protein	crude gluten		elasticity	tensile strength			
Amphidiploid 206	1977	Ukraine	692	14.1	23.6	97.5	44.5	64.0	94.5	430	7.0
Amphidiploid 256	2001	Ukraine	672	12.7	20.6	77.5	49.5	67.5	111.0	360	6.0
Raritet	2008	Ukraine	776	11.6	16.4	49.0	76.5	83.0	275.0	595	9.0
Proryv	2004	Russia	732	11.9	20.8	62.5	43.0	77.0	107.5	460	8.1
Valentin 90	2007	Russia	724	12.1	23.2	60.0	52.0	115.0	190.0	470	8.6
Kornet	2006	Russia	712	11.2	22.4	82.5	39.5	75.5	101.5	425	7.7
Lamberto	2003	Poland	724	11.8	17.6	75.0	42.0	67.0	92.0	390	7.4
Moderato	2004	Poland	724	11.6	19.6	90.0	55.0	72.0	131.0	360	5.5
Odesskaya 267 (wheat)	1997	Ukraine	788	13.2	26.3	55.0	91.0	109.0	412.0	610	9.0

homogeneous lines with contrasting parameters of gluten and dough qualities. Multi-line cultivars, as complex genetic and coenotic systems, manifest greater buffering capacity to changing environmental conditions, which secures an opportunity of grain formation with stably high for triticale baking properties.

References

- Борес Д., Раковська М. Химическая и биологическая оценка возделываемых в Польше сортов тритикале // Тритикале в Восточной Европе. Мальшин, 1990. С. 141–152.
- Комаров Н.М., Поспелова Л.С., Соколенко Н.И. и др. Селекция растений методом отдаленной гибридизации:

- концептуальные и методологические аспекты. Ставрополь: Сервисшкола, 2008. 168 с.
- Методи визначення показників якості рослинної продукції: Методика державного сортопробування сільськогосподарських культур / Під ред. О.М. Гончара. К.: Алефа, 2000. Вип.7. С. 6–41.
- Мусяенко И.Н., Капля А.В., Оканенко А.А. и др. Жаростойкость и продуктивность озимой пшеницы. К.: Вища школа, 1985. С. 138–146.
- Сиволап Ю.М., Галаев О.В., Рибалка О.І., Тищенко В.Д. Молекулярно-генетичні технологічні особливості озимого тритикале сорту Папсуєвське // Вісник аграрної науки. 2005. № 5. С. 43–46.
- Сокол Н.В., Донченко Л.В., Лакеу М.Й. и др. Возможности тритикале в хлебопечении с использованием пектина // Матер. науч.-практ. конф. «Зеленая революция П.П. Лукьяненко». Краснодар: Сов. Кубань, 2001. С. 386–392.
- Тритикале России. Сб. материалов секции тритикале РАСХН, 8–9 июля 1999 г. / Отв. ред. А.И. Грабовец. Ростов-на-Дону, 2000. 132 с.
- Федорова Т.Н., Беркутова Н.С., Лазарева Е.Н. Биохимические и технологические особенности зерна октоплоидных /8х/ тритикале // Селекция и семеноводство. 1988. № 6. С. 12–15.
- Хангильдин В.В. О принципах моделирования сортов интенсивного типа // Генетика количественных признаков с.-х. растений. М.: Наука, 1978. С. 111–116.
- Щипак Г.В. Селекція сортів озимої твердої пшениці і тритикале з підвищеними адаптивними і урожайними властивостями // Селекція польових культур. Зб. н. праць до 100 річчя створення Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва УААН. Харків, 2008. С. 42–88.
- Щипак Г.В. Селекція тритикале дворучок // Селекція і насінництво. 1998. Вип. 81. С. 38–45.
- Щипак Г.В., Суворова К.Ю., Чернобаб Р.А., Панченко І.А. Спосіб створення сортів озимого тритикале з підвищеними технологічними показниками якості зерна // Патент на корисну модель № 44901. Бюл. № 20. 26.10.2009.
- Юрьев В.Я. Методы оценки сортов на зимостойкость // Селекция и семеноводство. 1938. № 5. С. 28–29.
- Abdelmula A.A., Link W., Von Kittlitz E., Stelling D. Heterosis and inheritance of drought tolerance in faba bean, *Vicia faba* L. // Plant Breeding. 1999. V. 118. No. 6. P. 485–490.
- Anonymous. Triticale: A Promising Addition to the World's Cereal Grains. National Research Council. Washington, D.C.: National Academy Press, 1989. P. 35–41.
- Prášilová P., Prášil I. Winter hardiness scale of wheat cultivars of different geographical origin // Icelan. Agric. Sci. 2001. 14. P. 35–39.
- Tsvetkov S.M., Stoeva V. Bread making quality of winter hexaploid triticale (×Triticosecale Wittmack) in Bulgaria // Bulgar. J. Agr. Sci. 2003. V. 9. P. 203–208.

ПРОДУКТИВНОСТЬ, АДАПТИВНОСТЬ И КАЧЕСТВО ЗЕРНА СОВРЕМЕННЫХ УКРАИНСКИХ СОРТОВ ОЗИМОЙ ТРИТИКАЛЕ

Г.В. Щипак¹, Ю.В. Цупко², А.П. Петрова³, В.Г. Щипак¹

¹ Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН, Харків, Україна,
e-mail: ppi@kharkov.ukrtel.net;

² Сельскохозяйственный институт, Риверсайд, Кафуэ, Замбия, e-mail: tsupko@gmail.com;

³ Приморская опытно-селекционная станция, п. Ялта, Донецкая область, Украина

Приведены результаты сравнительного изучения (2000–2009 гг.) в двух агроэкологических зонах сортов озимых зерновых тритикале, выведенных в Институте растениеводства им. В.Я. Юр'єва. За период с 1977 г. в Украине зарегистрировано 16 сортов тритикале, урожайность возросла на 1,52 т/га. Новые многолинейные сорта Гарнэ и Раритет имеют высокие для пшенично-ржаных амфидиплоидов хлебопекарные свойства и превышают стандарт Амфидиплоид 256 по силе муки на 79–192 %, объемному выходу хлеба на 26–39 %, общей хлебопекарной оценке на 180–190 %.

Ключевые слова: тритикале, селекция, адаптивность, засуха, зимостойкость, абиотические стрессы, толерантность, индекс засухоустойчивости, хлебопекарные качества.

УДК 635.21:631.527.42

МЕЖВИДОВАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ В СЕЛЕКЦИИ КАРТОФЕЛЯ В УКРАИНЕ*

© 2012 г. А.А. Подгаецкий

Сумской национальной аграрный университет, Сумы, Украина, e-mail: podgaje@mail.ru

Поступила в редакцию 2 августа 2011 г. Принята к публикации 23 января 2012 г.

Изучали перспективность использования диких видов картофеля для выделения и создания источников устойчивости против фитофтороза, сухой фузариозной гнили; необходимость гомозиготизации ценных аллелей контроля признаков; возможность получения первичных и вторичных межвидовых гибридов, наличие у них эффективных генов контроля устойчивости к фитофторозу, сухой фузариозной гнили, а также возможность интрогрессии этих генов в исходный селекционный материал. Перечислены сорта, созданные с непосредственным участием беккроссов сложных межвидовых гибридов.

Ключевые слова: картофель, межвидовая гибридизация, искусственное заражение, фитофтороз, сухая фузариозная гниль, агрономические признаки, новые сорта.

Введение

В истории картофелеводства случались катастрофы, которые ставили под сомнение возможность выращивания культуры. Впервые это обусловлено эпифитотией фитофтороза в середине XIX в. в Европе, особенно в Ирландии (Энгельс, 1969). Вторая катастрофа связана с распространением в Европе рака картофеля в 1910 г. (Росс, 1989), а еще одна с распространением карантинного зоопатогена – картофельной цистообразующей нематоды (*Globodera rostochiensis*). В результате распространения болезней не только уничтожался урожай, часто полностью, но и произошло значительное сужение генофонда культуры, что отрицательно сказалось при дальнейшем развитии селекции (Glendinning, 1983).

Кроме сужения генетической базы селекции культуры, имелись и другие причины поиска новых путей создания сортов картофеля, ибо в результате использования только внутривидовой гибридизации «селекция картофеля в известной степени зашла в тупик», – как отмечал А.Я. Камераз (1973. С. 104). Кроме

того, анализ родословной селекционных сортов свидетельствует о близости их происхождения (Костина, 1982), что способствовало накоплению нежелательных генов и в какой-то степени приближало селекцию к близкородственному размножению. Считаем, этим можно также объяснить плохое цветение и ягодообразование у сортов внутривидового происхождения. В классической работе Е.М. Успенского (1935) указывается на отсутствие цветения у 13,2 % коллекционных образцов и завязывание ягод от самоопыления только в 11,8 % от числа цветущих. В нашем исследовании на продолжении 8 лет среди 915 сортов цвело 12,7–79,7 %, а средний балл проявления признака находился в пределах 1,3–4,9 по 9-балльной шкале (Подгаецкий, Гордиенко, 2008). Следует отметить, что межвидовые гибриды (оценено 190 форм), по сравнению с сортами имели большее количество цветущих генотипов с лимитами за 11 лет 3–28 %. Кроме этого, модальным классом распределения гибридов был 5 баллов против 1 балла у сортов. Гибриды также имели большую частоту образцов с цветением 5–9 баллов и выше значения среднего балла проявления

* Работа была представлена на Международной научной конференции «Экология, генетика, селекция на службе человечества», Ульяновск, 2011.

признака, что позволяет более успешно вовлекать их в селекционный процесс.

Отрицательной стороной сортов внутривидового происхождения (в пределах вида *S. tuberosum* L.) является отсутствие эффективных генов контроля многих агрономических признаков. И даже вовлечение в селекционную практику некоторых сородичей культурных сортов, не имеющих таких генов, приводит к потере первоначально высокого проявления среди потомства этих признаков. Поэтому ценными являются гены, которые отселектированы у видов в течение длительной оптимально сопряженной эволюции с патогенами.

Существуют и другие причины необходимости перестройки селекции картофеля с внутривидовой гибридизации на межвидовую, которые касаются особых межаллельных и межгенных отношений у межвидовых гибридов, повышения потенциала сортов с участием видов по многим агрономическим признакам.

Материалы и методы

Исходным материалом в исследовании были образцы диких и культурных видов картофеля, полученные из ВИР, зарубежных стран, на основании которых создавались доноры отдельных признаков. Для преодоления межвидовой нескрещиваемости использовали как существующие методы, так и разработанные нами (Подгаецкий, 1993). Создание исходного предселекционного и селекционного материала осуществляли в соответствии с разработанной нами схемой (рис.). Другие исследования проводили в соответствии с общепринятыми методиками (Методика исследования ..., 1967).

Результаты

В соответствии с разработанной нами схемой использования генофонда картофеля для создания исходного селекционного материала (рис.) первым этапом этой работы является сбор образцов диких и культурных видов в генцентрах их происхождения, в частности, по устойчивости к болезням и вредителям – в местах сопряженной эволюции растений-хозяев и патогенов.

На втором этапе проведения исследований установлена возможность выделения среди

сородичей культурных сортов видов с высоким фенотипическим проявлением устойчивости к фитофторозу. При использовании искусственного заражения листьев наивысшей устойчивостью против возбудителя характеризовались образцы видов *S. bulbocastanum* Dun., *S. cardiphyllum* Lindl., *S. ehrenbergii* Rydb. Их инфицированные отделенные листья не имели симптомов болезни даже при нагрузке инокулюма 60 конидий в поле зрения микроскопа при малом увеличении.

Анализ данных искусственного заражения сеянцев от самоопыления видов (у некоторых оценено до 25 тыс. растений) позволяет утверждать о перспективности поиска источников устойчивости среди таких из них: *S. antipoviczii* Buk., *S. demissum* Lindl., *S. stoloniferum* Schlecht., *S. polytrichon* Rydb., *S. fendleri* A. Gray, *S. simplicifolium* Bitt. В целом среди потомства образцов этих видов часть сеянцев без симптомов поражения составляла более 30 %.

К сожалению, у картофеля гены контроля устойчивости против фитофтороза надземной части растения и клубней часто имеют неодинаковое защитное действие, поэтому проводили искусственное заражение клубней методом половинок и оценивали их устойчивость к проникновению, распространению и размножению инфекции. Уникальным видом оказался *S. bulbocastanum*, отдельные образцы которого проявили абсолютную высокую резистентность против фитофторы. Эффективными полигенами относительно проникновения инфекции характеризовались также образцы видов *S. demissum* Lindl., *S. hougasii* Corr., *S. antipoviczii* Buk., *S. pinnatisectum* Greenm., распространения инфекции – виды *S. hougasii*, *S. stoloniferum*, *S. polytrichon*, *S. papita* Rydb., *S. gourlayi* Hawk., размножения гриба – *S. demissum*, *S. pinnatisectum*, *S. jamesii* Torr.

Доказана возможность выделения среди сородичей культурных сортов картофеля видов с эффективным генетическим контролем устойчивости к сухой фузариозной гнили, что подтверждается высоким средним проявлением признака и созданием потомства от самоопыления без симптомов болезни. Среди 36 оцененных нами видов наиболее перспективными для создания исходного предселекционного материала были: *S. stoloniferum*, *S. polytrichon*,

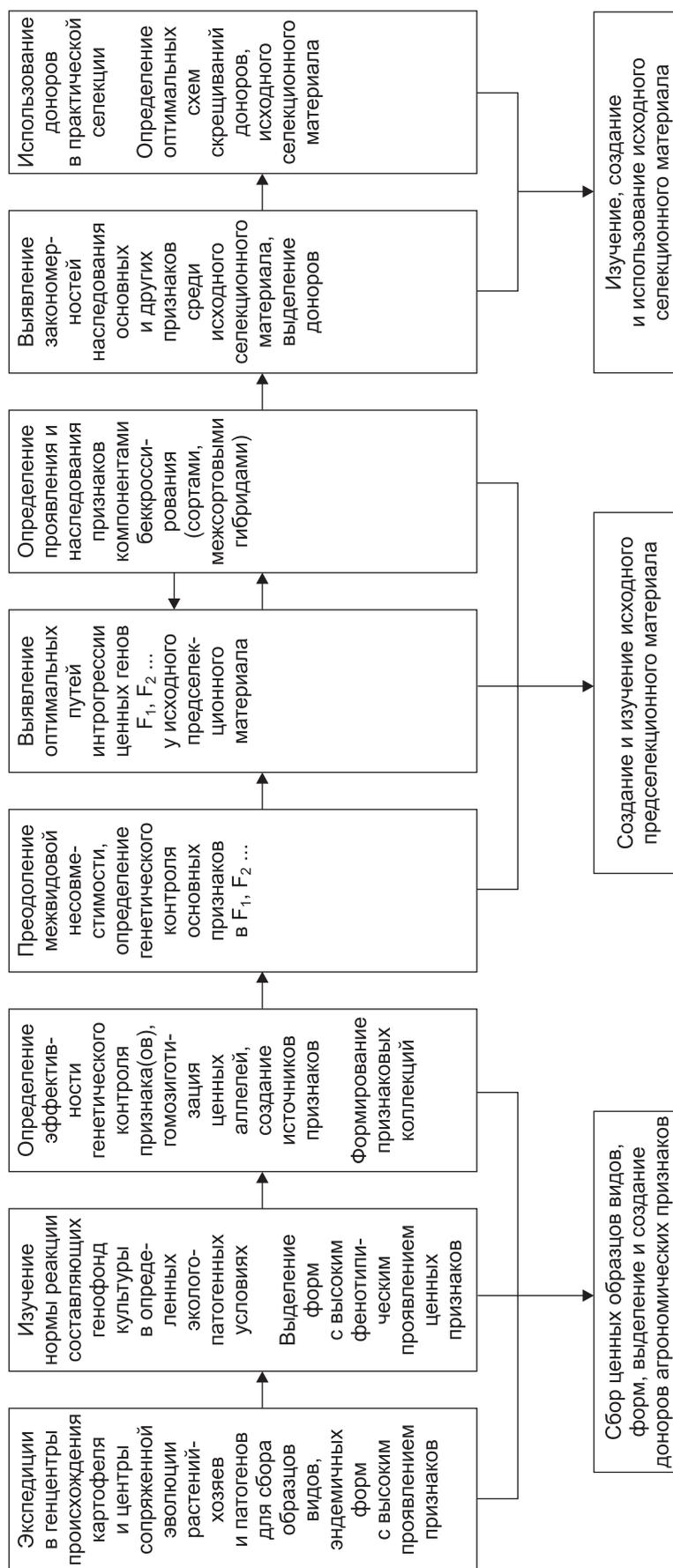


Рис. Поэтапное выполнение исследований с использованием генофонда картофеля для создания исходного селекционного материала, доноров отдельных или нескольких признаков.

S. jamesii, *S. trifidum* Corr., *S. simplicifolium* Bitt., *S. chacoense* Bitt.

Как утверждают многие селекционеры-картофелеводы и что подтверждено нашими исследованиями, большой ареал видов обуславливает различие путей сопряженной эволюции их и патогенов, что проявляется в полиморфизме выражения признаков среди образцов отдельных видов. Именно этим обусловлена необходимость третьего этапа при создании исходного предселекционного и селекционного материала. Полученные данные (табл. 1) свидетельствуют о неравноценности образцов вида *S. demissum* относительно эффективности генетического контроля устойчивости клубней к фитофторе. Только среди потомства трех образцов вида (УК 27-1, УК27-41 и УК27-46) средний балл устойчивости к проникновению инфекции составил 7,5. В то же время среди потомства от самоопыления других образцов (УК27-11, УК27-25) не выделено ни одного сеянца, имеющего хотя бы минимальную (3 балла) устойчивость. Аналогичное относилось к проявлению устойчивости к распространению и размножению гриба.

Установлена сложность выделения образцов с эффективным генетическим контролем устойчивости к распространению инфекции. Кроме перечисленных выше трех образцов с высокой резистентностью к проникновению инфекции средний балл потомства только еще двух других образцов (УК27-21 и УК27-26) относительно устойчивости к распространению гриба составил более 8 баллов. В отличие от изложенного, многие образцы вида характеризовались эффективным генетическим контролем устойчивости к распространению инфекции. У них все потомство не имело мицелия на инфицированной поверхности клубней.

В результате наших исследований выявлен оптимальный уровень гомозиготизации ценных аллелей генов контроля отдельных признаков образцов видов картофеля (табл. 2). Потомство I₁ образца УК27-18 вида *S. demissum* характеризовалось сравнительно высокой устойчивостью к фитофторозу. Около одной трети сеянцев после искусственного заражения в фазе 3–5 настоящих листьев не имели симптомов болезни. То же наблюдалось относительно возможности выделения материала с высокой полевой ус-

Таблица 1

Полиморфизм образцов вида *S. demissum* по составляющим устойчивости клубней к фитофторозу (1996–2000 гг.)

Номер образца по каталогу	Средний балл устойчивости клубней		
	к проникновению инфекции	к распространению инфекции	к размножению инфекции
УК27-1	7,5	8,0	9,0
УК27-5	3,5	6,0	9,0
УК27-6	3,5	7,1	4,5
УК27-8	2,0	6,8	4,5
УК27-10	2,3	6,8	4,3
УК27-11	1,0	5,0	9,0
УК27-12	4,5	6,0	8,0
УК27-13	5,0	5,5	9,0
УК27-14	1,7	4,0	4,5
УК27-16	3,0	6,5	7,1
УК27-18	5,5	5,7	9,0
УК27-21	6,3	8,3	9,0
УК27-24	5,5	7,0	8,0
УК27-25	1,0	4,5	5,0
УК27-26	5,5	8,0	9,0
УК27-28	3,0	7,2	5,0
УК27-29	3,2	3,8	9,0
УК27-30	5,3	7,5	9,0
УК27-32	5,3	7,3	8,0
УК27-33	4,0	5,5	9,0
УК27-35	5,5	7,8	9,0
УК27-36	4,8	7,8	9,0
УК27-37	4,5	7,4	9,0
УК27-40	5,9	7,7	9,0
УК27-41	7,5	8,5	9,0
УК27-42	6,5	7,5	9,0
УК27-46	7,5	8,3	9,0
УК27-47	5,6	6,6	9,0
УК27-48	6,5	7,8	9,0
УК27-49	5,8	7,2	9,0
УК27-52	3,0	7,2	9,0
УК27-54	2,8	7,8	6,5

тойчивостью (наличие единичных небольших пятен фитофтороза). От 11 сеянцев I₁ получено потомство от самоопыления. Представленные данные свидетельствуют о неравноценности его по устойчивости к фитофторозу. Особую ценность относительно эффективности гене-

Таблица 2

Изучение устойчивости исходного образца УК 27-18 вида *S. demissum* и его потомства от самоопыления (1985–1988 гг.) к фитофторе при искусственном заражении

Номер по каталогу	Оценено сеянцев, шт.	Среди них с типами устойчивости, %				Пораженных со средней и низкой полевой, %
		всего высокоустойчивых	с крайней высокой	сверхчувствительной	высокой полевой	
УК 27-18	342	78,7	33,1	8,5	37,1	21,3
УК 27-18с17	213	75,6	11,3	62,9	1,4	24,4
УК 27-18с26	49	100,0	24,5	65,3	10,2	0
УК 27-18с38	90	100,0	33,4	62,2	4,4	0
УК 27-18с55	129	99,2	59,7	39,5	0	0,8
УК 27-18с61	308	12,0	1,3	9,4	1,3	88,0
УК 27-18с63	229	98,3	62,9	34,1	1,3	1,7
УК 27-18с67	73	59,0	1,0	58,0	0	41,0
УК 27-18с70	139	2,9	0	2,9	0	97,1
УК 27-18с73	185	13,5	7,6	5,9	0	86,5
УК 27-18с79	103	0	0	0	0	100,0
УК 27-18с127	127	100,0	78,4	21,6	0	0

тического контроля признака имели сеянцы УК27-18с55, УК27-18с63 и УК27-18с127, у которых часть потомства с крайне высокой резистентностью против гриба составила около 60 % и больше.

Нашими исследованиями доказано, что гомозиготизация ценных аллелей по контролю устойчивости надземной массы растений вида *S. demissum* против фитофторы может происходить до I_3 – I_4 , а относительно сухой фузариозной гнили у многих видов с I_2 и выше.

Согласно нашим данным, очень сложным является вовлечение в создание предселекционного материала филогенетически отдаленных видов. Применяя разнообразный арсенал методов преодоления межвидовой нескрещиваемости, практически любой вид можно вовлечь в селекционную практику. Однако даже вовлекая в скрещивания высокоустойчивые формы, например, к фитофторозу, далеко не всегда можно получить аналогичное потомство (табл. 3). В этом случае мы считаем, что большую роль играет взаимоотношение генов родительских форм, контролирующих признак. В одинаковых по происхождению межвидовых комбинациях скрещивания различия проявления признака в зависимости от генотипа компонентов скрещивания могут составлять 11 раз и больше.

По сравнению с первичными межвидовыми гибридами (в скрещиваниях вовлекались два вида) среди вторичных межвидовых гибридов установлено только незначительное снижение фенотипического проявления устойчивости против фитофтороза, сухой фузариозной гнили. Результаты искусственного заражения сеянцев разных по происхождению (в зависимости от количества вовлеченных в скрещивания видов и различия сеянцев в пределах одной комбинации) вторичных межвидовых гибридов свидетельствуют о значительном влиянии генотипа материнских форм на проявление фитофтороустойчивости потомства (табл. 4). В целом наиболее перспективным для получения потомства с высокой резистентностью против гриба явилось использование «трехвидового» гибрида, в частности сеянца П 56/71.

Аналогичные данные получены относительно возможности выделения среди вторичных межвидовых гибридов потомства с крайней высокой (9 баллов), высокой (8) и относительно высокой (7) устойчивостью против сухой фузариозной гнили (табл. 5).

Результаты девятилетних полевых испытаний беккроссов сложных межвидовых гибридов свидетельствуют о возможности выделения среди них форм с очень высокой устойчиво-

Таблица 3

Изучение устойчивости отдельных листьев
первичных межвидовых гибридов при заражении фитофторой

Номера комбинаций	Происхождение	Оценено гибридов, шт.	Среди них выделено с индексом поражения, %			
			0	0,1–5,0	5,1–10,0	> 10,0
94.111	S. sto* × S. acl	5	20,0	60,0	20,0	0
95.114	S. sto × S. acl	14	7,1	57,2	21,4	14,3
95.115	S. sto × S. acl	20	15,0	50,0	30,0	5,0
95.124	S. sto × S. dms	49	8,2	55,2	28,6	8,2
95.137	S. sto × S. sim	15	6,7	40,0	40,0	13,3
95.122	S. sto × S. dms	34	2,9	55,9	38,3	2,9
94.104	S. sto × S. pnt	11	27,3	63,6	0	9,1
94.107	S. sto × S. pnt	4	25,0	75,0	0	0
94.108	S. sto × S. dms	3	33,3	33,3	33,4	0
93.54	S. sto × S. mcd	31	6,4	32,3	51,6	9,7
94.78	S. sto × S. ver	11	18,2	63,6	9,1	9,1
94.81	S. sto × S. ryb	47	8,5	63,9	25,5	2,1
92.14	S. sto × S. sim	20	15,0	55,0	25,0	5,0
94.98	S. sto × дигапл. S. t.	24	20,8	50,0	25,0	4,2
94.100	S. sto × S. ant	18	1U	83,3	5,6	0
94.101	S. sto × S. ver	43	14,0	72,1	11,6	2,3
93.53	S. sto × S. dms	19	0	57,9	36,8	5,3
94.103	S. sto × S. dms	12	25,0	50,0	25,0	0

Примечание. S. sto – *S. stoloniferum*; S. acl – *S. acaule*; S. dms – *S. demissum*; S. sim – *S. simplicifolium*; S. pnt – *S. pinnatisectum*; S. msd – *S. microdontum*; S. ver – *S. verrucosum*; S. ryb – *S. rybinii*; S. ant – *S. antipoviczii*; S. t. – *S. tuberosum*.

стью к фитофторозу. Ввиду того что в течение проведения исследования развитие болезни происходило по-разному, в среднем проявление признака у лучших беккроссов (81.388с97, 81.488с32, 83.10/107, 86.579с14 и некоторых других) было в 1,9–3,6 раза выше, чем у лучших сортов-стандартов (Львовянка, Полесский розовый), а в отдельные, эпифитотийные, годы при устойчивости стандартов в 1 балл выделены гибриды, не имеющие симптомов болезни (9 баллов), что свидетельствует об успешной интрогрессии эффективных генов контроля признака от диких видов в исходный селекционный материал. Аналогичное относилось к возможности выделения среди созданного нами материала беккроссов с высокой устойчивостью к сухой фузариозной гнили.

Проведение насыщающих скрещиваний вторичных межвидовых гибридов позволило создать исходный селекционный материал с вы-

соким проявлением отдельных или нескольких признаков, хотя и с меньшей степенью выражения, чем среди исходного предселекционного материала. Например, относительно легко можно выделить беккроссы с высокой продуктивностью, крахмалистостью, значительным количеством клубней под кустом, высокой полевой устойчивостью к вирусным болезням (репродуцирование отдельных межвидовых гибридов в течение около 30 лет позволило выделять формы без симптомов болезней). Отдельные беккроссы после испытания на провокационных фонах имели крайнюю высокую устойчивость против парши обыкновенной, железистой пятнистости клубней, дитиленхоза. Несмотря на то что в целом беккроссы межвидовых гибридов по группе спелости относятся к среднепоздним, с их непосредственным участием можно получать скороспелое потомство (Жолуденко, 2005).

Таблица 4

Изучение устойчивости к фитофторе семян картофеля,
полученных от скрещивания межвидовых гибридов с сортом Hydra (1981–1983 гг.)

Комбинации скрещивания	Оценено семян, шт.	Пораженных с низкой устойчивостью, %	С устойчивостью, %		Всего устойчивых, %
			сверх-чувствительной	крайней высокой	
П 56/71 × Hydra	142	9,2	6,3	84,5	90,8
П 56/27 × - " -	113	72,5	24,8	2,7	27,5
П 56/75 × - " -	58	46,5	46,6	6,9	53,5
Среднее	313	39,0	20,4	40,6	61,0
П 65/18 × - " -	334	41,0	44,6	14,4	49,0
П 65/232 × - " -	85	52,9	23,6	23,5	47,1
П 65/215 × - " -	100	98,0	2,0	0	2,0
П 65/86 × - " -	60	53,3	40,0	6,7	46,7
П 65/58 × - " -	106	88,7	9,4	1,9	11,3
Среднее	685	59,4	30,2	10,4	40,6
П 55/102 × - " -	68	51,5	35,3	13,2	48,5
П 55/38 × - " -	171	86,0	14,0	0	14,0
П 55/8 × - " -	387	57,1	41,9	0	42,9
П 55/94 × - " -	156	53,2	25,0	21,8	46,8
П 55/7 × - " -	99	33,3	40,4	26,3	66,7
Среднее	881	58,9	33,3	7,8	41,1

Примечание. Сеянцы комбинации П 56 – (*S. demissum* × *S. bulbocastanum*) × *S. andigenum*; П55 – {[(*S. acaule* × *S. bulbocastanum*) × *S. phureja*] × *S. demissum*} × *S. andigenum*; П65 – {[(*S. acaule* × *S. bulbocastanum*) × *S. phureja*] × *S. demissum*} × Полесский розовый.

Таблица 5

Устойчивость потомства межвидовых гибридов
против сухой фузариозной гнили (1982–1984 гг.)

Полевой номер	Происхождение	Сеянцы, шт.			Устойчивых, %
		Оценено	с баллами устойчивости		
			9–8	7	
81.368	П 55/8 / {[(acl. × blk.) × phu.] Ч dms} × adg./ × Hydra	10	2	2	40
81.714	П 56/59: [(dms. × blk.) × adg.] × Kora	5	2	1	60
81.459	Aquila × П 55/7 {[(acl. × blk.) × phu.] × dms} × adg.	33	1	8	27
111-2-3-4	77.277/3 (7415-5 × Adretta) × П 55/102	20	6	0	30
83.808	PW 76/635 × П 55/102	4	2	1	75
82.52	Hydra × П 80.24с6 (П 55/102 × 77.270/26)	11	1	1	18
83.181	П 14-2с18 (П 55/102 × Hydra) × Carla	8	1	1	25

Примечание. acl. – *S. acaule*, blk. – *S. bulbocastanum*, phu. – *S. phureja*, dms. – *S. demissum*, adg. – *S. andigenum*.

Даже без широкомасштабного использования полученного исходного селекционного материала в практической селекции все-таки

удалось создать новые сорта картофеля. Некоторые из них внесены в Государственный реестр сортов растений Украины (табл. 6).

Таблица 6

Сорта, созданные с участием сложных межвидовых гибридов

Название	Происхождение сорта	Происхождение гибрида	Год внесения в Реестр сортов Украины
Институт картофелеводства			
Днипрянка	Санте × 85.314с27	V ₂ шестивидового гибрида	2001
Подольянка	Аусония × 88.1439с6	F ₂ V ₁ шестивидового гибрида	2006
Палитра	88.1450с2 × Франзи	F ₂ от самоопыления шестивидового гибрида	–
Щедрик	85.291с12 × Багряна	V ₂ шестивидового гибрида	в испытании
Базис	85.291с12 × Багряна	V ₂ шестивидового гибрида	–
Околыця	90.817с4 × Беллароза	V ₂ трехвидового гибрида	в испытании
Полесская опытная станция			
Завия	89.721с81 × Пост 86	V ₂ от скрещивания двух шестивидовых гибридов	2008

Заключение

Установлена ценность диких видов картофеля *S. bulbocastanum* Dun., *S. cardiphylllum* Lindl., *S. ehrenbergii* Rydb., *S. antipoviczii* Buk., *S. demissum* Lindl., *S. stoloniferum* Schlechtd., *S. polytrichon* Rydb., *S. fendleri* A. Gray, *S. simplicifolium* Bitt. для поиска источников устойчивости к фитофторе (надземной части и клубней), а *S. stoloniferum*, *S. polytrichon*, *S. jamesii*, *S. strifidum* Corr., *S. simplicifolium* Bitt., *S. chacoense* Bitt. – к сухой фузариозной гнили. Доказана необходимость осуществления гомозиготизации ценных аллелей до I₄. Установлена возможность выделения среди первичных и вторичных межвидовых гибридов потомства с очень высокой устойчивостью против фитофтороза или сухой фузариозной гнили при значительном влиянии на проявление признаков генотипа созданных форм. Доказано, что беккроссирование вторичных межвидовых гибридов позволяет получать потомство с высокой продуктивностью, крахмалистостью, значительным количеством клубней под кустом, высокой полевой устойчивостью к вирусным болезням (репродуцирование отдельных межвидовых гибридов в течение около 30 лет позволило выделять формы без симптомов болезней). Отдельные беккроссы после испытания на провокационных фонах имели крайне высокую устойчивость против парши обыкновенной, железистой пятнистости клубней, дитиленхоза. Селекционная ценность созданного материала подтверждена созданием с его непосредственным участием сортов картофеля, часть из которых внесены в Государственный реестр сортов растений Украины.

новенной, железистой пятнистости клубней, дитиленхоза. Селекционная ценность созданного материала подтверждена созданием с его непосредственным участием сортов картофеля, часть из которых внесены в Государственный реестр сортов растений Украины.

Литература

- Жолуденко О.В. Создание скороспелого селекционно ценного материала картофеля: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Харьков: Институт растениеводства, 2005. 19 с.
- Камераз А.Я. Межвидовая и внутривидовая гибридизация картофеля // Генетика картофеля. М.: Наука, 1973. С. 104–131.
- Костина Л.И. Родословная сортов картофеля // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. Л., 1982. Т. 73. Вып. 2. С. 22–31.
- Методика исследования по культуре картофеля. М., 1967. 263 с.
- Подгаецкий А.А. Межвидовая несовместимость картофеля. Методы и способы ее преодоления (Методические рекомендации). Киев, 1993. 99 с.
- Подгаецкий А.А., Гордиенко В.В. Цветение и ягодообразование у сортов картофеля // Сб. науч. тр. Картофельводство, Минск, 2008. Т. 14. С. 278–289.
- Росс Х. Селекция картофеля. Проблемы и перспективы. М.: Агропромиздат, 1989. 184 с.
- Успенский Е.М. Биология цветения картофеля // Работы НИИКХ. М., 1935. Вып. VIII. 152 с.
- Энгельс Ф. Диалектика природы. М.: Политиздат, 1969. С. 154.
- Glendinning D.R. Potato introductions and breeding up to the early 20th century // New Phytologist. 1983. V. 94. P. 479–505.

INTERSPECIES CROSSES IN POTATO BREEDING IN UKRAINE

A.A. Podgayetsky

Sumy National Agrarian University, Sumy, Ukraine,
e-mail: podgaje@mail.ru

The potential of using wild potato species in breeding and raise of donors of resistance to late blight and dry rot, the necessity of homozygotization of alleles controlling valuable traits, possibility of raising primary and secondary interspecies hybrids, presence of efficient genes controlling the resistance to late blight and dry rot, and the possibility of introgression of these genes to breeding material are considered. Varieties raised by backcrossing complex interspecies hybrids are characterized.

Key words: potato, interspecies crosses, artificial contamination, late blight, Fusarium dry rot, agronomic traits, new varieties.

УДК 575.17

ДИНАМИКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ КРАСНОДАРСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ОБЫКНОВЕННОЙ ЗЛАКОВОЙ ТЛИ ПРИ СМЕНЕ РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА*

© 2012 г. **Е.Е. Радченко, Т.Л. Кузнецова, Н.В. Алпатьева**ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия,
e-mail: Eugene_Radchenko@rambler.ru

Поступила в редакцию 2 августа 2011 г. Принята к публикации 13 октября 2011 г.

Выявлена высокая общая и сезонная изменчивость краснодарской популяции обыкновенной злаковой тли по вирулентности к генам устойчивости сорго и ячменя, а также по RAPD-маркерам. Наблюдали отбор из популяции генотипов насекомого, специфически приспособленных к виду растения-хозяина. На ячмене преобладали авирулентные к устойчивым образцам сорго клоны. Миграция тли с ячменя на сорго приводила к быстрому накоплению клонов, вирулентных к генам устойчивости сорго *Sgr1–Sgr4* и *Sgr12*. При смене хозяина происходит существенное изменение соотношения групп генотипов, близких по профилям RAPD-фрагментов. Распределение RAPD-маркеров не зависит от аллелей вирулентности насекомого.

Ключевые слова: обыкновенная злаковая тля, сорго, ячмень, гены устойчивости, вирулентность, RAPD-анализ, структура популяции.

Введение

Обыкновенная злаковая тля (*Schizaphis graminum* Rond.) питается на культурных и дикорастущих злаках в южных регионах России. Наиболее значительный ущерб она причиняет сорго. Вредоносность насекомого может существенно ограничить устойчивость растений-хозяев. На стабильность устойчивости зерновых культур к тле влияет формирование биотипов насекомых с новой вирулентностью, которые способны успешно размножаться на устойчивых ранее сортах. Возможность приспособления к питающему растению вызывает необходимость изучения изменчивости насекомого.

Впервые различия по способности питаться на определенных сортах пшеницы и ячменя между популяциями *S. graminum* были обнаружены в США в 1947 г. (Dahms, 1948). С 1961 по 1997 гг. в США было идентифицировано 10 биотипов тли, дифференциально взаимодей-

ствующих с различными растениями-хозяевами: А–С, Е–К (Harvey *et al.*, 1997), а в 2010 г. появилось сообщение об обнаружении 13 новых биотипов (Weng *et al.*, 2010).

Неоднородность популяций насекомого на территории бывшего СССР впервые выявили при изучении устойчивости двух образцов сорго к ставропольской и узбекской популяциям тли (Радченко, Якшин, 1990). В результате многолетнего (1994–2008 гг.) мониторинга краснодарской (Кубанская опытная станция ВИР – КОС ВИР, Гулькевичский район) популяции *S. graminum* выявлена высокая изменчивость насекомого по вирулентности к 6 образцам сорго. Всего идентифицировали 42 фенотипа вирулентности тли, ежегодно – 22–36 фенотипов. Под воздействием абиотических факторов может меняться относительная конкурентоспособность клонов насекомого, т. е. изменение условий среды приводит к дифференциальному отбору в популяциях *S. graminum* (Радченко, Кузнецова, 2009).

* Работа была представлена на Международной научной конференции «Экология, генетика, селекция на службе человечества», Ульяновск, 2011.

Следует отметить, что обыкновенная злаковая тля – олигофаг, который зимует на озимых и дикорастущих злаках, весной и в начале лета вредит на зерновых колосовых и овсе, а в июне массово мигрирует на всходы сорго. Динамика частот генов вирулентности в популяциях фитофага при миграции на другой вид растения-хозяина в мировой литературе ранее не обсуждалась.

Цель нашей работы – оценить влияние смены хозяина на вариабельность генетической структуры краснодарской популяции *S. graminum* по вирулентности к растениям-хозяевам и по молекулярным маркерам.

Материал и методы

Колонии *S. graminum* собирали в 2009 и 2010 гг. на посевах сорго и ячменя КОС ВИР в июне, а затем в августе – на сорго. В 2009 г. насекомых собрали на коллекционных образцах ярового ячменя (коммерческие посева озимых зерновых в это время уже созрели) и на линии зернового сорго Ефремовское белое; в 2010 г. сбор насекомых проводили на подгонах озимого ячменя сорта Вавилон (коммерческий посев) и на районированном стандартном сорте Кубанское красное 1677.

Для получения клонов тлей в лабораторных условиях на смоченную водой вату в половинках чашек Петри раскладывали по несколько проросших семян пшеницы сорта Ленинградка. Через 3–5 дней на всходы в каждой чашке Петри подсаживали одну самку и закрывали стеклянными изоляторами, верхняя часть которых была затянута мельничным газом. Садки с клонами тли размещали на светоустановках, оборудованных люминесцентными лампами (Радченко, 1999).

В световом зале, где поддерживалась температура воздуха 20–25 °С, оценивали поврежденность образцов сорго с идентифицированными генами устойчивости к тле: к-3852, Сарваши (гены устойчивости *Sgr1* + *Sgr2*); к-9921, Shallu (*Sgr3*); к-6694, Deer (*Sgr4*); к-9436, Соргоградское (*Sgr5*); к-1362, Дурра белая (*Sgr5* + *Sgr6*); к-455, Carbam (*Sgr12*) (Радченко, 2000, 2006). Опытные образцы и неустойчивый контроль (линия Низкорослое 81) высевали в сосуды с почвой в круговом порядке и закрывали стеклянными изоляторами. В фазе 2

листьев всходы заселяли тлями одного клона из расчета 5 особей на растение. При гибели контроля определяли поврежденность растений каждого образца по шкале T.L. Archer с соавт. (1982): 0 – нет повреждений, 1 – повреждено 1–10 % листовой поверхности, 2 – 11–20 %, ..., 10 – 91–100 %. Растения с баллами 1–4 относили к устойчивым, 9–10 – к восприимчивым. В случае нечеткого проявления устойчивости эксперимент повторяли.

Полиморфизм субпопуляций (выборки клонов тли) оценивали по частотам фенотипов вирулентности, которые идентифицировали с помощью упомянутых образцов-дифференциаторов. Образцы разделили на две группы со строгим порядком внутри групп: Deer–Сарваши–Сарбам и Shallu–Соргоградское–Дурра белая. В каждой группе в случае авирулентности клона тли (устойчивости дифференциатора) образцу присваивали значение 0. В случае вирулентности (восприимчивости сорго) первому образцу присваивали значение 1, второму – 2, третьему – 4. Фенотип вирулентности клона тли обозначали числом из двух цифр, каждая из которых являлась суммой реакций устойчивости (восприимчивости) дифференциаторов. В случае вирулентности ко всем дифференциаторам клон насекомого обозначали числом 77 (1 + 2 + 4), в случае авирулентности – 00.

Аналогичную методику использовали и при изучении полиморфизма *S. graminum* по вирулентности к образцам ячменя. Оценивали устойчивые к ряду идентифицированных в США биотипов насекомого сорта Herb, Wintermalt и Post, который имеет ген устойчивости *Rsg1* (Porter *et al.*, 2007), а также выделенные нами образцы местного ячменя к-16190, к-15600 из Китая и к-28129 из КНДР (Радченко и др., 2004). Образцы для обозначения фенотипов вирулентности распределили в две группы в следующем порядке: Post – Herb – Wintermalt и к-16190 – к-28129 – к-15600.

Для оценки изменчивости субпопуляций тли использовали критерии, предложенные Л.А. Животовским (1982). Внутрипопуляционное разнообразие оценивали с помощью критерия μ (среднее число фенотипов в популяции) по формуле: $\mu = (\sqrt{p_1} + \sqrt{p_2} + \dots + \sqrt{p_m})^2$, где p_1, p_2, \dots, p_m – выборочные значения частот фенотипов, m – число фенотипов. Наряду со средним

числом фенотипов определяли показатель h – долю редких фенотипов: $h = 1 - \mu/m$. При сравнении популяций использовали критерий сходства r : $r = \sqrt{p_1q_1} + \sqrt{p_2q_2} + \dots + \sqrt{p_mq_m}$, где p_i и q_i – частоты фенотипов в сравниваемые годы. Значимость различий популяций по частотам общих фенотипов оценивали по критерию идентичности I : $I = \frac{8N_1N_2}{N_1 + N_2} (1 - r - \frac{p^0 + q^0}{4})$, где p^0 – сумма частот фенотипов 1-й выборки, не представленных во 2-й выборке; q^0 – сумма частот фенотипов 2-й выборки, которые отсутствуют в 1-й.

Для RAPD-анализа отобрали по 14–16 случайных клонов тли из 5 субпопуляций (всего 78 клонов насекомого). ДНК выделяли из 5–10 особей каждого клона по методике (Выделение ДНК ...), предложенной на сайте molbiol (http://molbiol.ru/protocol/14_04.html), с некоторыми модификациями. Полимеразную цепную реакцию проводили с 5 полиморфными RAPD-праймерами (OPA02, OPA10, OPA14, OPA17, OPG02) по протоколу, предложенному F.O. Aikhionbare с соавт. (1998). Полученные амплифицированные фрагменты разделяли с помощью электрофореза в горизонтальных агарозных 1,5 %-х гелях в 1×TAE буфере (трис-ацетатный буфер, pH 8,2), напряжение при этом составляло примерно 5V на 1 см длины геля. После электрофореза гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем УФ свете. Для сравнения RAPD-спектров составили базу данных, в которой каждому

компоненту был присвоен соответствующий порядковый номер, а затем данные переводили в бинарный вид, т. е. присутствие и отсутствие компонента в спектре кодировали соответственно цифрами 1 или 0. В конечную матрицу включили 49 воспроизводимых в ряде независимых опытов компонентов, из которых 41 оказался полиморфным. Для построения кладограммы, отражающей генетическое сходство клонов тли, применяли метод невзвешенных парных групп с использованием арифметических средних (UPGMA) в программе TREECON. В качестве критерия сходства использовали коэффициент M. Nei, W.H. Li (1979).

Результаты

В 2009 г., когда на сорго наблюдали очень высокую численность насекомого, выявили 27 фенотипов вирулентности тли к генам устойчивости сорго. В следующем году численность насекомого на сорго была самой низкой за период наблюдений с 1994 г. Однако и в период депрессии идентифицировали 25 фенотипов вирулентности тли (14 – на сорго, 11 фенотипов были уникальны для сбора на ячмене). Различия между субпопуляциями по среднему числу фенотипов и по доле редких фенотипов в ряде случаев существенны (табл. 1). Наименее выровнена субпопуляция, собранная в августе 2009 г. При низкой плотности популяции тли на сорго доминировал фенотип 73, который характеризуется вирулентностью ко всем диф-

Таблица 1

Фенотипическое разнообразие субпопуляций *S. graminum* по вирулентности к образцам сорго

Дата сбора	Изучено клонов	Число фенотипов вирулентности	Доминирующий фенотип	Частота доминирующего фенотипа	Среднее число фенотипов	Доля редких фенотипов
Субпопуляции, собранные на ячмене						
24.06.2009	30	10	00	0,43	8,14 ± 0,71	0,19 ± 0,07
21.06.2010	36	18	00	0,14	16,48 ± 0,83	0,08 ± 0,04
Субпопуляции, собранные на сорго						
24.06.2009	66	17	00	0,20	14,06 ± 0,79	0,17 ± 0,05
02.08.2009	100	15	71	0,60	8,83 ± 0,74	0,41 ± 0,05
21.06.2010	34	10	73	0,62	6,58 ± 0,81	0,34 ± 0,08
04.08.2010	45	8	73	0,62	5,42 ± 1,32	0,32 ± 0,17

ференциаторам, за исключением образца Дурра белая. В течение двух лет изучения на ячмене преобладали клоны, авирулентные к устойчивым образцам сорго.

Встречаемость на сорго клонов, вирулентных к образцу Дурра белая (гены устойчивости *Sgr5* и *Sgr6*), в 2009 г. не превышала 3 %, а в следующем году вирулентные к этому образцу клоны не выявлены. Лишь один собранный на ячмене клон оказался вирулентным. В первый год изучения к концу сезона существенно снизилась доля клонов, вирулентных к сорту Соргоградское (*Sgr5*). Частоты клонов, вирулентных к остальным образцам сорго, в июле и августе резко увеличились. В 2010 г. наблюдали такой же резкий рост числа клонов, сильно повреждающих Соргоградское, а частоты клонов, вирулентных к остальным образцам, варьировали примерно в одних и тех же пределах.

Результаты экспериментов свидетельствуют и о достаточно высоком полиморфизме краснодарской популяции *S. graminum* по вирулентности к сортам ячменя (табл. 2). В 2009 г. идентифицировали 14 фенотипов вирулентности, в 2010 г. – 21. Смена хозяина обусловила и смену доминирующего фенотипа.

В течение всего периода мониторинга большинство клонов тли были вирулентны к сортам ячменя Herb и Wintermalt, а 40–60 % сильно повреждали Post. На сорго в 2009 г. частоты клонов, вирулентных к образцам ячменя из второй группы, были невелики и несколько повысились к концу сезона. На ячмене все клоны тли были

авирулентны к образцам к-16190 и к-28129 и лишь 1 клон из 30 изученных сильно повреждал образец к-15600. В 2010 г. на ячмене вирулентные к образцу к-16190 клоны не выявлены. При переходе на сорго 23,5 % клонов сильно повреждали к-16190, а к концу сезона частота вирулентных клонов снизилась до 5,9 %. Сходная тенденция присуща и клонам, вирулентным к образцам к-28129 и к-15600, однако в данном случае снижение частот к концу сезона было менее заметным.

Согласно критерию идентичности 5 субпопуляций из 6 изученных существенно различались между собой, что указывает на высокий сезонный полиморфизм насекомого по вирулентности к сорго (табл. 3). Субпопуляция, собранная в 2009 г. на ячмене, существенно отличалась по генам вирулентности к образцам ячменя от субпопуляций на сорго; в 2010 г. значительно различались только субпопуляции, собранные на ячмене и на сорго в один и тот же день.

Сравнение данных 2009 и 2010 гг. показало, что по генам вирулентности к образцам сорго не различались субпопуляции, собранные на ячмене ($r = 0,68$; $I = 25,56$), а также на сорго в июне 2009 г. и ячмене в 2010 г. ($r = 0,72$; $I = 28,23$). По генам вирулентности к образцам ячменя сходство выявлено при сравнении 5 пар из 9, в том числе не различались и «ячменные» субпопуляции ($r = 0,79$; $I = 14,96$).

С помощью RAPD-анализа изучили полиморфизм 78 клонов, собранных в разные

Таблица 2

Фенотипическое разнообразие субпопуляций *S. graminum* по вирулентности к образцам ячменя

Дата сбора	Изучено клонов	Число фенотипов вирулентности	Доминирующий фенотип	Частота доминирующего фенотипа	Среднее число фенотипов	Доля редких фенотипов
Субпопуляции, собранные на ячмене						
24.06.2009	30	5	70	0,67	3,63 ± 0,41	0,27 ± 0,08
21.06.2010	36	9	70	0,44	6,51 ± 0,67	0,28 ± 0,07
Субпопуляции, собранные на сорго						
24.06.2009	48	9	60	0,38	6,87 ± 0,55	0,24 ± 0,06
02.08.2009	48	10	60	0,38	7,46 ± 0,63	0,25 ± 0,06
21.06.2010	34	12	66, 70, 76	0,18	10,50 ± 0,62	0,13 ± 0,06
04.08.2010	45	16	70	0,27	12,75 ± 0,96	0,20 ± 0,06

Таблица 3

Сходство между субпопуляциями *S. graminum*

Сравниваемые субпопуляции тли		Степень сходства			
		по генам вирулентности к образцам сорго		по генам вирулентности к образцам ячменя	
		<i>r</i>	<i>I</i>	<i>r</i>	<i>I</i>
2009 г.	июнь, ячмень – июнь, сорго	0,67	31,89*	0,77	24,44**
	июнь, ячмень – август, сорго	0,15	96,37**	0,68	28,76**
	июнь, сорго – август, сорго	0,34	154,82**	0,88	13,73
2010 г.	июнь, ячмень – июнь, сорго	0,32	63,44**	0,51	37,73**
	июнь, ячмень – август, сорго	0,31	72,92**	0,80	19,72
	июнь, сорго – август, сорго	0,83	13,13	0,72	21,65

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

периоды вегетации растений-хозяев. Все клоны имели уникальные RAPD-профили. Тем не менее можно выделить две группы клонов насекомого, которые образуют кластеры с бутстреп-поддержкой порядка 80 %. Соотношение этих групп, обозначенных нами как биотипы I и II, существенно менялось в 5 изученных субпопуляциях с июня 2009 г. по июнь 2010 г. Основной вклад в дифференциацию групп вносят ампликоны, полученные с помощью праймера OPA14. Например, клоны тли, RAPD-профили которых представлены на электрофоретических дорожках 3, 7 и 11, относятся к группе I, остальные – к группе II (рис. 1).

На ячмене в июне 2009 г. частоты групп биотипов I и II были примерно одинаковы, а при миграции на сорго доля биотипов группы I уменьшилась почти в 3 раза. 7 клонов, собранных на сорго, и 1 клон – на ячмене имеют уникальные сочетания RAPD-компонентов. По составу спектров, полученных с помощью праймера OPA14, они принадлежат к типу II и обозначены нами как «другие биотипы группы II». На ячмене обнаружен только 1 клон этого типа, на сорго – 6. Таким образом, при миграции фитофага с ячменя на сорго сокращалась доля биотипов группы I, возрастали частота и разнообразие биотипов группы II (рис. 2).

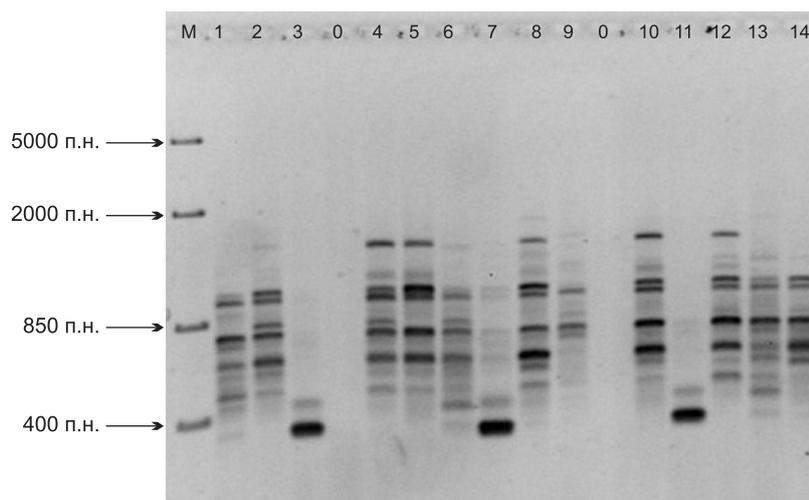


Рис. 1. Электрофоретические спектры RAPD-фрагментов ДНК, собранных на ячмене в июне 2010 г. клонов *S. graminum*, полученные с помощью праймера OPA 14.

M – маркер молекулярной массы; 1–14 – клоны тли; 0 – отрицательный контроль.

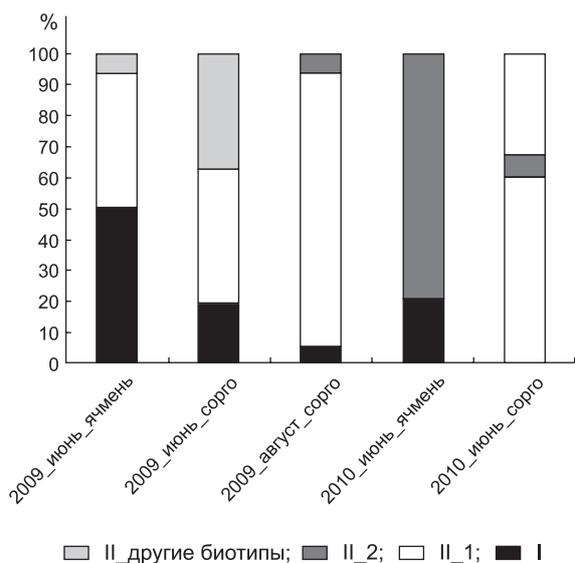


Рис. 2. Динамика частот биотипов тли I и II в период мониторинга (июнь 2009 г. – июнь 2010 г.).

Субпопуляция тли, собранная на сорго в августе 2009 г., оказалась более однородной по сравнению с июньским сбором: лишь 1 клон тли отнесен к типу I, 15 клонов принадлежали к типу II.

В перезимовавшей и размножавшейся на ячмене субпопуляции тли в июне 2010 г. обнаружено 3 клона, принадлежащих к I типу, и 13 клонов – ко второму. Однако собранные в августе предыдущего года биотипы группы II отличаются от перезимовавших и образуют самостоятельные группы, обозначенные нами как II_1 и II_2 (рис. 3). Основные RAPD-фрагменты, дифференцирующие данные группы, получены с помощью праймеров OPA10 и OPG02. Один клон тли из «августовской» субпопуляции 2009 г. в значительной степени сходен по RAPD-профилю с клонами, найденными на ячмене в июне следующего года.

При смене растения-хозяина (ячмень–сорго) в июне 2010 г. клоны тли, принадлежащие к первому типу, не выявлены. Собранные на сорго клоны принадлежали к типу II, причем 9 из 14 изученных клонов образовали самостоятельную группу. Основной вклад в дифференциацию этой группы внесли RAPD-профили, полученные с помощью праймеров OPA10, OPA 02 и частично OPA17. Эта группа сходна с клонами типа II_1, обнаруженными на сорго в августе

2009 г. Остальные 5 собранных на сорго клонов имеют уникальные RAPD-профили и отнесены нами к классу «другие биотипы группы II».

Обсуждение

Результаты изучения клонов обыкновенной злаковой тли, собранных в одном пункте, демонстрируют высокую изменчивость *S. graminum* по признаку вирулентности к *Sgr*-генам устойчивости сорго, как общую, так и сезонную. Мы установили также, что в период питания на сорго популяция фитофага лабильна и по вирулентности к образцам ячменя.

Сравнение собранных в один и тот же день субпопуляций тли, питающейся на созре-

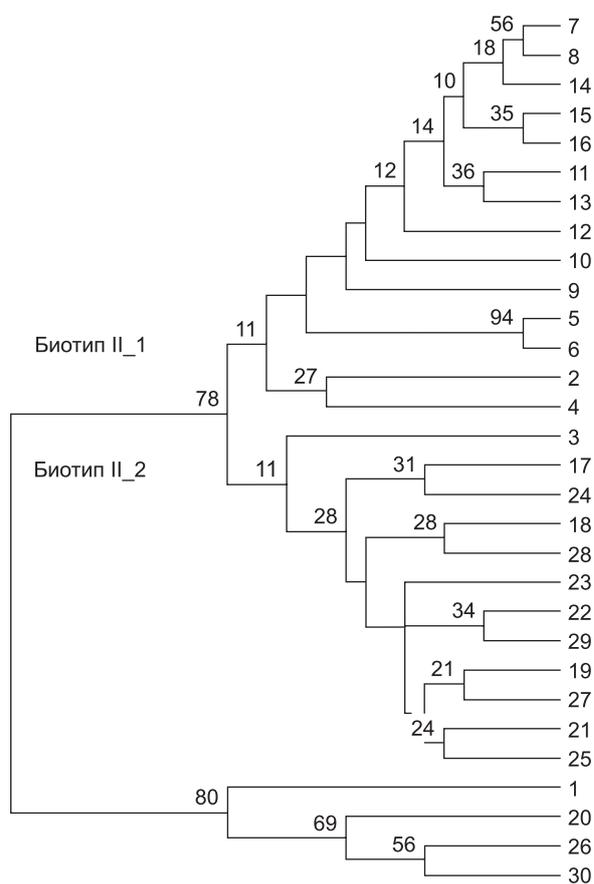


Рис. 3. Кладограмма UPGMA, построенная на основе данных RAPD-анализа клонов *S. graminum*, собранных на сорго в августе 2009 г., и на ячмене – в июне 2010 г.

1–16 – клоны тли, собранные в августе 2009 г. на сорго, 17–30 – клоны тли, собранные в июне 2010 г. на ячмене. Бутстреп-поддержка клад (в %) показана числами у основания ветвей.

ощем ячмене и уже мигрировавшей на молодые растения сорго, позволило выявить значительные различия между ними (табл. 3). Наблюдали отбор из популяции генотипов *S. graminum*, специфически приспособленных к виду растения-хозяина. При размножении насекомого на ячмене преимущество в конкуренции имели особи, не обладающие «лишними» генами вирулентности к сорго. Так, сорта-дифференциаторы сорго были устойчивы к 43 % клонов, собранных на ячмене в июне 2009 г. (табл. 1). При этом все клоны оказались авирулентными к двум сортам, Дурра белая и Deeg, а частоты вирулентности к другим образцам варьировали всего лишь от 0,166 (Сарваши) до 0,366 (Shallu). Смена хозяина привела к быстрому накоплению клонов, вирулентных, прежде всего, к генам устойчивости *Sgr1–Sgr4* и *Sgr12*. На сорго в июне 2009 г. уже 63,6 % клонов были вирулентны к образцу Shallu и 34,8 % – к сорту Deeg.

Смена растения-хозяина привела к существенному изменению структуры популяции *S. graminum* и по вирулентности к образцам ячменя, особенно в благоприятный для размножения насекомого год. Частоты вирулентных к сортам-дифференциаторам клонов в 2009 г. повысились (значительно – к сорту Herb), а в период депрессии, наоборот, несколько снизились. В целом же сезонные различия между субпопуляциями были менее выражены по сравнению с изменением структуры популяции по вирулентности к устойчивым образцам сорго.

С помощью полиморфных RAPD-прайм-еров обнаружили изменение соотношения двух групп биотипов тли при смене растения-хозяина (рис. 2, 3). При этом значимая связь между подвижностью выявленных фрагментов ДНК и вирулентностью не выявлена. Частота клонов тли, относящихся к группе I, в 2009 г. уменьшалась при миграции насекомого с ячменя, а в 2010 г. такие клоны на сорго вовсе не выявлены. Частота биотипов группы II на сорго, напротив, увеличивается. Субпопуляции тли, собранные на сорго в июне 2009 и 2010 гг., наиболее полиморфны по RAPD-спектрам и разнообразны по фенотипам вирулентности. Клоны, отнесенные нами по RAPD-спектрам к группам биотипов I и II_1 в 2009 г. или I и II_2 в 2010 г., более приспособлены к питанию на ячмене; при миграции на

сорго преимущество в конкуренции получали биотипы класса II_1.

Исследования о влиянии генов вирулентности на приспособленность фитопатогенов привели к противоречивым результатам: избыточная (не требующаяся для поражения коммерческих сортов) вирулентность либо снижает конкурентоспособность, либо нейтральна, или же ее повышает (Левитин, 1986; Дьяков, 1998). В наших опытах клоны насекомого, сильно повреждающие образцы с генами устойчивости *Sgr1–Sgr4* и *Sgr12*, быстро вытесняли на сорго доминировавший ранее «нулевой» фенотип (табл. 1). Сорт Кубанское красное 1677 и линия Ефремовское белое, на которых собирали тлю, не имеют генов устойчивости сортов-дифференциаторов, однако комплементарные им «лишние» гены вирулентности насекомого повышали конкурентоспособность фитофага при питании на сорго.

Следует отметить также, что депрессия численности насекомого на сорго была сопряжена с безусловным доминированием фенотипа 73, который характеризуется вирулентностью к 5 образцам сорго из 6 изученных (табл. 1). Исследования динамики популяций фитопатогенных грибов показали, что в неблагоприятные для развития болезней годы преобладают расы, имеющие мало генов вирулентности (Дьяков, 1998). В наших опытах, напротив, клоны *S. graminum* с широким спектром вирулентности оказались более приспособлены к выживанию в неблагоприятных условиях.

Работа поддержана грантами РФФИ № 09-04-00786 и № 12-04-00710.

Литература

- Выделение ДНК из мух [http://molbiol.ru/protocol/14_04.html]
- Дьяков Ю.Т. Популяционная биология фитопатогенных грибов. М.: Муравей, 1998. 382 с.
- Животовский Л.А. Показатели популяционной изменчивости по полиморфным признакам // Фенетика популяций. М.: Наука, 1982. С. 38–44.
- Левитин М.М. Генетические основы изменчивости фитопатогенных грибов. Л.: Агропромиздат, 1986. 208 с.
- Радченко Е.Е. Идентификация генов устойчивости зерновых культур к тлям. СПб: ВИР, 1999. 60 с.
- Радченко Е.Е. Идентификация генов устойчивости сорго к обыкновенной злаковой тле // Генетика. 2000. Т. 36. № 4. С. 510–519.

- Радченко Е.Е. Наследование устойчивости образцов зернового сорго и суданской травы к обыкновенной злаковой тле // Генетика. 2006. Т. 42. № 1. С. 65–70.
- Радченко Е.Е., Звейнек И.А., Тырышкин Л.Г. и др. Устойчивость образцов из Юго-Восточной Азии к вредителям и болезням // Каталог мировой коллекции ВИР. СПб: ВИР, 2004. Вып. 751. 43 с.
- Радченко Е.Е., Кузнецова Т.Л. Полиморфизм краснодарской популяции обыкновенной злаковой тли по вирулентности к растениям-хозяевам // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 2009. Т. 166. С. 214–220.
- Радченко Е.Е., Якшин Г.В. Устойчивые к обыкновенной злаковой тле образцы сорго // Селекция и семеноводство. 1990. № 1. С. 26–27.
- Aikhionbare F.O., Kenneth P.P., Mayo Z.B. Greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes characterized using random amplified polymorphic DNA // Genetic Analysis Biomol. Engineering. 1998. V. 14. No. 4. P. 105–108.
- Archer T.L., Onken A.B., Matheson R.L., Bynum E.D. Jr. Nitrogen fertilizer influence on greenbug (Homoptera: Aphididae) dynamics and damage to sorghum // J. Econ. Entomol. 1982. V. 75. No. 4. P. 695–698.
- Dahms R.G. Comparative tolerance of small grains to greenbugs from Oklahoma and Mississippi // J. Econ. Entomol. 1948. V. 41. No. 5. P. 825–826.
- Harvey T.L., Wilde G.E., Kofoid K.D. Designation of a new greenbug biotype K, injurious to resistant sorghum // Crop Sci. 1997. V. 37. No. 3. P. 989–991.
- Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl Acad. Sci. 1979. V. 76. No. 10. P. 5269–5273.
- Porter D.R., Burd J.D., Mornhinweg D.W. Differentiating greenbug resistance genes in barley // Euphytica. 2007. V. 153. No. 1/2. P. 11–14.
- Weng Y., Perumal A., Burd J.D., Rudd J.C. Biotypic diversity in greenbug (Hemiptera: Aphididae): microsatellite-based regional divergence and host-adapted differentiation // J. Econ. Entomol. 2010. V. 103. No. 4. P. 1454–1463.

DYNAMICS OF THE GENETIC STRUCTURE OF THE KRASNODAR GREENBUG POPULATION UNDER HOST PLANT ALTERATION

E.E. Radchenko, T.L. Kuznetsova, N.V. Alpatieva

Vavilov All-Russia Research Institute of Plant Industry, St. Petersburg, Russia,
e-mail: Eugene_Radchenko@rambler.ru

Summary

A high level of overall and seasonal variability of the Krasnodar greenbug population for virulence to sorghum and barley resistance genes as well for RAPD markers was revealed. The selection of insect genotypes specifically adapted to host plant species was recorded. Aphid clones avirulent to resistant sorghum accessions were most abundant on the barley. Greenbug migration from barley to sorghum led to rapid accumulation of clones virulent to sorghum genes for resistance: *Sgr1–Sgr4* and *Sgr12*. After alteration of the host, a significant shift of genotype groups similar in RAPD profiles was observed. The distribution of RAPD markers was independent of alleles for virulence of the aphid.

Key words: *Schizaphis graminum* Rondani, sorghum, barley, genes for resistance, virulence, structure of populations.

УДК 57(091)

ТРИ СТОЛЕТИЯ БИОЛОГИИ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ*© 2012 г. **С.В. Шалимов**

Санкт-Петербургский филиал Института истории естествознания и техники
им. С.И. Вавилова РАН, Санкт-Петербург, Россия,
e-mail: sshal85@mail.ru

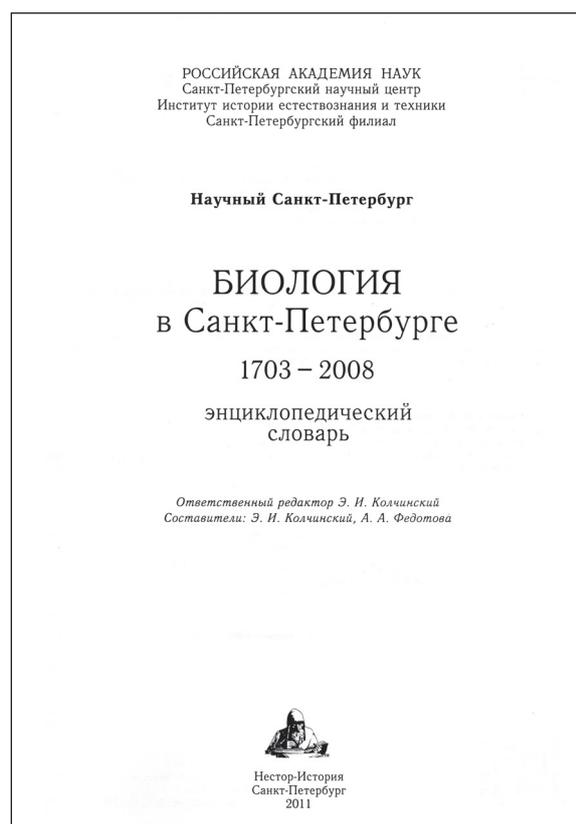
Поступила в редакцию 20 января 2012 г. Принята к публикации 13 февраля 2012 г.

В статье рассматривается фундаментальное справочное издание «Биология в Санкт-Петербурге. 1703–2008». Автор обращает внимание на основные достижения данного труда. Вместе с тем высказывается ряд замечаний и пожеланий. Делается вывод о существенном значении новой книги для дальнейшего изучения истории биологических исследований.

Ключевые слова: история науки, биология, Санкт-Петербург, «лысенковщина», генетика.

В настоящее время биология вызывает все больший научный и практический интерес. Рост внимания к биологическим исследованиям обусловлен, прежде всего, определяющей ролью в развитии науки и в жизни общества. Очевидно, что в современном мире в условиях усугубляющегося экономического и в особенности продовольственного кризиса именно достижения биологической науки во многом определяют перспективы преодоления вызовов XXI в.

Вместе с тем невозможно рассчитывать на успехи современной биологии без критического осмысления исторического опыта развития биологических исследований, анализа эффективности научно-технической политики, рассмотрения достижений и ошибок прошлого. В свою очередь, одним из наиболее привлекательных объектов для подобного ретроспективного анализа является институционализация биологических исследований в городе Санкт-Петербурге – крупнейшем центре мировой и российской науки, где, собственно, и зародилась отечественная биология. Именно в городе на Неве появились первые естественнонаучные музеи и лаборатории, были сделаны фундаментальные открытия и сформирована сеть



биологического образования. В то же время биология в Санкт-Петербурге прошла все непростые этапы развития данной отрасли естество-

* Рецензия на книгу Биология в Санкт-Петербурге. 1703–2008: Энциклопедический словарь / Отв. ред. Э.И. Колчинский. Сост. Э.И. Колчинский, А.А. Федотова. СПб: Нестор-история, 2011. 568 с.

вознания, в том числе крайне неоднозначный «советский» период. Тем самым исторический пример развития в северной столице науки о живом несет в себе значительную ценность как для истории биологии в России, так и для всей истории отечественной науки.

В этой связи выход в свет фундаментального издания «Биология в Санкт-Петербурге. 1703–2008: Энциклопедический словарь» можно считать знаковым событием. В сущности, это первый труд такого масштаба не только по теме, определяемой названием, но и в целом по истории отечественной биологии.

Основное достижение рассматриваемой работы заключается в том, что в ней становление и развитие биологических исследований в городе на Неве представлены в небывало широких хронологических рамках – от начала XVIII в. и почти до нашего времени. Привлекает в рецензируемом издании широта рассматриваемого круга вопросов: более 1650 статей включают имена известных биологов, названия биологических научно-исследовательских и образовательных учреждений, музеев, научных сообществ, периодических изданий, сыгравших важную роль в институционализации биологических исследований в Санкт-Петербурге. Более того, в книге содержится информация об административных структурах, неформальных объединениях ученых, издательствах, библиотеках, архивах, общественных и государственных деятелях, меценатах, оказавших влияние на развитие науки о живом.

Наряду с этим работу выгодно отличает многоплановость источниковой базы, включающей документы из архивов Москвы и Санкт-Петербурга, материалы из личных архивов ученых, периодические специализированные издания. Следует также отметить высокое полиграфическое качество рецензируемого издания, наличие богатого иллюстративного материала, значительная часть которого впервые вводится в научный оборот.

Очевидным достоинством справочника является электронная версия издания, что вполне соответствует современной общемировой тенденции выпускать справочные и исторические пособия в двух формах.

Самостоятельное научное значение имеет предисловие, написанное ответственным

редактором издания, доктором философских наук, профессором Э.И. Колчинским. В частности, данный текст информирует читателя об основных путях и ключевых этапах институционализации биологии в Санкт-Петербурге, включает историографический очерк и концентрирует целый ряд положений и выводов. Так, по утверждению автора, «к началу XX в. в столице Российской империи сложилась дифференциальная сеть научно-исследовательских и образовательных учреждений, связанных с изучением многообразных проявлений жизни и распространением полученных знаний в обществе. <...> В результате в городе на Неве был создан огромный потенциал для успешного развития биологических исследований широким фронтом» (С. 10). Однако вскоре «Ленинград оказался одним из главных полигонов, где испытывались методы советизации и диалектизации биологии с попытками создать некие варианты «пролетарской», «диалектико-материалистической» и советской биологии, сопровождаемые запретами целых научных направлений и отраслей знаний. ...». Как следствие ««лысенкоизм», деятельность О.Б. Лепешинской, решения августовской сессии ВАСХНИЛ 1948 и объединенной сессии АН АМН СССР об учении И.П. Павлова 1950 нанесли существенный вред развитию генетики, физиологии, цитологии, гистологии и ряда смежных дисциплин. Ленинградские ученые сыграли огромную роль в борьбе с «лысенковщиной» и в ликвидации ее последствий» (С. 11, 12).

В связи с этим особую ценность представляют статьи, посвященные институционализации генетических исследований в городе на Неве. Достаточно сказать, что в издании включены более 50 информационных справок об известных генетиках, научно-исследовательских учреждениях и периодических изданиях соответствующего профиля. В частности, читатели узнают много нового о биографиях таких ученых, как Н.И. Вавилов, Ф.Г. Добржанский, М.Е. Лобашев, М.С. Навашин, Ю.А. Филипченко и многих других. В свою очередь, из справок о научных журналах следует специально отметить статью о «Ботаническом журнале» (С. 64), являвшемся, как известно, одним из центров борьбы с «лысенковщиной» в 1950-е гг. Из очерков, посвященных научно-исследо-

вательским институтам и научно-образовательным учреждениям, необходимо выделить материалы о легендарном ВИРе (ныне Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова РАСХН) (С. 114) и Биолого-почвенном факультете Санкт-Петербургского государственного университета (С. 56, 57), где с 1957 г. возобновилось чтение полноценного лекционного курса классической генетики и началось возрождение кадрового потенциала опальной науки.

Весьма важно, что во многих очерках выявляется роль целого ряда ученых и научных учреждений в противостоянии «лысенковщине». При этом упоминаются не только заслуги таких ведущих борцов с Т.Д. Лысенко, как В.Я. Александров, И.А. Рапопорт (С. 27, 400), но и вклад менее известных, но не менее мужественных ученых, в том числе отдавших жизнь за свои научные убеждения, Л.И. Говорова, Г.Д. Карпенченко, Г.А. Левитского, Е.К. Эмме (С. 140, 227, 272, 527). Вместе с тем в издании фигурируют имена не только противников «лысенковщины», но и представителей лагеря «народного академика», среди которых были И.И. Презент, Н.В. Турбин, И.Г. Эйхфельд (С. 392, 473, 525).

Несмотря на то что энциклопедический словарь посвящен ученым и научным учреждениям Санкт-Петербурга, он также отражает значительный объем биологических исследований в других регионах страны. Как известно, мобильность всегда была отличительной чертой исследователей, и поэтому многие биологи, являвшиеся по месту своего профессионального становления петербуржцами, впоследствии внесли существенный вклад в развитие науки в других городах.

В частности, целый ряд упомянутых в справочнике ученых-генетиков, по праву принадлежавших к биологическому сообществу Санкт-Петербурга, прочно вписали свои имена в историю сибирской науки. Среди них известные ученые, сыгравшие важную роль в становлении Института цитологии и генетики СО РАН, Ю.Я. Керкис, А.Н. Лутков, Р.Л. Берг. Заслуживает одобрения то, что в биографических справках не остался без внимания сибирский период их деятельности: отражены научные достижения и занимаемые должности, названы ученики (С. 50, 231, 288).

Отмечая очевидные достижения рецензируемого труда, хотелось бы вместе с тем высказать некоторые замечания и пожелания. Так, хотя верхней хронологической границей работы является 2008 г., в ней не даны биографические данные современных исследователей. В соответствии с принципами, принятыми составителями, среди представленных персоналий в книге нет ни одного ныне здравствующего ученого. Думается, данный критерий отбора материала в какой-то мере обедняет биографическую часть справочника.

Кроме того, необходимо обратить внимание на некоторые пробелы в опубликованных в энциклопедическом словаре биографических справках. В частности, очерк об ученице Н.И. Вавилова, представительнице известной научной династии Р.Л. Берг при характеристике ее общественной деятельности ограничивается следующей информацией: «С 1960-х участник движения за права человека» (С. 50). С нашей точки зрения, здесь необходимо было сказать об участии Раисы Львовны в крупнейшей правозащитной акции – подписании знаменитого «письма 46-ти». Напомним, в феврале 1968 г. 46 сотрудников Новосибирского научного центра подписали письмо протеста против нарушений законности в ходе «процесса четырех» (он имел место в Москве в начале того же года и явился самой крупной репрессивной акцией против «диссидентов», – по процессу проходили А. Гинзбург, Ю. Галансков, А. Добровольский, В. Лашкова), вызвавшее широкий международный резонанс. Между тем данное общественно-политическое событие оказало решающее влияние на всю последующую биографию ученого. Известно, что после подписания письма Р.Л. Берг была фактически «выдавлена» из новосибирского Академгородка...

Разумеется, высказанные замечания не меняют общей высокой оценки рассматриваемой книги и могут быть отнесены не столько к критике данной работы, сколько к пожеланиям на будущее.

Таким образом, литература по истории отечественной биологии пополнилась фундаментальным, содержательным изданием. Энциклопедический словарь вносит существенный вклад в понимание процессов становления и развития одной из ведущих отраслей науки как

в региональном, так и в общероссийском контексте. Хочется надеяться, что рецензируемый справочник даст значительный импульс для дальнейшего изучения исторического опыта институционализации биологических исследований в России.

THREE CENTURIES OF BIOLOGY IN ST. PETERSBURG*

S.V. Shalimov

St. Petersburg Branch of the Institute for the History of Science and Technology,
RAS, St. Petersburg, Russia, e-mail: sshal85@mail.ru

Summary

The paper is dedicated to the fundamental book «Biology in St. Petersburg. 1703–2008». The reviewer underlines the main advantages of the book and makes some remarks and wishes. The conclusion about a notable role of the new publication for further studies in the history of biology is made.

Key words: history of biology, St. Petersburg, «Lysenkoism», genetics.

* Book review: Biology in St. Petersburg. 1703–2008. Encyclopaedic Dictionary / Ed. by E.I. Kolchinsky, Compiled by E.I. Kolchinsky, A.A. Fedotova. St. Petersburg: Nestor-historia, 2011 (In Russian).

Федеральное государственное унитарное предприятие «ПОЧТА РОССИИ»												
Бланк заказа периодических изданий										Ф. СП-1		
										АБОНЕМЕНТ на <small>газету</small> 4 2 1 5 3		
										<small>журнал</small> (индекс издания)		
Вавиловский журнал										Количество		
<small>(наименование издания)</small>										Комплектов		
генетики и селекции												
на 20 _____ год по месяцам												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Куда												
<small>(почтовый индекс)</small>						<small>(адрес)</small>						
Кому												
<small>(фамилия, инициалы)</small>												
----- Линия отреза -----												
										ДОСТАВОЧНАЯ		
										КАРТОЧКА 4 2 1 5 3		
										<small>(индекс издания)</small>		
										Газету		
										На Журнал Вавиловский журнал генетики и селекции		
										<small>(наименование издания)</small>		
Стоимость			подписки			руб.			Кол-во комп-лектов			
			переадресовки			руб.						
на 20 _____ год по месяцам												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
почтовый индекс			город									
			Село									
			область									
			район									
код улицы			улица									
дом			корпус			квартира						
Фамилия И.О.												

Отредактировано и подготовлено к печати
в редакционно-издательском отделе ИЦиГ СО РАН

Редакторы: А.А. Ончукова, И.Ю. Ануфриева
Дизайн: А.В. Харкевич
Компьютерная графика: А.В. Харкевич, Т.Б. Коняхина
Компьютерная верстка: Т.Б. Коняхина, Н.С. Глазкова

Подписано в печать 22.06.2012 г.
Формат бумаги 60×84 1/8. Усл.-печ. л. 21,6. Уч.-изд. л. 20,4
Тираж 250. Заказ 279

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН»
630090, Новосибирск, Морской проспект, 2