

---

# БАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

ОСНОВАН В 1997 г.

Том 17

1

Март 2013

---

# VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

FOUNDED IN 1997

Vol. 17

1

March 2013

---

«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](mailto: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, 2013

© Вавиловский журнал генетики и селекции, 2013

© Сибирское отделение Российской академии  
наук, 2013

## Содержание

<i>А.И. Щапова</i> РАЗНООБРАЗИЕ ЖИЗНЕННЫХ ЦИКЛОВ И ИХ РОЛЬ В ЭВОЛЮЦИИ БАЗОВОГО ЧИСЛА ХРОМОСОМ ГАПЛОИДНЫХ ГЕНОМОВ У РАЗНЫХ ТИПОВ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ .....	6
<i>А.А. Торгашева</i> МЕЙОЗ: ЧТО НУЖНО ПЕРЕЖИТЬ РАДИ УМЕНЬШЕНИЯ ЧИСЛА ХРОМОСОМ ВДВОЕ.....	17
<i>М.Д. Голубовский, А.М. Полищук</i> НЕСКОЛЬКО СЛОВ О К.Н. ГРИНБЕРГЕ .....	29
<i>К.Н. Гринберг, В.И. Кухаренко</i> РЕАЛИЗАЦИЯ ФЕНОТИПИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ХРОМОСОМНЫХ АНОМАЛИЙ У ЧЕЛОВЕКА .....	32
<i>Л.А. Першина, Т.С. Осадчая, Е.Д. Бадаева, И.А. Белан, Л.П. Россеева</i> ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ АНДРОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ СОРТОВ И ПЕРСПЕКТИВНОЙ ФОРМЫ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ЗАПАДНОСИБИРСКОЙ СЕЛЕКЦИИ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ НАЛИЧИЕМ ИЛИ ОТСУТСТВИЕМ ПШЕНИЧНО-ЧУЖЕРОДНЫХ ТРАНСЛОКАЦИЙ .....	40
<i>М.М. Злотина, О.Н. Ковалева, И.Г. Лоскутов, Е.К. Потокينا</i> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ <i>PPD</i> И <i>VRN</i> ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ВЕГЕТАЦИОННОГО ПЕРИОДА СОРТОВ ЯЧМЕНЯ.....	50
<i>М.Н. Шантуренко, Л.А. Тарутина, Т.В. Печковская, Л.А. Мишин, Л.В. Хотылёва</i> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ RAPD-МАРКЕРОВ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ ОТБОРА ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ПЕРЦА СЛАДКОГО ( <i>CAPSICUM ANNUM</i> L.) В СЕЛЕКЦИИ НА ГЕТЕРОЗИС .....	63
<i>С.И. Малецкий, С.С. Юданова, Е.И. Малецкая</i> ГАРМОНИЧЕСКИЕ ПРОПОРЦИИ В ПОПУЛЯЦИЯХ ЗАМЫКАЮЩИХ КЛЕТОК УСТЫИЦ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ ( <i>BETA VULGARIS</i> L.).....	72
<i>Б.Р. Кулуев, Е.В. Михайлова, А.В. Чемерис</i> ПЕРЕНОС ТРАНСГЕНОВ <i>ARGOS-LIKE</i> И <i>AtEXPA10</i> В НЕТРАНСГЕННЫЕ ФОРМЫ ТАБАКА И ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ИХ КОНСТИТУТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ .....	81

<i>Е.М. Лисицын</i>	
ОСНОВНЫЕ ПРИЧИНЫ НИЗКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ АЛЮМОУСТОЙЧИВЫХ РЕГЕНЕРАНТОВ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР.....	89
<i>В.И. Малиновский, Г.Б. Боровский, Е.Л. Горбылева, И.В. Федосеева, Е.Л. Таусон, В.А. Соколов, В.К. Войников</i>	
РОЛЬ КОРОТКИХ РНК В УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К БИОТИЧЕСКИМ И АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ .....	96
<i>Т.М. Хлебодарова, Д.Ю. Ощепков, Н.В. Тикунова, И.В. Бабкин, А.Д. Груздев, В.А. Лихошвай</i>	
РЕКОНСТРУКЦИЯ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА <i>yf1A</i> <i>ESCHERICHIA COLI</i> В УСЛОВИЯХ СТРЕССА .....	104
<i>Н.В. Храброва, Ю.В. Андреева, О.В. Ваулин, С.С. Алексеева, А.К. Сибатаев</i>	
ИЗМЕНЧИВОСТЬ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНА СУБЪЕДИНИЦЫ I ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ С У ВИДОВ РОДОВ <i>Aedes</i> И <i>Ochlerotatus</i> (DIPTERA: CULICIDAE).....	114
<i>М.А. Клещев, А.В. Осадчук, Л.В. Осадчук</i>	
СПЕРМАТОГЕННАЯ ФУНКЦИЯ У МЫШЕЙ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ VALB/cLac, DD/He И ИХ F <sub>1</sub> РЕЦИПРОКНЫХ КРОССОВ.....	123
<i>Е.В. Долгова, В.П. Николин, Н.А. Попова, А.С. Проскурина, К.Е. Орищенко, Е.А. Алямкина, Я.Р. Ефремов, С.И. Байбародин, Е.Р. Черных, А.А. Останин, С.С. Богачев, Т.С. Гвоздева, Е.М. Малкова, О.С. Таранов, В.А. Рогачев, А.В. Панов, С.Н. Загребельный, М.А. Шурдов</i>	
ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ, ВОЗНИКАЮЩИЕ В ОРГАНИЗМЕ МЫШЕЙ, ОБРАБОТАННЫХ СОЧЕТАНИЕМ ЦИКЛОФОСФАНА И ЭКЗОГЕННОЙ ДНК .....	129
<i>С.Я. Амстиславский, Т.Н. Игонина, И.Н. Рожкова, Е.Ю. Брусенцев, А.А. Роговая, Д.С. Рагаева, В.А. Напримеров, Е.А. Литвинова, И.Ф. Плюснина, А.Л. Маркель</i>	
РЕДЕРИВАЦИЯ ПУТЕМ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНОВ ЛИНИЙ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ И КРЫС.....	147
<i>Н.С. Эйгес</i>	
ИСТОРИЧЕСКАЯ РОЛЬ ИОСИФА АБРАМОВИЧА РАПОПОРТА В ГЕНЕТИКЕ. ПРОДОЛЖЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ХИМИЧЕСКОГО МУТАГЕНЕЗА .....	162
<i>И.М. Суриков</i>	
ГЕНЕТИК НИКОЛАЙ ВАСИЛЬЕВИЧ ТУРБИН И ЕГО ВРЕМЯ .....	173
<i>М.Б. Конашев</i>	
СТРАСТИ ПО ФЕОДОСИЮ, ИЛИ КАК И ПОЧЕМУ Ф.Г. ДОБРЖАНСКИЙ СТАЛ «НЕВОЗВРАЩЕНЦЕМ».....	180
<i>В.А. Соколов</i>	
ЭВОЛЮЦИОННЫЙ СИНТЕЗ ЛЕДЬЯРДА СТЕББИНСА .....	188

## Content

<i>A.I. Shchapova</i> THE DIVERSITY OF LIFE CYCLES AND THEIR ROLE IN THE EVOLUTION OF BASIC CHROMOSOME NUMBERS IN VARIOUS ORGANISMS .....	6
<i>A.A. Torgasheva</i> MEIOSIS: HOW TO HALVE THE CHROMOSOME NUMBER .....	17
<i>M.D. Golubovsky, A.M. Polishchuk</i> SOME WORLDS ABOUT K.N. GRINBERG .....	29
<i>K.N. Grinberg, V.I. Kukharensko</i> REALIZATION OF THE PHENOTYPIC EFFECT OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN HUMANS .....	32
<i>L.A. Pershina, T.S. Osadchaya, E.D. Badaeva, I.A. Belan, L.P. Rosseeva</i> FEATURES OF ANDROGENESIS IN ANTHR CULTURES OF VARIETIES AND A PROMISING ACCESSION OF SPRING COMMON WHEAT BRED IN WEST SIBERIA DIFFERING IN THE PRESENCE OR ABSENCE OF WHEAT-ALIEN TRANSLOCATIONS .....	40
<i>M.M. Zlotina, O.N. Kovaleva, I.G. Loskutov, E.K. Potokina</i> USE OF ALLELE-SPECIFIC MARKERS OF THE <i>PPD</i> AND <i>VRN</i> GENES FOR PREDICTING GROWING SEASON DURATION IN BARLEY CULTIVARS .....	50
<i>M.N. Shapturensko, L.A. Tarutina, T.V. Pechkovskaya, L.A. Mishin, L.V. Khotyleva</i> USE OF RAPD MARKERS OPTIMIZES THE SELECTION OF SOURCE MATERIAL OF SWEET PEPPER ( <i>CAPSICUM ANNUUM</i> L.) IN BREEDING FOR HETEROSIS .....	63
<i>S.I. Maletskii, S.S. Yudanova, E.I. Maletskaya</i> HARMONIC PROPORTIONS OF CHLOROPLAST NUMBER IN STOMATA OF GUARD CELL POPULATIONS IN SUGAR BEET ( <i>BETA VULGARIS</i> L.) .....	72
<i>B.R. Kuluev, E.V. Mikhaylova, A.V. Chemeris</i> TRANSFER OF <i>ARGOS</i> -LIKE AND <i>AtEXPA10</i> GENES INTO NONTRANSGENIC FORMS OF TOBACCO AND PHENOTYPIC EFFECTS OF THEIR CONSTITUTIVE EXPRESSION .....	81

<i>E.M. Lisitsyn</i>	
THE MAIN REASONS OF THE LOW EFFICIENCY OF OBTAINING ALUMINUM-RESISTANT REGENERANTS OF CEREAL CROPS .....	89
<i>V.I. Malinovsky, G.B. Borovskii, E.L. Gorbyleva, I.V. Fedoseeva, E.L. Tauson, V.A. Sokolov, V.K. Voinikov</i>	
ROLE OF SMALL RNAs IN PLANT DEFENSE AGAINST BIOTIC AND ABIOTIC STRESSES.....	96
<i>T.M. Khlebodarova, D.Yu. Oshchepkov, N.V. Tikunova, I.V. Babkin, A.D. Gruzdev, V.A. Likhoshvai</i>	
RECONSTRUCTION OF MECHANISMS REGULATING THE EXPRESSION OF THE <i>ESCHERICHIA COLI YFIA</i> GENE UNDER STRESS CONDITIONS .....	104
<i>N.V. Khrabrova, Yu.V. Andreeva, O.V. Vaulin, S.S. Alekseeva, A.K. Sibataev</i>	
VARIABILITY OF MITOCHONDRIAL CYTOCHROME OXYDASE SUBUNIT I GENE SEQUENCE IN SPECIES OF THE GENERA <i>Aedes</i> AND <i>Ochlerotatus</i> (DIPTERA: CULICIDAE).....	114
<i>M.A. Kleshchev, L.V. Osadchuk, A.V. Osadchuk</i>	
SPERMATOGENESIS INDICES IN INBRED STRAINS DD/He AND BALB/cLac AND THEIR F <sub>1</sub> RECIPROCAL CROSSES.....	123
<i>E.V. Dolgova, V.P. Nikolin, N.A. Popova, A.S. Proskurina, K.E. Orishchenko, E.A. Alyamkina, Ya.R. Efremov, S.I. Baiborodin, E.R. Chernykh, A.A. Ostanin, S.S. Bogachev, T.S. Gvozdeva, E.M. Malkova, O.S. Taranov, V.A. Rogachev, A.S. Panov, S.N. Zagrebelnyi, M.A. Shurdov</i>	
PATHOLOGICAL CHANGES IN MICE TREATED WITH CYCLOPHOSPHAMIDE AND EXOGENOUS DNA.....	129
<i>S.Ya. Amstislavsky, T.N. Igonina, I.N. Rozhkova, E.Yu. Brusentsev, A.A. Rogovaya, D.S. Ragaeva, V.A. Naprimerov, E.A. Litvinova, I.Z. Plyusnina, A.L. Markel</i>	
REDERIVATION BY EMBRYO TRANSFER IN STRAINS OF LABORATORY MICE AND RATS .....	147
<i>N.S. Eiges</i>	
THE ROLE OF JOSEPH ABRAMOVICH RAPOPORT IN THE HISTORY OF GENETICS. RESEARCH CONTINUED WITH THE USE OF CHEMICAL MUTAGENS .....	162
<i>I.M. Surikov</i>	
GENETICIST NIKOLAY VASILYEVICH TURBIN AND HIS TIME .....	173
<i>M.B. Konashev</i>	
ST. THEODOSIUS PASSION. HOW AND WHY TH.G. DOBZHANSKY BECAME A NON-RETURNER.....	180
<i>V.A. Sokolov</i>	
EVOLUTIONARY SYNTHESIS BY LEDYARD STEBBINS.....	188

УДК 575.8:576.316

## РАЗНООБРАЗИЕ ЖИЗНЕННЫХ ЦИКЛОВ И ИХ РОЛЬ В ЭВОЛЮЦИИ БАЗОВОГО ЧИСЛА ХРОМОСОМ ГАПЛОИДНЫХ ГЕНОМОВ У РАЗНЫХ ТИПОВ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ

© 2013 г. А.И. Щапова

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

Поступила в редакцию 24 января 2013 г. Принята к публикации 1 февраля 2013 г.

В работе представлены результаты сравнительного анализа базовых чисел хромосом гаплоидных геномов у видов четырех отделов голосеменных растений (*Gymnospermae*), трех семейств покрытосеменных растений (*Anthophyta*), трех подклассов млекопитающих (*Mammalia*), различающихся по типу их жизненного цикла. Результаты проведенного анализа показали, что виды голосеменных и покрытосеменных растений с чередованием гапло-диплоидных фаз, спорической мейотической редукцией, гермафродитным определением пола и доминированием спорофита имеют малые базовые числа хромосом ( $x = 7-14$ ), а большинство их видов являются полиплоидами.

Виды разных подклассов млекопитающих с доминированием спорофита, гаметической мейотической редукцией, раздельнополых с хромосомным наследованием пола существенно различаются по базовому числу хромосом. Виды *Monotremata* (яйцекладущие) имеют малое базовое число хромосом (5–6) и уровень плоидности  $10x$ , размах изменчивости среди видов *Marsupialia* (сумчатые) равен  $x = 5-16$ , а у *Euarchontoglires* (плацентарные) –  $x = 3-51$ . У сумчатых и плацентарных полиплоиды не обнаружены.

С помощью дифференциального окрашивания хромосом и различных методов флюоресцентной гибридизации хромосомоспецифических проб установлено, что эволюция базового числа хромосом у покрытосеменных растений сопровождалась неоднократной гибридизацией и полиплоидизацией малохромосомных видов с последующей дисплоидизацией посредством слияния негомологичных хромосом и реципрокных транслокаций. Полагают, что базовое число прародителя покрытосеменных видов не превышало 3–5 хромосом.

Результаты молекулярных и цитологических исследований у плацентарных и сумчатых видов млекопитающих показали, что изменение базовых чисел хромосом у них также происходило посредством слияний негомологичных хромосом и реципрокных транслокаций. Полагают, что базовое число хромосом прародителя плацентарных было в пределах  $x =$  от 40 до 50, у сумчатых 16–20, а у яйцекладущих 5–6.

Наличие существенных различий базовых чисел хромосом у прародителей трех разных подклассов млекопитающих, разошедшихся в эволюции несколько десятков млн лет назад, позволяет предположить, что в эволюции базовых чисел хромосом у прародителей сумчатых и плацентарных имела место полиплоидия с последующей дисплоидией.

У проанализированных видов живых организмов установлена определенная взаимосвязь между типом их жизненного цикла и базовым числом хромосом.

Результаты проведенных исследований указывают на то, что основным фактором обнаруженных различий по базовому числу хромосом у проанализированных видов, различающихся по типу жизненного цикла, являются генетические различия их в определении пола, и значительно меньшее влияние на этот процесс оказывает продолжительность гапло-диплоидных фаз.

**Ключевые слова:** базовое число хромосом, гаплоидный геном, эволюция видов, жизненные циклы, типы мейотической редукции хромосом.

## ВВЕДЕНИЕ

Полагают, что возраст Земли 4,5 млрд лет. На основании геологических исследований, связанных с формированием земной коры, и изменений климата, выделяют четыре эры: докембрий (начало которого 4,5 млрд лет назад), палеозой (590 млн лет), мезозой (248 млн лет) и кайнозой (65 млн лет) (Рейвн и др., 1990а, б).

Многие исследователи считают, что жизнь на Земле возникла в эру докембрия, самые ранние одноклеточные организмы (прокариоты) появились на Земле около 3,5 млрд лет назад и на протяжении 2 млрд лет они были единственной формой жизни, а эукариоты возникли значительно позже – только 1,5 млрд лет назад (Рейвн и др., 1990б). Полагают, что на протяжении довольно длительного периода первые эукариотические организмы были гаплоидными и размножались бесполом путем посредством митоза, а переход на гапло-диплоидную фазу жизненного цикла и связанное с этим возникновение мейоза и полового способа размножения произошло около 850 млн лет назад (Райков, 1978, 1982; Maguire, 1992; Богданов, 2003; Wilkins, Holliday, 2009).

Переключение с гаплоидной фазы жизненного цикла эукариот на диплоидную способствовало переходу на спорофитную фазу жизненного цикла, возникновению многоклеточных организмов, процессу дифференцировки клеток и формированию в последующие периоды геологических эр палеозоя и мезозоя огромно разнообразия форм живых организмов.

Однако многие вопросы, касающиеся происхождения хромосом, увеличения их числа, механизмов происхождения мейоза и полового способа размножения остаются мало исследованными. В настоящей статье предпринята попытка рассмотреть вопрос о взаимосвязи в эволюции разных видов живых организмов типа их гапло-диплоидного жизненного цикла и базового числа хромосом гаплоидного генома.

## РАЗНООБРАЗИЕ ЖИЗНЕННЫХ ЦИКЛОВ И ИХ ЭВОЛЮЦИЯ

Среди ныне живущих видов живых организмов выделяют жизненные циклы с зиготическим, гаметическим и спорическим мейозом (Рейвн и др., 1990а).

При зиготическом мейозе зигота делится мейотически, образуя четыре гаплоидные клетки, которые затем делятся митотически с образованием новых гаплоидных клеток или многоклеточной особи, которая в конечном итоге дает гаметы за счет дифференцировки отдельных клеток. При таком типе жизненного цикла доминирует гаметофит, а зигота является единственной диплоидной клеткой.

При гаметическом мейозе в результате мейотического деления диплоидного ядра образуются гаплоидные гаметы, которые, сливаясь, образуют диплоидную зиготу. При таком типе жизненного цикла доминирует спорофит, а гамета является единственной гаплоидной клеткой.

При спорическом мейозе спорофит (диплоидная особь) в результате мейоза образует гаплоидные споры, не функционирующие как гаметы, а делящиеся митотически. При этом возникают многоклеточные гаплоидные организмы (гаметофиты), формирующие в дальнейшем гаметы, которые сливаются с образованием диплоидных зигот, дающих начало диплоидным особям. Этот тип жизненного цикла назван «чередованием поколений».

Жизненные циклы, различающиеся по типу мейотической редукции числа хромосом диплоидного ядра, характеризуются различной продолжительностью гаплоидной и диплоидной фаз. У видов с зиготической редукцией мейотическое деление осуществляется сразу же при первом делении зиготы, а у видов с гаметическим мейозом все вегетативные стадии жизненного цикла диплоидны, а мейоз происходит с образованием гамет. У видов, характеризующихся чередованием гаплоидной и диплоидной фаз, мейоз занимает промежуточное положение в их жизненном цикле.

Зиготическая редукция является наиболее примитивной. В процессе эволюции видов происходило постепенное увеличение продолжительности диплофазы с переходом на спорическую, а затем на гаметическую мейотическую редукцию.

### **ЖИЗНЕННЫЕ ЦИКЛЫ И РАЗНООБРАЗИЕ БАЗОВЫХ ЧИСЕЛ ХРОМОСОМ У ВИДОВ РАЗНЫХ ОТДЕЛОВ ЦАРСТВА PLANTAE**

Виды царства Plantae характеризуются в основном жизненным циклом со спорической мейотической редукцией диплоидного ядра и чередованием гаплоидной и диплоидной фаз (Курсанов и др., 1966). Наиболее продолжительную гаплофазу имеют виды отдела Bryophyta (моховидные), несколько меньшую виды Pterophyta (папортники), и очень незначительную ее продолжительность виды отделов семенных растений. Покрытосеменные растения (Anthophyta) имеют только два митотических деления в микроспорогенезе, и три – в макроспорогенезе (Поддубная-Арнольди, 1964). Наиболее детально кариологически изучены виды 4 разных отделов голосеменных (Gymnospermae) и двух классов отдела покрытосеменных (Anthophyta).

Первые голосеменные появились в конце палеозойской эры примерно около 300 млн лет назад. В настоящее время насчитывают около 800 видов 15 разных семейств (Муратова, Круклис, 1988). Предполагают, что саговниковые являются самыми древними среди голосеменных, которые эволюционировали от древних видов папортниковых. Затем от общего древа голосеменных отошли гинкговые, хвойные и гнетовые.

Жизненные циклы голосеменных в основном сходны и представляют собой чередование гетероморфных поколений с крупными спорофитами и редуцированными гаметофитами, в их жизненном цикле преобладает диплофаза (Рейвн и др., 1990а).

Хромосомные числа изучены у 80 родов 15 семейств четырех отделов голосеменных. Достаточно полная сводка результатов этих исследований приведена в монографии Е.Н. Муратовой и М.В. Круклис (1988).

Большинство видов отдела саговниковые имеют гаплоидное число хромосом  $x = 8$  при

размахе изменчивости по этому признаку  $x = 8-14$ , виды отдела гнетовые – имеют  $x = 7$ , а у видов отдела гинкговые гаплоидные числа хромосом пока не установлены.

Самым многочисленным из современных голосеменных является отдел хвойные, в который включено более 600 видов 60 родов 8 разных семейств. Гаплоидное число хромосом у большинства видов хвойных равно 12, однако встречаются виды с  $x = 9, 10$  и 11, а также полиплоиды.

В итоге среди кариологически исследованных видов четырех разных отделов голосеменных, жизненные циклы которых характеризуются чередованием гапло-диплоидных поколений со спорической редукцией диплоидных клеток и доминированием спорофита, размах изменчивости по гаплоидному числу хромосом составил от  $x = 7$  до  $x = 14$ . Среди видов отдельных родов обнаружены полиплоиды. Виды голосеменных растений в основном гермафродиты, половое размножение которых сопровождается регулярным мейозом и сингамией.

Среди современных растений значительное место по количеству видов и распространению их на всех континентах принадлежит покрытосеменным, которые возникли в первой половине мелового периода. Около 75 млн лет назад многие современные семейства и даже некоторые ныне живущие роды этого отдела растений уже существовали (Рейвн и др., 1990б). Многие исследователи считают, что покрытосеменные возникли из примитивных кустарниковых голосеменных.

Покрытосеменные (цветковые) отнесены к отделу Anthophyta и поделены на два класса: Dicotyledones (двудольные) и Monocotyledones (однодольные). Жизненные циклы всех видов этого отдела растений характеризуются изоморфным чередованием гапло-диплоидных фаз со спорической редукцией диплоидных клеток и доминированием спорофита. Половое размножение у многих сопровождается регулярным чередованием мейоза и сингамии. Виды с хромосомным наследованием пола очень редки, в основном доминируют гермафродиты. Среди полиплоидных видов встречаются апомикты, а многие обладают вегетативным способом размножения.



К настоящему моменту хромосомные числа определены у значительного числа видов цветковых растений. Наиболее полная сводка результатов этих исследований дана в монографии «Хромосомные числа цветковых растений», в которой приведены результаты исследований 35000 видов, относящихся к 272 семействам и 4669 родам, что составляет около 15 % мировой флоры (Болховских и др., 1969), а также в ряде других работ (Авдулов, 1931; Цвелев, 1976; Tzvelev, 1989).

Среди однодольных самым крупным по количеству родов растений и по числу видов является семейство злаковые (Poaceae), а у двудольных семейство сложноцветные (Asteraceae) и крестоцветные (Brassicaceae). Анализ результатов хромосомных чисел показал, что в семействе злаковых размах изменчивости по базовому числу составил от  $x = 2$  до  $x = 13$ , при этом у большинства родов  $x = 7$  (29,5 %) и 10 (31,9 %) большинство видов являются тетра- или гексаплоидами (Щапова, 2011).

Подобным разнообразием базовых чисел хромосом ( $x$ ) характеризуются многие семейства двудольных цветковых растений, в том числе и Asteraceae и Brassicaceae (табл. 1).

На основании результатов молекулярных исследований с помощью RFLP (restriction fragment length polymorphism) проб ДНК риса у видов злаков, относящихся не только к разным родам, но и даже к разным подсемействам, были получены экспериментальные доказательства того, что эволюция гаплоидных геномов злаков является результатом неоднократной гибридизации предковых малохромосомных видов с последующими полиплоидизацией и дисплоидизацией, приводящими к уменьшению гаплоидного числа хромосом генома (Whitkus *et al.*, 1992; Moore *et al.*, 1995; Gaut, Doebley, 1997; Gomez *et al.*, 1998; Щапова, 2011).

Дисплоидия, приводящая к уменьшению базового числа хромосом гаплоидных геномов, обнаружена в семействе Brassicaceae Burnett. (Kowalski *et al.*, 1994; Lagercrantz, Lydiate, 1996; Yogeewaran *et al.*, 2005; Lysak *et al.*, 2006; Hipp, 2007; Guerra, 2008). Вначале с помощью RFLP проб ДНК в геноме *Brassica nigra* были обнаружены дубликации, локализованные на трех разных хромосомах гаплоидного набора (Lagercrantz, Lydiate, 1996). На основе этих результатов было сделано предположение, что гаплоидный геном этого вида произошел от гексаплоидного

Таблица 1

Разнообразие базового числа хромосом у разных родов трех семейств покрытосеменных растений

Базовое число хромосом	Семейство					
	Poaceae Barnh		Acteraceae Dumort		Brassicaceae Burnett	
	Количество родов	Доля родов, %	Количество родов	Доля родов, %	Количество родов	Доля родов, %
2	2	0,57	1	0,26	–	–
3	1	0,28	8	2,04	1	0,91
4	3	0,85	20	5,1	1	0,91
5	3	0,85	48	12,24	4	3,64
6	3	0,85	29	7,4	19	17,27
7	110	31,25	40	10,2	44	40
8	5	1,42	49	12,5	26	23,63
9	55	15,63	123	31,38	4	3,64
10	119	33,81	50	12,76	2	1,8
11	7	1,99	20	5,1	9	8,18
12	41	11,65	4	1,02	–	–
13	3	0,85	–	–	–	–
Итого	352	100	392	100	110	100

предка. В дальнейшем анализ генетических карт *B. nigra* ( $n = 8$ ), *B. oleracea* ( $n = 9$ ) и *B. rapa* ( $n = 10$ ), полученных с помощью RFLP-проб, показал наличие различий между кариотипами этих видов по числу перестроек хромосом. Результаты этого исследования было подтверждено происхождение их от прародителя с  $n = 6$ .

Сравнительный анализ генетических карт *Brassica oleracea* и *Arabidopsis thaliana*, полученных с помощью RFLP-проб, показал, что кариотипы этих видов, принадлежащих к разным родам одного и того же семейства растений, в процессе дивергенции подверглись интенсивному процессу структурных перестроек хромосом (Kowalski *et al.*, 1994). При наличии различий между геномами этих видов по 17 разным транслокациям и 9 инверсиям 11 консервативных районов остались подобными. Авторами сделано также заключение о том, что *A. thaliana* ( $n = 5$ ) является палеополиплоидом, и что базовое число хромосом прародителя менее пяти, а возможно, и трех или четырех.

Сравнительный анализ геномов *Arabidopsis thaliana* и *Brassica nigra* с использованием 160 фрагментов ДНК *Arabidopsis thaliana* подтвердил, что современные диплоидные виды *Brassica* произошли от гексаплоидного прародителя, и что гаплоидный геном *Arabidopsis thaliana* подобен по структуре гипотетическому гексаплоиду.

С помощью 432 EST-маркеров установлено, что геном *Arabidopsis thaliana* ( $n = 5$ ) отличается от *Arabidopsis lyrata* ( $n = 8$ ) 10 разными перестройками, и сделано заключение о том, что *A. thaliana* ( $n = 5$ ) произошел от предкового генома  $n = 8$ , а от него произошли *A. capsella* и *A. lyrata* ( $n = 8$ ) (Yogeeswaran *et al.*, 2005).

Эволюция базового числа хромосом гаплоидных геномов видов *Arabidopsis*, *Brassica* и других родственных им родов растений изучена с помощью других молекулярных методов, в результате которых подтверждено, что кариотипы *A. thaliana* ( $2n = 10$ ) и родственных ему видов с  $2n = 12$  и  $2n = 14$  произошли от предкового кариотипа с  $2n = 16$  (Lysak *et al.*, 2006). Таким образом, установлено, что дисплоидия базового числа хромосом у этих видов произошла вследствие слияния акроцентрических хромосом, перичентрических инверсий, реципрокных транслокаций и эли-

минаций микрохромосом. При этом полагают, что дивергенция видов *Brassica* и *Arabidopsis* произошла около 10 млн лет назад (Bennetzen, Freeling, 1997). Предполагают также, что разнообразие хромосомных чисел гаплоидных геномов в других семействах покрытосеменных растений является следствием дисплоидии (Hipp, 2007; Guetta, 2008).

Таким образом, голосеменные и покрытосеменные растения, характеризующиеся чередованием гапло-диплоидных фаз в жизненном цикле с доминированием спорофита и преимущественно гермафродитным определением пола, имеют малое базовое число хромосом гаплоидного генома, а многие из них являются полиплоидами.

### ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ И РАЗНООБРАЗИЕ ХРОМОСОМНЫХ ЧИСЕЛ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Первые млекопитающие появились еще в мезозое (248 млн лет назад), а в палеоцене и эоцене кайнозойской эры существовали уже виды разных семейств (Рейвн и др., 1990б). Полагают, что темпы эволюции их в разное геологическое время были неодинаковы.

Класс млекопитающих (Mammalia Linnaeus) подразделяют на 3 подкласса: 1) яйцекладущие (Prototheria Gill), 2) сумчатые (Metatheria) и 3) плацентарные (Eutheria) (Соколов, 1973). Яйцекладущие являются более ранним ответвлением от остальных видов млекопитающих (170 млн лет назад), а сумчатые дивергировали около 130 млн лет назад (De Leo *et al.*, 1999).

Млекопитающие характеризуются разнополым способом размножения с хромосомным наследованием пола, гаметической редукцией диплоидных клеток и доминированием спорофита. Гаплоидная клетка, образующаяся в результате мейоза, не претерпевает последующего митотического деления, а является единственной гаплоидной клеткой в жизненном цикле, которая превращается в гамету с последующей сингамией (Голиченков и др., 2004).

Подсчет чисел хромосом произведен у большого числа видов млекопитающих. Подробная сводка результатов этих исследований приведена в монографии «Atlas of Mammalian chromosomes» под редакцией S.J. O'Brien,

J.C. Menninger, W.G. Nash (2006). Большой вклад в исследование кариотипов млекопитающих внесен А.С. Графодатским с соавт. (Graphodatsky *et al.*, 2000a, b).

У Prototheria подсчет чисел хромосом произведен у трех видов из отряда Monotremata: двух видов *Tachyglossus aculeatus* и *Zaglossus bruijnii* из семейства ехидн (Tachyglossidae) и одного вида *Ornithorhynchus anatinus* из семейства утконосов (Ornithorhynchidae). В результате проведенных исследований установлено, что самки и самцы утконоса имеют одинаковое число хромосом  $2n = 52$ , а у ехидны  $2n = 64$  у самок и  $2n = 63$  у самцов. Цитологические исследования показали, что в эволюции кариотипов видов ехидн и утконоса имела место полиплоидия (Grutzner *et al.*, 2004; Rens *et al.*, 2004). Кариотип самца утконоса содержит 42 аутосомы + 5X + 5Y, а кариотип самца ехидны 54 аутосомы + 5X + 4Y. В мейозе утконоса формируется мультивалентное кольцо из 8–10 половых хромосом, а у ехидны – из 9. В анафазе I мейоза X-хромосомы отходят к одному полюсу, а Y-хромосомы – к противоположному.

В результате цитологических исследований установлено также, что эволюция кариотипов видов подкласса Monotremata сопровождалась не только полиплоидией, но и дисплоидией. Оказалось, что виды семейств Tachyglossidae и Ornithorhynchidae, разошедшиеся в эволюции друг от друга около 20–45 млн лет назад, различаются по числу аутосом. Гаплоидный набор аутосом у утконосов на 6 хромосом меньше, чем у ехидн. Наличие 5 пар половых хромосом у этих видов указывает на пятикратное увеличение числа хромосом у исходного прародительского вида.

Сумчатых насчитывают около 301 вида 22 семейств 7 разных отрядов (Rens *et al.*, 2003; O'Brien *et al.*, 2006). Хромосомные числа определены у 58 видов 18 семейств из 7 отрядов. Размах изменчивости по диплоидному числу хромосом составил от  $2n = 10–32$  ( $x = 5–16$ ). При этом у 25 видов из 6 разных отрядов  $2n = 14$ .

В результате проведенных исследований с использованием различных молекулярных методов были изучены кариотипы с  $2n = 14$  не только из разных семейств, но и из разных отрядов (De Leo *et al.*, 1999). На основании этих результатов было сделано предположение,

что прародительский геном сумчатых имел  $2n = 14$ . Однако в дальнейшем в результате сравнительного исследования с помощью молекулярных методов (reciprocal chromosome painting) структуры кариотипов у 7 видов из 6 семейств 3 разных отрядов с числами хромосом  $2n = 12, 14, 16, 18, 20$  и 32 была установлена локализация всех 15 консервативных блоков *Aeropyrum rufescens* на хромосомах остальных 6 видов (Rens *et al.*, 1999, 2001, 2003). При этом было обнаружено, что виды, имеющие одинаковое базовое число хромосом, существенно различаются по характеру хромосомной локализации консервативных блоков.

Результатами этих исследований был поставлен под сомнение вывод о прародительском геноме сумчатых с  $2n = 14$ , а также экспериментально доказано, что в эволюции кариотипов сумчатых имело место уменьшение базового числа хромосом гаплоидных геномов в результате структурных перестроек. У видов сумчатых обнаружено несколько различных вариантов по набору половых хромосом у особей мужского пола (XY, XY1Y2, X1X2Y). У ныне существующих видов сумчатых полиплоиды не обнаружены.

Кариотипы наибольшего числа видов изучены у плацентарных животных. Так, например, у отряда приматов (Primates) определены хромосомные числа у 77 видов 13 семейств (табл. 2). Размах изменчивости диплоидного числа

**Таблица 2**

Разнообразие базового числа хромосом у разных отрядов плацентарных млекопитающих

Наименование отрядов	Количество		Размах изменчивости чисел хромосом
	семейств	видов	
Primates	13	77	10–40
Rodentia	19	209	9–51
Carnivora	10	110	15–39
Chiroptera	13	140	7–31
Artiodactyla	10	110	3–37
Perissodactyla	3	15	22–42
Итого	68	661	3–51

хромосом у видов данного отряда составил  $2n = 20-80$  ( $x = 10-40$ ). При этом у 56 видов  $2n = 42-54$ , у 5 –  $2n = 20-38$ , а у 16 –  $2n = 58-80$ . Виды с малым диплоидным числом хромосом  $2n = 20-38$  обнаружены только в семействе Megaladapidae (лемуры), а наибольшее число хромосом обнаружено у видов семейства Cercopithecidae (мартышки)  $2n = 60-72$  и у двух видов семейства Tarsiidae (долгопяты)  $2n = 80$ ; у гориллы и шимпанзе  $2n = 48$ , а у человека  $2n = 46$ .

Наибольший размах изменчивости обнаружен у отряда грызунов (Rodentia). Среди 209 изученных видов 19 разных семейств имеют  $2n = 18-102$  ( $x = 9-51$ ). Значительное разнообразие хромосомных чисел обнаружено и среди видов Carnivora ( $2n = 30-78$ ), Chiroptera ( $2n = 14-62$ ), Artiodactyla ( $2n = 6-74$ ) и Perisodactyla ( $2n = 44-84$ ). Среди 661 вида из 68 разных семейств 6 отрядов плацентарных млекопитающих разнообразие по числу хромосом составило  $2n = 6-102$  ( $x = 3-51$ ). Полиплоидных видов не обнаружено, наибольшее число видов имеют  $2n = 36-54$  ( $x = 18-27$ ).

В результате использования методов Zoo-FISH (fluorescence *in situ* hybridization), FACS (fluorescence activated cell sorting) и ДНК проб от индивидуальных хромосом установлено, что обнаруженное разнообразие кариотипов у видов отряда приматов по диплоидному числу хромосом является следствием различных структурных перестроек хромосом (O'Brien *et al.*, 2006).

Разнообразие хромосомных чисел ( $2n = 42, 44, 50, 52$ ) у видов семейства Hylobatidae оказалось следствием около 33 различных транслокаций. Кариотип *Hylobates syndactylus* ( $2n = 50$ ) содержит 16 независимых транслокаций, а *Hylobates lar* ( $2n = 44$ ) 14 транслокаций.

Большое разнообразие структурных перестроек хромосом обнаружено и у видов остальных семейств. Различные транслокации хромосом, приводящие к изменению числа хромосом, обнаружены и у видов семейства Lemuridae ( $2n = 44, 60$ ), Megaladapidae ( $2n = 20, 26, 34$ ) и Cebidae ( $2n = 16-62$ ). В результате проведенных исследований установлено, что разнообразие хромосомных чисел у отряда Primates  $2n = 20-80$  есть следствие реципрокных транслокаций и Робертсоновских слияний между негомологичными хромосомами.

Сравнительное исследование кариотипов с использованием различных методов флюоресцентной *in situ* гибридизации и G-banded дифференциального окрашивания хромосом проведено у трех видов семейства Canidae и одного вида семейства Mustelidae отряда Carnivora (Graphodatsky *et al.*, 2000a, b). Среди этих видов самое большое число хромосом у *Canis familiaris*  $2n = 78$ , а самое малое у *Vulpes vulpes*  $2n = 34$  и *Alopex lagopus*  $2n = 50$ . *Mustela vison* из семейства Mustelidae также содержит малое диплоидное число хромосом  $2n = 30$ .

Для определения степени гомологии геномов этих видов были взяты 42 консервативные пробы от индивидуальных хромосом собаки *Canis familiaris*. В результате гибридизации этих проб на дифференциально окрашенные метафазные хромосомы остальных трех видов была установлена гомология их геномов, указывающая на единое происхождение этих видов, которые дивергировали от общего предка около 10 млн лет назад. При этом было обнаружено, что все 42 консервативных блока от *Canis familiaris* локализируются на хромосомах *Vulpes vulpes*, *Alopex lagopus* и *Mustela vison*, которые в отличие от собаки имеют двуплечие хромосомы и значительно меньшее их число. Однако по характеру локализации этих блоков они существенно различаются. На основании полученных результатов авторами сделано предположение, что уменьшение гаплоидного числа хромосом у данных видов могло быть следствием слияний негомологичных хромосом в различных комбинациях и что слияние хромосом является основным механизмом в эволюции кариотипов у Canids, приводящим к уменьшению числа хромосом (Graphodatsky *et al.*, 2000b).

С помощью флюоресцентной гибридизации хромосомоспецифичных проб видов *Tamias sibiricus*, *Castor fiber* и человека изучена гомология геномов 8 видов отряда Rodentia и 6 видов отряда Lagomorpha (Beklemisheva *et al.*, 2011). Рядом других исследователей также сделан вывод о том, что тандемные слияния и реципрокные транслокации являются основными преобразованиями хромосом в эволюции кариотипов Rodentia, приводящими не только к структурным преобразованиям отдельных хромосом, но и к изменению их базового числа (Matsubara *et al.*, 2003; Rambau, Robinson, 2003).

Подобные результаты получены при исследованиях степени гомологии геномов с помощью флюоресцентной *in situ* гибридизации хромосомо-специфичных проб и дифференциального окрашивания хромосом у видов Chiroptera (Volleth *et al.*, 2001, 2002; Kulemzina *et al.*, 2011a), Perissodactyla (Trifonov *et al.*, 2003), Cetartiodactyla (Kulemzina *et al.*, 2011b).

В результате проведенных исследований установлено, что у плацентарных млекопитающих с гаметической мейотической редукцией и хромосомным наследованием пола размах изменчивости по базовому числу хромосом составил  $x = 3-51$ , а у большинства видов  $x = 16-30$ . Виды с полиплоидным числом хромосом не обнаружены. Сравнительные исследования кариотипов различных отрядов плацентарных млекопитающих с использованием флюоресцентной гибридизации хромосомоспецифичных проб показали наличие гомологии их геномов, а имеющиеся разнообразие их базовых чисел хромосом гаплоидных геномов является в основном следствием слияний и реципрокных транслокаций.

Размах изменчивости по базовому числу хромосом у сумчатых видов, отделившихся от общего древа млекопитающих около 130 млн лет назад, составил  $x = 5-16$ . При этом среди 58 цитологически изученных видов у 25 из них  $x = 7$ . Сумчатые, как и плацентарные, характеризуются хромосомным определением пола и гаметофитной мейотической редукцией. Полиплоиды у видов этого подкласса не обнаружены.

С помощью молекулярных методов установлено, что уменьшение гаплоидного числа хромосом у видов данного подкласса млекопитающих является следствием слияний негомологичных хромосом и реципрокных транслокаций. Результаты проведенных исследований указывают также на то, что базовое число хромосом у прародителя сумчатых было значительно меньшим, чем у плацентарных млекопитающих, отошедших от общего древа около 130 млн лет назад.

В результате проведенных исследований установлено также, что эволюция кариотипов видов яйцекладущих млекопитающих с хромосомным определением пола и гаметической мейотической редукцией, отошедших от общего

древа млекопитающих около 170 млн лет назад, сопровождалась неоднократной полиплоидизацией и дисплоидизацией малохромосомных прародительских видов с  $x = 5-6$ . Наличие 5 пар половых хромосом поддерживается у них на протяжении длительного периода эволюции благодаря наличию реципрокных транслокаций между половыми хромосомами, обуславливающих образование в мейозе кольца из 9–10 половых хромосом и регулярное расхождение их в МI мейоза.

## ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнительном анализе кариотипов разных видов живых организмов установлена определенная взаимосвязь между типом их жизненного цикла и базовым числом хромосом гаплоидного генома.

Оказалось, что виды голосеменных и покрытосеменных растений с чередованием гаплодиплоидных поколений в их жизненном цикле со спорической мейотической редукцией имеют малые базовые числа хромосом гаплоидных геномов ( $x = 2-14$ ). Размах изменчивости базовых чисел хромосом среди проанализированных видов млекопитающих с доминированием спорифита в их жизненном цикле и гаметической редукцией хромосом клеточного ядра оказался значительно большим ( $x = 3-51$ ). При этом среди проанализированных видов трех разных подклассов млекопитающих обнаружены существенные различия по базовому числу хромосом. Виды подкласса Monotremata (яйцекладущие) имеют малое базовое число хромосом ( $x = 5-6$ ). Среди видов подкласса Marsupialia (сумчатые) размах изменчивости по базовому числу хромосом составил  $x = 5-16$ , а разнообразие базовых чисел хромосом у видов 6 различных отрядов подкласса Euarchontoglires (плацентарные)  $x = 3-51$ , у большинства из них  $x = 16-30$ .

С помощью дифференциального окрашивания хромосом и различных методов флюоресцентной гибридизации хромосомоспецифичных проб установлено, что эволюция базового числа хромосом у покрытосеменных растений сопровождалась неоднократной гибридизацией и полиплоидизацией малохромосомных видов с последующей дисплоидизацией посредством слияний негомологичных хромосом и реци-

прокных транслокаций. Полагают, что базовое число прародителя покрытосеменных видов не превышало 3–5 хромосом.

В результате различных методов дифференциального окрашивания хромосом и флюоресцентной *in situ* гибридизации хромосомспецифичных проб установлено также, что у плацентарных и сумчатых видов млекопитающих изменения базовых чисел хромосом в сторону их уменьшения происходило также посредством слияний негомологичных хромосом и реципрокных транслокаций. Полагают, что базовое число хромосом прародителя плацентарных видов было в пределах 40–50, а у сумчатых 16–20.

Цитологические исследования показали также, что эволюция кариотипов видов яйцекладущих, отошедших от общего древа млекопитающих около 170 млн лет назад, сопровождалась не только полиплоидией, но и дисплоидией. Увеличение базового числа хромосом у прародителей сумчатых и плацентарных по сравнению с яйцекладущими, возможно, является также результатом полиплоидии.

Жизненные циклы семенных видов растений и млекопитающих различаются не только по продолжительности гапло-диплоидных фаз, но и по генетическому контролю пола.

Виды голосеменных и покрытосеменных растений в основном гермафродиты (Львова, 1963). Раздельнополюе с хромосомным определением пола среди видов растений крайне редки, а многие растения, относящиеся к категории двудомных, являются на самом деле мутантными формами гермафродитов. Среди млекопитающих преобладают раздельнополюе с хромосомным определением пола (O'Brien *et al.*, 2006).

Результаты сравнительного анализа жизненных циклов и разнообразия хромосомных чисел у разных типов живых организмов показали наличие взаимосвязи между ними. Семенные растения со спорической мейотической редукцией, чередованием гапло-диплоидных фаз жизненного цикла и гермафродитным определением пола имеют малые базовые числа хромосом гаплоидных геномов и большое число полиплоидных видов. Плацентарные и сумчатые млекопитающие с гаметической мейотической редукцией, раздельнополюе с хромосомным

определением пола имеют значительно большее разнообразие базовых чисел хромосом, чем у высших растений, при отсутствии среди них полиплоидов.

На основании имеющихся данных сделано заключение о том, что обнаруженные различия по размаху изменчивости базовых чисел хромосом у семенных растений и млекопитающих в основном обусловлены генетическими различиями в определении пола: раздельнополюе с хромосомным его определением у млекопитающих и обополюе с гермафродитным типом у семенных растений. И значительно меньшее влияние на этот процесс оказывает продолжительность гапло-диплоидных фаз.

## ЛИТЕРАТУРА

- Авдулов Н.П. Кариосистематическое исследование семейства злаков // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. Приложение 44 Л.: ВАСХНИЛ. Ин-т растениеводства, 1931. 428 с.
- Богданов Ю.Ф. Изменчивость и эволюция мейоза // Генетика. 2003. Т. 39. № 4. С. 453–473.
- Болховских З.В., Гриф В.Г., Захарьева О.И., Матвеева Т.С. Хромосомные числа цветковых растений / Под ред. А.Н. Федорова. Л.: Наука, 1969. 920 с.
- Голиченков В.А., Иванов Е.А., Никерясова Е.Н. Эмбриология. М.: Издат. центр «Академия», 2004. 224 с.
- Курсанов Л.И., Комарницкий Н.А., Раздорский В.Ф., Уранов А.А. Анатомия и морфология растений. Т. 1. М.: Просвещение, 1966. 423 с.
- Львова И.Н. Пол у растений. М.: Изд-во МГУ, 1963. 56 с.
- Муратова Е.Н., Круклис М.В. Хромосомные числа голосеменных растений. Новосибирск: Наука, 1988. 120 с.
- Поддубная-Арнольди В.А. Общая эмбриология покрытосеменных растений. М.: Наука, 1964. 482 с.
- Райков И.Б. Ядро простейших. Морфология и эволюция. Л.: Наука, 1978. 327 с.
- Райков И.Б. Новые данные о мейозе у простейших // Генетика, биохимия и цитология мейоза. М.: Наука, 1982. С. 75–80.
- Рейвн П., Эверт Р., Айкхорн С. Современная ботаника. Т. 1. М.: Мир, 1990а. 347 с.
- Рейвн П., Эверт Р., Айкхорн С. Современная ботаника. Т. 2. М.: Мир, 1990б. 344 с.
- Соколов В.Е. Систематика млекопитающих. М.: Высш. шк., 1973. 432 с.
- Цвелев Н.Н. Злаки СССР. Л.: Наука. Ленингр. отд-ние, 1976. 788 с.
- Шапова А.И. Эволюция базового числа хромосом в семействе злаковых (Poaceae Barnh) // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2011. Т. 15. № 4. С. 769–780.
- Atlas of Mammalian Chromosomes/Eds. S.J. O'Brien, J.C. Menninger, W.G. Nash. Willey and Sons, 2006. 714 p.
- Beklemisheva V.R., Romanenko S.A., Biltueva L.S. *et al.* Reconstruction of karyotype evolution in core Glires. I. The

- genome homology revealed by comparative chromosome painting // *Chromosome Res.* 2011. V. 19. P. 549–565.
- Bennetzen J.L., Freeling M. The unified glass genome: synergy in synteny // *Genome Res.* 1997. V. 7. P. 301–306.
- De Leo A.A., Guedelha N., Toder R. *et al.* Comparative chromosome painting between marsupial order: relationships with a  $2n = 14$  ancestral marsupial karyotype // *Chromosome Res.* 1999. V. 7. P. 509–517.
- Gaut B.S., Doebley J.F. DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 6808–6814.
- Gomez M.I., Islam-Faridi M.N., Zwick M.S. *et al.* Tetraploid nature of *Sorghum bicolor* (L.) Moench // *J. Hered.* 1998. V. 89. P. 188–190.
- Graphodatsky A.S., Yang F., O'Brien P.C.M. *et al.* A comparative chromosome map of the Arctic fox, red fox and dog defined by chromosome painting and high resolution G-banding // *Chromosome Res.* 2000a. V. 8. P. 253–263.
- Graphodatsky A.S., Yang F., Serdukova N. *et al.* Dog chromosome-specific paints reveal evolutionary inter- and intrachromosomal rearrangements in the American mink and human // *Cytogenet. Cell Genet.* 2000b. V. 90. P. 275–278.
- Grutzner F., Rens W., Tsend-Ayush F. *et al.* In the platypus a meiotic chain of ten chromosomes shares genes with the bird Z and mammal X chromosomes // *Nature.* 2004. V. 432. P. 913–917.
- Guerra M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implication // *Cytogenet. Genome Res.* 2008. V. 120. P. 339–350.
- Hipp A.I. Non uniform processes of chromosome evolution in sedges (Carex: Cyperaceae) // *Evolution Int. J. Org. Evol.* 2007. V. 61. P. 2175–2199.
- Kowalski S.P., Lan Tien-Hung, Feldmann K.A., Paterson A.H. Comparative mapping of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea* chromosomes reveals islands of conserved organization // *Genetics.* 1994. V. 138. P. 499–510.
- Kulemzina A.I., Nie W., Trifonov V.A. *et al.* Comparative chromosome painting of four Siberian Vespertilionidae species with *Aselliscus stoliczkanus* and Human probes // *Cytogenet. Genome Res.* 2011a. V. 134. P. 200–205.
- Kulemzina A.I., Yang F., Trifonov V.A. *et al.* Chromosome painting in Tragulidae facilitates the reconstruction of Ruminantia ancestral karyotype // *Chromosome Res.* 2011b. V. 19. P. 531–539.
- Lagercrantz U., Lydiate D.J. Comparative genome mapping in Brassica // *Genetics.* 1996. V. 144. P. 1903–1910.
- Lysak M.A., Berr A., Pecinka A. *et al.* Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 5224–5229.
- Maguire M.P. Evolution of meiosis // *J. Theor. Biol.* 1992. V. 154. P. 43–55.
- Matsubara K., Nishida-Umehara C., Kuroiwa A. *et al.* Identification of chromosome rearrangements between the laboratory mouse (*Mus musculus*) and the Indian spiny mouse (*Mus platythrix*) by comparative FISH analysis // *Chromosome Res.* 2003. V. 11. P. 57–64.
- Moore G., Devos K.M., Wang Z., Gale M.D. Grasses, line up and form a circle // *Curr. Biol.* 1995. V. 5. P. 737–739.
- O'Brien S.J., Menninger J.C., Nash W.G. Atlas of Mammalian Chromosomes // Canada: WILEY-LISS. 2006. P. 714.
- Rambau R.V., Robinson T.J. Chromosome painting in the African four-striped mouse *Rhabdomys pumili*: Detection of possible murid specific contiguous segment combination // *Chromosome Res.* 2003. V. 11. P. 91–98.
- Rens W., O'Brien P.C.M., Yang F. *et al.* Karyotype relationships between four distantly related marsupials revealed by reciprocal chromosome painting // *Chromosome Res.* 1999. V. 7. P. 461–474.
- Rens W., O'Brien P.C.M., Yang F. *et al.* Karyotype relationships between distantly related marsupials from South America and Australia // *Chromosoma.* 2001. V. 9. P. 301–308.
- Rens W., O'Brien P.C.M., Graves J.A.M., Ferguson-Smith M.A. Localization of chromosome regions in potoroo nuclei (Potorous tridactylus Marsupialia: Potoroinae) // *Chromosoma.* 2003. V. 112. P. 66–76.
- Rens W., Grutzner R., O'Brien P.C.M. *et al.* Resolution and evolution of the duck-billed platypus karyotype with an X1Y1X2Y2X3Y3X4Y4X5Y5 male sex chromosome constitution // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 16257–16261.
- Trifonov V., Yang F., Ferguson-Smith M.A., Robinson T.J. Cross-species chromosome painting in the Perissodactyla: Delimitation of homologous regions in Burchells zebra (*Equus burchelli*) and the white (*Ceratotherium simum*) and black rhinoceros (*Diceros bicornis*) // *Cytogenet. Genome Res.* 2003. V. 1003. P. 104–110.
- Tzvelev N.N. The system of grasses (Poaceae) and their evolution // *Bot. Rev.* 1989. V. 55. P. 141–204.
- Volleth M., Bronner G., Go'pfer M.C. *et al.* Karyotype comparison and phylogenetic relationships of Pipistrellus-like bats (Vespertilionidae; Chiroptera; Mammalia) // *Chromosome Res.* 2001. V. 9. P. 25–46.
- Volleth M., Heller K.-G., Pfeiffer R.A., Hameister H. A comparative ZOO-FISH analysis in bats elucidates the phylogenetic relationships between Megachiroptera and five Microchiropteran families // *Chromosome Res.* 2002. V. 10. P. 477–497.
- Whitkus R., Doebley J., Lee M. Comparative genome mapping of sorghum and maize // *Genetics.* 1992. V. 132. P. 1119–1130.
- Wilkins A.S., Holliday R. The evolution of meiosis from mitosis // *Genetics.* 2009. V. 181. P. 3–12.
- Yogeewaran K., Frary A., York T.L. *et al.* Comparative genome analyses of *Arabidopsis* ssp.: Inferring chromosomal rearrangement events in the evolutionary history of *A. thaliana* // *Genome Res.* 2005. V. 15. P. 505–515.

---

**THE DIVERSITY OF LIFE CYCLES AND THEIR ROLE  
IN THE EVOLUTION OF BASIC CHROMOSOME NUMBERS  
IN VARIOUS ORGANISMS**

**A.I. Shchapova**

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

**Summary**

Basic chromosome numbers are compared among species of four gymnosperm divisions, three Anthophyta families, and three Mammalia subclasses, with different life cycle types. Gymnosperm and angiosperm species characterized by alternation of haploid and diploid phases, sporic meiotic reduction, hermaphroditism, and sporophyte predominance have small basic chromosome numbers (BCNs):  $x = 7$  to 14, and most of their species are polyploids. Species of various mammal subclasses, with sporophyte predominance gametic meiotic reduction, dioecious, and characterized by a chromosomal sex-determination system broadly vary in BCN. Monotremata species (oviparous) have small BCNs and ploidy levels  $10x$ . The BCN variability among marsupials is  $x = 5$  to 16, and in Euarchontoglires (placentals)  $x = 3$  to 51. No polyploids have been found among marsupials or placentals.

Data on chromosome banding and various kinds of fluorescence hybridization of chromosome-specific probes indicate that the BCN evolution in angiosperms was accompanied by repeated crosses and polyploidization of species with few chromosomes followed by dysploidization by means of conjugation of nonhomologous chromosomes and reciprocal translocations. It is believed that the BCN of the placental ancestor was  $x = 40-50$ ; of the marsupial ancestor, 16–20; and of oviparous mammals, 5–6. The significant difference among BCNs of the ancestors of the three mammal subclasses, which diverged tens of millions of years ago, suggests that the evolution of BCNS in the ancestors of marsupials and placentals involved polyploidy followed by dysploidy.

The species analyzed demonstrate a correlation between life cycle type and BCN.

The results indicate that the genetic difference in sex determination systems were the main cause of BCN variation in the species analyzed, differing in life cycle type. The lengths of the haploid and diploid phases are of minor significance.

**Key words:** basic chromosome number, haploid genome, species evolution, life cycles, types of meiotic chromosome reduction.



УДК 575.116.12:576.3:576.316:576.354.4

## МЕЙОЗ: ЧТО НУЖНО ПЕРЕЖИТЬ РАДИ УМЕНЬШЕНИЯ ЧИСЛА ХРОМОСОМ ВДВОЕ\*

© 2013 г. А.А. Торгашева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,  
e-mail: [torgasheva@bionet.nsc.ru](mailto:torgasheva@bionet.nsc.ru)

Поступила в редакцию 7 мая 2012 г. Принята для публикации 28 мая 2012 г.

В течение более ста лет со времени открытия мейоза представления об этом сложном способе деления клеток постоянно изменяются и уточняются. Для его успешного протекания множество процессов, таких, как репликация хромосом, упаковка хроматина, обмен гомологичными участками, выстраивание бивалентов в плоскости деления, расхождение, должно быть точно скоординировано во времени и пространстве. Развитие молекулярно-генетических и иммуноцитохимических методов в последние десятилетия позволило выяснить детали этих процессов и приблизиться к пониманию механизмов их регуляции. В данном обзоре приведены современные представления об основных событиях, происходящих в мейозе, на примерах дрожжей и млекопитающих. Особое внимание уделено процессам синапсиса и рекомбинации хромосом, а также моноориентации кинетохоров сестринских хроматид в первом делении – ключевым особенностям, отличающим мейоз от митоза и обеспечивающим редукцию числа хромосом.

**Ключевые слова:** мейоз, рекомбинация, синаптонемный комплекс, инактивация половых хромосом, моноориентация кинетохоров, когезия.

### МЕЙОЗ – МОДИФИЦИРОВАННАЯ ВЕРСИЯ МИТОЗА. ОСНОВНЫЕ ОТЛИЧИЯ МЕЙОЗА ОТ МИТОЗА

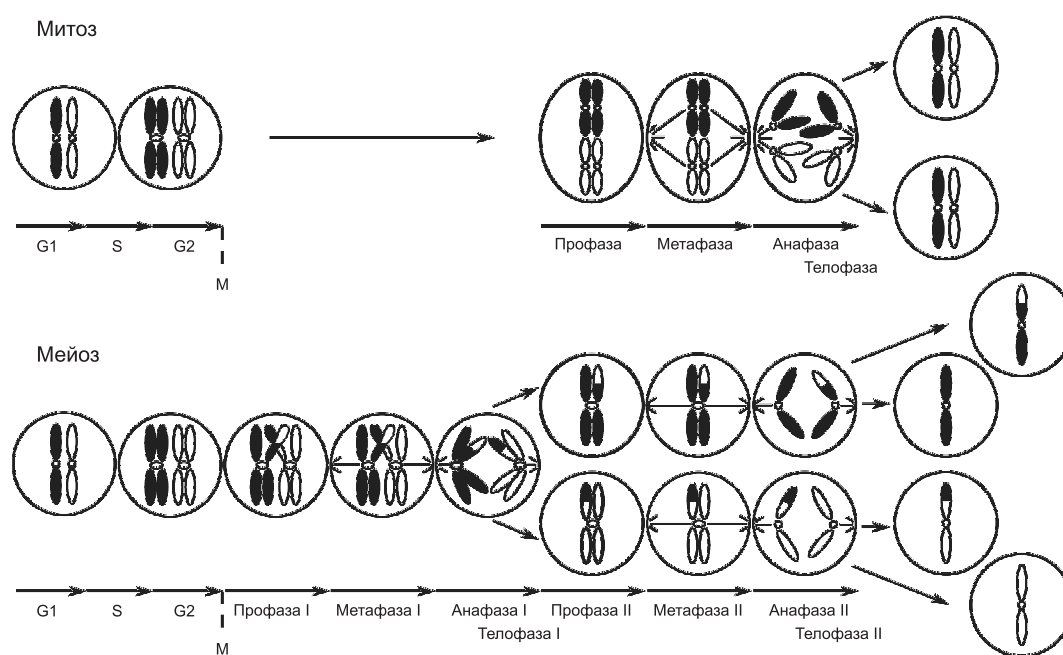
Мейоз – это особый тип клеточного деления, в результате которого образуются клетки, содержащие гаплоидный набор хромосом. Для получения таких клеток необходимо точно и правильно разделить хромосомный набор на две части. Именно это является основной сложностью, с которой связаны отличия мейоза от митотического деления.

Мейоз возник на основе существующего митотического аппарата деления клетки и рекомбинации, которая в том или ином виде существовала, вероятно, со времени появления двуспиральной молекулы ДНК (Богданов, 2008а). Как перед митозом, так и перед мейозом в S-фазе происходит репликация хромосом,

образуются сестринские хроматиды, которые связываются между собой белками-когезинами. В митозе хромосомы выстраиваются в экваториальной плоскости веретена и происходит единственное деление, в результате которого сестринские хроматиды каждой из хромосом расходятся к разным полюсам, при этом гомологичные хромосомы расходятся независимо. В мейозе гомологичные хромосомы (каждая состоит из двух хроматид) объединяются попарно, образуя биваленты, после чего следует два деления. Первое – редукционное, в нем расходятся гомологи. Второе деление – эквационное – подобно митотическому, в нем расходятся сестринские хроматиды (рис. 1).

Основные события, отличающие мейоз от митоза, касаются первого деления, а точнее его самой продолжительной фазы – профазы I. В профазе I выделяют пять последовательных

\* Статья написана по материалам публичной лекции, прочитанной в Институте цитологии и генетики СО РАН. Презентация и видеозапись лекции: [http://www.bionet.nsc.ru/asp/?paige\\_id=86](http://www.bionet.nsc.ru/asp/?paige_id=86).



**Рис. 1.** Последовательность событий в митозе и мейозе (на примере одной пары гомологичных хромосом).

стадий: лептотена, зиготена, пахитена, диплотена и диакинез (рис. 2).

Последующие этапы занимают не более 10 % всего времени мейоза. В оставшейся части первого деления различают метафазу I, анафазу I и телофазу I. В метафазе I биваленты выстраиваются в экваториальной плоскости веретена. В анафазе I расходятся гомологичные хромосомы, состоящие из двух хроматид (редукционное деление). Вслед за телофазой I следует короткая интерфаза II (без удвоения хромосом), и клетки приступают ко второму (эквационному) делению: профаза II, метафаза II, анафаза II и телофаза II. Результатом мейоза является образование из каждой диплоидной клетки четырех гаплоидных (рис. 1).

### СИНАПТОНЕМНЫЙ КОМПЛЕКС. ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМАТИНА В ПРОФАЗЕ I МЕЙОЗА

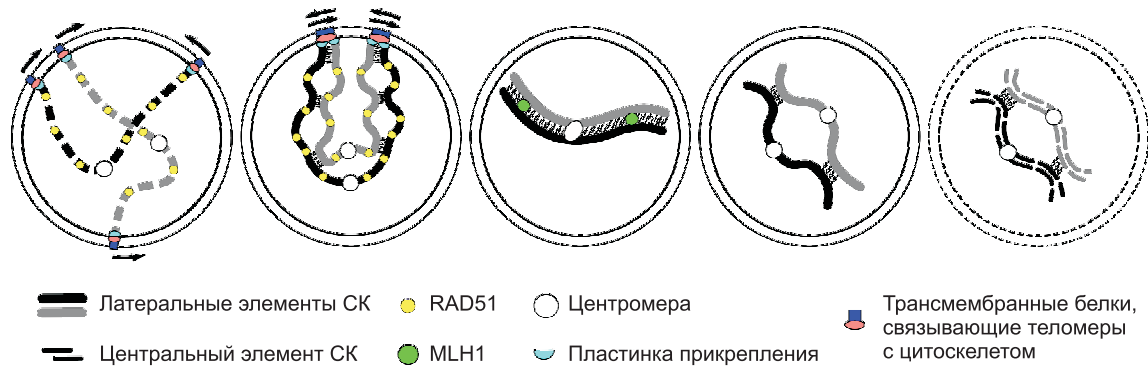
Гомологичные хромосомы, каждая из которых состоит из пары сестринских хроматид, объединяются и удерживаются вместе с помощью специфической для мейоза структуры – синаптонемного комплекса (СК) (Богданов, Коломиец, 2007). Вместе с тем СК не только соединяет, но и удерживает гомологичные

хромосомы на расстоянии, необходимом для нормального прохождения рекомбинационных процессов.

Синаптонемный комплекс представляет собой полимерную белковую структуру. Полностью сформированный СК на стадии пахитены состоит из трех частей: двух латеральных (боковых) элементов, образующихся вдоль гомологичных хромосом на стадии лептотены, и соединяющего их центрального элемента (рис. 3).

Хроматин в профазе I мейоза организован в виде петель, основания которых скреплены белками латеральных элементов. Основой для их формирования являются оси хромосом, которые соединяют друг с другом сестринские хроматиды с помощью комплексов белков-когезинов. В состав когезиновых комплексов входят 4 белковые субъединицы, которые, предположительно, образуют кольцо, «обнимающее» (embracing) сестринские хроматиды. По составу мейотические комплексы отличаются от митотических: специфическим для мейоза является когезин REC8, обнаруженный у всех изученных организмов (Revenkova, Jessberger, 2006).

В зиготене латеральные элементы объединяются между собой с помощью поперечных



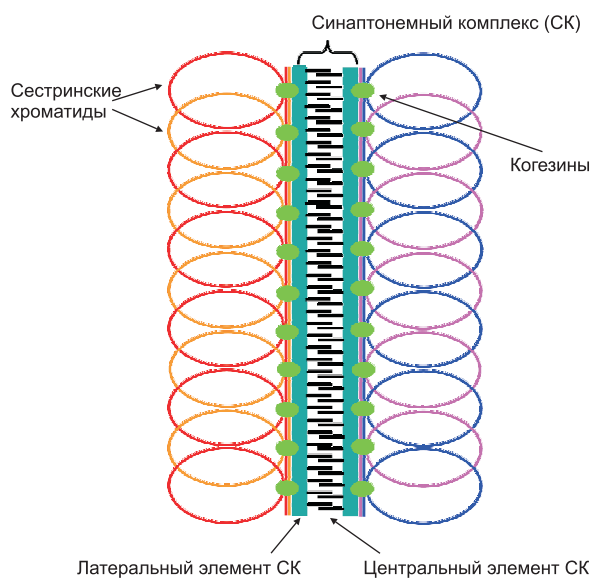
**Рис. 2.** Стадии профазы I мейоза (на примере одной пары гомологичных хромосом).

На стадии **лептотены** начинают формироваться оси хромосом – будущие латеральные элементы синаптонемного комплекса (СК), в хромосому вносятся множество двуниевых разрывов. В местах разрывов образуются одноцепочечные концы ДНК, с ними связываются белки RAD51, способствующие внедрению этих концов в гомологичные участки несестринской хроматиды. При этом происходит активное движение хромосом, прикрепленных теломерными концами к ядерной мембране. С помощью пластинки прикрепления и трансмембранных белков теломеры связаны с компонентами цитоскелета, направляющими это движение. К концу лептотены – началу зиготены теломерные концы хромосом собираются вместе, формируя структуру «букета». В **зиготене** образуется центральный элемент СК и начинается репарация двуниевых разрывов по кроссоверному или некроссоверному пути с участием комплекса белков мисматч репарации. В образовании кроссоверных продуктов принимает участие белок MLH1. Репарация и формирование СК завершаются в **пахитене**. В **диплотене** и **диакинезе** постепенно разрушаются центральный и латеральные элементы СК, гомологичные хромосомы остаются связанными только в местах рекомбинационного обмена. Начинается подготовка к делению.

филаментов – белков центрального элемента СК, которые полимеризуются вдоль бивалента подобно застежке-молнии (рис. 3). У млекопитающих каждый поперечный филамент состоит из двух белков SCP1. С-концами они прикреплены к белкам латерального элемента, а N-концами связаны между собой. Размер этих

филаментов определяет расстояние между латеральными элементами, которое варьирует от 70 нм у дрожжей и нематод до 150 нм у птиц (Богданов, 2008а).

Синаптонемный комплекс обнаружен в профазе I мейоза у многих сотен видов из всех царств эукариот. Его морфология и функции универсальны для большинства организмов. Удивительно то, что при этом у разных групп эукариот в эволюционно далеких таксонах используются совершенно разные, негомологичные белки. Например, у млекопитающих основными составляющими латеральных элементов являются белки SCP2 и SCP3, негомологичные белкам Hop1 и Red1 дрожжей. Белок центрального элемента млекопитающих SCP1 не гомологичен белку дрожжей Zip1, имеющему сходное строение. Замечательную аналогию приводит Ю.Ф. Богданов. Он сравнивает строение СК в разных таксонах с постройкой домов по единому плану, но из разных материалов. Материал не важен – «важно, чтобы СК выровнял параллельно лежащие гомологичные хромосомы, сохранял между ними пространство, в котором происходит рекомбинация ДНК» (Богданов, 2008б).



**Рис. 3.** Схема строения синаптонемного комплекса.

## ЭТАПЫ СБОРКИ СИНАПТОНОМНОГО КОМПЛЕКСА. БУКЕТ ХРОМОСОМ

Описанная схема строения характерна для синаптонемного комплекса в пахитене. Сборка же СК осуществляется на стадии лептотены-зиготены параллельно рекомбинационным процессам.

В лептотене начинаются поиск и выравнивание гомологичных участков хромосом. Ранее считалось, что синапсис предшествует рекомбинации. В настоящее время становится ясным, что эти два процесса тесно связаны между собой, по крайней мере для почкующихся дрожжей, млекопитающих и растений. У этих объектов необходимыми условиями синапсиса хромосом являются образование предшественников рекомбинации – двунитевых разрывов ДНК, возникновение и репарация промежуточных рекомбинационных соединений.

Двунитевые разрывы вносятся в ДНК с помощью белка SPO11 (Santucci-Darmanin, Baudat, 2010). У мыши их количество достигает 200–400 на клетку. Эти разрывы образуются не в случайных местах, а там, где происходит активация хроматина и открывается доступ к ДНК. В свою очередь, образование двунитевых разрывов индуцирует глобальное фосфорилирование гистона H2A.X с помощью ATM/ATR-киназ, что приводит к подавлению транскрипции.

В местах разрывов образуются одноцепочечные 3'-концы, которые с помощью RecA-подобных белков (у эукариот это RAD51 и DMC1) внедряются в неповрежденный гомологичный участок одной из двух **несестринских** хроматид. Именно этот контакт запускает сборку белков центрального элемента СК, они начинают аккумулироваться в местах первичного контакта гомологичных хромосом.

Каким образом гомологичным участкам удастся найти друг друга, остается не до конца понятным. По-видимому, основным механизмом, который способствует поиску, увеличивая вероятность взаимодействий гомологичных участков, является активное движение хромосом, прикрепленных теломерами к ядерной мембране, с последующим формированием структуры «букета» (рис. 2) (Scherthan, 2007).

Активное движение характерно для хромосом в ранней профазе I и широко распро-

странено у эукариотических организмов. Хотя специфические механизмы этого процесса у разных организмов различны, во всех случаях происходят энергичные возвратно-поступательные движения (со скоростью до 1 мкм/с для почкующихся дрожжей). Они управляются компонентами цитоскелета, которые связаны с теломерными концами хромосом с помощью белков, пронизывающих ядерную оболочку. Присоединение СК к мембране происходит с помощью пластинки прикрепления, состоящей из теломерных повторов, теломерных белков, субъединиц когезина и белков латеральных элементов. Теломеры двигаются по мембране и к началу зиготены временно собираются на центросомном полюсе ядра, формируя структуру «букета» (рис. 2). Эта эволюционно консервативная структура была впервые обнаружена в начале XX в. и с тех пор описана для множества известных организмов.

Формирование структуры букета играет важную роль в опознавании и выравнивании гомологов, способствуя инициации синапсиса и рекомбинации хромосом. Это происходит за счет ограничения пространства для поиска и увеличения вероятности первичной ассоциации гомологов в околотеломерных участках. Поэтому и формирование СК начинается, как правило, на периферии ядра.

Начало сборки центрального элемента СК определяет начало стадии зиготены. Сначала белки центрального элемента аккумулируются в местах, где найдена гомология на уровне последовательности. Дальнейшая полимеризация может идти уже автоматически, без сверки гомологии. Она заканчивается к началу пахитены, когда четыре хроматиды двух гомологов оказываются тесно связанными между собой (рис. 2).

В пахитене завершаются и рекомбинационные процессы. Рассмотрим, каким образом одновременно с формированием СК гомологичным хромосомам удастся обменяться участками ДНК.

## РЕКОМБИНАЦИЯ. ОБМЕН ГОМОЛОГИЧНЫМИ УЧАСТКАМИ

Ключевыми событиями, инициирующими рекомбинацию, являются образование дву-

нитевых разрывов в лептотене и внедрение одноцепочечных 3'-концов в гомологичный участок несестринской хроматиды с помощью RecA-подобных белков. В зиготене и пахитене происходит репарация этих разрывов, в результате которой образуются два типа продуктов: кроссоверные (CO) и некроссоверные (NCO) (Baudat, de Massy, 2007) (рис. 4).

После внедрения в гомологичный участок одноцепочечный конец активной цепи начинает достраиваться (удлиняться) ДНК-полимеразой, использующей в качестве матрицы интактную цепь ДНК несестринской хроматиды. Образующееся при этом промежуточное соединение – D-петля – нестабильно. После достраивания небольшого участка ДНК активная цепь может

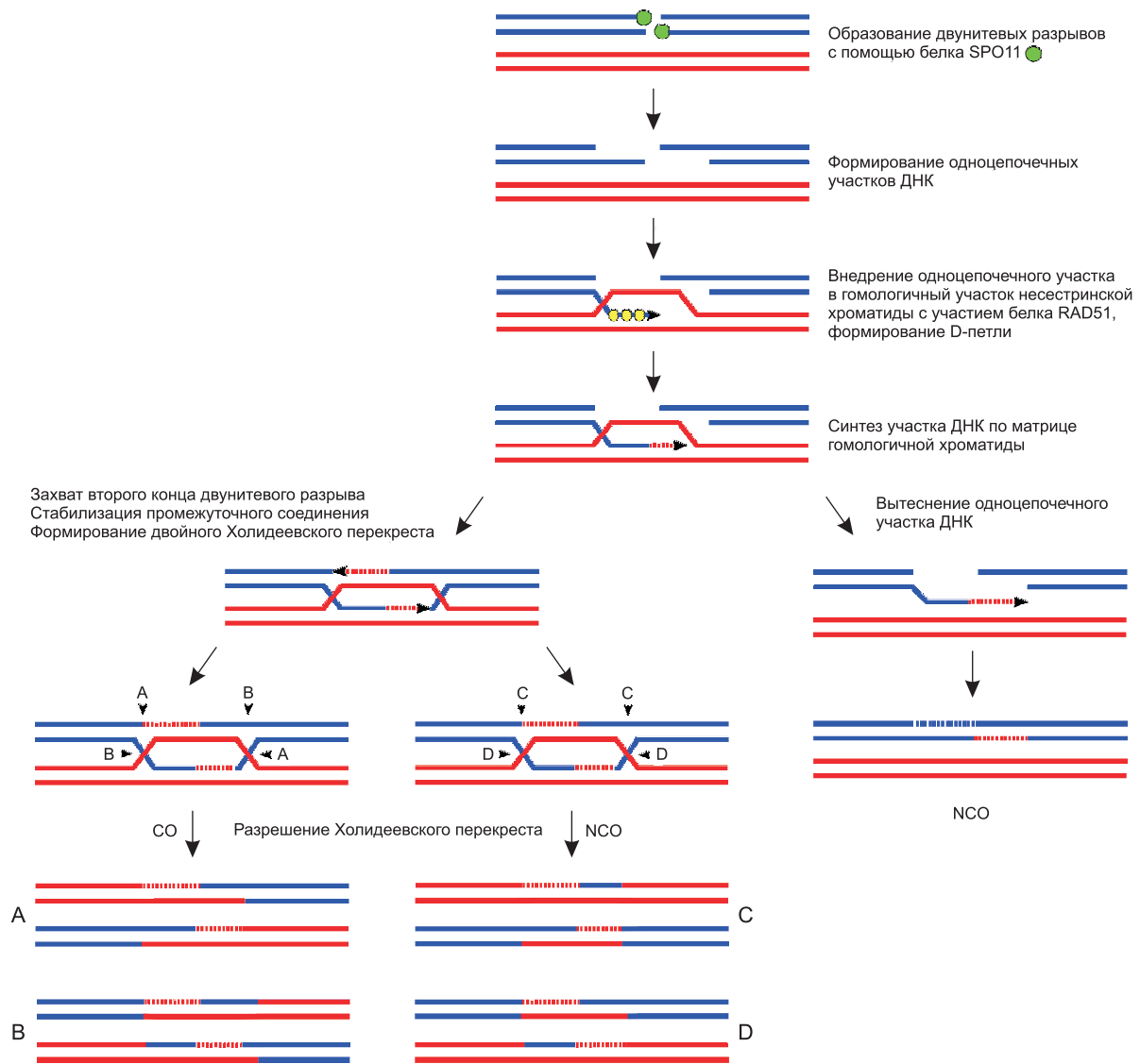


Рис. 4. Схема гомологичной рекомбинации.

Синим и красным цветом показаны цепи ДНК двух несестринских хроматид, участвующих в кроссинговере. Рекомбинация инициируется в местах «горячих точек», где с помощью белка SPO11 образуются двуниевые разрывы. В месте разрыва образуется одноцепочечный конец, с которым связываются белки RAD51, способствуя его внедрению в гомологичный участок несестринской хроматиды. Образуется нестабильное соединение – D-петля. Если оно будет стабилизировано комплексом белков мисматч репарации, произойдет захват второго конца двуниевых разрыва с образованием двойного Холлидеевского перекреста. В зависимости от способа его разрешения могут образовываться как кроссоверные продукты (CO, варианты A и B), так и некроссоверные (NCO, варианты C и D). В противном случае внедренный одноцепочечный конец диссоциирует и образуются некроссоверные продукты.

диссоциировать от несестринской хроматиды и связаться со вторым концом двуцепочечного разрыва. Образуется некроссоверный продукт (NCO) (рис. 4). Если гомологи различаются по этому локусу, то происходит перенос информации с интактной цепи ДНК на активную – генная конверсия.

Промежуточное соединение гомологов может быть стабилизировано комплексом белков мисматч репарации. В этом случае по мере достраивания активной цепи ДНК и расширения D-петли происходит захват другого 3'-конца двуцепочечного разрыва. В результате формируется стабильное соединение – двойная Холидеевская структура (dHj: double Holliday junction), которая затем может мигрировать на расстояния до нескольких сотен пар оснований (Santucci-Darmanin, Baudat, 2010).

В пахитене происходит разрешение Холидеевской структуры. В зависимости от того, в какой ориентации будут произведены разрезы, они приведут к образованию кроссоверных или некроссоверных продуктов (рис. 4). Для завершения формирования кроссоверных продуктов необходимо участие белков мисматч репарации MLH1 и MLH3, поэтому MLH1 широко используется в качестве маркера для локализации сайтов рекомбинации на пахитенных хромосомах.

Кроме MLH1-MLH3-зависимого способа образования кроссоверных продуктов, был обнаружен другой путь с участием эндонуклеазы Mus81. Предполагается, что она может принимать участие в образовании CO на ранней стадии репарации после внедрения одноцепочечного конца. С помощью Mus81-пути у дрожжей *Saccharomyces pombe* образуется большинство CO, однако у мышей этот путь, по всей видимости, не играет существенной роли в образовании кроссоверных продуктов. У мышей, нокаутных по гену белка MLH1, уровень рекомбинации снижается в 10–20 раз и сохраняется на уровне 5–10 % от нормы.

У дрожжей *S. cerevisiae* разрешение Холидеевской структуры преимущественно приводит к образованию кроссоверных продуктов. У млекопитающих же происходит более сложная регуляция. Число сайтов локализации белка MSH4 (который соответствует стабильному промежуточному соединению гомологов) существенно

превышает число сайтов локализации белка MLH1 (т. е. сайтов рекомбинации). Их распределение вдоль хромосомы, как и распределение сайтов MLH1, неслучайно и неравномерно.

### РЕГУЛЯЦИЯ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ РЕКОМБИНАЦИОННЫХ ОБМЕНОВ. ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Если о механизмах рекомбинации известно довольно много, то о том, как регулируется распределение точек рекомбинации и сайтов инициации синапсиса, не известно практически ничего (хотя в теориях о том, как оно должно регулироваться, недостатка нет). Число сайтов рекомбинации может превышать число двунитевых разрывов в 10–20 раз. У мыши число сайтов локализации белка RAD51, выявляемого в местах двунитевых разрывов, может составлять от 200 до 400, а число сайтов рекомбинации варьирует в пределах 22–28. При этом как сайты рекомбинации, так и двунитевые разрывы распределены по хромосоме неравномерно и неслучайно.

Положение двунитевых разрывов определяется локализацией «горячих точек» – участков длиной 1–2 тыс. п.н. с высокой рекомбинационной активностью, окруженных участками с низкой частотой рекомбинации протяженностью несколько десятков тысяч пар оснований (Paigen, Petkov, 2010). Их активность зависит от состояния хроматина и находится под контролем гена *PRDM9*, продукт которого модифицирует гистон H3K4.

Однако каким образом происходит выбор способа репарации двунитевого разрыва – кроссоверного или некроссоверного пути – остается неясным. Отчасти этот процесс регулируется на хромосомном уровне. Это подтверждается тем, что для большинства изученных организмов характерны общие особенности распределения сайтов рекомбинации вдоль хромосомы. К ним относятся выраженный околотеломный пик (сильнее проявляется у самцов), снижение рекомбинации в околотеломных районах. Свой вклад в неравномерность распределения обменов по хромосомам вносит интерференция – снижение вероятности образования обмена вблизи уже возникшего.

Высокая частота рекомбинации в околотеломном районе (теломерный пик), по-види-

тому, обусловлена сближением теломерных концов гомологичных хромосом в процессе формирования структуры «букета». Это облегчает поиск гомологичных участков, что необходимо для инициации как синапсиса, так и рекомбинации.

Эффект подавления рекомбинации в центромерном районе («центромерный эффект») изначально связывали с конденсированным статусом центромерного гетерохроматина. Полученные позже данные указывают на то, что должны быть и другие механизмы супрессии. В частности, у дрожжей клонированная центромера, искусственно перенесенная в другое место генома и не ассоциированная с гетерохроматином, все равно проявляла «центромерный эффект». В недавнем исследовании было показано, что в подавлении центромерной рекомбинации принимают участие механизмы РНК-интерференции.

Сложнее всего оказалось объяснить эффект кроссоверной интерференции. Этим эффектом описывается распределение множественных обменов (более одного на хромосому). Вероятность возникновения второго рекомбинационного обмена увеличивается по мере увеличения расстояния от первого. Несмотря на то что было предложено несколько моделей этого явления, механизмы, обеспечивающие проявление интерференции, неизвестны (Berchowitz, Copenhagen, 2010).

Современные модели интерференции предполагают наличие интерференционного сигнала, который распространяется от первичного сайта рекомбинации в обоих направлениях и предотвращает возникновение дополнительного кроссинговера. В разных моделях роль такого сигнала отводится либо механическим силам, действующим вдоль оси бивалента, либо предполагаемому, неизвестному, фактору, который полимеризуется вдоль оси.

### **ПАХИТЕННЫЙ КОНТРОЛЬ. РЕПАРАЦИЯ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ В X- И Y-ХРОМОСОМАХ**

Репарация двунитевых разрывов и образование кроссоверов завершаются в пахитене. При этом гомологи полностью спарены, центральный элемент СК сформирован на протяжении всех бивалентов. На этой стадии происходит

разрешение Холидеевских структур. По мере репарации фосфорилированный гистон H2A.X исчезает с аутосом, и их транскрипционная активность восстанавливается.

Но что будет, если гомологичный участок не найден и спариться не удастся? В таких неспаренных участках хромосом репарация остается незавершенной. И асинапсис сам по себе, и наличие в асинаптических районах нерепарированных повреждений ДНК представляют на этой стадии серьезную опасность, поскольку они могут привести к нарушению транскрипции, неправильному расхождению хромосом и образованию анеуплоидных гамет.

Эти нарушения синапсиса и репарации активируют процесс пахитенного контроля (checkpoint). Запуск этого процесса приводит к подавлению транскрипции в неспаренном участке – мейотическому сайленсингу неспаренного хроматина (MSUC: meiotic silencing of unsynapsed chromatin). Одним из ключевых этапов этого механизма является вторая волна фосфорилирования гистона H2A.X с помощью ATM/ATR киназ (Burgoyne *et al.*, 2009).

Есть, однако, одна пара хромосом, для которой синапсис и рекомбинация неизбежно должны вызывать проблемы. Это X- и Y-хромосомы самцов. Как правило, они синаптируют и рекомбинируют в небольшом псевдоаутосомном районе. Остальные участки половых хромосом не имеют гомологичного партнера для спаривания, поэтому в пахитене они подвергаются транскрипционной инактивации (MSCI: meiotic sex chromosome inactivation) (Turner, 2007). Эта инактивация происходит благодаря второй волне фосфорилирования H2A.X и является частным случаем общего механизма инактивации неспаренных участков – MSUC. Фосфорилирование начинается вблизи оси, а затем распространяется и полностью покрывает половые хромосомы, приводя к образованию полового тельца (XY body) с более конденсированным, транскрипционно неактивным хроматином.

Тем не менее двунитевые разрывы в неспаренных участках половых хромосом должны быть репарированы. Каким образом это происходит, остается неясным. Теоретически возможны два способа: с помощью гомологичной рекомбинации с использованием сестринской хроматиды или с помощью типа репарации, при

котором происходит прямое сшивание концов разрыва без использования гомологичного образца (NHEJ: non-homologous end joining).

Оба эти пути запрещены в ранней профазе, и двунитевые разрывы в неспаренных участках на стадии пахитены остаются нерепарированными. Это подтверждается тем, что множественные сайты связывания с RAD51 наблюдаются в неспаренном плече X-хромосомы вплоть до середины пахитены. Интересно, что на неспаренном участке Y-хромосомы сайты RAD51 в пахитене встречаются крайне редко. Остается неясным, что является причиной этого – низкая активность белка SPO11 на этом участке, формирующего двунитевые разрывы на Y-хромосоме, или их более быстрая репарация по сравнению с X-хромосомой. Из-за наличия большого числа повторов в Y хромосоме такая репарация может осуществляться посредством внутривнутрихромосомной рекомбинации в зиготене параллельно репарации (гомологичной рекомбинации) в аутосомах (Schoenmakers, Baarends, 2011).

К середине диплотены рекомбинационные белки и фосфорилированный гистон H2A.X исчезают с полового тельца, указывая на то, что двунитевые разрывы репарированы. Вероятно, к этому времени отменяется запрет на репарацию по матрице сестринской хроматиды. Возможно, активируется и механизм прямого сшивания концов разрыва – NHEJ.

В отличие от неспаренных районов половых хромосом в псевдоаутосомном районе двунитевые разрывы репарируются одновременно или даже немного раньше, чем в аутосомах. Сайты связывания RAD51 не встречаются в этом районе в пахитене, и один обязательный кроссовер формируется немного раньше, чем в среднем в аутосомах.

### **РАСХОЖДЕНИЕ ХРОМОСОМ. МОНООРИЕНТАЦИЯ ЦЕНТРОМЕР В ПЕРВОМ ДЕЛЕНИИ**

Когда все двунитевые разрывы репарированы и Холидеевские структуры разрешены, клетка начинает готовиться к делению. В диплотене СК разрушается. Гомологичные хромосомы отделяются друг от друга и только в районе хиазм сохраняют физический контакт между собой (рис. 2). Благодаря тому, что в местах располо-

жения хиазм ДНК хроматиды одного гомолога соединена с ДНК несестринской хроматиды и когезии сестринских хроматид, бивалент существует как единая структура. Другими словами, для сохранения бивалента нужны и кроссинговер, и когезиновые связи сестринских хроматид. Если в биваленте произошел один кроссинговер, то бивалент имеет вид креста, если два, то вид кольца или ряда колец при наличии более двух хиазм (рис. 5).

В диакинезе хромосомы бивалента значительно укорочены, позиции кроссинговера выявляются в виде хиазм. Прекращается синтез РНК, хромосомы конденсируются и утолщаются. На этой стадии можно увидеть, что каждый бивалент содержит четыре отдельные хроматиды, причем каждая пара сестринских хроматид соединена центромерой, тогда как несестринские хроматиды, претерпевшие кроссинговер, образуют хиазмы. Эта стадия является переходной к стадии деления клетки.

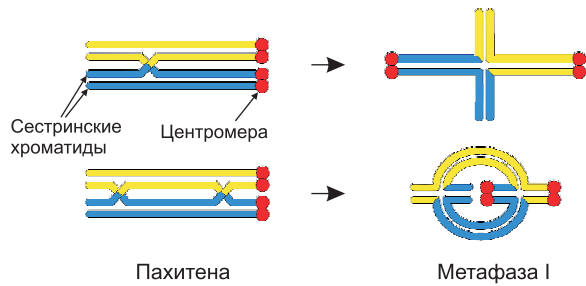
В метафазе I мейоза, как и в митозе, хромосомы выстраиваются в экваториальной плоскости веретена деления и затем в анафазе расходятся к разным полюсам. Для правильного расхождения хромосом в **митозе** требуется, чтобы кинетохоры **сестринских хроматид** в метафазе были биориентированы, т. е. были присоединены к микротрубочкам противоположных концов веретена деления. В этом случае сестринские кинетохоры испытывают натяжение, которое уравнивается когезией сестринских хроматид. Когда эти условия выполняются, активируется фермент сепараза, которая расщепляет когезины и запускает расхождение сестринских хроматид.

В отличие от митоза в первом делении **мейоза** к разным полюсам расходятся не сестринские хроматиды, а гомологичные хромосомы, удерживаемые вместе с помощью хиазм. Такое поведение достигается благодаря двум специфическим для мейоза особенностям (Tanaka, Watanabe, 2008).

Во-первых, кинетохоры сестринских хроматид присоединены к микротрубочкам, исходящим от одного полюса веретена деления, т. е. моноориентированы (рис. 6).

Во-вторых, расщепление когезинов происходит в два этапа. В первом делении мейоза расщепляются когезины хромосомных плеч. Связь между гомологичными хромосомами





**Рис. 5.** Синаптические конфигурации бивалентов с одним и двумя рекомбинационными обменами в пахитене и метафазе I.

теряется и они расходятся. Однако сестринские хроматиды продолжают быть связанными друг с другом благодаря тому, что когезия между ними сохраняется в перичентромерном районе вплоть до второго деления.

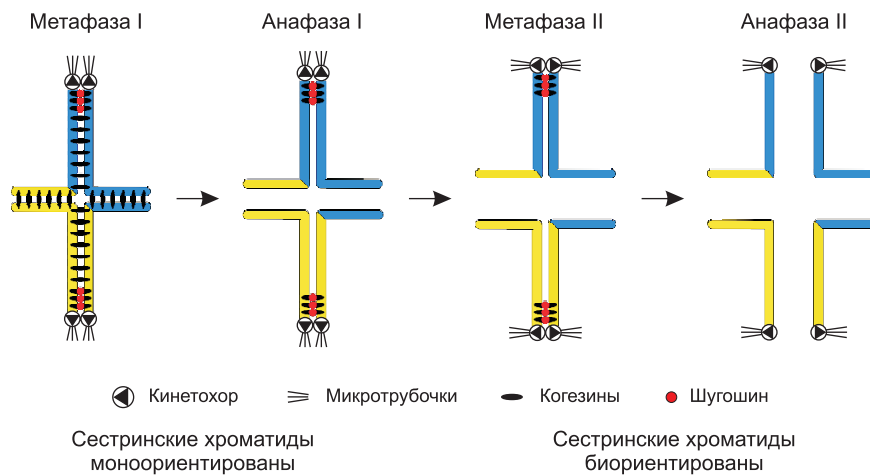
В мейозе одна из субъединиц когезинового комплекса заменена на специфический для мейоза когезин REC8. Оказалось, что от действия сепаразы в перичентромерном районе его защищает белок шугошин (Sgo1, японск. – духхранитель) (Clift, Marston, 2011) (рис. 6). Если в мейозе вместо REC8 индуцировать экспрессию его митотического аналога, то когезия между

сестринскими хроматидами будет полностью разрушена в метафазе-анафазе мейоза I. При этом у дрожжей белок семейства шугошинов ответственен и за монополярную ориентацию кинетохоров.

После завершения первого деления мейоза клетки без удвоения ДНК вступают во второе деление, проходящее по схеме классического митоза. Как только устанавливается правильное биполярное присоединение микротрубочек к кинетохорам сестринских хроматид и на центромерах генерируется натяжение, запускается второй этап расщепления когезинов – расщепляется когезин REC8 в перичентромерном районе. Сестринские хроматиды расходятся к противоположным полюсам.

### ОСОБЕННОСТИ МЕЙОЗА В ООГЕНЕЗЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ. ПОВЫШЕНИЕ РИСКА ОБРАЗОВАНИЯ АНЕУПЛОИДНЫХ ГАМЕТ С ВОЗРАСТОМ

Процесс образования половых клеток, основным событием которого является мейоз, существенно различается у самок и самцов.



**Рис. 6.** Схема расхождения хромосом в мейозе.

До анафазы I сестринские хроматиды связаны вместе с помощью когезиновых комплексов. Благодаря им и рекомбинационному обмену все четыре хроматиды объединены в бивалент. В анафазе I расщепляются когезины хромосомных плеч, позволяя гомологичным хромосомам разойтись к разным полюсам. В перичентромерном районе когезины защищены от расщепления белком шугошином. При этом кинетохоры обеих сестринских хроматид моноориентированы – присоединены к одному полюсу веретена деления. Благодаря этому сестринские хроматиды расходятся вместе. В метафазе II кинетохоры сестринских хроматид присоединены к разным полюсам веретена деления – биориентированы. Шугошин инактивируется, и расщепляются когезины перичентромерного района, позволяя сестринским хроматидам разойтись к разным полюсам.

Одно из важнейших отличий касается продолжительности и распределения мейотических событий во времени.

У самцов сперматогенез начинается при достижении половой зрелости и может продолжаться всю жизнь. При этом весь процесс образования сперматозоидов занимает у мыши 35 дней, у человека – 64, из них на мейоз приходится 13 и 24 дня соответственно.

В отличие от самцов у самок оогенез начинается в период эмбрионального развития и останавливается на стадии профазы I (у человека и многих других млекопитающих – в диплотене). К моменту рождения в яичниках самок уже содержатся все ооциты, из которых впоследствии будут развиваться яйцеклетки. Дальнейшее развитие ооцитов происходит уже после полового созревания. В каждом эстральном цикле половые гормоны стимулируют завершение первого (редукционного) деления одного из ооцитов. После этого клетка сразу же вступает во второе деление. Затем еще одна остановка происходит на стадии метафазы II. Завершается второе мейотическое деление только в случае оплодотворения.

Таким образом, в состоянии покоя на стадии диплотены ооцит человека может находиться от 10 до 50 лет. Такая длительная задержка приводит к тому, что с возрастом увеличивается риск образования гамет с хромосомными нарушениями. Действительно, если с возрастом мужчины повышается частота точечных мутаций в сперматоцитах (поскольку вступлению в мейоз предшествует большое число клеточных делений), то большинство хромосомных аномалий имеют материнское происхождение. Риск этих нарушений увеличивается до 35 % к 40 годам и, как правило, связан с неправильным расхождением хромосом в первом делении мейоза (Wang *et al.*, 2011).

Среди возможных причин этого эффекта рассматриваются ошибки рекомбинации, нарушения сборки веретена деления и присоединения к нему кинетохоров. Однако главной причиной повышения риска образования анеуплоидных гамет считается преждевременная потеря когезии между сестринскими хроматидами. На стадии диплотены гомологичные хромосомы физически связаны между собой благодаря

тому, что несестринские хроматиды, между которыми произошел рекомбинационный обмен, остаются связанными с сестринскими хроматидами с помощью REC8-содержащих когезиновых комплексов.

В исследованиях на мышах было показано, что когезиновые комплексы образуются **только** в S-фазе, функционируют на протяжении всего мейоза и не заменяются новыми. При этом с возрастом их количество уменьшается. К 12 месяцам у мышей количество когезина REC8 может сокращаться на 90 %. Интересно, что до этого времени сохраняется низкий уровень хромосомных нарушений, однако он резко возрастает уже к 15 месяцам. Вероятно, изначально с хромосомами связывается избыточное количество когезинов, и риск возникновения анеуплоидных гамет серьезно повышается только после падения уровня REC8 ниже критической границы (Chiang *et al.*, 2012).

К серьезным последствиям может привести нарушение когезии в перичентромерном районе, поскольку он ответственен за правильное присоединение кинетохоров к веретену деления. Ошибки их ориентации приводят к неправильной сегрегации хромосом. У мыши частота таких ошибок, приводящих к разъединению центромер, увеличивается с возрастом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Большинство данных, приведенных в обзоре, получено при изучении млекопитающих и дрожжей. Однако механизмы регуляции сложного каскада событий, происходящих в мейозе, их последовательность и взаимосвязь могут очень сильно различаться у разных групп организмов. В некоторых случаях компонент или механизм, который является ключевым для одного организма, оказывается не таким значимым или вовсе ненужным для другого. Так, например, самцы дрозофилы обходятся без синаптонемного комплекса и рекомбинации. У нематод и самок дрозофилы формирование двунитевых разрывов и синапсис хромосом могут происходить независимо друг от друга. В регуляции и координации мейотических событий у разных видов могут участвовать разные компоненты сигнальных систем.

## СЛОВАРЬ

**Синаптонемный комплекс** – белковая полимерная структура, пространственно организующая гомологичные хромосомы в профазе I мейоза. Состоит из двух боковых (латеральных) элементов и соединяющего их центрального.

**Когезиновые комплексы** – белковые комплексы, связывающие сестринские хроматиды после репликации в S-фазе как в митозе, так и в мейозе. Состоят из четырех субъединиц. Участвуют в регуляции расхождения сестринских хроматид.

**Гомологичная рекомбинация** – обмен гомологичными участками хромосом в профазе I мейоза. Затрагивает две несестринские хроматиды бивалента.

**Двунитевые разрывы ДНК** – множественные повреждения ДНК в лептотене, запускающие процесс гомологичной рекомбинации. Индуцируются белком SPO11.

**Двойная Холидеевская структура (dHj: double Holliday junction)** – стабильное промежуточное соединение ДНК несестринских хроматид, образующееся в процессе рекомбинации.

**Мисматч репарация** – система исправления ошибочных спариваний нуклеотидов, возникающих в процессе репликации и рекомбинации ДНК, а также в результате некоторых типов повреждений ДНК.

**Интерференция** – снижение вероятности возникновения рекомбинационного обмена вблизи уже возникшего.

**Пахитенный контроль (checkpoint)** – система, контролирующая завершение процессов синапсиса и рекомбинации в пахитене.

**Инактивация половых хромосом** – процесс подавления транскрипционной активности неспаренных участков половых хромосом в профазе I мейоза у гетерогаметного пола.

**Кинетохоры** – белковая структура в центромерном районе хромосомы, к которой прикрепляются волокна веретена деления. Играет важную роль в сегрегации хромосом.

**Сепараза** – протеаза, ответственная за расщепление когезинов в метафазе митоза и мейоза.

**Шугошин** – белок, защищающий когезины в перицентромерной области. В мейозе регулирует поэтапное расщепление когезинов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Богданов Ю.Ф. Эволюция мейоза одноклеточных и многоклеточных эукариот. Ароморфоз на клеточном уровне // Журн. общ. биологии. 2008а. Т. 29. С. 102–107.
- Богданов Ю.Ф. Белковые механизмы мейоза // Природа. 2008б. Т. С. 3–9.
- Богданов Ю.Ф., Коломиец О.Л. Синаптонемный комплекс – индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом. М.: КМК, 2007. 358 с.
- Baudat F., de Massy B. Regulating double-stranded DNA break repair towards crossover or non-crossover during mammalian meiosis // Chromosome Res. 2007. V. 15. P. 565–577.
- Berchowitz L.E., Copenhaver G.P. Genetic interference: don't stand so close to me // Curr. Genomics. 2010. V. 11. P. 91–102.
- Burgoyne P.S., Mahadevaiah S.K., Turner J.M. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis // Nature Rev. Genetics. 2009. V. 10. P. 207–216.
- Chiang T., Schultz R.M., Lampson M.A. Meiotic origins of maternal age-related aneuploidy // Biol. Reprod. 2012. V. 86. P. 1–7.
- Clift D., Marston A.L. The role of shugoshin in meiotic chromosome segregation // Cytogenet. and Genome Res. 2011. V. 133. P. 234–242.
- Paigen K., Petkov P. Mammalian recombination hot spots: properties, control and evolution // Nature Rev. Genetics. 2010. V. 11. P. 221–233.
- Revenkova E., Jessberger R. Shaping meiotic prophase chromosomes: cohesins and synaptonemal complex proteins // Chromosoma. 2006. V. 115. P. 235–240.
- Santucci-Darmanin S., Baudat F. Meiotic Recombination in Mammals / Eds M.-H. Verlhac, A. Villeneuve. Oogenesis: John Wiley and Sons, Ltd, 2010. P. 141–177.
- Scherthan H. Telomere attachment and clustering during meiosis // Cell Mol. Life Sci. 2007. V. 64. P. 117–124.
- Schoenmakers S., Baarends W. Meiotic Pairing of Homologous Chromosomes and Silencing of Heterologous Regions // Epigenetics and Human Reproduction / Eds S. Rousseaux, S. Khochbin. Berlin; Heidelberg: Springer, 2011. P. 157–186.
- Tanaka K., Watanabe Y. Sister Chromatid Cohesion and Centromere Organization in Meiosis // Recombination and Meiosis / Eds R. Egel, D.-H. Lankenau. Berlin; Heidelberg: Springer, 2008. P. 57–79.
- Turner J.M. Meiotic sex chromosome inactivation // Development. 2007. V. 134. P. 1823–1831.
- Wang Z.B., Schatten H., Sun Q.Y. Why is chromosome segregation error in oocytes increased with maternal aging? // Physiology (Bethesda). 2011. V. 26. P. 314–325.

**Источники в интернете**

Видеомодель гомологичной рекомбинации у прокариот:  
<http://bioweb.wku.edu/courses/biol22000/16Recombination/RecDS.html>  
Видеомодель альтернативного разрешения Холлидеевской структуры:  
<http://engels.genetics.wisc.edu/Holliday/holliday3D.html>

**MEIOSIS: HOW TO HALVE THE CHROMOSOME NUMBER****A.A. Torgasheva**

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: [torgasheva@bionet.nsc.ru](mailto:torgasheva@bionet.nsc.ru)

**Summary**

The notion of meiosis has been changed and refined for over a century since the discovery of this complicated way of cell division. Its success depends on precise time and space orchestration of many processes, such as chromosome replication, packaging, exchange of homologous regions, alignment in the plane of division, and disjunction. The development of molecular and immunocytochemical methods in recent decades cast light on the details of these processes and brought scientists closer to the understanding of mechanisms regulating them. This review presents the current notion of the major meiotic events by examples of yeast and mammals. Particular attention is paid to processes underlying chromosome synapsis and recombination, as well as monoorientation of sister kinetochores in the first division, the key features distinguishing meiosis from mitosis and ensuring chromosome number reduction.

**Key words:** meiosis, recombination, synaptonemal complex, sex chromosome inactivation, kinetochore monoorientation, cohesion.

УДК 57(092)

## НЕСКОЛЬКО СЛОВ О К.Н. ГРИНБЕРГЕ

© 2013 г. М.Д. Голубовский<sup>1</sup>, А.М. Полищук<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley, USA,  
e-mail: mdgolub@gmail.com;

<sup>2</sup> Ashqelon, Israel

Поступила в редакцию 29 мая 2012 г. Принята к публикации 26 июня 2012 г.

Год назад исполнилось бы 75 лет Киру Николаевичу Гринбергу (1936–1989), замечательному исследователю в области медицинской цитогенетики, рано ушедшему из жизни. К.Н. Гринберг родился в Москве. В 1960 г. он окончил 2-й Московский мединститут. После его окончания он работал психиатром в городке Кимры на верхней Волге. Затем увлекся генетикой и перешел на работу в сектор генетики Института атомной энергии им. Н.В. Курчатова, где овладел методами культуры клеток. В начале 1960-х годов, когда в стране стали возрождаться исследования в области цитогенетики, Александра Алексеевна Прокофьева-Бельговская (1903–1984) организовала лабораторию цитогенетики человека (1964 г.) сначала в составе Института морфологии человека, а затем в составе Института медицинской генетики АМН СССР. Этой лабораторией А.А. Прокофьева-Бельговская руководила на общественных началах, фактически же лабораторией руководил ее заместитель К.Н. Гринберг. Он сформулировал оригинальное научное направление, подбирал и осваивал методики, адекватные поставленным целям, отвечал за подбор и обучение сотрудников, за материальное обеспечение лаборатории.

Главными направлениями исследований лаборатории стали изучение роли хромосомных мутаций в эмбриопатиях и патологиях развития, а также детальный анализ феногенетики хромосомного дисбаланса на уровне поведения клеток (параметры клеточного деления, характер пролиферации, особенности биохимии и т. д.). К концу 1970-х гг. К.Н. Гринберг и его коллеги установили сходный или однотипный ответ в поведении клеток и в феногенетике раз-

вития при разных хромосомных нарушениях. Культивируемые эмбриональные фибробласты у эмбрионов с хромосомными нарушениями отличались по сравнению с нормальными {спектрами} плеядой общеклеточных различий: изменение морфологии, низкий пролиферативный потенциал, снижение образования коллагена и скорости передвижения, отсутствие ориентированного роста. Все это в конце концов приводило к нарушению морфогенеза по типу гетерохронии или рассогласованию во времени детерминации и дифференциации органов в ходе онтогенеза. Была высказана гипотеза о существовании канализированного механизма в реализации хромосомного дисбаланса. Его основные проявления оказались неспецифичными и относительно независимыми от специфики хромосом, вовлеченных в анеуплоидию. Данный феномен, по предложению Гринберга, получил название «клеточный синдром». В недавней всеобъемлющей сводке по цитогенетике эмбрионального развития человека (Баранов, Кузнецова, 2007) отмечается «безусловная ценность» этой концепции, получившей разнообразные подтверждения в ходе последующих исследований.

Молекулярно-цитологическое истолкование причин, определяющих неспецифичность клеточного ответа, может быть связано со следующими установленными в последние два десятилетия особенностями организации наследственной системы клетки: архитектоника клеточного ядра, упорядоченное расположение хромосом в местах мембранных контактов, наличие определенной зоны активности или территории для каждой хромосомы, функцио-



А.А. Прокофьева-Бельговская с сотрудниками лаборатории цитогенетики человека Института медицинской генетики АМН СССР. Слева направо: К.Н. Гринберг, В.И. Кухаренко, А.А. Прокофьева-Бельговская и О.А. Подугольникова. Март 1983 г.

нальная компартиментализация хромосомных локусов и отдельных сегментов. Очевидно, что хромосомный дисбаланс должен приводить к существенным аномалиям внутриядерной структуры и негативно сказываться на работе всего генома.

Однако до настоящего времени нет четких ответов даже на простые конкретные вопросы: чем объяснить сходство клинических проявлений многих хромосомных болезней; почему дисбаланс одних хромосом всегда летален уже на ранних стадиях, тогда как дисбаланс по другим совместим с завершением эмбриогенеза и даже с постнатальным развитием; почему хромосомные нарушения в подавляющем большинстве подвергаются элиминации еще до рождения, что непосредственно вызывает гибель зародышей с хромосомными абберациями. Эти и многие другие вопросы фенотипики хромосомной патологии пока не имеют доказательных ответов (Баранов, Кузнецова 2007). Публикуемая в журнале статья К.Н. Гринберга и В.И. Кухаренко, несомненно, интересна в этом отношении.

Сотрудники лаборатории, работавшие с К.Н. Гринбергом с самих первых дней, отмечают, что научные интересы и контакты К.Н. Гринберга были необыкновенно широки, «его эрудиция, мягкость и доброта привлекали людей. Его выступления были всегда содержательны

и просто красивыми» (Подугольникова, 2009). Гринберг был привязан не только к хромосомам. Дома у него было несколько аквариумов и террариумов, он с удовольствием посещал московский птичий рынок. Это был человек разносторонней культуры. Он писал философские новеллы, стихи, притчи.

Цитогенетикам, вступавшим в науку в 1960–1970-е годы, хорошо известно, как охотно и много Кир Николаевич помогал осваивать методы культивирования клеток или цитогенетические методики. Велика его роль и в восстановлении медицинской генетики в постлысенковский период. В 1964 г. состоялось важное совещание АМН СССР у академика В.Д. Тимакова (в то время вице-президент АМН), на котором обсуждались планы создания медико-генетической службы. Исход совещания во многом зависел от того, как оно подготовлено и кто будет делать основной доклад. По предложению А.А. Прокофьевой-Бельговской, вся подготовка совещания была возложена на В.М. Гиндилиса и К.Н. Гринберга. Они связались с оставшимися «старыми кадрами» генетиков (Р.П. Мартынова, Е.Ф. Давиденкова, Ю.Л. Горощенко и др.), а также с новым поколением ученых, работавших в области медицинской генетики, и подробно рассказали им о предстоящем совещании. Основной доклад от имени А.А. Прокофьевой-Бельговской,

В.П. Эфроимсона и их сотрудников делал В.М. Гиндилис (Полищук, 2010).

Позднее Гринберг и Гиндилис послали письмо в АМН СССР, содержащее конкретные рекомендации по структуре Института медицинской генетики и по направлениям развития медицинской генетики (Гиндилис, 2008). Таким образом, Кир Николаевич не замыкался только на своей научной работе. Он знал больше и мыслил масштабнее. К сожалению, ему пришлось в полной мере испытать на себе эффекты так называемых рецидивов лысенковщины – попыток отдельных ученых монополизировать ту или иную область науки. Чувство недоумения и возмущения охватило его, когда (незадолго до кончины А.А. Прокофьевой-Бельговской) он узнал о намерении руководства Института медицинской генетики расформировать лабораторию. Коллектив лаборатории решил бороться против этого вопиюще несправедливого решения, и Гринберг возглавил эту борьбу (Подугольникова, 2009). Увы, к своему изумлению и огорчению, он столкнулся с тем, что ряд коллег, знавших его много лет и ценивших его знания, талант и эрудицию, при очередной переаттестации проголосовали против его избрания на должность старшего научного сотрудника. По существу, лишили его работы.

Кир Николаевич испытал горькое чувство унижения, когда руководство института издевательски предложило ему должность младшего научного сотрудника в той лаборатории, которой он долгие годы фактически заведовал. Пять долгих лет боролся ученый за сохранение своей лаборатории и собственное достоинство, опираясь на помощь своих сотрудников (прежде всего В. Кухаренко и О. Подугольниковой). Главное, что помогло ему выстоять – это непоколебимая уверенность в своей правоте. Кир Николаевич победил – в феврале 1988 г. его избрали заведующим лабораторией клеточной фенотипики и наследственной патологии. Однако через 11 месяцев он умер, будучи полон идей, замыслов и желания воплотить их в жизнь. Судьба оказалась жестокой: «еще оружие цело, и только жизнь иссякла до конца» (Г. Гейне).

#### ЛИТЕРАТУРА

- Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития человека. СПб., 2007.
- Полищук А.М. Медицинская генетика в России // Химия и жизнь. 2010. № 2. [elementy.ru.lib](http://elementy.ru/lib).
- Гиндилис В. Эпизоды из советской жизни: воспоминания. М.: ОГИ, 2008. 246 с.
- Подугольникова О. А вместе мы – лаборатория. Салин (Мичиган)–Москва, 2009.

УДК 575.1:572:576.316

## РЕАЛИЗАЦИЯ ФЕНОТИПИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ХРОМОСОМНЫХ АНОМАЛИЙ У ЧЕЛОВЕКА

© 2013 г. К.Н. Гринберг, В.И. Кухаренко

Институт репродуктивной генетики, Чикаго, США,  
e-mail: kukharenko\_9@msn.com

Поступила в редакцию 22 мая 2012 г. Принята к публикации 20 июня 2012 г.

Уже несколько десятилетий обсуждаются различные условия формирования фенотипа больных с аномалиями кариотипа (в частности пациентов с синдромом Дауна). Ранее нами были представлены факторы, влияющие на формирование фенотипа пациентов с хромосомными аномалиями (Гринберг, 1978, 1982; Grinberg, Kukharenko, 1992). Мы полагаем, что общая концепция фенотипического проявления хромосомного дисбаланса должна учитывать следующие факторы:

1. Изменения в числе хромосом, кроме специфических эффектов, связанных с дозой локализованных в данной хромосоме генов, сопровождаются неспецифическим эффектом, проявляющимся в угнетении роста и развития организма.
2. Пороки развития, наблюдаемые у человека при хромосомных аномалиях, представляют собой персистирующие образования, являющиеся нормальной стадией на более ранних этапах развития. Основные эффекты хромосомных аномалий являются гипоморфными. Вместе с тем эти пороки развития фактически не отличаются от пороков развития, вызванных отдельными генами и тератогенными факторами внешней среды.
3. В основе патогенеза фенотипического проявления хромосомного дисбаланса могут лежать нарушения основных и элементарных событий морфогенеза, происходящие на клеточном уровне. Такими событиями являются пролиферация клеток, миграция, специфическая рецепция и индукционные взаимоотношения.
4. Предполагается, что изменения метаболического гомеостаза в клетках с аномальным кариотипом способствуют проявлению скрытой изменчивости структур, обеспечивающих основные морфогенетические функции клеток. Хромосомные аномалии усиливают эволюционно обусловленную изменчивость в сторону замедления созревания клеточных и тканевых структур, что и является основным звеном патогенеза хромосомного дисбаланса.

**Ключевые слова:** трисомия, синдром Дауна, пороки развития, замедление созревания, клетки, спонтанные аборты.

История проблемы связи между кариотипом и фенотипом началась задолго до обнаружения хромосомных аномалий у человека. Некоторые исследователи еще в 1930-х годах считали, что у человека по аналогии с *Datura*, *Oenothera*, *Drosophila* хромосомные aberrации могут быть причиной болезней (см. Carter, 2002; Neri, Opitz, 2009). В 1959 г. была впервые описана трисомия (синдром Дауна) у человека (Lejeune *et al.*, 1959), вскоре были описаны и другие хромосомные синдромы (Edwards *et al.*, 1960; Patau *et al.*, 1960). Характерной особенностью хромосомных болезней является возможность

сразу видеть причину и следствие: причина – лишняя или отсутствующая хромосома (или ее отдельные сегменты), следствие – клиническая картина болезни (клинический фенотип). Эта очевидность сосуществования причины и следствия породила определенный стереотип изучения хромосомных болезней путем установления связи или корреляции между фенотипом и кариотипом. Факт наличия такой связи не вызывает сомнений, однако характер связи постоянно подвергался обсуждению. Упомянутый стереотип в изучении хромосомных болезней опирался на предположение о том, что каждая



хромосома содержит уникальный набор генов, каждый из которых обладает специфическим эффектом и, следовательно, совокупность фенотипических проявлений обязана своим появлением эффекту дозы этих генов. Предполагалось, что если у человека имеются 22 пары аутосом, то должно быть выявлено, по крайней мере, 22 клинически отличимых синдрома. При этом основным доводом была ссылка на классические работы по трисомикам *Datura*, так как при анализе этого растения с трисомиями каждой хромосоме соответствует специфический фенотип коробочки (Blakeslee, 1922).

Однако усовершенствование методов как фенотипического, так и цитогенетического анализа не приблизило нас к разрешению основного парадокса. Суть этого парадокса состоит в том, что, несмотря на уникальность генного состава каждой хромосомы человека, фенотипические проявления трисомий и моносомий имеют между собой больше общего, чем специфического. А. Taylor (1968) одна из первых обследовала большое количество больных с трисомией 13 и 18. Она обнаружила, что 44 из 46 симптомов были общими для обеих трисомий, а при включении в сравнение результатов патолого-анатомического исследования «наложение» симптомов оказалось еще более значительным. Складывалось мнение, что симптомы синдромов с хромосомными аномалиями перекрываются друг с другом, а не являются резко очерченными феноменологическими сущностями. Ни одна из аномалий фенотипа, входящих в состав хромосомного синдрома, не принадлежит исключительно этому синдрому. Эти аномалии в изолированном виде встречаются в популяции у нормальных людей, а также входят в состав фенотипа ряда моногенных синдромов (Лазюк, 1974) или в комплекс пороков, вызванных факторами внешней среды. Увеличение количества генов в результате полных или частичных трисомий не приводило к появлению новых «фенов». Цитогенетик может видеть хромосомную делецию, а ее клинические проявления могут быть зарегистрированы в тех же феноменах, что и при трисомии. Следует отметить, что и в работах А. Blakeslee (1922) указывалось, что несмотря на специфические фенотипы коробочек у разных трисомных растений, все трисомики

характеризовались наличием общих и поэтому неспецифических изменений: угнетением роста, замедлением развития и низкой фертильностью из-за замедленной скорости роста пыльцевых трубочек. Мы обнаруживаем то же самое при хромосомных болезнях у человека: при наличии немногих более или менее характерных сочетаний симптомов наиболее тяжелые проявления хромосомного дисбаланса являются общими и неспецифическими.

При всех хромосомных болезнях отмечается ряд общих расстройств, которые и делают эти болезни «тяжелыми». Ясно, что клиническая тяжесть синдрома определяется не эпикантом или низко расположенными ушными раковинами, а неспособностью к росту и развитию, пороками сердца, мочеполовой системы, центральной нервной системы. Именно эти расстройства и являются общими для хромосомных синдромов. На это обстоятельство было обращено внимание уже давно. В. Hall (1965) заметил сходство фенотипов при трисомиях и объяснял это тем, что трисомия любой хромосомы приводит к задержке развития, в результате чего индивидуум рождается со структурами, не завершившими своего развития.

При цитогенетическом исследовании больных с клиническим диагнозом синдрома Дауна диплоидный кариотип обнаружен у 23–36 % пациентов (Hindley, Medakkar, 2002; Sivakumar, Larkins, 2004). Эти данные свидетельствуют о том, что для реализации аномального фенотипа не обязательно наличие трисомного кариотипа. Неспецифический характер аномалий фенотипа при хромосомных синдромах доказывается еще и необходимостью дифференциальной диагностики с хорошо известными наследственными синдромами (Meckel syndrome, Smith-Lemli-Opitz syndrome, Rubinstein-Taybe syndrome и др.) (Лазюк, 1974). Таким образом, ясно, что фенотипический эффект хромосомных аномалий может копироваться единичными генами.

Химические тератогены также могут вызывать появление комплекса врожденных пороков развития, неотличимых от «хромосомных синдромов». В этом отношении особенно показательны работы, в которых описаны женщины, принимавшие во время беременности противоэпилептические препараты (Alsdorf, Wyszynski, 2005; Ornoy, 2009). Судя по описанию этих

больных, речь идет о стигмах типичных «хромосомных синдромов» (пороки развития сердца, головы, конечностей, скелетные дефекты).

Таким образом, ни клиническая, ни патологоанатомическая феноменология хромосомных аномалий у человека не представляет доказательств специфического влияния различных нарушений в числе хромосом в кариотипе на развитие. Создается впечатление, что хромосомные нарушения влияют на развитие так же, как и отдельные гены и внешние причины, в том числе химические факторы (тератогены).

Следует отметить, что исследования хромосомных болезней в основном ведутся на достаточно удаленных друг от друга уровнях: уровень организма (клинические и патоморфологические исследования) и молекулярный уровень. Совершенно ясно, что между ними должен находиться еще один уровень – клеточный, без которого трудно получить полную картину патогенеза хромосомопатий. Кроме того, некоторые показатели (пролиферация и движение) вообще могут быть получены только при исследовании клеточных популяций. Мы считаем, что одной из основных задач клеточной генетики является поиск ответа на вопросы: каким образом генетические факторы влияют на количество клеток в клеточных системах и на основные клеточные функции – размножение, дифференцировку, способность рецептировать биологически активные вещества и их участие в морфогенезе? Каким образом генетические факторы изменяют свойства клеток так, что это приводит к нарушению развития – от эмбриональности до болезней зрелого возраста?

Одной из первых работ по изучению пролиферации клеток с аномальным кариотипом являлась работа S. Cure (Cure *et al.*, 1974). Было показано, что время удвоения количества клеток штаммов, полученных из материала спонтанных абортусов человека с абберрантным набором хромосом, значительно выше, чем в контрольных диплоидных штаммах. Скорость размножения клеточной популяции зависит от ряда факторов, в частности типа клеток, параметров митотического цикла, величины пролиферативного пула клеток. Нами проведено клонирование 43 штаммов эмбрионального и постнатального происхождения с диплоидным и аномальным кариотипами и показано, что клоногенность

клеток, полученных из спонтанных абортусов с аномальным кариотипом, была резко снижена по сравнению с эмбриональным диплоидным контролем, в то время как хромосомный дисбаланс в клетках постнатального происхождения не приводил к уменьшению клоногенности (Гринберг, Терехов, 1985). Нами проведено комплексное морфологическое и цитохимическое исследование 40 эмбриональных штаммов с диплоидным и анеуплоидным кариотипами (Гринберг, 1978). Клетки большинства спонтанных абортусов с аномальным набором хромосом имели значительные морфологические изменения, они также не образовывали типичный, характерный рисунок клеточного слоя. Складывалось впечатление, что эти клетки не приобретали тех признаков, которые характеризуют диплоидные клетки. Морфологические изменения клеток с абберрантным набором хромосом сопровождалась серией сходных цитохимических отклонений, что позволило сформулировать положение о «клеточном синдроме» у носителей аномального кариотипа (Гринберг, 1978). Результаты цитохимических находок по щелочной фосфатазе и коллагену были подтверждены в работах с использованием биохимических методов (Kuliev *et al.*, 1974; Тамаркина и др., 1975; Kukharenko *et al.*, 1984). При сопоставлении цитохимических данных с морфологическими можно утверждать, что при хромосомном дисбалансе имеется морфологическая и биохимическая незрелость фибробластов. В ряде наших публикаций представлены данные по «клеточному синдрому» при обследовании различных штаммов, выведенных из материала спонтанных абортусов (Kuliev *et al.*, 1974, 1977). При исследовании штаммов с аномальным кариотипом, выведенных из спонтанных абортусов, обнаружено резкое снижение миграции клеток (Фрейдин и др., 1988), в некоторых штаммах найдены изменения митотического цикла (Kukharenko *et al.*, 1974). Нарушение миграционной способности клеток может объяснить некоторые стигмы у носителей хромосомных аномалий, например, они имеют высокую частоту болезни Гиршпрунга, причиной которой является нарушение миграции клеток нервного гребня в стенки кишечника. Известно, что внеклеточный матрикс создает пути направленной миграции клеток, в

частности миграции и дифференциации клеток нервного гребня эмбрионов (Henderson, Copp, 1997; Perris, Perrisinoto, 2000). Имеются данные о резком снижении синтеза элементов межклеточного матрикса (коллагена, фибронектина и гиалуроновой кислоты) в клетках эмбриолеталей человека (Kukhareno *et al.*, 1984, 1991; Delvig *et al.*, 1987). Можно предположить, что нарушение синтеза межклеточного матрикса, пролиферативной активности клеток, подвижности клеток эмбрионов человека с аномальным кариотипом может служить причиной значительного нарушения морфогенетических процессов.

Жизнедеятельность клетки находится под контролем различных регуляторных систем, в частности системы циклических нуклеотидов (цАМФ и цГМФ). Процессы клеточного деления, роста, дифференцировки клеток связаны с изменением содержания цАМФ. В клетках спонтанных абортусов с трисомным кариотипом обнаружены увеличение уровня цАМФ и изменение соотношения цАМФ/цГМФ (Кухаренко, Хохлова, 1989). Увеличение уровня цАМФ обнаружено также в слюне больных с синдромом Дауна, уменьшение уровня цГМФ найдено в клетках амниотической жидкости плодов с трисомией 21 (Sproles, 1973; Karlsson *et al.*, 1990). Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что в клетках человека с трисомным кариотипом нарушены механизмы функционирования мембранного комплекса, что может приводить к каскаду реакций, нарушающих активность различных ферментов (McCooy, Enns, 1978; McSwigan *et al.*, 1981; Fruen, Lester, 1990; Kurup R.K., Kurup P.A., 2003).

Первые идеи относительно возможных механизмов фенотипического проявления хромосомной трисомии принадлежат J. Lejeune, обнаружившему трисомию 21. Он исходил из биохимических представлений о механизмах реализации хромосомного дисбаланса, основываясь на концепции эффекта дозы гена (Lejeune *et al.*, 1959). В дальнейшем исследователи пытались с биохимических позиций объяснить действие тройной дозы нормальных генов, картированных на хромосоме 21, на формирование проявлений трисомии 21, но они не могли объяснить генез пороков развития, генез умственной отсталости при других хромосомных аномалиях.

Представляет большой интерес теория, разработанная С. Waddington, основанная на понятии «канализация развития» (Waddington, 1942). Этот автор полагал, что генотип обладает некоторой буферностью, так что развитие канализовано и обычно идет по определенным путям и эти пути развития варьируют по своей стабильности в зависимости от степени канализации. Эта теория разрабатывалась на примере хромосомных трисомий. Предполагалось, что трисомия нарушает баланс в генотипе и степень канализации уменьшается. Отсюда следует, что те признаки, которые слабо канализованы, при трисомии будут страдать в большей степени, чем жестко канализованные. Это было подтверждено путем изучения дерматоглифики и размеров полости рта у больных с синдромом Дауна (Shapiro, 1975). Этот феномен назван «разветвленной нестабильностью развития» (Shapiro, 1983, 1994). Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что у больных с трисомным кариотипом некоторые пороки развития встречаются с частотой, в десятки раз превышающей популяционные частоты (Källén *et al.*, 1996; Pont *et al.*, 2006). Главное достоинство этой теории состоит в том, что она связывает фенотипические эффекты трисомии с фундаментальным феноменом изменчивости. Долгое время в качестве основы реализации трисомного кариотипа на фенотип носителя рассматривались только две гипотезы, часто противопоставлявшиеся друг другу, – «эффект дозы гена» и «разветвленная нестабильность развития».

В изучении проблемы влияния хромосомного дисбаланса на фенотип носителя важное значение имеет проблема фенотипического анализа становления аномалий, свойственных большинству хромосомных болезней. Например, пороки сердца часто встречаются при хромосомных аномалиях. Сопоставление различных стадий эмбрионального развития сердца с картиной дефектов, обнаруживаемых при хромосомных аномалиях, показывает, что эти дефекты представляют собой нормальные структуры для определенных стадий развития сердца. Таковы овальное отверстие, открытый аортальный проток, различные дефекты в перегородках сердца. Аномалия состоит не в том, что данная структура возникает, а в том, что она существует в то время, когда она должна была бы исчезнуть.

Общепризнано, что главной тенденцией в эволюции человека является феномен неотении (Montagu, 1955; Bjorklund, 1997). Под неотенией подразумевают эволюционные изменения, состоящие в сохранении инфантильных признаков, эволюция как будто изменила процесс развития таким образом, что промежуточные стадии предка сделались окончательными формами у потомка. Существование такого эволюционного процесса заставляет думать, что в популяции человека имеется огромный резерв изменчивости. По-видимому, в наибольшей степени изменчивы именно завершающие стадии каждого отдельно взятого этапа развития. Иными словами, начальные стадии развития какой-либо структуры или органа более стабильны, нежели конечные. Это логическое допущение, подкрепляемое фактом широкого распространения в популяции мелких девиаций поздносозревающих структур (например, клинодактилия и мелкие варианты развития кисти и стоп). Речь идет не о стабильной блокаде развития, а именно о торможении созревания, которое продолжается, но медленно. В. Hall (1965) детально обследовал развитие клинодактилии, которая является наиболее распространенной аномалией конечностей при хромосомных синдромах. Показано, что имеется длительная задержка развития средней фаланги мизинца, в ряде случаев эта аномалия исчезает с возрастом, т. е. происходит постнатальное дозревание структур, которые должны были полностью сформироваться внутриутробно. Также В. Hall (1965) обратил наше внимание на то, что ушная раковина у детей с синдромом Дауна сходна с ушной раковиной плода. С увеличением возраста больных с синдромом Дауна увеличивается частота нормальных пропорций головы и лица (Farkas *et al.*, 2002).

Стадия созревания (матuration) структур весьма подвержена изменчивости. В масштабе клеточной системы под созреванием можно подразумевать смену одной клеточной популяции другой, например, смена фетальных эритроцитов с фетальным гемоглобином эритроцитами, которые образуются у взрослых индивидов. Создаются большие возможности для стохастических изменений под влиянием самых различных факторов. Известно, что свойства мультимера определяются пропорцией разных полипеп-

тидных цепей. Изменения в числе хромосом в клетке могут приводить к преобладанию какого-то определенного типа полипептидов, поэтому вероятностный процесс самосборки приведет к формированию белка, в котором пропорция цепей будет иная, чем в норме (Тамаркина и др., 1978). Таким образом, несовершенная матурация белков клеток и клеточных сообществ может быть вызвана хромосомными аномалиями и быть причиной персистенции онтогенетически ранних структур. Классическим примером персистенции эмбриональных черт у родившегося ребенка является персистенция эмбрионального гемоглобина при трисомии 13, когда популяция плодных эритроцитов вовремя не замещается взрослыми эритроцитами, характерными для нормальных детей.

При анализе патогенеза наиболее частых аномалий, обнаруживаемых при хромосомных болезнях, можно отметить следующие основные положения.

1. Хромосомные аномалии не приводят к возникновению каких-либо особых пороков развития. Пороки, составляющие сущность патологии при хромосомных болезнях, встречаются с определенной частотой в популяции, также могут являться результатом действия отдельных генов и тератогенных факторов.

2. Наиболее часто и наиболее тяжело поражаются органы или структуры, развивающиеся либо из парных симметричных зачатков, либо из зачатков разных тканей (глаз, мочевиная система). Основной дефект при этом – несовершенное смыкание зачатков, выраженное в различной степени. Органы, исходящие из одного зачатка, менее подвержены порокам, например практически не встречаются при хромосомных аномалиях пороки развития печени, селезенки, поджелудочной железы.

3. Можно предположить, что хромосомные аномалии приводят к дефектам заключительных фаз формирования дефинитивного органа. Хромосомная аномалия препятствует окончательному формированию наиболее поздно возникающих структур, причем таких, которые и при нормальном кариотипе довольно изменчивы в степени своей завершенности. Если представить себе, что в отношении признака «завершенное формообразование органа» существует изменчивость в ранге «запаздывание

формообразования – преждевременное формообразование», то получается, что хромосомная аномалия сдвигает изменчивость в этом ряду в сторону запаздывания. Следствием этого является то, что хромосомные аномалии в основном проявляются в персистенции ранних онтогенетических образований. Это касается не только морфологических образований, но и биохимических признаков. Иными словами, для большинства структур патологические отклонения (пороки развития) возможны только в одном направлении – при недоразвитии до окончательного состояния. Именно этим и объясняется гипоморфный эффект хромосомных аномалий.

4. Экспрессивность хромосомных аномалий варьирует в широких пределах так же, как экспрессивность доминантных генов, приводящих к возникновению сходных по фенотипу пороков. Например, при синдроме Холт-Орама экспрессивность у носителя гена в одной семье может варьировать от полного отсутствия конечности и тяжелейшего порока сердца (у ребенка) до легкой степени гипоплазии лучевой кости и субклинического порока сердца у родителя. Одна и та же хромосомная аномалия может быть причиной прекращения развития зародыша и может быть обнаружена у живорожденного ребенка. Большое значение для экспрессии фенотипа хромосомной аномалии имеет генетический фон носителя. Аутосомные трисомии, возникающие у диких мышей, имеют более грубый фенотип, чем у лабораторных мышей (Dyban, Vaganov, 1987). В семьях с сегрегирующей сбалансированной транслокацией хромосом члены семьи, в кариотипе которых обнаружена частичная трисомия, не имеют абсолютного сходства спектра аномалий. Сходство в этом отношении между хромосомными аномалиями и доминантными генами позволяет думать о сходстве и в путях фенотипической реализации. Это сходство позволяет, пусть и несколько формально, рассматривать хромосомную аномалию как мутацию с гипоморфным эффектом, с варьирующей экспрессивностью и пенетрантностью. Экспрессивность в данном случае может быть измерена тяжестью дефектов, а пенетрантность – долей лиц в популяции, имеющих данную хромосомную аномалию, но не имеющих фенотипических проявлений. Эти взгляды также

были поддержаны авторами большой сводки по цитогенетике эмбрионального развития человека (Баранов, Кузнецова, 2006).

В настоящее время имеется много данных об изменении активности генов/транскрипционной активности генов, картированных на разных хромосомах, в клетках, полученных от индивидов с различными хромосомными аномалиями (Анненков, 1980; FitzPatrick *et al.*, 2002; Cheon *et al.*, 2003; Deutsch *et al.*, 2005; Rosovski *et al.*, 2007; Slonim *et al.*, 2009; а также см. обзор Patterson, 2009). Данные этих работ свидетельствуют о значительном дисбалансе экспрессии многих эуплоидных генов, в том числе генов, участвующих в процессах пролиферации, дифференциации, апоптоза, имеющих отношение к формированию цитоскелета клеток.

Предлагаемая клеточная схема реализации хромосомного дисбаланса может иметь следующий вид. Имеются значительное изменение экспрессии генов, картированных на трисомных хромосомах, и глобальная дисрегуляция активности генов, картированных на эуплоидных хромосомах. Все это приводит к изменению функциональной активности как отдельных клеток, так и клеточных сообществ, что в конечном итоге приводит к персистенции ранних онтогенетических образований, незавершенному формообразованию, что при рождении детей с хромосомными аномалиями регистрируется как пороки развития, дизморфии, отставание в развитии.

## ЛИТЕРАТУРА

- Анненков Г.А. Исследование эффектов доз генов и проблема регуляции генной экспрессии в клетках с хромосомными aberrациями // Вестник АМН СССР. 1980. № 6. С. 55–58.
- Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития человека. СПб.: Изд-во Н-Л, 2006. 611 с.
- Гринберг К.Н. Цитологические проявления хромосомного дисбаланса // Прогресс в медицинской генетике. М.: Медицина, 1978. С. 151–186.
- Гринберг К.Н. Клеточная генетика в изучении наследственных болезней // Вестник АМН СССР. 1982. № 6. С. 76–81.
- Гринберг К.Н., Витковски Р. Клеточная генетика // Перспективы медицинской генетики. М.: Медицина, 1982. С. 66–93.
- Гринберг К.Н., Терехов С.М. Хромосомный дисбаланс и пролиферативный потенциал клеток *in vitro* // Бюл. эксперим. биол. медицины. 1985. Т. 99. № 2. С. 191–193.

- Кухаренко В.И., Хохлова Ю.В. Уровень цАМФ и цГМФ в клетках спонтанных абортусов с трисомным и триплоидным кариотипом // *Вопр. мед. химии*. 1989. Т. 35. № 4. С. 73–75.
- Лазюк Г.И. Патологическая анатомия и дифференциальный диагноз хромосомных болезней, обусловленных изменениями в системе аутосом: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Каунас, 1974. 46 с.
- Тамаркина А.Д., Анненков Г.А., Кулиев А.М., Гринберг К.Н. Изучение ферментов в культивируемых фибробластах человека. Сообщение IV. Активность ферментов в С-трисомных штаммах // *Генетика*. 1975. Т. 11. № 4. С. 142–145.
- Тамаркина А.Д., Филиппов И.К., Анненков Г.А., Бенишвили Г.Х. Изменение соотношения мольных долей субъединиц лактатдегидрогеназы в лимфоцитах больных с синдромом Дауна // *Генетика*. 1978. Т. 14. № 2. С. 354–358.
- Фрейдин М.И., Гринберг К.Н., Кауров Б.А. Движение *in vitro* эмбриональных фибробластов человека с нормальными и аномальными наборами хромосом // *Цитология*. 1988. Т. 30. № 6. С. 718–725.
- Alsdorf R., Wyszynski D.F. Teratogenicity of sodium valproate // *Expert Opin. Drug Saf.* 2005. V. 4. No. 2. P. 345–353.
- Bjorklund D.F. The role of immaturity in human development // *Psychol. Bull.* 1997. V. 122. No. 2. P. 153–169.
- Blakeslee A.F. Variation in *Datura* due to changes in chromosome number // *Am. Naturalist*. 1922. V. 56. P. 16–31.
- Carter K.C. Early conjectures that Down syndrome is caused by chromosomal nondisjunction // *Bull. Hist. Med.* 2002. V. 76. No. 3. C. 528–563.
- Cheon M.S., Shim K.S., Kim S.H. *et al.* Protein levels of genes encoded on chromosome 21 in fetal Down syndrome brain: Challenging the gene dosage effect hypothesis (Part IV) // *Amino Acids*. 2003. V. 25. No. 1. C. 41–47.
- Cure S., Boué J., Boué A. Growth characteristics of human embryonic cell lines with chromosomal anomalies // *Biomedicine*. 1974. V. 21. No. 5. P. 233–236.
- Delvig A.A., Kukhareno V.I., Belkin V.M. *et al.* Collagen and fibronectin synthesis by trisomic and triploid fibroblasts from human spontaneous abortuses // *Mol. Gen. Genet.* 1987. V. 209. No. 3. P. 592–595.
- Deutsch S., Lyle R., Dermitzakis E.T. *et al.* Gene expression variation and expression quantitative trait mapping of human chromosome 21 genes // *Hum. Mol. Genet.* 2005. V. 14. No. 23. P. 3741–3749.
- Dyban A.P., Baranov V.S. *Cytogenetics of Mammalian Embryonic Development*. Oxford: Clarendon Press, 1987. 362 p.
- Edwards J.H., Harnden D.G., Cameron A.H. *et al.* A new trisomic syndrome // *Lancet*. 1960. V. 1. No. 7128. P. 787–790.
- Farkas L.G., Katic M.J., Forrest C.R. Age-related changes in anthropometric measurements in the craniofacial regions and in height in Down's syndrome // *J. Craniofac. Surg.* 2002. V. 13. No. 5. P. 614–622.
- FitzPatrick D.R., Ramsay J., McGill N.I. *et al.* Transcriptome analysis of human autosomal trisomy // *Hum. Mol. Genet.* 2002. V. 11. No. 26. P. 3249–3256.
- Fruen B.R., Lester B.R. Down's syndrome fibroblasts exhibit enhanced inositol uptake // *Biochem. J.* 1990. V. 270. No. 1. P. 119–123.
- Grinberg K., Kukhareno V. Phenotypic effects of human aneuploidy: hypothesis of nonspecific teratological interaction // *Proc. of the 24 Annual Meeting European Society of Human Genetics*. Elsinore, Denmark. 1992. P. 81.
- Hall B. Delayed ontogenesis in human trisomy syndromes // *Hereditas*. 1965. V. 52. No. 3. P. 334–344.
- Henderson D.J., Copp A.J. Role of the extracellular matrix in neural crest cell migration // *J. Anat.* 1997. V. 191 (Pt 4). P. 507–515.
- Hindley D., Medakkar S. Diagnosis of Down's syndrome in neonates // *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.* 2002. V. 87. No. 3. P. F220–221.
- Källén B., Mastroiacovo P., Robert E. Major congenital malformations in Down syndrome // *Am. J. Med. Genet.* 1996. V. 65. No. 2. P. 160–166.
- Karlsson J.O., Sjöstedt A., Wahlström J. *et al.* Cyclic guanosine monophosphate metabolism in human amnion cells trisomic for chromosome 21 // *Biol. Neonate*. 1990. V. 57. No. 6. P. 343–348.
- Kukhareno V.I., Delvig A.A., Grinberg K.N. Disturbances in collagen synthesis in trisomic cells from spontaneously aborted embryos // *Hum. Genet.* 1984. V. 68. No. 3. P. 269–271.
- Kukhareno V.I., Kuliev A.M., Grinberg K.N. *et al.* Cell cycles in human diploid and aneuploid strains // *Humangenetik*. 1974. V. 24. No. 4. P. 285–296.
- Kukhareno V.I., Pichugina E.M., Freidin M.I. *et al.* Synthesis of glycosaminoglycans in fibroblasts from abortuses with trisomy, triploidy, and from children with Down's syndrome // *Hum Genet.* 1991. V. 87. No. 5. P. 592–596.
- Kuliev A.M., Grinberg K.N., Kukhareno V.I. *et al.* Monosomy 21 in a human spontaneous abortus. Morphogenetic disturbances and phenotype at the cellular level // *Hum. Genet.* 1977. V. 38. No. 2. P. 137–145.
- Kuliev A.M., Kukhareno V.I., Grinberg K.N. *et al.* Investigation of a cell strain with trisomy 14 from a spontaneously aborted human fetus // *Humangenetik*. 1974. V. 21. No. 1. P. 1–12.
- Kurup R.K., Kurup P.A. Hypothalamic digoxin-mediated model for trisomy 21 // *Pediatr. Pathol. Mol. Med.* 2003. V. 22. No. 5. P. 411–422.
- Lejeune J., Turpin R., Gautier M. Mongolism; a chromosomal disease (trisomy) // *Bull. Acad. Natl. Med.* 1959. V. 143. No. 11/12. P. 256–265.
- McCoy E.E., Enns L. Sodium transport ouabain binding, and (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase activity in Down's syndrome platelets // *Pediatr. Res.* 1978. V. 12. No. 6. P. 685–689.
- McSwigan J.D., Hanson D.R., Lubiniecki A. *et al.* Down syndrome fibroblasts are hyperresponsive to beta-adrenergic stimulation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981. V. 78. No. 12. P. 7670–7673.
- Montagu M.F.A. Time, morphology, and neoteny in the evolution of man // *Am. Anthropol.* 1955. V. 57. P. 13–27.
- Neri G., Opitz J.M. Down syndrome: comments and reflections on the 50th anniversary of Lejeune's discovery // *Am. J. Med. Genet.* 2009. V. 149. Part A. P. 2647–2654.
- Ornoy A. Valproic acid in pregnancy: how much are we en-

- dangering the embryo and fetus? // *Reprod. Toxicol.* 2009. V. 28. No. 1. P. 1–10.
- Patau K., Smith D.W., Therman E. *et al.* Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome // *Lancet.* 1960. V. 1. No. 7128. P. 790–793.
- Patterson D. Molecular genetic analysis of Down syndrome // *Hum. Genet.* 2009. V. 126. P. 195–214.
- Perris R., Perissinotto D. Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration // *Mech. Dev.* 2000. V. 95. No. 1/2. P. 3–21.
- Pont S.J., Robbins J.M., Bird T.M. *et al.* Congenital malformations among liveborn infants with trisomies 18 and 13 // *Am. J. Med. Genet. A.* 2006. V. 140. No. 16. P. 1749–1756.
- Rozovski U., Jonish-Grossman A., Bar-Shira A. *et al.* Genome-wide expression analysis of cultured trophoblast with trisomy 21 karyotype // *Hum. Reprod.* 2007. V. 22. No. 9. P. 2538–2545.
- Shapiro B.L. Amplified developmental instability in Down's syndrome // *Ann. Hum. Genet.* 1975. V. 38. No. 4. P. 429–437.
- Shapiro B.L. Down syndrome – a disruption of homeostasis // *Am. J. Med. Genet.* 1983. V. 14. No. 2. P. 241–269.
- Shapiro B.L. The environmental basis of the Down syndrome phenotype // *Dev. Med. Child Neurol.* 1994. V. 36. No. 1. P. 84–90.
- Sivakumar S., Larkins S. Accuracy of clinical diagnosis in Down's syndrome // *Arch. Dis. Child.* 2004. V. 89. No. 7. P. 691.
- Slonim D.K., Koide K., Johnson K.L. *et al.* Functional genomic analysis of amniotic fluid cell-free mRNA suggests that oxidative stress is significant in Down syndrome fetuses // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. No. 23. P. 9425–9429.
- Sproles A.C. Cyclic AMP concentration in saliva of normal children and children with Downs syndrome // *J. Dent. Res.* 1973. V. 52. No. 5. P. 915–917.
- Taylor A.I. Autosomal trisomy syndromes: a detailed study of 27 cases of Edwards' syndrome and 27 cases of Patau's syndrome // *J. Med. Genetics.* 1968. V. 5. No. 3. P. 227–252.
- Waddington C.H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters // *Nature.* 1942. V. 150. P. 563–565.

## REALIZATION OF THE PHENOTYPIC EFFECT OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN HUMANS

K.N. Grinberg, V.I. Kukharenko

Reproductive Genetics Institute, Chicago, USA, e-mail: kukharenko\_9@msn.com

### Summary

Factors determining the phenotype formation in patients with abnormal karyotype (including those with Down's syndrome) have been discussed for several decades. Earlier, we considered factors affecting phenotype formation in patients with chromosomal aberrations (Grinberg, 1978, 1982; Grinberg, Kukharenko, 1992). We believe that the general concept of the phenotypic manifestation of chromosomal disbalance must take into account the following factors:

1. The alteration in the number of chromosomes, in addition to specific effects connected with the dose of the genes located in a particular chromosome is accompanied by a nonspecific effect, which is manifested in the oppression of growth and development of the organism.
2. Birth defects observed in persons with chromosomal aberrations are persisting conditions, which are normal at earlier developmental stages. The main effects of chromosomal aberrations are hypomorphic. Nevertheless, these birth defects actually do not differ from developmental defects caused by particular genes and teratogenic environmental factors.
3. The phenotypic manifestation of chromosomal imbalance may be based on disturbances of the basic and elementary events in morphogenesis, occurring at the cell level. Such events are proliferation and migration of cells, specific reception, and induction relationships.
4. It is supposed that changes of metabolic homeostasis in cells with abnormal karyotypes favor the manifestation of the latent variability of structures that support the basic morphogenetic functions in cells. It is conceivable that chromosomal aberrations strengthen the evolutionarily conditioned variability towards the delay of maturation of cellular and tissue structures, which is the key link in the pathogenesis associated with chromosomal imbalance.

**Key words:** trisomy, trisomy 21, Down's syndrome, birth defects, cell maturation, developmental delay, cellular mechanisms, spontaneous abortion.

УДК 631 527.41:631.11: 633.14

## ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ АНДРОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ СОРТОВ И ПЕРСПЕКТИВНОЙ ФОРМЫ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ЗАПАДНОСИБИРСКОЙ СЕЛЕКЦИИ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ НАЛИЧИЕМ ИЛИ ОТСУТСТВИЕМ ПШЕНИЧНО-ЧУЖЕРОДНЫХ ТРАНСЛОКАЦИЙ

© 2013 г. Л.А. Першина<sup>1,2</sup>, Т.С. Осадчая<sup>1</sup>,  
Е.Д. Бадаева<sup>3</sup>, И.А. Белан<sup>4</sup>, Л.П. Россеева<sup>4</sup>

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

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия;

<sup>3</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия;

<sup>4</sup> Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Россельхозакадемии, Омск, Россия

Поступила в редакцию 26 февраля 2013 г. Принята к публикации 6 марта 2013 г.

Изучены особенности андрогенеза при культивировании пыльников у 8 сортов и перспективной формы яровой мягкой пшеницы, созданных в Западной Сибири (СибНИИСХ Россельхозакадемии, г. Омск). Изученные сорта близки по происхождению, но отличаются между собой наличием или отсутствием пшенично-чужеродных транслокаций (пшенично-ржаной 1RS.1BL и пшенично-пырейной 7DL-7A1). Перспективная форма Л-311/00-22 несет транслокацию 1RS.1BL и цитоплазму культурного ячменя *Hordeum vulgare* L. Основная цель работы – определить методические возможности для получения дигаплоидных линий у изученных генотипов, несущих пшенично-чужеродные транслокации. Выявлена неодинаковая реакция на условия культивирования пыльников разных сортов в зависимости от концентрации в инициальной среде 2.4-Д. Оптимальными оказались условия для реализации андрогенеза и получения дигаплоидных линий у формы Л-311/00-22. Обсуждается зависимость влияния чужеродно-пшеничных транслокаций на особенности андрогенеза от генотипической среды пшеницы.

**Ключевые слова:** культура пыльников, особенности андрогенеза, транслокации 1RS.1BL, 7DL-7A1, дигаплоидные линии.

### ВВЕДЕНИЕ

Один из подходов к увеличению генетического разнообразия мягкой пшеницы с целью улучшения ее хозяйственно ценных и адаптивных признаков основан на интрогрессии в ее геном чужеродного генетического материала с кластерами генов, определяющими проявление этих признаков, от других культурных злаков и

дикорастущих сородичей (Friebe *et al.*, 1996; Ji *et al.*, 2012). Полученные таким образом генотипы могут продолжительное время использоваться в качестве доноров этих генов при создании большого разнообразия сортов мягкой пшеницы (Rabinovich, 1998). Интерес представляют сорта и перспективные формы яровой мягкой пшеницы, созданные в Западной Сибири, которые несут чужеродный генетический материал



и характеризуются сочетанием хозяйственно ценных признаков с устойчивостью к грибным патогенам. Эти сорта и формы, как правило, гетерогенные и проявляют полиморфизм по ряду морфологических и физиологических признаков (Белан и др., 2010, 2012; Лайкова и др., 2013). Чтобы повысить эффективность их дальнейшего использования в селекционном процессе, необходимо выделить из них отдельные линии, а после отбора в работу включать наиболее ценные линии.

С этой целью, как правило, используют два подхода: формируют линии от отдельных зерен, отобранных из элитных растений, – метод «single seed descent» (SSD) (Thiemt, Oettler, 2008) или получают дигаплоидные линии, сформированные на основе гаплоидных растений с удвоенным числом хромосом, которые по сути являются гомозиготными (Barnabas *et al.*, 2001; Сибикеева и др., 2004). У гомозиготных организмов действие рецессивных генов проявляется наряду с доминантными, поэтому при работе с ними значительно сокращается время отбора нужных генотипов (Kasha, Maluszynsky, 2003). Кроме того, получение гомозиготных линий – это способ фиксации в одном генотипе сочетания серии целевых генов, перенесенных от разных родителей (пирамидирования генов), что дает возможность создания «идеальных» генотипов (Servin *et al.*, 2004; Ye, Smith, 2008), например с долговременной устойчивостью к биотическим факторам (Joshi, Nayak, 2010) или закрепленным гетерозисом (Maluszynski *et al.*, 2001).

Для получения дигаплоидных линий используют методы культивирования пыльников (Barnabas *et al.*, 2001), изолированных микроспор (Oleszczuk *et al.*, 2004), завязей и семяпочек (Dunwell, 1986), скрещивания с гаплопродюсерами (Guzy-Wröbelska, Szarenko, 2003). В работах с мягкой пшеницей и ее гибридами наиболее часто используют методы культивирования пыльников, предусматривающие создание условий для проявления андрогенеза – развития растений из гаплоидных клеток – микроспор (Hu *et al.*, 1983).

Разделяют три основных этапа андрогенеза *in vitro*: образование эмбриоидов; индукция эмбриоидов к регенерации проростков; развитие зеленых и хлорофилл-дефектных растений

(альбиносов) (Henry, Buysler, 1985). Каждый из этих этапов находится под независимым генетическим контролем как ядерного генома (Agache *et al.*, 1988), так и цитоплазмы (Sági, Barnabás, 1989).

Установлена роль отдельных хромосом в процессе андрогенеза пшеницы. Так, на индукцию эмбриоидов стимулирующее влияние оказывает хромосома пшеницы 4В, а на регенерацию зеленых растений – хромосомы 2А, 2В, 3А, 5В (Torg *et al.*, 2001). Интрогрессия чужеродных хромосом в геном мягкой пшеницы приводит к изменениям в проявлении особенностей андрогенеза. Так, у пшенично-ржаных замещенных линий хромосомы ржи 1R, 3R и 7R оказывают стимулирующее влияние на образование андрогенных эмбриоидов, а хромосома 5R – супрессирующее; хромосома 1R негативно влияет на регенерацию зеленых проростков, а хромосома ржи 3R, напротив, положительно (Добровольская и др., 2001, 2003). Сорта мягкой пшеницы, несущие пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL, во многих случаях характеризуются повышенной способностью к образованию андрогенных эмбриоидов в культуре пыльников (Henry, Buysler, 1985; Agache *et al.*, 1989; Foroughi-Wehr, Zeller, 1990). Присутствие в геноме мягкой пшеницы пшенично-пырейной транслокации 7DL-7Ai, носителя гена *Lr19*, определяющего устойчивость растений пшеницы к листовой ржавчине, и пшенично-эгилопной транслокации, носителя гена *Lr9*, подавляет процессы образования андрогенных эмбриоидов и регенерации зеленых растений (Sibikeeva, Sibikeev, 1996; Сибикеева и др., 2004).

Эффективность метода культивирования пыльников в конечном счете определяется тем, насколько много будет получено необходимых для дальнейшей работы дигаплоидных линий (Oleszczuk *et al.*, 2011), что в свою очередь зависит от частоты образования зеленых растений со спонтанно или индуцированно (в результате обработки колхицином) удвоенным числом хромосом. На результативность андрогенеза оказывают влияние условия выращивания исходных растений и методы предобработки пыльников (Hu *et al.*, 1983). Однако определяющим является влияние генотипа на способность пыльников к андрогенезу в условиях оптимизации состава индукционной среды (Tersi *et al.*, 2006).

В настоящей работе была поставлена задача изучить особенности андрогенеза при культивировании пыльников у сортов яровой мягкой пшеницы западносибирской селекции, близких по происхождению, но различающихся наличием или отсутствием пшенично-чужеродных транслокаций, и определить методические возможности для получения дигамплоидных линий у сортов и перспективной формы, имеющих такие транслокации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве исходного материала использовано 8 сортов яровой мягкой пшеницы (Омская 20, Омская 29, Омская 30, Омская 33, Омская 35, Омская 37, Омская 38, Казанская Юбилейная) и перспективная форма Л-311/00-22. Включенные в работу сорта являются близкими по происхождению (Трубачеева и др., 2011). Так, сорт Омская 20, происхождение которого (Скала × Саратовская 36) × (Грекум 114 × Кавказ) входит в родословную других изученных сортов, кроме сорта Омская 29 (табл. 1). При создании сорта Омская 29 была использована сестринская линия сорта Омская 20. Сорта Омская 29, Омская 37, Омская 38 являются носителями пшенично-ржаной транслокации 1RS.1BL (Трубачеева и др., 2011), унаследованной от сорта Кавказ. Кроме того, у сестринских по происхождению сортов, среднепозднего сорта

Омская 37 и среднеспелого сорта Омская 38, помимо пшенично-ржаной транслокации 1RS.1BL, присутствует и пшенично-пырейная транслокация 7DL-7Ai (Белан и др., 2010; Belan *et al.*, 2012).

Перспективная форма Л-311/00-22 имеет происхождение: (аллоплазматическая дигамплоидная линия Л-17Д) × (Lai3302 × Дружина). Линия Л-17Д получена в результате культивирования пыльников аллоплазматической рекомбинантной линии Л-17 (Першина и др., 1999а), сформированной на основе растения, выделенного среди беккроссных потомков ВС<sub>3</sub>-поколения ячменно-пшеничного гибрида *H. vulgare* L. ( $2n = 14$ ) (сорт Неполегающий) × *T. aestivum* L. ( $2n = 42$ ) (сорт Саратовская 29). При беккроссировании ячменно-пшеничного гибрида в качестве рекуррентных родителей были использованы сорта яровой мягкой пшеницы Мироновская 808 (дважды) и Саратовская 29 (Perishina *et al.*, 1998; Першина и др., 1999б). Ранее на основании изучения генов, определяющих устойчивость формы Л-311/00-22 к патогенам бурой ржавчины, предположили, что в геноме этой формы присутствует пшенично-ржаная транслокация (Е.И. Гультеяева. Личн. сообщ.). Это предположение было подтверждено с применением С-окрашивания хромосом в соответствии с методикой (Badaeva *et al.*, 1994); пшенично-ржаная транслокация была идентифицирована как 1RS.1BL (рис. 1).

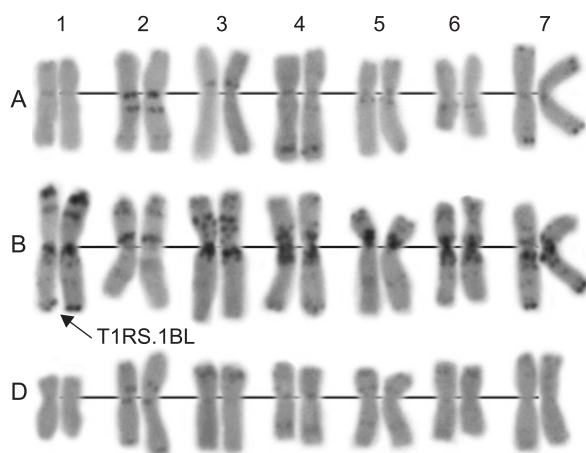
Таблица 1

Родословные сортов яровой мягкой пшеницы, созданных в СибНИИСХ СО РАСХН с привлечением сорта озимой пшеницы Кавказ

Сорта	Родословные сортов
<b>Омская 20</b>	Скала / Саратовская 36 /3/ Грекум 114 // Кавказ
Омская 29	(Дружина // Грекум 114) / Кавказ /4/ (Скала / Саратовская 36 /3/ Грекум 114 // Кавказ)*
Омская 30	<b>Омская 20</b> /3/ Дружина // Грекум 114 / Кавказ
Омская 33	<b>Омская 20</b> /3/ Дружина // Грекум 114 / Кавказ /4/ Омская 28
Омская 35	Омская 29 / Омская 30 = Омская 29 / <b>Омская 20</b> /3/ Дружина // Грекум 114 / Кавказ
Омская 37	Кавказ / Грекум 114 // Венец /3/ Бургас /4/ Тайфун /5/ <b>Омская 20</b> / Омская 24
Омская 38	Кавказ / Грекум 114 // Венец /3/ Бургас /4/ Тайфун /5/ <b>Омская 20</b> / Омская 24
Казанская Юбилейная	<b>Омская 20</b> /3/ Дружина // Грекум 114 / Кавказ /4/ Лютесценс 3/88-6

Примечание. / – первое скрещивание; // – второе скрещивание; номера всех последующих скрещиваний обозначены цифрами, заключенными в //.

\* В скобках приведено происхождение сестринской линии сорта мягкой пшеницы Омская 20.



**Рис. 1.** Результат С-окрашивания хромосом формы Л-311/00-22.

1–7 – гомеологические группы; А, В, D – геномы. Стрелкой указана пшенично-ржаная транслокация T1RS.1BL.

Исходные растения для культивирования пыльников выращивали в гидропонной теплице. По достижении микроспорами одноядерной стадии колосья из первых побегов срезали и помещали на 5–8 суток в холодильную камеру при  $t = 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . В асептических условиях колосья обрабатывали 98° спиртом. Пыльники вычленили из 8–10 колосков средней части колоса. Вычлененные пыльники помещали на агаризованную картофельную среду РП (Chuang *et al.*, 1978) без регуляторов роста и с разным содержанием 2,4-Д (0,5, 0,75, 1,0 мг/л). В качестве источника углеводов использовали сахарозу (90 г/л). Агар Vasto Difco брали в концентрации 8 г/л. После пересадки пыльники культивировали в темноте при  $t = 29\text{ }^{\circ}\text{C}$ , а с появлением первых эмбрио-подобных структур – при  $t = 24\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Эмбриоподобные структуры (ЭС), достигшие в диаметре примерно 1 мм, переносили на среду Гамборга (B5) (Gamborg, Eveleigh, 1968) без фитогормонов и культивировали при  $t = 24\text{ }^{\circ}\text{C}$  и непрерывном освещении. Развившиеся зеленые проростки на стадии трех листьев высаживали в вегетационные сосуды, наполненные мелким керамзитом, и прикрывали стаканами для поддержания влажности. В течение трех недель проростки подкармливали жидкой средой Гамборга B5, наполовину разбавленной водой.

Особенности андрогенеза оценивали по частоте пыльников, образовавших ЭС; частоте

образования ЭС; частоте образования всех и зеленых проростков к 100 культивированным пыльникам; частоте зеленых растений со спонтанным удвоением числа хромосом к общему числу образовавшихся проростков. Число хромосом у зеленых растений-регенерантов определяли по ранее описанному методу (Першина и др., 1999б). Полученные данные обрабатывали статистически (Лакин, 1980).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности андрогенеза у сортов яровой мягкой пшеницы, не имеющих чужеродного генетического материала (табл. 1), и близкого к ним по происхождению сорта Омская 29, носителя транслокации 1RS.1BL (табл. 2), изучали при культивировании пыльников на среде РП с разным содержанием 2,4-Д. Появление первых эмбриоподобных структур (ЭС) отмечали через 19–21 день с начала культивирования независимо от концентрации 2,4-Д в инициальной среде и сорта пшеницы. К ЭС относили плотные или слегка прозрачные, хорошо различимые структуры (рис. 2).

Как следует из приведенных данных, все сорта проявили способность к образованию ЭС независимо от содержания 2,4-Д в среде. Однако оценка частоты продуктивных, т. е. образовавших ЭС пыльников показывает неодинаковую реакцию разных сортов на условия культивирования пыльников в зависимости от концентрации 2,4-Д. Так, у сортов Омская 33 и Омская 35 изменение концентрации 2,4-Д в инициальной среде существенно не влияло на изменение частоты продуктивных пыльников. У сортов Омская 30 и Казанская Юбилейная частота продуктивных пыльников достоверно увеличивалась на среде с повышением содержания 2,4-Д (начиная с 0,75 мг/л и 0,5 мг/л соответственно). У сорта Омская 20, напротив, с увеличением концентрации 2,4-Д до 1 мг/л отмечалось достоверное снижение частоты продуктивных пыльников. Среда, не содержащая 2,4-Д, как и среды с добавлением 0,5 и 0,75 мг/л 2,4-Д, были одинаково эффективными для культивирования пыльников сорта Омская 20. Сравнение средних значений частоты продуктивных пыльников показало, что лучшая реакция на условия культивирования среди сортов, не содержащих чужеродного гене-

Таблица 2

Результаты культивирования пыльников сортов яровой мягкой пшеницы, не содержащих чужеродный генетический материал, на среде Р-II с разной концентрацией 2,4-Д

Генотип	Содержание в среде 2,4-Д (мг/л)	Число культивируемых пыльников	Продуктивные пыльники#		ЭС#		Всего проростков&		Зеленые проростки#	
			Число	Частота, %	Число	Частота, %	Число	Частота, %	Число	Частота, %
Омская 20	0	225	36	16,0 a	191	84,8 a	14		3	1,3
	0,5	260	37	14,2 a	135	51,9 c	8		0	–
	0,75	299	41	13,7 a	199	66,5 b	8		0	–
	1,0	102	6	5,8 b	37	36,2 d	0		–	
<b>Всего</b>		<b>886</b>	<b>120</b>	<b>13,5</b>	<b>562</b>	<b>63,4</b>	<b>30</b>	<b>5,3</b>	<b>3</b>	<b>0,3</b>
Омская 30	0	223	11	4,9 b	87	39,0 b	1		0	–
	0,5	112	5	4,4 b	24	21,4 c	3		0	–
	0,75	155	18	11,6 a	54	34,8 b	1		0	–
	1,0	153	16	10,4 a	101	66,0 a	3		3	1,9
<b>Всего</b>		<b>643</b>	<b>50</b>	<b>7,7***</b>	<b>266</b>	<b>41,3***</b>	<b>8</b>	<b>3,0</b>	<b>3</b>	<b>0,4</b>
Омская 33	0	386	20	5,1 a	40	10,3 a	1		0	–
	0,5	142	6	4,2 a	19	13,3 a	1		0	–
	0,75	217	10	4,6 a	15	6,9 b	0		–	–
	1,0	198	11	5,5 a	22	11,1 a	0		–	–
<b>Всего</b>		<b>943</b>	<b>47</b>	<b>4,9***/*/</b>	<b>96</b>	<b>10,1***/****/</b>	<b>2</b>	<b>2,0</b>	<b>0</b>	
Омская 35	0	284	20	7,0 a	38	13,3 b	2		0	
	0,5	136	8	5,8 a	20	14,7 b	0		–	
	0,75	345	32	9,2 a	105	30,4 a	3		0	
	1,0	157	9	5,7 a	30	19,1 b	0		–	
<b>Всего</b>		<b>922</b>	<b>69</b>	<b>7,4***</b>	<b>193</b>	<b>20,9***</b>	<b>5</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	
Казанская юбилейная	0	185	10	5,4 b	45	24,3 bc	7		0	–
	0,5	158	21	13,3 a	108	68,3 a	5		0	–
	0,75	205	30	14,6 a	69	33,6 b	3		1	0,5
	1,0	271	32	11,8 a	52	19,1 c	3		1	0,4
<b>Всего</b>		<b>819</b>	<b>93</b>	<b>11,3</b>	<b>274</b>	<b>33,4***</b>	<b>18</b>	<b>6,5</b>	<b>2</b>	<b>0,2</b>

Примечание. ЭС – эмбриоподобные структуры. Значения, отмеченные одинаковыми латинскими буквами в отдельных колонках для каждого генотипа, значимо не различаются ( $p < 0,05$ ). Разница по сравнению со значениями сорта Омская 20 достоверна при \*\*\*  $p < 0,001$ . Разница по сравнению со значениями сорта Омская 35 достоверна при /\*/  $p < 0,05$  и /\*\*\*\*/  $p < 0,001$ . # к 100 культивированным пыльникам. & к числу ЭС.

тического материала, была у сортов Омская 20 и Казанская Юбилейная (значения этих показателей составили соответственно 13,5 и 11,3 %). Сорт Омская 20 достоверно превосходит другие сорта и по частоте образования эмбриоподобных структур (ЭС) (табл. 2). При этом наибольшее значение этого показателя (84,8 %) у сорта Ом-

ская 20 отмечалось при культивировании пыльников на среде, не содержащей 2,4-Д.

Проведено сравнение особенностей андрогенеза в культуре пыльников сорта Омская 20 с сортом Омская 29, который является носителем пшенично-ржаной транслокации 1RS.1BL. Выявлено, что средний показатель частоты продук-

Таблица 3

Результаты культивирования пыльников сортов яровой мягкой пшеницы и перспективной формы Л-311/00-22, несущих пшенично-чужеродные транслокации, на среде Р-II с разной концентрацией 2,4-Д

Генотип	Содержание в среде 2,4-Д (мг/л)	Число культивируемых пыльников	Продуктивные пыльники#		ЭС#		Всего проростков&		Зеленые проростки#	
			Число	Частота, %	Число	Частота, %	Число	Частота, %	Число	Частота, %
Омская 29	0	301	22	7,3 a	101	33,5 a	18	17,8 b	1	0,3 a
	0,5	170	11	6,4 a	79	46,4 b	2	2,5 a	1	0,5 a
	0,75	897	110	12,2 b***	471	52,5 b***	137	29,0 c***	36	4,0 b***
	1,0	318	51	16,0 b	101	31,7 a	8	7,9 a	2	0,6 a
<b>Всего</b>		<b>1686</b>	<b>194</b>	<b>11,5</b>	<b>752</b>	<b>44,6/****/</b>	<b>165</b>	<b>21,9/****/</b>	<b>40</b>	<b>2,3/****/</b>
Омская 37	0	307	13	4,2 a	28	9,1 a****\	0	–	–	–
	0,75	1513	193	12,7 b***	393	29,9 b***	203	51,6***	66	4,3***
Омская 38	0	267	10	3,7 a*\	5	1,8 a****\	0	–	–	–
	0,75	1048	59	5,6 a***(***)	109	10,4***(***)	18	16,5***(***)	0	–
Л-311/00-22	0	185	5	2,7 a**\	20	10,8 a****\	0	–	–	–
	0,75	1223	209	17,1 b	960	78,4 b	685	71,3	198	16,1

Примечание. ЭС – эмбриоподобные структуры. Значения, отмеченные одинаковыми латинскими буквами в отдельных колонках для каждого отдельного генотипа, значимо не различаются ( $p < 0,05$ ). Разница по сравнению с формой Л-311/00-22 достоверна при \*\*\*  $p < 0,001$ , по сравнению с сортом Омская 37 достоверна при (\*\*\*)  $p < 0,001$ , по сравнению с сортом Омская 20 (см. табл. 2) достоверна при \*\*\*\*/  $p < 0,001$ , по сравнению с сортом Омская 29 достоверна при \*\  $p < 0,05$ , \*\*\  $p < 0,01$  и \*\*\*\*\  $p < 0,001$ . # к 100 культивированным пыльникам. & к числу ЭС.

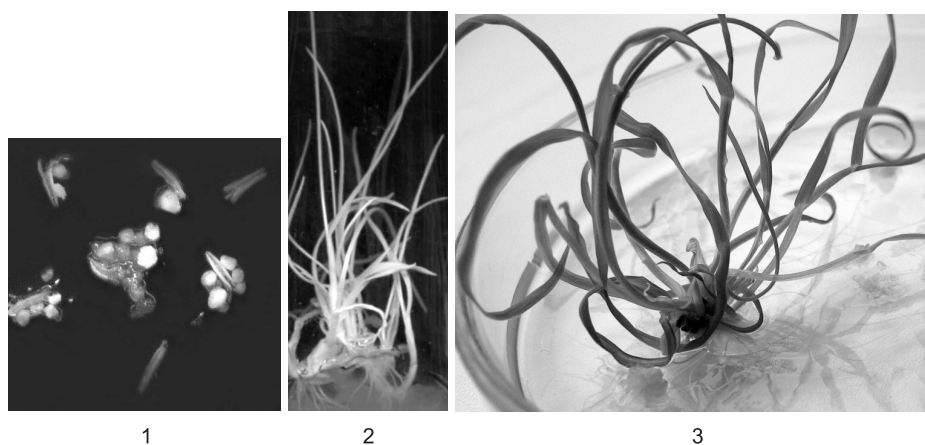


Рис. 2. Эмбриоподобные структуры, образовавшиеся при культивировании пыльников (1), хлорофилл-дефектные проростки (2) и нормальные проростки (3), развившиеся в результате культивирования эмбриоподобных структур.

тивных пыльников у сорта Омская 29 (11,5 %) (табл. 3) достоверно не отличается от значения этого показателя у сорта Омская 20 (13,5 %), а частота образования ЭС у сорта Омская 29 (44,6%) достоверно ниже, чем у сорта Омская 20

(63,4 %). Можно предположить, что генотипическая среда сорта Омская 29 не способствовала стимулирующему влиянию пшенично-ржаной транслокации 1RS.1BL на образование андрогенных эмбриоидов в культуре пыльников, как

это было отмечено у многих ранее изученных сортов мягкой пшеницы – носителей этой же транслокации (Henry, Buysen, 1985; Agache *et al.*, 1989; Foroughi-Wehr, Zeller, 1990).

Что касается регенерационной способности эмбриоподобных структур (ЭС), охарактеризованной по частоте образования всех проростков (зеленых и альбиносов) (рис. 2), то у всех сортов, не имеющих чужеродного генетического материала, включая и сорт Омская 20, значения этого показателя были достоверно ниже, чем у сорта Омская 29 (табл. 2, 3).

У сорта Омская 29 частота продуктивных пыльников была наиболее высокой при культивировании на средах с 0,75 мг/л и 1,0 мг/л 2,4-Д. Однако, если судить по таким показателям андрогенеза, как частота образования ЭС и частота образования всех и зеленых проростков, то следует, что для сорта Омская 29 оптимальной является инициальная среда, содержащая 0,75 мг/л 2,4-Д (табл. 3). Таким образом, в результате проведения этой части работы для сорта Омская 29, носителя пшенично-ржаной транслокации, оптимизированы условия культивирования для получения зеленых растений.

При культивировании пыльников сортов яровой мягкой пшеницы Омская 37 и Омская 38 и формы Л-311/00-22 – носителей пшенично-чужеродных транслокаций использовали два состава индукционной среды – безгормональную и с добавлением 0,75 мг/л 2,4-Д. Установлено, что инициальная среда, не содержащая 2,4-Д, не является эффективной для индукции эмбриоподобных структур из пыльников у этих генотипов по сравнению с сортом Омская 29 (табл. 3). Более того, те немногочисленные ЭС структуры, которые образовались на среде без 2,4-Д у сортов Омская 37 и Омская 38 и формы Л-311/00-22 в отличие от сорта Омская 29 не проявили способности к регенерации проростков. Вместе с тем известно, что при культивировании изолированных микроспор тритикале безгормональная инициальная среда наиболее эффективна как для индукции эмбриоидов, так и для регенерации зеленых растений (Pauk *et al.*, 2000).

Благоприятной для культивирования пыльников сортов Омская 37 и Омская 38 и формы Л-311/00-22 оказалась инициальная среда с добавлением 7,5 мг/л 2,4-Д. Вместе с тем обращает на себя внимание разная реакция двух

сестринских сортов яровой мягкой пшеницы, среднепозднего сорта Омская 37 и среднеспелого сорта Омская 38 на условия культивирования пыльников. У сорта Омская 38 все изученные показатели андрогенеза были достоверно ниже, чем у сорта Омская 37, а все регенерировавшие проростки у сорта Омская 38 были хлорофилл-дефектными (альбиносами) (табл. 3). Оба сорта несут по две транслокации – пшенично-ржаную 1RS.1BL и пшенично-пырейную 7DL-7Ai. Уже подчеркивалось, что короткое плечо хромосомы 1RS в составе транслокации 1RS.1BL несет гены, стимулирующие образование эмбриодов в культуре пыльников (Henry, Buysen, 1985; Agache *et al.*, 1989; Foroughi-Wehr, Zeller, 1990), а присутствие транслокации 7DL-7Ai в геноме пшеницы приводит к подавлению процессов андрогенеза (Sibikeeva, Sibikeev, 1996; Сибикеева и др., 2004). Учитывая различия, выявленные при изучении особенностей реакции сортов Омская 37 и Омская 38, носителей одних и тех же транслокаций, на условия культивирования пыльников, можно говорить о разной степени влияния генотипической среды у среднепозднего сорта Омская 37 и среднеспелого сорта Омская 38 на проявление признаков андрогенеза.

Известно, что эмбриогенная способность пыльников и регенерационная способность андрогенных эмбриоидов зависят не только от генотипа, но и от условий выращивания растений-доноров. Например, при выращивании растений-доноров в искусственных условиях (теплицы, оранжереи, ростовые камеры, где нарушено освещение) во многих случаях не удавалось индуцировать образование эмбриоидов из пыльников (Жоносарь, 2009) или регенерацию проростков из эмбриоидов (Иванов, 2006). Это наиболее актуально для генотипов, чувствительных к качеству освещения и продолжительности светового дня (Жоносарь, 2009), поскольку при изменении условий освещения в тканях растений происходит нарушение соотношения и уровня эндогенных фитогормонов. В свою очередь, это затрудняет оптимизацию состава культуральных сред за счет введения экзогенных фитогормонов. По-видимому, в нашей работе условия выращивания растений-доноров сорта Омская 38 в теплице явились одной из причин негативной реакции этого сорта на условия культивирования пыльников.

Другая реакция на условия культивирования пыльников отмечена у формы Л-311/00-22, также выращенной в условиях гидропонной теплицы, при использовании инициальной среды, содержащей 0,75 мг/л 2,4-Д (табл. 3). У этой формы наиболее высокими по сравнению с изученными сортами оказались значения всех показателей андрогенеза (частота продуктивных пыльников, частота образования ЭС, регенерационная способность ЭС и частота образования зеленых проростков). В результате культивирования пыльников на среде с 0,75 мг/л 2,4-Д у формы Л-311/00-22 было получено 198 зеленых проростков (16,1 % к числу культивированных пыльников), что достоверно выше, чем у сортов Омская 29 – 40 зеленых проростков (4 %) и Омская 37 – 66 зеленых проростков (4,3 %) (табл. 3). Следует подчеркнуть, что форма Л-311/00-22, несущая пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL, является аллоплазматической (имеет цитоплазму культурного ячменя) (Першина и др., 1999б). Ранее в наших работах было показано, что пыльники аллоплазматических линий мягкой пшеницы *Hordeum vulgare*-(*Triticum aestivum*) в условиях *in vitro* характеризуются высокой эмбриогенной способностью (Першина и др., 1993, 1999а). Таким образом, у формы Л-311/00-22 имеются два генетических фактора, которые могут оказывать положительное влияние на проявление признаков андрогенеза.

Что касается частоты образования спонтанных дигаметоидов ( $2n = 42$ ), характеризующихся в отличие от стерильных гаплоидов ( $2n = 21$ ) фертильностью, то достоверных различий между значениями этого показателя андрогенеза у сортов Омская 37 и Омская 38 и формы Л-311/00-22 не выявлено. Так, у формы Л-311/00-22 получено 62 фертильных дигаметоидов ( $31,3 \pm 3,2$  %), у сорта Омская 29 – 9 ( $22,5 \pm 6,6$  %), а у сорта Омская 37 – 16 дигаметоидных фертильных растений ( $24,2 \pm 5,2$  %). Можно предположить, что на процесс спонтанного удвоения числа хромосом у андрогенных растений влияние генотипического разнообразия не значительно, как это отмечалось ранее (Першина и др., 1999а; Добровольская и др., 2001).

На основе полученных андрогенных растений формы Л-311/00-22 и сортов Омская 29 и Омская 37, у которых произошло удвоение хромосом, сформированы дигаметоидные линии.

Эти линии включены в работу по изучению проявления хозяйственно ценных и адаптивных признаков, в исследования по изучению передачи пшенично-чужеродных хромосом в процессе андрогенеза и характеристик цитоплазматических геномов после действия стрессовых условий культивирования *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (11-04-00806а; 11-04-00126а); Интеграционной программы СО РАН совместно с СО РАСХН № 60; программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие» № 30.36.

## ЛИТЕРАТУРА

- Белан И.А., Россеева Л.П., Трубочеева Н.В. и др. Особенности хозяйственно ценных признаков линий сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37, несущих пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 4. С. 632–640.
- Белан И.А., Россеева Л.П., Россеев В.М. и др. Изучение хозяйственно-ценных и адаптивных признаков у линий сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37, несущих транслокации 1RS.1BL и 7DL-7Ai // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012. Т. 16. № 1. С. 178–186.
- Добровольская О.Б., Першина Л.А., Кравцова Л.А. и др. Влияние хромосом ржи на особенности андрогенеза у пшенично-ржаных замещенных линий *Triticum aestivum* L. Сорта Саратовская 29/*Secale cereale* L. сорта Онохойская и тритикале // Генетика. 2001. Т. 37. № 5. С. 624–630.
- Добровольская О.Б., Першина Л.А., Кравцова Л.А., Щапова А.И. Сравнение эффекта хромосом ржи 1R и 5R на особенности андрогенеза при культивировании пыльников пшенично-ржаных замещенных линий в зависимости от происхождения // Генетика. 2003. Т. 39. № 4. С. 570–574.
- Жоносарь М.В. Оптимизация технологии получения удвоенных гаплоидов мягкой пшеницы, различающихся по генам фотопериодической чувствительности (*Ppd*) и продолжительности яровизации (*Vrd*): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Одесса, 2009. 20 с.
- Иванов Г.И. Биотехнологические аспекты создания исходного материала для селекции зерновых колосовых культур: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Краснодар, 2006. 45 с.
- Лайкова Л.И., Белан И.А., Бадаева Е.Д. и др. Создание и изучение сорта яровой мягкой пшеницы «Памяти Майстренко» с интрогрессивной генетической материальной от синтетического гексаплоида *Triticum timopheevii* Zhuk. Ч *Aegilops tauschii* Coss. // Генетика. 2013. Т. 49. № 1. С. 103–112.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1980. 294 с.
- Першина Л.А., Белова Л.И., Девяткина Э.П. и др. Эффективность получения гаплоидных растений в культуре пыльников и при отдаленных скрещиваниях злаков //

- Физиология и биохимия культурных растений. 1999а. Т. 31. № 3. С. 196–202.
- Першина Л.А., Нумерова О.М., Белова Л.И. и др. Особенности андрогенеза у мягкой пшеницы межвидовых и межродовых гибридов // Сиб. биол. журнал. 1993. С. 3–8.
- Першина Л.А., Нумерова О.М., Белова Л.И. и др. Восстановление фертильности у беккроссных потомков ячменно-пшеничных гибридов *Hordeum vulgare* L. ( $2n = 14$ ) × *Triticum aestivum* L. ( $2n = 42$ ) в зависимости от генотипов пшеницы, введенных в возвратные скрещивания // Генетика. 1999б. Т. 35. № 2. С. 228–236.
- Сибикеева Ю.Е., Сибикеев С.Н., Крупнов В.А. Влияние *Lr19*-транслокации на андрогенез *in vitro* и наследование устойчивости к листовой ржавчине в популяциях  $DH_3$ -линий и  $F_2$  гибридов мягкой пшеницы // Генетика. 2004. Т. 40. № 9. С. 1224–1228.
- Трубачеева Н.В., Россеева Л.П., Белан И.А. и др. Особенности сортов яровой мягкой пшеницы Западной Сибири, несущих пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL // Генетика. 2011. Т. 47. С. 18–24.
- Agache S., Bacheller B., Buysse J. *et al.* Genetic control of anther culture response in wheat using aneuploid, chromosome substitution and translocation lines // *Theor. Appl. Genet.* 1989. V. 77. P. 7–11.
- Agache S., Buysse J., Snape J. Studies of the genetic relationship between anther culture and somatic tissue culture abilities in wheat // *Plant Breed.* 1988. V. 100. P. 26–33.
- Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S., Filatenko A.A. Intraspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum* // *Plant Syst. Evol.* 1994. V. 192. No. 1. P. 117–145.
- Barnabas B., Szakacs É., Karsai I., Bedő Z. *In vitro* androgenesis of wheat: from fundamental to practical application // *Euphytica.* 2001. V. 119. P. 211–216.
- Belan I.A., Rosseeva L.P., Rosseev V.M. *et al.* Using of alien genetic material in spring bread wheat breeding in Western Siberia // *Eur. Cereals Genet. Co-op. Newslett.* 2012. P. 113–115.
- Chuang C.C., Ouyang J.W., Chia H. *et al.* A set of potato media for wheat anther culture // *Proc. Symp. Plant Tissue Culture.* Peking: Sci. Press., 1978. P. 51–56.
- Dunwell J.M. Pollen, ovule and embryo culture as tools in plant breeding // *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications* / Eds L.A. Withes, P.G. Alderson. London; Butterworths, 1986. P. 375–404.
- Friebe B., Jiang J., Raupp W.J. *et al.* Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status // *Euphytica.* 1996. V. 91. P. 59–87.
- Foroughi-Wehr B., Zeller F.J. *In vitro* microspore reaction of different German wheat cultivar // *Theor. Appl. Genet.* 1990. V. 79. P. 79–80.
- Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley // *Can. J. Biochem.* 1968. V. 46. P. 417–421.
- Guzy-Wróbelska J., Szarenko I. Molecular and agronomic evaluation of wheat doubled haploid lines obtained through maize pollination and anther culture methods // *Plant Breeding.* 2003. V. 122. P. 305–313.
- Henry Y., Buysse J. Effect of the 1B/1R translocation on anther-culture ability in wheat // *Plant Cell Rep.* 1985. V. 4. P. 307–310.
- Hu D., Tang Y., Yuan Z., Wang J. The induction of pollen sporophytes of winter wheat and the development of the new variety 'Jiughua No 1' // *Sci. Agric. Sin.* 1983. V. 1. P. 29–35.
- Ji J., Zhang A., Wang Z. *et al.* A wheat-*Thinopyrum ponticum*–rye trigeneric germplasm line with resistance to powdery mildew and stripe rust // *Euphytica.* 2012. V. 188. P. 199–207.
- Joshi R.K., Nayak S. Gene pyramiding – a broad spectrum technique for developing durable stress resistance in crop // *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 2010. V. 5. P. 51–60.
- Kasha K.J., Maluszynski M. Production of doubled haploids in crop plants // *Doubled Haploid Production in Crop Plants* / Eds M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 2003. P. 1–4.
- Maluszynski M., Szarejko I., Barriga P., Balcerzyk A. Heterosis in crop mutant crosses and production of high yielding lines using doubled haploid systems // *Euphytica.* 2001. V. 120. P. 387–398.
- Oleszczuk S., Rabiza-Swider J., Zimny J., Lukaszewski A.J. Aneuploidy among androgenic progeny of hexaploid triticale (× *Triticosecale* Wittmack) // *Plant Cell Rep.* 2011. V. 30. P. 575–586.
- Oleszczuk S., Sowa S., Zimny J. Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (× *Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo // *Plant Cell Rep.* 2004. V. 22. P. 885–893.
- Pauk J., Puolimatka M., Lököš T., Monostori T. *In vitro* androgenesis of triticale in isolated microspore culture // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2000. V. 61. P. 221–229.
- Pershina L.A., Numerova O.M., Belova L.I., Devyatkina E.P. Biotechnological and cytogenetic aspects of producing new wheat genotypes using hybrids // *Euphytica.* 1998. V. 100. No. 1/3. P. 239–244.
- Rabinovich S.V. Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivar of *Triticum aestivum* L. // *Euphytica.* 1998. V. 100. P. 323–340.
- Sági L., Barnabás B. Evidence for cytoplasmic control of *in vitro* microspore embryogenesis in the anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 1989. V. 78. P. 867–872.
- Servin B., Martin O.C., Mezard M., Hospital F. Toward a theory of marker-assisted pyramiding // *Genetics.* 2004. V. 168. P. 513–523.
- Sibikeeva Yu.E., Sibikeev S.N. Genetic analysis of anther culture response in wheat carrying alien translocations // *Theor. Appl. Genet.* 1996. V. 92. P. 782–785.
- Tersi M., Xynias I.N., Gouli-Vadinoudi E., Roupakias D.G. Anther culture response of  $F_1$  durum × bread wheat hybrids after colchicines // *Plant Breed.* 2006. V. 125. P. 457–460.
- Thiemt E.M., Oettler G. Agronomic performance of anther-derived haploid and single seed descent lines in crosses between primary and secondary winter triticale // *Plant Breed.* 2008. V. 127. P. 476–479.
- Torp A.M., Hansen A.L., Andersen S.B. Chromosomal regions associated with green plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture // *Euphytica.* 2001. V. 119. P. 377–387.
- Ye G., Smith K.F. Marker-assisted gene pyramiding for inbred lines development: basic principles and practical guidelines // *Intern. J. Plant Breed.* 2008. V. 2. No. 1. P. 1–10.



**FEATURES OF ANDROGENESIS IN ANTHHER CULTURES OF VARIETIES  
AND A PROMISING ACCESSION OF SPRING COMMON WHEAT BRED  
IN WEST SIBERIA DIFFERING IN THE PRESENCE OR ABSENCE  
OF WHEAT-ALIEN TRANSLOCATIONS**

**L.A. Pershina<sup>1,2</sup>, T.S. Osadchaya<sup>1</sup>, E.D. Badaeva<sup>3</sup>, I.A. Belan<sup>4</sup>, L.P. Rosseeva<sup>4</sup>**

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

<sup>2</sup> Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia;

<sup>3</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

<sup>4</sup> Siberian Research Institute of Agriculture, Russian Academy of Agricultural Sciences, Omsk, Russia

**Summary**

Androgenesis has been studied in anther cultures of eight cultivars and one promising accession of spring common wheat raised in West Siberia (Siberian Research Institute of Agriculture, Omsk, Russia). The varieties are close in origin but vary in the presence or absence of wheat-alien translocations (wheat-rye 1RS.1BL and wheat-couch grass 7DL-7Ai). The promising accession L-311/00-22 bears the 1RS.1BL translocation and the cytoplasm of cultivated barley *Hordeum vulgare* L. The main task of the study is to assess the possibility of obtaining dihaploid lines in the genotypes examined bearing wheat-alien translocations. It has been found that different accessions respond differently to anther culture conditions depending on the concentration of 2,4-D in the initial medium. Accession L-311/00-22 is best for androgenesis experiments and raise of dihaploid lines. The dependence of the effect of the genotypic environment of wheat on the effect of wheat-alien translocation on androgenesis features, is discussed.

**Key words:** anther culture, androgenesis, translocations 1RS.1BL and 7DL-7Ai, doubled haploid lines.

УДК 575.162

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ *Ppd* И *Vrn* ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ВЕГЕТАЦИОННОГО ПЕРИОДА СОРТОВ ЯЧМЕНЯ

© 2013 г. М.М. Злотина, О.Н. Ковалева, И.Г. Лоскутов, Е.К. Потокينا

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства  
им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия,  
e-mail: e.potokina@vir.nw.ru

Поступила в редакцию 24 декабря 2012 г. Принята к публикации 18 января 2013 г.

У 91 сорта ярового ячменя, допущенного к использованию на территории России и Беларуси, с помощью аллель-специфичных молекулярных маркеров проанализировано аллельное состояние генов *Vrn-H1*, *Vrn-H2*, *Vrn-H3*, *Ppd-H1* и *Ppd-H2*. В полевом эксперименте произведена оценка сроков выколашивания у сортов этой же выборки в условиях северо-запада России.

Показано, что сорта ячменя, имеющие доминантный аллель гена *Ppd-H1*, достоверно опережают другие генотипы по скорости развития (колошению) и являются более скороспелыми при возделывании в условиях длинного светового дня. Среди изученного в данном эксперименте отечественного сортамента ячменей носители доминантного аллеля *Ppd-H1* составили всего 9 %. Аллели генов *Vrn* также оказывают достоверное влияние на продолжительность периода «всходы–колошение» изученных сортов. Среди генотипов, несущих одинаковые аллели генов *Ppd-H1* и *Ppd-H2*, носители аллельной комбинации *Vrn-H1vrn-H2Vrn-H3* переходят к колошению достоверно раньше генотипов с другим сочетанием аллелей генов *Vrn*. Использование аллель-специфичных маркеров генов *Ppd* и *Vrn* может значительно упростить отбор на скороспелость и ускорить селекцию сортов на этот признак.

**Ключевые слова:** молекулярные маркеры, аллели генов *Ppd* и *Vrn*, сроки колошения, маркер-вспомогательная селекция, ячмень.

По производству ячменя (*Hordeum vulgare* L.) и занятым под этой культурой площадям Россия занимает первое место в мире (Сортовые ресурсы ..., 2010). Как скороспелая, засухоустойчивая и солевыносливая культура ячмень возделывается практически во всех регионах страны, легко приспосабливаясь к контрастным условиям климата и разнообразию почв. Для каждой климатической зоны требуются сорта с определенной продолжительностью вегетационного периода. Для Нечерноземной зоны России показано преимущество по урожайности сортов ячменя среднеспелого и позднеспелого типов (Глуховцев, 2004). На территории европейского Севера с суммой температур от 800–1000 °С до 1200–1400 °С возможно возделывание в открытом грунте

только ультраскороспелых и скороспелых холодостойких сортов (Батакова, 2011). Селекция на скороспелость затрудняется наличием корреляции между продолжительностью вегетационного периода и урожайностью. Известно, что ультраскороспелые сорта при благоприятном длинном периоде вегетации, как правило, являются менее урожайными (Лукьяненко, 1990). Однако в северных районах европейской части России с коротким и очень коротким вегетационным периодом такие сорта оказываются вне конкуренции по сравнению с потенциально более продуктивными, но в большинстве случаев невызревающими сортами (Гуляев, 1999).

Общая продолжительность вегетационного периода зерновых культур зависит от длины

отдельных межфазных периодов: всходы–колошение и колошение–созревание. У ячменя и пшеницы контроль продолжительности периода всходы–колошение в основном осуществляют генетические системы генов *Vrn* (vernalization response) и *Ppd* (photoperiod response). Гены *Ppd* определяют реакцию растений ячменя на длину дня и, как следствие, сроки зацветания и начала колошения растений в разных условиях возделывания. Гены *Vrn* определяют потребность растений в яровизации для перехода к колошению, тем самым также участвуют в регуляции скорости развития и выраженности структуры урожая ячменя. Разнообразие комбинаций аллелей генов *Ppd* и *Vrn*, встречающихся у ячменя, возможно, обуславливает адаптацию растений к различным условиям окружающей среды.

На сегодняшний день для ячменя разработаны молекулярные маркеры, позволяющие идентифицировать аллели *Vrn* и *Ppd* на больших выборках сортов и селекционных линий с помощью ПЦР и рестрикционного анализа. Целью настоящего исследования было выявление аллелей генов *Vrn* (*Vrn-H1*, *Vrn-H2*, *Vrn-H3*) и *Ppd* (*Ppd-H1*, *Ppd-H2*) у яровых сортов ячменя, возделываемых на территории России и Беларуси, а также сравнение сроков выколашивания сортов ячменя, несущих разные комбинации аллелей изучаемых генов, в условиях северо-западного региона РФ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на 91 сорте ячменя, районированном в различных климатических зонах России и сохраняемом в коллекции генофонда Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР). Данные о сроках появления всходов и начала колошения растений ячменя были получены в результате полевого эксперимента 2012 г., проведенного на Пушкинской опытной станции ВИР. Задача полевого эксперимента состояла в предварительном сравнительном анализе продолжительности фазы «всходы–колошение» у генотипов с разными сочетаниями аллелей *Vrn* и *Ppd* при выращивании в одних и тех же условиях.

Для молекулярно-генетического анализа аллелей генов *Ppd* и *Vrn* геномную ДНК

выделяли из листьев ячменя по стандартной методике с использованием СТАВ-буфера (Saghai-Maroof *et al.*, 1984). Маркирование генов *Vrn* и *Ppd* осуществляли с помощью ПЦР с использованием опубликованных аллель-специфичных праймеров (табл. 1) и рестрикционного анализа.

ПЦР проводили в термоциклере (GeneAmp PCR system 9700). При выявлении аллелей гена *Ppd-H1* в состав реакционной смеси объемом 20 мкл входили: 50–100 нг ДНК, 1 × буфер для Taq полимеразы (pH 8,6, 2,5 mM Mg<sup>2+</sup>) (Sileks), 200 мкмоль dNTPs, 0,25 мкмоль каждого праймера и 2,5 ед. Taq полимеразы (Dialat). Рестрикционный анализ проводили в общем объеме 15 мкл, содержащем 3 мкл продукта ПЦР, 1 × SEBuffer B (pH 7,6), 7,5 ед. активности эндонуклеазы *Msp I*.

При тестировании аллелей гена *Ppd-H2* в состав реакционной смеси объемом 25 мкл входили: 50–100 нг ДНК, 1 × буфер для Taq полимеразы (pH 8,6, 2,5 mM Mg<sup>2+</sup>) (Sileks), 200 мкмоль dNTPs, 0,20 мкмоль каждого праймера и 2,5 ед. Taq полимеразы (Dialat).

При маркировании аллелей гена *Vrn-H1* в состав реакционной смеси объемом 20 мкл входили: 50–100 нг ДНК, 1 × буфер для Taq полимеразы (pH 8,6, 2,5 mM Mg<sup>2+</sup>) (Sileks), 200 мкмоль dNTPs, 0,5 мкмоль каждого праймера и 2,5 ед. Taq полимеразы (Dialat).

При молекулярном анализе гена *Vrn-H2* реакционная смесь объемом 25 мкл включала: 50–100 нг ДНК, 1 × буфер для Taq полимеразы (pH 8,6, 2,5 mM Mg<sup>2+</sup>) (Sileks), 200 мкмоль dNTPs, 0,20 мкмоль каждого праймера и 2,5 ед. Taq полимеразы (Dialat).

При выявлении аллелей гена *Vrn-H3* в состав реакционной смеси объемом 25 мкл входили: 50–100 нг ДНК, 1 × буфер для Taq полимеразы (pH 8,6, 2,5 mM Mg<sup>2+</sup>) (Sileks), 200 мкмоль dNTPs, 0,20 мкмоль каждого праймера и 2,5 ед. Taq полимеразы (Dialat). Рестрикционный анализ проводили в общем объеме 15 мкл, содержащем 3 мкл продукта ПЦР, 1 × SEBuffer 2K (pH 7,6), 2,5 ед. активности эндонуклеазы *Ksp22I*.

Визуализацию продуктов ПЦР проводили с помощью электрофореза в 1,3 %-м агарозном геле в 0,5 × TBE буфере (напряжение 100–120 V, 1–1,5 ч) с добавлением бромистого этидия.

Таблица 1

Последовательности аллель-специфичных праймеров,  
опубликованные для генов *Ppd* и *Vrn* ячменя, использованные в анализе

Ген	Тестируемый аллель гена	Последовательность аллель-специфичных праймеров, использованных в анализе	Температура отжига праймеров, t°	Ожидаемый размер ДНК-фрагмента, пн	Литературный источник
<i>Ppd-H1</i>	<i>Ppd-H1</i>	Jones5-F: GATGGATTCAAAGGCAAGGA Jones5-R: CGTTAGAGCCCTGCTTCATC	60	620/MspI = = 276+269+70	Jones <i>et al.</i> , 2008
<i>Ppd-H1</i>	<i>ppd-H1</i>	Jones5-F: GATGGATTCAAAGGCAAGGA Jones5-R: CGTTAGAGCCCTGCTTCATC	60	620/MspI = = 276+339	
<i>Ppd-H2</i>	<i>Ppd-H2</i>	HvFT3-F: GTCCTCCTCCAGTATATGTC HvFT3-R: CТАCTCCCCTTGAGAACTTTC	60	1433	Kikuchi <i>et al.</i> , 2009
<i>Ppd-H2</i>	<i>ppd-H2</i>	HvFT3-F4: GGATGGATCGGATTATTATTGTATG HvFT3-R1: CTGCACATTATTTGTGATGCAA	60	1500	
<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H1</i>	Пара праймеров № 1 HvBM5A-intronI-F3b: CTTGCATGTGTTGTCGGTCT HvBM5A-intronI-R3b: GCTGGGACAAGACTCTACGG	60	830 или 344	Cockram <i>et al.</i> , 2009
<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H1</i>	Пара праймеров № 2 HvBM5A-intronI-F1: GTTCTCCACCGAGTCATGGT HvBM5A-TE-R1: AGAGATGGAGGCATGGAGCA	60	488	
<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H1/</i> <i>vrn-H1</i>	Пара праймеров № 3 HvBM5A-exon2-F1: TCCCAAGAAAАСТTGAACAACACCAG HvBM5Aexon2-R1: ATTAGGTTACATCATTTCGACCA	60	616 или 574	
<i>Vrn-H2</i>	<i>Vrn-H2</i>	HvZCCT.06F: CCTAGTTAAAACATATATCCATAGAGC HvZCCT.07R: GATCGTTGCGTTGCTAATAGTG	60	307 и 273	Karsai <i>et al.</i> , 2005
<i>Vrn-H3</i>	<i>Vrn-H3</i>	HvFT1-R: ACGTACGTCCCTTTTCGATG HvFT1-F: CGCTAGGACTTGGAGCATCT	60	350/Ksp22I = = 138+142+69	Kikuchi <i>et al.</i> , 2009
<i>Vrn-H3</i>	<i>vrn-H3</i>	HvFT1-R: ACGTACGTCCCTTTTCGATG HvFT1-F: CGCTAGGACTTGGAGCATCT	60	350/Ksp22I = = 138+211	

Оценку достоверности и степени влияния комбинации аллелей анализируемых генов на продолжительность вегетационного периода (начало колошения) проводили с помощью непараметрических критериев Краскела–Уоллеса (Kruskal–Wallis test) и Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test), с использованием программного обеспечения Statistica 5.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Маркирование аллелей генов *Ppd* ячменя

Фотопериодическая чувствительность (ФПЧ) пшеницы и ячменя контролируется главным образом локусами *Ppd*, локализованными на второй группе гомеологичных хромосом у пше-

ницы и хромосоме 2Н у ячменя. Однако эффект локусов *Ppd*, оказываемый на ФПЧ, у этих видов различен (Cockram *et al.*, 2007). У пшеницы слабая ФПЧ означает, что растения переходят к колошению на коротком дне в те же сроки, что и на длинном дне. Такая нечувствительность к короткому дню (слабая ФПЧ) у растений пшеницы определяется доминантными аллелями генов *Ppd*. Для ячменя такого эффекта не наблюдается. Присутствие доминантного аллеля *Ppd-H1* у растений ячменя определяет быструю реакцию на удлинившийся световой день и, как следствие, раннее колошение в условиях длинного дня. Задержка перехода к фазе колошения на длинном дне связана с наличием рецессивного аллеля (*ppd-H1*). В условиях короткого дня время перехода к колошению у ячменя контролируется другим локусом *Ppd-H2*, локализованным на хромосоме Н1 (Laurie *et al.*, 1995). Сообщается, что носители доминантного аллеля *Ppd-H2* в условиях короткого дня переходят к колошению раньше, чем генотипы с рецессивным аллелем *ppd-H2* (Casao *et al.*, 2011).

При сравнении последовательностей гена *Ppd-H1* у чувствительных и нечувствительных к длинному дню генотипов ячменя были выявлены 23 нуклеотидные замены (SNP, single nucleotide polymorphism), из которых 7 меняют аминокислотный состав кодируемого регуляторного белка (Turner *et al.*, 2005).

Позднее Jones с соавт. (2008) проанализировали у 87 сортов ячменя ассоциацию сроков колошения на длинном и коротком дне с аллельным полиморфизмом *Ppd-H1*. Было установлено, что одна из 23 нуклеотидных замен, выявленных ранее, а именно SNP15, демонстрирует сильную и достоверную связь с анализируемым фенотипом ячменя. SNP15 (С/Т) приводит к замене кодируемой аминокислоты пролин (*Ppd-H1*) на серин (*ppd-H1*). При сравнении картины рестрикции последовательностей гена *Ppd-H1* сорта Igr1 (доминантный аллель, AY970701) и сорта Triumph (рецессивный аллель, AY970704), опубликованных в базе данных NCBI, нами было установлено, что в случае Igr1 нуклеотидная последовательность доминантного аллеля *Ppd-H1* (SNP15(С)) имеет дополнительный сайт, узнаваемый рестриктазой *MspI*.

ПЦР была проведена с парой праймеров, Jones5-F и Jones5-R, описанных Jones с соавт.

(2008) (табл. 1), в результате чего был амплифицирован фрагмент последовательности гена размером 620 п.н., содержащий SNP15. После обработки ПЦР-продукта рестриктазой *MspI* размеры ДНК-фрагментов рецессивного аллеля *ppd-H1* составили 276+339 п.н., для доминантного аллеля *Ppd-H1* – 276+269+70 п.н. (рис. 1).

Только у 8 из 91 проанализированного сорта ячменя (9 %) был идентифицирован доминантный аллель *Ppd-H1*.

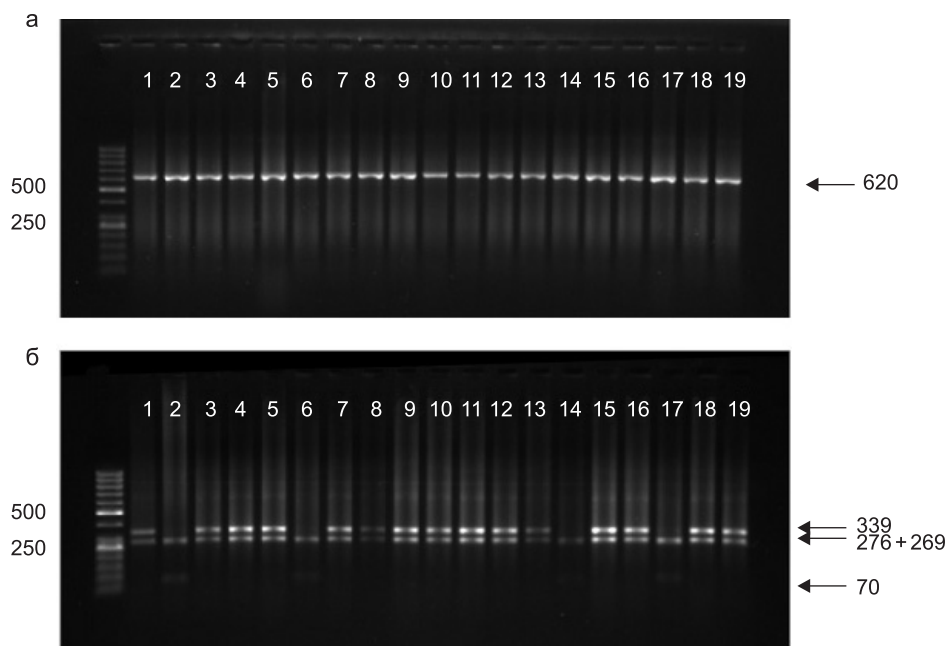
Наиболее вероятным геном-кандидатом для локуса *Ppd-H2* ячменя является *HvFT3* (Faure *et al.*, 2007). К настоящему моменту для *HvFT3* описаны доминантный и рецессивный аллели; последний представляет собой усеченный и нефункциональный вариант структуры гена, фактически псевдоген. Наличие доминантного аллеля в условиях короткого дня ускоряет переход к фазе колошения, присутствие рецессивного аллеля наоборот приводит к его задержке (Kikuchi *et al.*, 2009). Установлено, что сорт Morex содержит интактный ген *HvFT3* (доминантный аллель), включающий 4 экзона и 3 интрона, тогда как *HvFT3* у сорта Steptoe утратил почти всю структурную часть, кроме фрагмента одного из экзонов. Этот рецессивный аллель эффективно выявляется с помощью праймеров *HvFT3-F4* и *HvFT3-R1* (табл. 1). Для выявления доминантного аллеля в настоящем исследовании использовали пару праймеров *HvFT3-F* и *HvFT3-R* (Kikuchi *et al.*, 2009) (табл. 1, рис. 2).

Из 91 проанализированного сорта 88 (93 %) являлись носителями доминантного аллеля *Ppd-H2* (*HvFT3*).

### Маркирование генов *Vrn-H1*, *Vrn-H2* и *Vrn-H3* ячменя

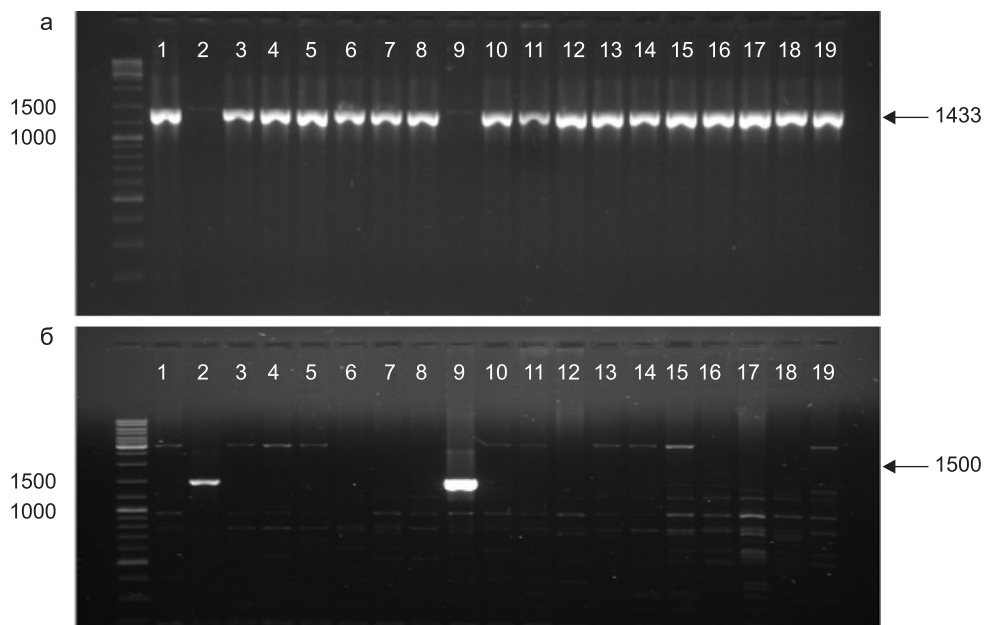
Реакция на яровизацию у ячменя контролируется тремя основными генами *Vrn-H1*, *Vrn-H2* и *Vrn-H3*, локализованными на хромосомах 5Н, 4Н и 7Н соответственно. Озимыми, т. е. восприимчивыми к яровизации, являются носители аллельной комбинации *vrn-H1 Vrn-H2 vrn-H3*, тогда как остальные аллельные комбинации этих трех генов ассоциированы с «яровым» типом развития (Takahashi, Yasuda, 1971).

Ген *VRN1* кодирует AP1-подобный MADS-бокс-транскрипционный фактор, необходимый



**Рис. 1.** Выявление доминантного (276+269+70 п.н.) и рецессивного (276+339 п.н.) аллелей гена *Ppd-H1* с помощью CAPS маркера у сортов: 1 – Чакинский 221; 2 – Мамлюк; 3 – Тандем; 4 – Danuta; 5 – Первоцелинник; 6 – Симон; 7 – Никита; 8 – Омский 91; 9 – Казьмински; 10 – Натали; 11 – Зерноградец 770; 12 – Margret; 13 – Messina; 14 – Одесский 22; 15 – Владимир; 16 – Велес; 17 – Биом; 18 – Бином; 19 – Ястреб.

а – продукт ПЦР с парой праймеров Jones5-F, Jones5-R; б – картина рестрикции продукта ПЦР с эндонуклеазой *MspI*.



**Рис. 2.** Выявление доминантного (1433 п.н.) (а) и рецессивного (1500 п.н.) (б) аллелей гена *Ppd-H2* по результатам амплификации с аллель-специфичными праймерами HvFT3-F, HvFT3-R (а) и HvFT3-F4, HvFT3-R1 (б) у сортов: 1 – Ерофей; 2 – Эколог; 3 – Прерия; 4 – Харьковский 99; 5 – Биос-1; 6 – Волгарь; 7 – Джин; 8 – Ача; 9 – Соболек; 10 – Skarlett; 11 – Сонет; 12 – Зерноградец 770; 13 – Задонский 8; 14 – Рахат; 15 – Раушан; 16 – Мик-1; 17 – Зерноградский; 18 – Приазовский 9; 19 – Челябинский 99.

для инициации цветения (Trevaskis *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2003). У озимых форм ген *Vrn-H1* экспрессируется на низком уровне. Делеция в первом интроне *Vrn-H1* («яровой аллель») связана с высоким уровнем экспрессии гена, при этом потребность в яровизации растений отсутствует (Zitzewitz *et al.*, 2005).

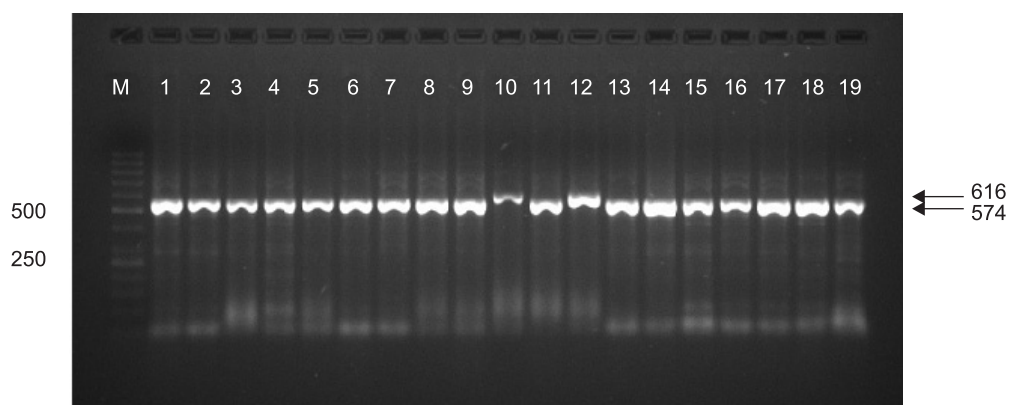
При анализе нуклеотидного полиморфизма гена *Vrn-H1* среди 400 сортов ячменя (Соскограм *et al.*, 2009) было выявлено 8 аллелей, 2 из которых обуславливают озимый, а 6 – яровой тип развития. Все описанные аллели могут быть идентифицированы в результате ПЦР с использованием трех пар праймеров (Соскограм *et al.*, 2009), приведенных в табл. 1. Амплификации фрагмента последовательности гена с парой праймеров № 1, выявляющей «озимый» рецессивный аллель *vrn-H1*, не наблюдалось, за исключением ПЦР с ДНК сорта Волгодон (данные не приведены). Реакция проходила только с парой праймеров № 3 (рис. 3), доказывая наличие доминантного аллеля *Vrn-H1* у 90 анализируемых сортов.

*Vrn-H2* – репрессор зацветания – кодирует белок, содержащий «цинковые пальцы» и ССТ домен, и задерживает переход к генеративной фазе у озимых форм ячменя, не прошедших этап яровизации (Karsai *et al.*, 2005).

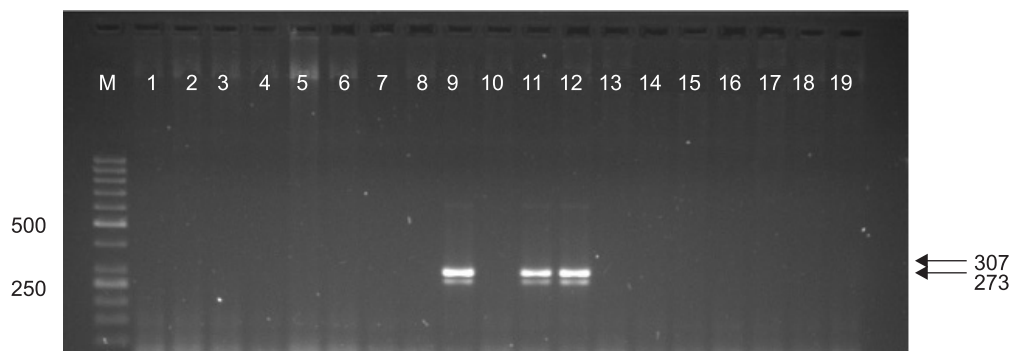
В локусе *Vrn-H2* у озимых генотипов идентифицирован кластер, состоящий из трех генов *ZCCT-H* (Karsai *et al.*, 2005). Этот «озимый» вариант структуры локуса может рассматриваться

как доминантный аллель. «Яровой» аллель *vrn-H2* характеризуется делецией всех трех *ZCCT-H* генов (Ha, Hb и Hc), является рецессивным и связан с ускоренным колошением (Karsai *et al.*, 2005; Zitzewitz *et al.*, 2005). В настоящее время не установлено, какой именно из трех генов кластера является ключевым. Полагают, что ген *ZCCT-Ha* является наиболее вероятным кандидатом (Dubcovsky *et al.*, 2005). Пара праймеров, HvZCCT.06F и HvZCCT.07R, позволяет амплифицировать фрагменты сразу двух генов: *ZCCT-Ha* (307 пн) и *ZCCT-Hb* (273 пн) (Karsai *et al.*, 2005) (табл. 1). С указанной парой праймеров продукт ПЦР амплифицируется только у озимых форм, диагностируя, таким образом, доминантный «озимый» аллель *Vrn-H2* (рис. 4). Отсутствие ПЦР-продукта свидетельствует о наличии рецессивного «ярового» аллеля *vrn-H2*.

Ген *HvFT1* у ячменя является ортологом гена *FT* (Flowering Locus) у *Arabidopsis* и наиболее вероятным геном-кандидатом для локуса *Vrn-H3* (Yan *et al.*, 2006). В семействе *FT*-подобных генов *HvFT1* является ключевым, ответственным за сроки колошения у ячменя (Kikuchi *et al.*, 2009). Показано, что в условиях, инициирующих цветение, белок FT синтезируется в листьях и транспортируется в апикальную меристему побега, что сопровождается переходом растений от вегетативной фазы развития к репродуктивной (Corbesier *et al.*, 2007; Jaeger, Wigge, 2007; Distelfeld *et al.*, 2009).



**Рис. 3.** Выявление доминантного аллеля *VRN-H1* у сортов: 1 – Прерия; 2 – Харьковский 99; 3 – Биос-1; 4 – Волгарь; 5 – Джин; 6 – Ача; 7 – Соболек; 8 – Skarlett; 9 – Сонет; 10 – Зерноградец 770; 11 – Задонский 8; 12 – Рахат; 13 – Раушан; 14 – Мик-1; 15 – Зерноградский; 16 – Приазовский 9; 17 – Челябинский 99; 18 – Безенчукский 2; 19 – Михайловский – по результатам ПЦР с аллель-специфичной парой праймеров № 3.



**Рис. 4.** Выявление доминантного (*Vrn-H2*) (307+273 п.н.) и рецессивного (*vrn-H2*) (отсутствие продукта) аллеля гена *VRN-H2* у сортов: 1 – Джин; 2 – Белогорский; 3 – Купец; 4 – 917-01; 5 – 530-98; 6 – 775-04; 7 – 780-04; 8 – 781-04; 9 – Нудум 95; 10 – С-105; 11 – Астана 2000; 12 – Арна; 13 – Джарело; 14 – Неофит; 15 – Египет; 16 – Сибиряк; 17 – Таусень; 18 – Волгарь; 19 – Лунь по результатам амплификации с аллель-специфичными праймерами HvZCCT.06F, HvZCCT.07R.

Доминантный аллель *Vrn-H3* (DQ898515) отличается от рецессивного аллеля *vrn-H3* (DQ898517) 7 SNP и 2 вставками-делециями в промоторной области гена, а также 2 SNP в первом интроне (Yan *et al.*, 2006). Показано, что полиморфизм первого интрона достоверно ассоциирован с изменчивостью по типу развития (яровой/озимый) у ячменя (Yan *et al.*, 2006). Две нуклеотидные замены в первом интроне (А/Т) и (G/C) в позициях 270 и 384 ассоциированы с доминантным аллелем *Vrn-H3* (А и G) и рецессивным аллелем *vrn-H3* (Т и С). Наличие аллеля *Vrn-H3* проявляется в ускоренном колошении, а аллеля *vrn-H3* – в задержке перехода к фазе цветения (Yan *et al.*, 2006).

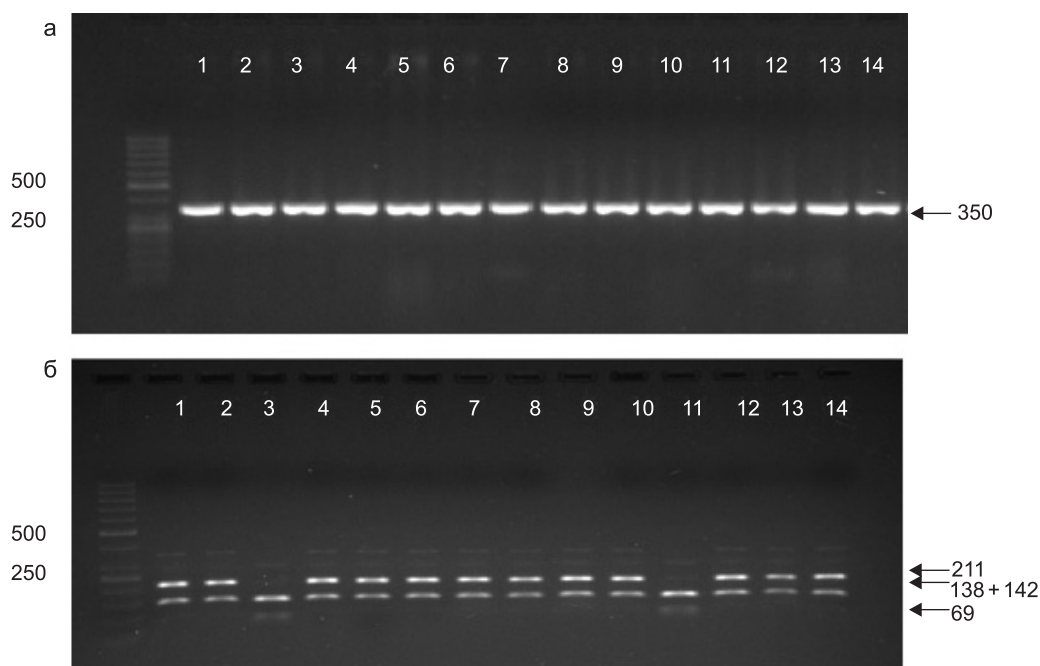
SNP384 (G/C) в случае нуклеотида «G» (*Vrn-H3*) является мишенью для рестриктазы *Ksp22I*. В результате ПЦР с праймерами HvFT1-F и HvFT1-R (табл. 1) амплифицировался продукт ожидаемого размера 350 п.н. После обработки продукта ПРЦ рестриктазой *Ksp22I* размеры фрагментов в случае рецессивного аллеля (*vrn-H3*, SNP384/C) у анализируемых сортов ячменя составили 211 и 138 п.н. Для доминантного аллеля (*Vrn-H3*, SNP384/G), нуклеотидная последовательность которого имеет дополнительный сайт рестрикции для *Ksp22I*, размеры разрезанных фрагментов составили 138, 142 и 69 п.н. (рис. 5). Результаты молекулярно-генетического анализа показали, что 75 % тестируемых сортов ячменя имеют рецессивный аллель *vrn-H3*.

#### Влияние комбинации аллелей генов *Ppd* и *Vrn* на скорость развития сортов ячменя в условиях северо-западного региона России

Для оценки влияния комбинации аллелей генов *Ppd* и *Vrn* на сроки выколашивания сортов ячменя в условиях Северо-Западного региона РФ были идентифицированы аллели генов *Ppd-H1*, *Ppd-H2*, *Vrn-H1*, *Vrn-H2* и *Vrn-H3* у 91 сорта ячменя, выращенного в течение одного вегетационного периода 2012 г. в условиях Пушкинского опытного участка ВИР (г. Санкт-Петербург). В результате молекулярно-генетического анализа среди тестируемых сортов было выявлено 9 групп, каждая из которых отличалась своей собственной аллельной комбинацией генов *Ppd* и *Vrn* (табл. 2) и содержала от 1 до 56 генотипов ячменя. Самым большим количеством генотипов оказалась представлена группа «RD-DRR», в которую входят сорта, несущие комбинацию аллелей *ppd-H1Ppd-H2Vrn-H1vrn-H2vrn-H3*. Группы «DD-RRR» (*Ppd-H1Ppd-H2vrn-H1vrn-H2vrn-H3*) и «RR-DRR» (*ppd-H1ppd-H2Vrn-H1vrn-H2vrn-H3*), наоборот, были представлены только одним сортом, в связи с чем не рассматривались при дальнейшем статистическом анализе.

Результаты статистического анализа (Kruskal-Wallis test) показали, что сроки начала колошения сортов ячменя достоверно ассоци-





**Рис. 5.** Выявление доминантного (*Vrn-H3*) (138+142+69 п.н.) и рецессивного (*vrn-H3*) (211+138 п.н.) аллеля гена *Vrn-H3* с помощью CAPS маркера у сортов: 1 – Владимир; 2 – Велес; 3 – Биом; 4 – Бином; 5 – Ястреб; 6 – Т-12; 7 – Жозефин; 8 – Таловский 9; 9 – Марни; 10 – Прикумский 47; 11 – Щедрый; 12 – Родник; 13 – Тимерхан; 14 – Саншайн.

а – продукт ПЦР, размером 350 п.н., полученный при использовании пары праймеров HvFT1-F и HvFT1-R; б – картина рестрикции продукта ПЦР с эндонуклеазой *Ksp22I*.

**Таблица 2**

Выявленные аллельные комбинации аллелей генов *Ppd-H1*, *Ppd-H2*, *Vrn-H1*, *Vrn-H2* и *Vrn-H3* у проанализированных сортов ячменя

Название сорта, линии	№ по каталогу	Происхождение	Т	<i>Ppd-H1</i>	<i>Ppd-H2</i>	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	<i>Vrn-H3</i>	Обозначение в анализе
Биом	30984	Новосибирская область	45	D	D	D	R	D	DD-DRD
Прикумский 47	31045	Ставропольский край	44	D	D	D	R	D	DD-DRD
Мамлюк	28151	Красноярский край	40	D	D	D	R	R	DD-DRR
Баган	29040	Новосибирская область	43	D	D	D	R	R	DD-DRR
Безенчукский 2	30799	Самара	45	D	D	D	R	R	DD-DRR
Симон	30898	Кемеровская область	47	D	D	D	R	R	DD-DRR
Одесский 22	30969	Украина	44	D	D	D	R	R	DD-DRR
Волгодон	31104	Самарская область	45	D	D/R	R	R	R	DD-RRR
С-105	пр8007	Челябинская область	47	R	D	D	R	D	RD-DRD
Кредо	31116	Челябинская область	47	R	D	D	R	D	RD-DRD
Лукинский	31102	Пензенская область	47	R	D	D	R	D	RD-DRD
Вариант	31103	Пензенская область	49	R	D	D	R	D	RD-DRD
Зенит	31099	Тюменская область	45	R	D	D	R	D	RD-DRD
Зауральский 1	31100	Тюменская область	50	R	D	D	R	D	RD-DRD
Саша	31110	Сиб. НИИСХ	50	R	D	D	R	D	RD-DRD
Красноярский 80	27102	Красноярский край	51	R	D	D	R	D	RD-DRD
Ача	30243	Новосибирская область	45	R	D	D	R	D	RD-DRD

## Продолжение таблицы 2

Название сорта, линии	№ по каталогу	Происхождение	T	<i>Ppd-H1</i>	<i>Ppd-H2</i>	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	<i>Vrn-H3</i>	Обозначение в анализе
Skarlett	30371	Германия	46	R	D	D	R	R	RD-DRD
Челябинский 99	30777	Челябинская область	50	R	D	D	R	D	RD-DRD
Михайловский	30803	Московская область	50	R	D	D	R	R	RD-DRD
Челябинец 1	30819	Челябинская область	45	R	D	D	R	D	RD-DRD
Annabel	30821	Германия	50	R	D	D	R	D	RD-DRD
Тандем	30883	Кировская область	45	R	D	D	R	D	RD-DRD
Никита	30900	Кемеровская область	48	R	D/R	D	R	D	RD-DRD
Казьминский	30926	Приморский край	44	R	D	D	R	D	RD-DRD
Селянин	29916	Беларусь	49	R	D	D	R	D	RD-DRD
Купец	31088	Кировская область	56	R	D	D	R	R	RD-DRR
917-01	пр7984	Кировская область	48	R	D	D	R	R	RD-DRR
530-98	пр7986	Кировская область	53	R	D	D	R	R	RD-DRR
775-04	пр7987	Кировская область	57	R	D	D	R	R	RD-DRR
780-04	пр7988	Кировская область	46	R	D	D	R	R	RD-DRR
781-04	пр7989	Кировская область	50	R	D	D	R	R	RD-DRR
Джарело	пр8016	Украина	49	R	D	D	R	R	RD-DRR
Неофит	пр7981	Украина	52	R	D	D	R	R	RD-DRR
Египет	пр7979	Украина	49	R	D	D	R	R	RD-DRR
Сибиряк	30987	Кемерово	52	R	D	D	R	R	RD-DRR
Таусень	31115	Архангельская область	51	R	D	D	R	R	RD-DRR
Лунь	31101	Пензенская область	49	R	D	D	R	R	RD-DRR
IRBE (PR-3528)	31143	Латвия	50	R	D	D	R	R	RD-DRR
Лумага	31144	Латвия	53	R	D	D	R	R	RD-DRR
Фобос	31148	Беларусь	49	R	D	D	R	R	RD-DRR
Криничный	27605	Беларусь	53	R	D	D	R	R	RD-DRR
Кедр	28119	Красноярский край	50	R	D	D	R	R	RD-DRR
Одесский 115	29010	Украина	49	R	D	D	R	R	RD-DRR
Ерофей	29221	Еврейская АО	52	R	D	D	R	R	RD-DRR
Прерия	29438	Украина	46	R	D	D	R	R	RD-DRR
Харьковский 99	29548	Украина	48	R	D	D	R	R	RD-DRR
Биос-1	29634	Московская область	48	R	D	D	R	R	RD-DRR
Волгарь	29831	Куйбышевская область	49	R	D	D	R	R	RD-DRR
Джин	30021	Кировская область	50	R	D	D	R	R	RD-DRR
Сонет	30448	Свердловская область	50	R	D	D	R	R	RD-DRR
Зерноградец 770	30451	Ростовская область	50	R	D	D	R	R	RD-DRR
Задонский 8	30452	Ростовская область	48	R	D	D	R	R	RD-DRR
Рахат	30591	Московская область	51	R	D	D	R	R	RD-DRR
Раушан	30592	Московская область	46	R	D	D	R	R	RD-DRR
Мик-1	30593	Московская область	63	R	D	D	R	R	RD-DRR
Зерноградский	30594	Ростовская область	44	R	D	D	R	R	RD-DRR
Приазовский 9	30595	Ростовская область	47	R	D	D	R	R	RD-DRR
Новичок	30806	Кировская область	45	R	D	D	R	R	RD-DRR
Нур	30820	Московская область	52	R	D	D	R	R	RD-DRR
Сокол	30827	Ростовская область	45	R	D	D	R	R	RD-DRR
Чакинский 221	30859	Тамбовская область	49	R	D	D	R	R	RD-DRR

## Окончание таблицы 2

Название сорта, линии	№ по каталогу	Происхождение	T	<i>Ppd-H1</i>	<i>Ppd-H2</i>	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	<i>Vrn-H3</i>	Обозначение в анализе
Danuta	30889	Германия	50	R	D	D	R	R	RD-DRR
Первоцелинник	30895	Оренбургская область	47	R	D	D	R	R	RD-DRR
Омский 91	30918	Омская область	46	R	D	D	R	R	RD-DRR
Нагали	30957	Оренбургская область	46	R	D	D	R	R	RD-DRR
Margret	30966	Германия	50	R	D	D	R	R	RD-DRR
Messina	30967	Германия	52	R	D	D	R	R	RD-DRR
Владимир	30981	Московская область	48	R	D	D	R	R	RD-DRR
Велес	30982	Белгородская область	48	R	D	D	R	R	RD-DRR
Бином	30985	Свердловская область	46	R	D/R	D	R	R	RD-DRR
Ястреб	30986	Самарская область	48	R	D	D	R	R	RD-DRR
T-12	30990	Оренбургская область	45	R	D	D	R	R	RD-DRR
Жозефин	31038	Германия	54	R	D	D	R	R	RD-DRR
Таловский 9	31041	Воронежская область	46	R	D	D	R	R	RD-DRR
Марни	31044	Германия	52	R	D	D	R	R	RD-DRR
Щедрый	31046	Ростовская область	47	R	D	D	R	R	RD-DRR
Родник Прикамья	31077	Кировская область	50	R	D	D	R	R	RD-DRR
Саншайн	31129	Германия	52	R	D	D	R	R	RD-DRR
Поспех	31122	Беларусь	53	R	D	D	R	R	RD-DRR
Липень	пр7908	Беларусь	52	R	D	D	D	R	RD-DRR
Дублет-Липень	пр7909		50	R	D	D	R	R	RD-DRR
Нудум 95	пр8006	Челябинская область	55	R	D	D	D	R	RD-DDR
Тимерхан	31096	Татарстан	53	R	D	D	D	R	RD-DDR
Талер	пр7910		49	R	D	D	D	R	RD-DDR
Астана 2000	пр7991	Казахстан	49	R	D	D	D	D	RD-DDD
Арна	пр7992	Казахстан	47	R	D	D	D	D	RD-DDD
Rubiola	31145	Латвия	57	R	D	D	D	D	RD-DDD
Белогорский	22089	Ленинградская область	49	R	R	D	R	D	RR-DRD
Соболек	30245	Красноярский край	49	R	R	D	R	D	RR-DRD
Эколог	29417	Кировская область	53	R	R	D	R	R	RR-DRR

Примечание. T – продолжительность периода «посев–колошение» в условиях естественного фотопериода. D – доминантный аллель, R – рецессивный аллель. D/R – выявлена гетерозиготность локуса.

ированы с наличием той или иной комбинации аллелей *Vrn* и *Ppd* ( $p = 0,0005$ ) (рис. 6).

Для попарного сравнения анализируемого фенотипа у групп сортов с разной комбинацией аллелей генов *Ppd* и *Vrn* использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни (табл. 3). Результаты анализа показали, что сорта, несущие доминантные аллели генов *Ppd* (DD-DRR), достоверно опережают другие генотипы по скорости развития и являются скороспелыми при возделывании в условиях северо-западного региона России. Результаты согласуются с ранее полученными данными, показывающими связь

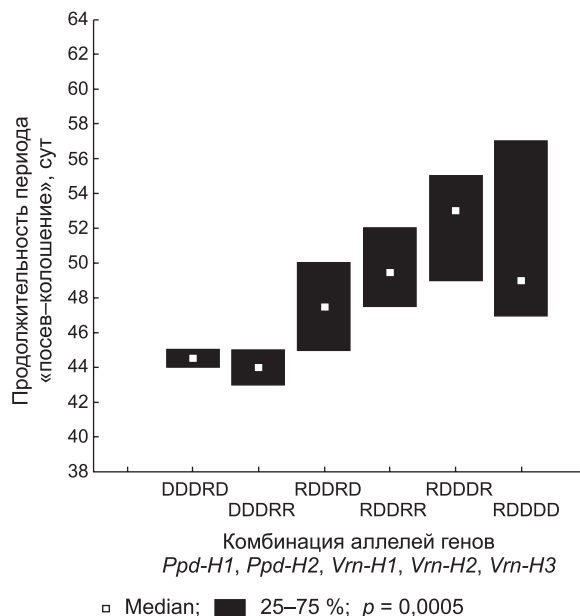
раннего колошения ячменя на длинном дне с наличием доминантного аллеля гена *Ppd-H1* (Turner *et al.*, 2005).

Статистический анализ показал, что аллели генов *Vrn* также оказывают достоверное влияние на скорость выколашивания ячменя. Так, генотипы с аллельной комбинацией RD-DRD зацветают достоверно раньше генотипов с другими комбинациями аллелей генов *Vrn* (RD-DRR и RD-DDR) (рис. 6, табл. 3).

Таким образом, результаты молекулярного маркирования генов *Ppd* и *Vrn* позволяют на самых ранних этапах онтогенеза прогнози-

ровать продолжительность вегетационного периода у генотипов ячменя. Использование аллель-специфичных маркеров *Ppd* и *Vrn* может оказаться полезным инструментом для селекции на скороспелость сортов ячменя, способных приспосабливаться к неблагоприятным условиям возделывания в зонах рискованного земледелия (короткий период вегетации, «уход» от засухи и высоких летних температур). Наличие или отсутствие доминантного аллеля гена *Ppd-H1*, определяющего ранние сроки начала колошения (см. рис. 6), можно определить у любого сорта ячменя в лаборатории с помощью ПЦР и рестрикционного анализа, при этом отпадает необходимость в трудоемких полевых исследованиях. Использование молекулярного маркирования гена *Ppd-H1* также позволяет контролировать перенос желательного доминантного аллеля *Ppd-H1* в скрещиваниях при выведении новых скороспелых сортов.

Исключительный интерес для селекции представляет также и плейотропный эффект «генов развития» *Ppd* и *Vrn*. Регулируя сроки колошения, локусы *Ppd* одновременно оказывают влияние и на изменчивость многих хозяйственно ценных признаков. Например, показано, что ранний переход к фазе колошения у сортов ячменя коррелирует с низким содержанием белка в зерне – самым важным признаком для селекции пивоваренных сортов (See *et al.*, 2002). Таким образом, прогнозирование продолжительности вегетационного периода сортов ячменя на самых ранних этапах



**Рис. 6.** Изменчивость сроков начала колошения сортов ячменя в зависимости от комбинации аллелей генов *Ppd-H1*, *Ppd-H2*, *Vrn-H1*, *Vrn-H2* и *Vrn-H3* в условиях длинного фотопериода.

развития растений с использованием системы аллель-специфичных маркеров *Ppd* и *Vrn* может также позволить косвенно оценивать и другие важные для селекции признаки.

Работа выполнена при поддержке грантов межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» (2011-16-МЦП/16) и гранта РФФИ № 12-04-01161-а.

**Таблица 3**

Попарное сравнение сроков начала колошения у генотипов ячменя с разной комбинацией аллелей генов *Ppd* и *Vrn* в условиях длинного светового дня (непараметрический U-критерий Манна-Уитни)

	DD-DRD	DD-DRR	RD-DRD	RD-DRR	RD-DDR	RD-DDD
DD-DRD		0,857143	0,057143	0,007260*	0,200000	0,200000
DD-DRR			0,007058*	0,000137*	0,035714*	0,035714*
RD-DRD				0,020768*	0,040260*	0,355844
RD-DRR					0,140392	0,807407
RD-DDR						0,700000
RD-DDD						

\* Достоверно значимые различия при  $p < 0,05$ .

## ЛИТЕРАТУРА

- Батакова О.Б. Исходный материал для селекции ярового ячменя в условиях европейского Севера РФ: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. СПб., 2011.
- Глуховцев В.В. Роль сорта в проблеме повышения урожайности и качества зерна в условиях Среднего Поволжья // Резервы повышения эффективности агропромышленного производства: Матер. регион. науч.-практ. конф. Уфа, 2004. С. 122–124.
- Гуляев Г.В. Скороспелые сорта зерновых культур – важнейший резерв в борьбе с засухой // Селекция и семеноводство. 1999. № 2/3. С. 10–17.
- Лукьяненко П.П. Избранные труды. М.: Агропромиздат, 1990. С. 125–126.
- Сортовые ресурсы зернофуражных культур Нечерноземной зоны России (каталог) / Под ред. Г.А. Багаловой, Н.Н. Зезина. Екатеринбург: ГНУ Уральский НИИСХ, 2010.
- Casao M.C., Karsai I., Igartua E. *et al.* Adaptation of barley to mild winters: A role for PPDH2 // BMC Plant Biology. 2011. V. 11. P. 164–177.
- Cockram J., Jones H., Leigh F.J. *et al.* Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication, and sustainable productivity // J. Exp. Bot. 2007. V. 58. P. 1231–1244.
- Cockram J., Norris C., O'Sullivan D.M. PCR-based markers diagnostic for spring and winter seasonal growth habit in barley // Crop. Sci. 2009. V. 49. P. 403–410.
- Corbesier L., Vincent C., Jang S. *et al.* FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis* // Science. 2007. V. 316. P. 1030–1033.
- Distelfeld A., Li C., Dubcovsky J. Regulation of flowering in temperate cereals // Curr. Opin. Plant Biol. 2009. V. 12. P. 178–184.
- Dubcovsky J., Chen C., Yan L. Molecular characterization of the allelic variation at the VRN-H2 vernalization locus in barley // Mol. Breed. 2005. V. 15. P. 395–407.
- Faure S., Higgins J., Turner A. *et al.* The FLOWERING LOCUS T-like gene family in barley (*Hordeum vulgare*) // Genetics. 2007. V. 176. P. 599–609.
- Jaeger K.E., Wigge P.A. FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis* // Curr. Biol. 2007. V. 17. P. 1050–1054.
- Jones H., Leigh F.J., Mackay I. *et al.* Population based resequencing reveals that the flowering time adaptation of cultivated barley originated east of the fertile crescent // Mol. Biol. Evol. 2008. V. 25. No. 10. P. 2211–2219.
- Karsai I., Szucs P., Meszaros K. *et al.* The Vrn-H2 locus is a major determinant of flowering time in a facultative winter growth habit barley (*Hordeum vulgare* L.) mapping population // Theor. Appl. Genet. 2005. V. 110. P. 1458–1466.
- Kikuchi R., Kawahigashi H., Ando T. *et al.* Molecular and functional characterization of PEBP genes in barley reveal the diversification of their roles in flowering // Plant Physiol. 2009. V. 149. P. 1341–1353.
- Laurie D.A., Pratchett N., Bezant J.H. *et al.* RFLP mapping of five major genes and eight quantitative trait loci in a winter/spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross // Genome. 1995. V. 38. P. 575–585.
- Saghai-Marooif M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A. *et al.* Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 8014–8018.
- See D., Kanazin V., Kephart K. *et al.* Mapping genes controlling variation in barley grain protein concentration // Crop Sci. 2002. V. 42. P. 680–685.
- Takahashi R., Yasuda S. Genetics of earliness and growth habit in barley // Barley genetics II / Ed. R.A. Nilan. Washington State Univ. Press, Pullman, 1971. P. 388–408.
- Trevaskis B., Bagnall D.J., Ellis M.H. *et al.* MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 13099–13104.
- Turner A., Beales J., Faure S. *et al.* The pseudo response regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in barley // Science. 2005. V. 310. P. 1031–1033.
- Yan L., Fu D., Li C. *et al.* The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of FT // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 19581–19586.
- Yan L., Loukoianov A., Tranquilli G. *et al.* Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN1 // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 6263–6268.
- Zitzewitz J., Szucs P., Dubcovsky J. *et al.* Molecular and structural characterization of barley vernalization genes // Plant Mol. Biol. 2005. V. 59. P. 449–467.

**USE OF ALLELE-SPECIFIC MARKERS  
OF THE *PPD* AND *VRN* GENES  
FOR PREDICTING GROWING SEASON DURATION  
IN BARLEY CULTIVARS**

**M.M. Zlotina, O.N. Kovaleva, I.G. Loskutov, E.K. Potokina**

Vavilov Institute of Plant Industry (VIR), St. Petersburg, Russia,  
e-mail: e.potokina@vir.nw.ru

**Summary**

Allelic combinations of the *Vrn-H1*, *Vrn-H2*, *Vrn-H3*, *Ppd-H1*, and *Ppd-H2* genes have been investigated with allele-specific molecular markers in 91 spring barley cultivars recommended for use in Russia and Belarus. In a field experiment under conditions of North-West Russia, heading date evaluation has been performed in these cultivars.

Barley varieties having the dominant *Ppd-H1* allele were shown to overrun other genotypes in the developmental rate (heading date) and to mature earlier under long-day conditions. Among studied cultivars, grown in Russia, only 9 % possessed the dominant *Ppd-H1* allele. A significant association was also found between the allele combination of *Vrn* genes and heading date of barley cultivars. Among cultivars with identical genotypes for *Ppd-H1* and *Ppd-H2*, those having the allelic combination *Vrn-H1vrn-H2Vrn-H3* flower significantly earlier than with other haplotypes. The use of allele-specific markers of *Ppd* and *Vrn* genes makes breeding for early ripeness easier and faster.

**Key words:** molecular markers, alleles of the *Ppd* and *Vrn* genes, heading date, marker assisted selection, barley.

УДК 631.527:577.21

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ RAPD-МАРКЕРОВ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ ОТБОРА ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ПЕРЦА СЛАДКОГО (*CAPSICUM ANNUM L.*) В СЕЛЕКЦИИ НА ГЕТЕРОЗИС

© 2013 г. М.Н. Шаптуренко<sup>1</sup>, Л.А. Тарутина<sup>1</sup>, Т.В. Печковская<sup>1</sup>,  
Л.А. Мишин<sup>2</sup>, Л.В. Хотылёва<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,  
e-mail: shapturenko@igc.bas-net.by;

<sup>2</sup> Институт овощеводства, Минск, Беларусь

Поступила в редакцию 1 ноября 2012 г. Принята к публикации 16 января 2013 г.

С целью изучения эффективности использования ДНК-скрининга для проведения отбора дивергентных пар гибридизации в селекции на гетерозис выполнен RAPD анализ полиморфизма образцов перца сладкого различного эколого-географического происхождения. Определены генетические дистанции, коллекция расклассифицирована методом UPGMA. Отобраны дивергентные генотипы и проведена их гибридизация по полной диаллельной схеме 5×5. Дана оценка комбинационной способности линий и эффекта гетерозиса их гибридов. Выявлены комбинации с высоким уровнем гетерозиса по основным показателям продуктивности и определен вклад аддитивных и доминантных генов в реализации генетического потенциала исходных родительских форм. Показано, что при формировании гетерозиса в F<sub>1</sub> у изученных нами гибридов перца сладкого вклад специфической комбинационной способности родительских линий был более важен, чем общая комбинационная способность. При оценке сопряженности величины эффекта гетерозиса и уровня дивергенции родительских форм перца сладкого выявлены положительные связи для основных признаков продуктивности, однако их величины невысокие. В целом ДНК-анализ оказался наиболее информативным для установления генетических различий между фенотипически однородным материалом, он нацеливает на поиск отдельных ДНК-локусов, положительно ассоциированных с гетерозисом в F<sub>1</sub>.

**Ключевые слова:** перец сладкий (*Capsicum annuum L.*), гетерозис, комбинационная способность, молекулярные маркеры, генетические дистанции.

### ВВЕДЕНИЕ

В селекции на гетерозис перца сладкого, как и других хозяйственно важных растений с автономным типом размножения, особое значение имеет стратегия отбора исходного материала, который должен отвечать селекционным требованиям в части реализации желаемых признаков, в первую очередь высокой урожайности, и обладать достаточным уровнем дивергенции, поскольку, согласно генетической концепции гетерозиса, значительный вклад в формирование гетерозисного эффекта вносят гетерозиготные локусы (Birchler *et al.*, 2003). Однако иденти-

фикация дивергентных генотипов этой культуры при отборе фенотипически сходных форм затруднена даже при использовании метода педигри, так как в результате длительной селекции с применением специфических подходов и ограниченного числа выдающихся генотипов происходило постепенное сужение генетического пула рода *Capsicum*, который в основном представлен сортами, принадлежащими к ограниченному числу экотипов. Идентификация форм, способных дать превосходное гибридное потомство, является одним из самых дорогих и трудозатратных этапов селекции, поэтому предсказание гибридного качества рассматри-

вается как наиболее привлекательный аспект для исследователей, способный увеличить эффективность селекционных программ.

Начиная с 60-х годов прошлого столетия были предприняты попытки использования морфологических индексов, сведений о географическом происхождении и несколько позже – биохимических маркеров для предсказания гетерозиса, но их точность оказалась низкой (Moll *et al.*, 1965; Frei *et al.*, 1986). С развитием молекулярно-генетических подходов полиморфизм ДНК стал рассматриваться как мера генетической разнородности и критерий отбора дивергентных генотипов для различных культур. Несмотря на то что в ряде исследований была показана полезность такой оценки для подбора пар скрещиваний (Selvaraj *et al.*, 2010; Becker, Link, 2000), единого мнения о связи гетерозиготности с гибридной силой так и не сложилось (Syed, Chen, 2005). Некоторые исследователи считают, что оценка общей гетерогенности не может быть адекватным критерием подбора родительских пар при гибридизации, так как она отражает общий уровень различий между генотипами и не имеет связи с рассматриваемыми признаками (Renming *et al.*, 2008). Результаты, полученные при использовании QTL и других типов маркеров, оказались также неубедительными (Garcia *et al.*, 2008; Frascaroli *et al.*, 2009).

В настоящей работе проведена оценка полиморфной структуры коллекции перца сладкого на основе RAPD PCR и анализ хозяйственно важных признаков диаллельных гибридов F<sub>1</sub> для изучения сопряженности уровня дивергенции родительских форм и эффекта гетерозиса в поколении F<sub>1</sub>.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для отбора пар скрещиваний оценивали молекулярно-генетическую дивергенцию образцов перца сладкого различного эколого-географического происхождения (из коллекций Института генетики и цитологии НАН Беларуси и Института овощеводства НАН Беларуси) на основе полимеразной цепной реакции с произвольными десятичленными праймерами, синтезированными по аналогам фирмы Oregon Tech. (ОРА-02, ОРА-04, ОРА-11, ОРА-20, ОРВ-01, ОРВ-02, ОРВ-20, ОРС-01, ОРВ-01, ОРВ-03,

ОРВ-05, ОРВ-06, ОРВ-07, ОРВ-09, ОРВ-11, ОРВ-15). Праймеры отбирали по способности выявлять межлинейный полиморфизм *Capsicum annum* L. Полимеразную цепную реакцию проводили в стандартном режиме с использованием предварительного (5 циклов) мягкого отжига (–3 °С от t<sub>пл</sub> праймера). Генетические дистанции (GD) рассчитывали по Nei (Nei, Li, 1979):

$$G_{D_{ij}} = 1 - 2N_{ij}/(N_i + N_j),$$

где N<sub>ij</sub> – число общих фрагментов i- и j-го образцов, N<sub>i</sub> и N<sub>j</sub> – число фрагментов каждого из образцов. Кластеризацию экспериментального материала осуществляли методом UPGMA с помощью программного пакета Treeconw (vers. 1.3b). Достоверность проведенной кластеризации оценивали на основе bootstrap-анализа.

Отобранные формы перца сладкого изучали в системе полных диаллельных скрещиваний (5 × 5). Опыление осуществляли вручную. Оценивали гибридное потомство F<sub>1</sub> и родительские линии в рендомизированных блоках с 5 повторностями в остекленных неотапливаемых теплицах Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Анализировали следующие количественные признаки: масса и количество плодов с растения, средняя масса, длина и диаметр плода, толщина перикарпия. Оценку общей (ОКС) и специфической (СКС) комбинационной способности проводили по методу I. Griffing (Турбин и др., 1974). Наследуемость в узком смысле оценивали как отношение дисперсий, вызванной аддитивными эффектами генов, к общей фенотипической дисперсии. Относительный гипотетический гетерозис рассчитывали в процентах как превышение F<sub>1</sub> над средней величиной обеих родительских линий.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Оценка ДНК-полиморфизма линий перца сладкого

Традиционно определение хозяйственной ценности образца и последующая оценка перспектив его использования как компонента гибридизации основаны на изучении фенотипа. Одним из наиболее важных показателей, характеризующих родительские формы гибрида, является комбинационная способность, которая определяет относительную ценность



генотипа и перспективы его использования в селекции на гетерозис. Такой путь предполагает обязательное проведение скрещиваний и анализ гибридного потомства. При этом, как правило, наблюдается варьирование величины гетерозиса по отдельным комбинациям. Поэтому ценность одной и той же формы может быть выражена двумя способами: средней величиной гетерозиса, наблюдаемой во всех гибридных комбинациях – соответствует ОКС, либо отклонением от этой величины в отдельных комбинациях – соответствует СКС (Турбин и др., 1974). Успех использования такого подхода определяется выбором рациональных схем скрещивания и использованием исходного материала, обладающего высокими адаптивными и хозяйственно ценными свойствами.

Для оптимизации селекционного процесса были предприняты попытки найти маркерные признаки, ассоциированные с комбинационной способностью. В некоторых исследованиях были обнаружены положительные связи между такими признаками и комбинационной способностью. Однако отбор пар для гибридизации на основе этих связей не был

результативным (Cheres *et al.*, 2000; Jin-Xiong Shen *et al.*, 2006). С развитием технологий молекулярно-генетического анализа продолжился поиск эффективных «предсказателей» гибридной силы, основанный на разработке систем отбора и ранжирования исходных коллекций по гетерогенным группам (Fisher *et al.*, 2010). Наиболее актуальна данная проблема для самоопыляющихся культур, для которых идентификация генетически отличных генотипов затруднена.

С целью разработки приемов подбора перспективных пар скрещивания мы исследовали уровень генетической разнородности коллекции перца сладкого на основе RAPD PCR с использованием 16 праймеров, отобранных по результатам предварительных испытаний как полиморфные. Нами рассмотрено 136 ампликонов, из которых 60 оказались полиморфными. Уровень выявленного полиморфизма составил 44,1 %. Наиболее эффективным для оценки ДНК-дивергенции было использование праймеров OPW-15, OPA-04, а также OPW-11 на матрице, полученной после амплификации с OPC-01 (рис. 1).

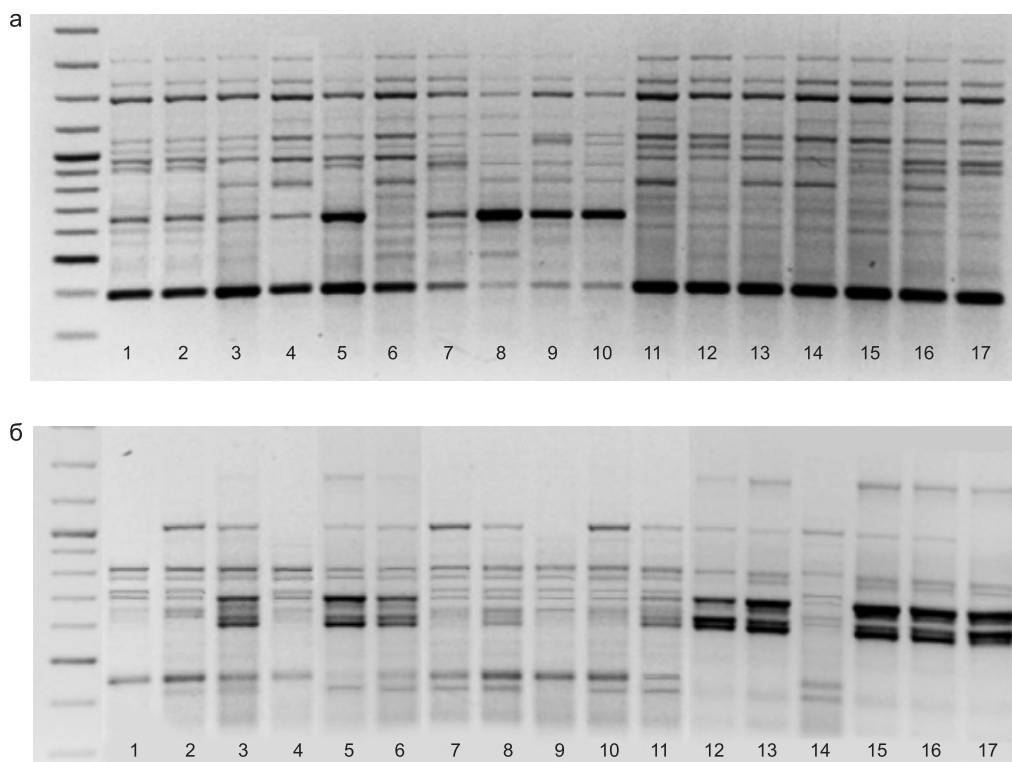


Рис. 1. Фингерпринтинг амплификации с праймерами OPW-15 (а) и OPW-11 на ДНК-матрице OPC-01 (б).

Результаты ПЦР-анализа позволили разделить экспериментальные образцы перца сладкого на дивергентные классы в соответствии с алгоритмом UPGMA. Согласно иерархической кластеризации изученные генотипы организованы в субкластеры с различным размахом дистанций, что позволило идентифицировать полиморфные пары скрещивания (рис. 2).

На основе данных молекулярно-генетического и биометрического анализов нами были отобраны для гибридизации в системе диаллельных скрещиваний 5 селекционных линий перца Л1603, Л1604, Л1605, Л1606, Л1608, которые характеризовались хорошим сочетанием хозяйственно важных признаков (урожайность, архитектура плода, срок созревания) и обладали достаточным уровнем генетической дивергенции.

#### Анализ комбинационной ценности линий и эффекта гетерозиса в $F_1$

Изучение гибридов перца сладкого в системе полных диаллельных скрещиваний с последующей оценкой характера проявления ряда количественных признаков, комбинационной ценности и эффекта гетерозиса в  $F_1$  по основным компонентам продуктивности выявило высокозначимые различия между генотипами

по большинству анализируемых показателей (табл. 1). Средние квадраты (MS), обусловленные общей комбинационной способностью, значительно отличались от MS случайных отклонений ( $P < 0,01$ ) для массы, количества плодов с растения и средней массы плода. MS специфической комбинационной способности также высокозначимы для этих же признаков и длины плода. Это говорит о том, что между линиями как по общей, так и по специфической комбинационной способности существуют достоверные различия, что дает нам возможность перейти к анализу эффектов ОКС и констант СКС.

Лучшими по ОКС оказались линии Л1603 ( $\hat{g}_7 = 0,1$ ) и Л1608 ( $\hat{g}_5 = 0,15$ ), которые по массе и количеству плодов с растения достоверно отличались от остальных линий и имели относительно высокие варианты специфической комбинационной способности (табл. 2). Следовательно, эти линии должны проявить себя положительно и как компонент синтетического гибридного сорта, и в отдельных гибридных комбинациях.

Показатели изменчивости ОКС и СКС не достоверны для диаметра плода и толщины перикарпия, что обусловлено высоким фенотипическим сходством исходных линий в характере проявления данных признаков. По этим признакам полученные гибриды не имели статистически значимых отличий от родителей.

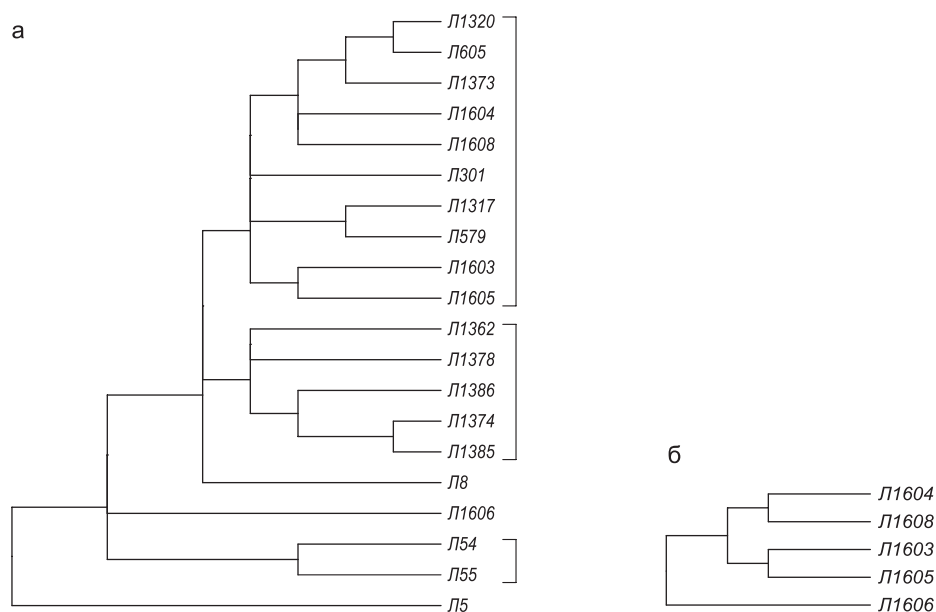


Рис. 2. Иерархическая кластеризация, основанная на данных RAPD-фингерпринтинга.

а – селекционная коллекция перца сладкого, б – линии, использованные в диаллельных скрещиваниях.

Таблица 1

Дисперсионный анализ комбинационной способности, оценки аддитивной ( $\sigma_{ад.}^2$ ) и неаддитивной ( $\sigma_{неад.}^2$ ) генетических вариантов и наследуемости в узком смысле ( $h^2$ ) по основным компонентам продуктивности в  $5 \times 5$  диаллельном скрещивании перца сладкого

Источник варьирования	Степень свободы	Средние квадраты ( $ms$ ), отнесенные к индивидуальному наблюдению в опыте					
		Масса плодов растения, кг	Кол-во плодов растения	Средняя масса плода, г	Длина плода, см	Диаметр плода, см	Толщина стенки плода, мм
Общая	74						
Гибриды	24	0,49**	22,61**	1399,8**	5,84**	0,75*	0,85
ОКС	4	0,76**	57,42**	4048,5**	3,92	0,71	0,64
СКС	10	0,56**	21,77**	1230,3**	9,73**	0,66	0,91
Реципрокный эффект	10	0,32**	10,03**	509,8	2,73**	0,86*	0,87
Случайные отклонения	50	0,06	2,03	398,5	2,67	0,39	0,59
$\sigma_{ад.}^2 = 2\sigma_g^2$		0,04	7,23	563,6	0	0,01	0
$\sigma_{неад.}^2 = 2\sigma_s^2$		0,30	11,45	495,1	4,20	0,16	0,19
$h^2 = 2\sigma_g^2 / (2\sigma_g^2 + \sigma_s^2 + \sigma^2)$		0,10	0,35	0,39	0	0,02	0

Примечание. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .

Интересно сравнить относительные величины вариантов ОКС и СКС одной и той же линии, т. е. величины  $\sigma_{gi}^2$  и  $\sigma_{si}^2$ . В основном значения  $\sigma_{si}^2$  достоверно превосходили  $\sigma_{gi}^2$  по большинству проанализированных признаков (табл. 2). Согласно интерпретации G.F. Sprague, L.A. Tatum (1942), эти результаты указывают на то, что в генетическом контроле компонентов продуктивности значительную роль играют доминантные и эпистатические эффекты. Этот вывод подтверждается и долей изменчивости, обусловленной аддитивными эффектами генов, — наследуемостью, которая была невысокой и варьировала в зависимости от признака в пределах 0,1–0,39 (табл. 1), что также свидетельствует о преобладающей роли аллельных и неаллельных взаимодействий генов в определении фенотипа линий перца, включенных в наш анализ.

Испытания в условиях закрытого грунта показали, что среди исходных родительских форм самыми высокоурожайными являются линии Л1604 и Л1608 (табл. 2). Большинство гибридов, полученных на основе этих линий, превосходило родителей по продуктивности. Лучшими комбинациями были Л1608 × Л1603, Л1603 × Л1608. Гибриды Л1604 × Л1605, Л1606 × Л1608 имели значимо низкое по отношению к родителям

выражение основных компонентов продуктивности (табл. 3).

Анализ прямых и обратных гибридов  $F_1$  выявил наличие реципрокных эффектов. Так, по признаку «масса плодов с растения» комбинации Л1606 × Л1608 и Л1604 × Л1605 достоверно отличались от своих реципрокных гибридов Л1608 × Л1606 и Л1605 × Л1604.

На основе оценки комбинационной способности определены генотипы, обладающие высоким генетическим потенциалом для селекции (табл. 2). Линии Л1608 и Л1603 характеризуются наибольшими эффектами ОКС ( $\hat{g}_i$ ) по массе и числу плодов с растения. Полученные с участием данных линий гибриды реализовывают потенциально высокую продуктивность в большинстве комбинаций.

Высокими значениями вариантов СКС ( $\sigma_{si}^2$ ) обладают Л1603, Л1606 и Л1608, что определяет индивидуальную ценность их отдельных гибридов, которые характеризуются высокими константами СКС ( $\hat{s}_{ij}$ ). Например, гибриды Л1603 × Л1608 и Л1605 × Л1606 имели самые высокие константы СКС по массе и количеству плодов с растения, а гибриды Л1604 × Л1606 и Л1606 × Л1608 — по средней массе плода (табл. 2).

Таблица 2

Средние значения ( $x_i$ ) оценки эффектов ОКС ( $g_i$ ), констант СКС ( $s_{ij}$ ), варiances ОКС ( $\sigma_{si}^2$ ) и СКС ( $\sigma_{gi}^2$ ) линий перца сладкого по основным компонентам продуктивности

Признак	Линия	$x_i$	$\hat{g}_i$	Стандартная ошибка		$\hat{s}_{ij}$					$\sigma_{si}^2$	$\sigma_{gi}^2$
				$\hat{g}_i$	$\hat{g}_i - \hat{g}_j$	Л1603	Л1604	Л1605	Л1606	Л1608		
Масса плодов с растения, кг	Л1603	1,05	0,1			-0,40	-0,08	0,04	-0,06	0,50	0,1	0,01
	Л1604	1,17	0,1				-0,27	-0,02	0,32	0,05	0,04	0,01
	Л1605	0,42	-0,23	0,04	0,06			-0,37	0,36	-0,02	0,06	0,05
	Л1606	0,55	-0,13						-0,45	-0,16	0,11	0,01
	Л1608	1,18	0,15							-0,36	0,09	0,02
Количество плодов с растения	Л1603	6,3	1,2			-3,13	-0,60	-0,33	-0,07	4,13	6,61	1,38
	Л1604	8,3	0,67				-0,40	-0,47	1,30	0,17	0,38	0,39
	Л1605	2,3	-2,1	0,23	0,37			-0,87	1,90	-0,23	0,95	4,35
	Л1606	4,3	-0,7						-1,67	-1,47	2,32	0,43
	Л1608	6,7	0,93							-2,60	6,28	0,81
Средняя масса плода, г	Л1603	155,6	-11,3			6,80	1,19	10,00	-1,95	-16,04	57,4	117,3
	Л1604	142,3	-2,5				-24,09	10,23	14,26	-1,59	178,4	0
	Л1605	182,7	19	3,3	5,2			-26,71	6,34	0,14	194,8	349,8
	Л1606	126,8	-6,6						-31,41	12,75	304,4	32,8
	Л1608	179	1,4							4,74	66,5	0
Длина плода, см	Л1603	10,9	0,4			-2,25	0,84	-0,23	0,62	1,03	1,64	0,12
	Л1604	11	-0,11				-1,15	0,13	0,47	-0,29	0,41	0
	Л1605	11,2	0,34	0,21	0,33			-0,47	1,16	-0,59	0,31	0,07
	Л1606	11,5	0,13						-1,19	-1,05	0,94	0
	Л1608	13,1	-0,08							0,89	0,67	0

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что при формировании гетерозиса в  $F_1$  у изученных нами гибридов перца сладкого вклад СКС родительских линий был более важен, чем ОКС. Это подтверждает и корреляционный анализ, который выявил наличие тесной связи ( $r = 0,61$ ) между значениями эффекта гетерозиса и константами СКС у 20 диаллельных гибридов для признака «масса плодов с растения» (рис. 3).

Анализ комбинационной способности позволяет делать заключения о ценности родительских линий исходя из предпочтения типа действия генов, ответственных за фенотипическое проявление признака у гибрида. Однако более существенное значение для практических целей имеет количественная оценка эффекта гетерозиса, которая непосредственно в абсолютных

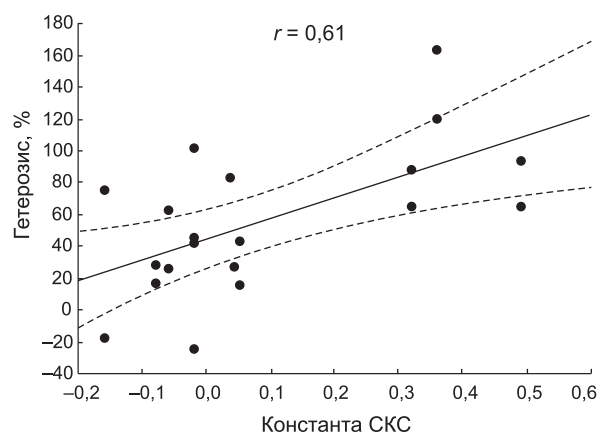


Рис. 3. Связь эффекта гетерозиса в  $F_1$  с величиной константы СКС для признака «масса плодов с растения».

величинах определяет качество гибридов  $F_1$  в сравнении с родителями.

В результате испытания  $F_1$  достоверные значения гетерозиса обнаружены во всех 20 комбинациях, причем 10 гибридов превосходили родителей по признаку «масса плодов с растения» более чем на 50 %, в 8 комбинациях положительные эффекты составляли 16–46 % и только две комбинации характеризовались достоверно отрицательными значениями гетерозиса (табл. 3).

Превосходно показали себя прямые и реципрокные гибриды  $F_1$  Л1605 × Л1606, Л1603 × Л1608, которые характеризуются наибольшими значениями констант СКС по признаку «масса плодов с растения» (табл. 3). Однако, если в первом случае реализация продуктивного потенциала обеспечена равным вкладом аддитивного и неаддитивного действия генов ( $\sigma_{si}^2 \approx \sigma_{gi}^2$ ), то во втором преимущественное значение имело неаддитивное действие ( $\sigma_{si}^2 > \sigma_{gi}^2$ ).

В целом величины гетерозиса, наблюдаемые по массе плодов с растения, достаточно высокие (16–164 %), за исключением комбинаций Л1604 × Л1605 и Л1606 × Л1608, у которых гетерозис по отношению к родительским линиям был отрицательным. Тем не менее это не оказало существенного влияния на средний уровень гетерозиса по всей группе гибридов (56,5 %).

#### Роль генетической дивергенции родительских форм в реализации генетического потенциала их гибридов $F_1$

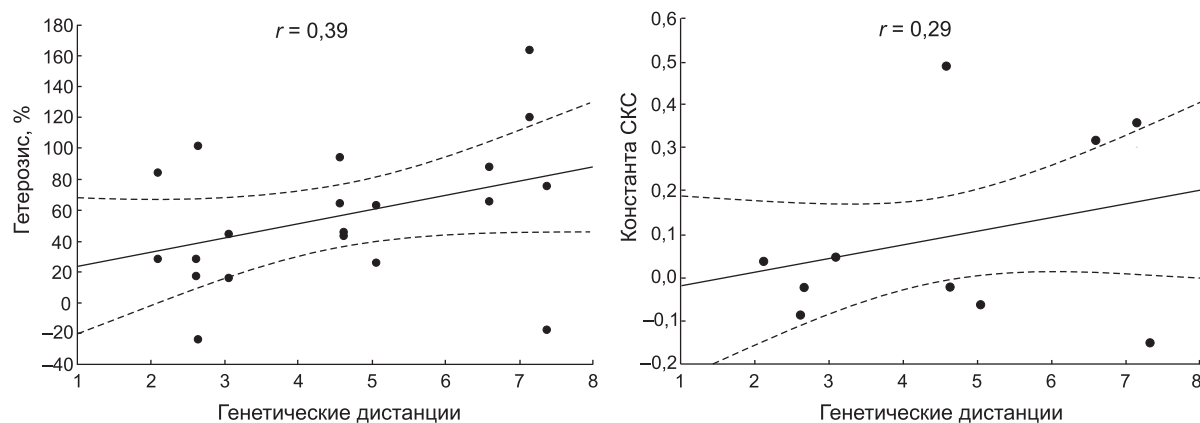
Высказывается мнение, что генетические дистанции (GD), рассчитанные на основе ДНК анализа, не всегда могут быть использованы для точного предсказания урожайности гибридов, если используемые маркеры не связаны с локусами количественных признаков (Birchler *et al.*, 2010). Кроме того, подобные связи достаточно условны, поскольку большинство хозяйственно важных признаков полигенны и находятся под влиянием среды. Мы полагаем, что для повышения эффективности селекции на гетерозис необходимо строить селекционные стратегии на выборе генотипов, отвечающих необходимым требованиям, сохраняя равновесие между агрономической ценностью исходных форм и уровнем их генетической дивергенции.

**Таблица 3**  
Генетические дистанции (GD)  
и уровень гетерозиса в  $F_1$

Гибридная комбинация		GD	Относительный гипотетический гетерозис, %			
♀	♂		Масса плодов с растения	Кол-во плодов с растения	Масса средняя плода	Длина плода
Л1603 × Л1604	Л1604 × Л1603	2,61	29	14	15	20
Л1604 × Л1605	Л1605 × Л1604	2,64	-24	-43	22	2
Л1603 × Л1605	Л1605 × Л1603	2,1	28	23	6	6
Л1603 × Л1606	Л1606 × Л1603	5,05	26	19	15	22
Л1603 × Л1608	Л1608 × Л1603	4,56	65	95	-14	4
Л1604 × Л1606	Л1606 × Л1604	6,59	88	38	40	10
Л1604 × Л1608	Л1608 × Л1604	3,06	44	37	1	-3
Л1605 × Л1606	Л1606 × Л1605	7,14	164	112	32	18
Л1605 × Л1608	Л1608 × Л1605	4,61	43	27	11	-9
Л1606 × Л1608	Л1608 × Л1606	7,38	-17	-27	17	-9
Средняя			56,5	42,5	11,4	9,3

Примечание. Значение гетерозиса  $\geq 12$  % достоверно при  $P = 0,05$ .

Наши исследования сопряженности величины эффекта гетерозиса у гибридов  $F_1$  перца сладкого и уровня генетической дивергенции исходных родительских форм, оцененного на основе RAPD-скрининга, показали, что существуют положительные ассоциации для признаков «масса плодов с растения» ( $r = 0,39$ ), «средняя масса» ( $r = 0,33$ ) и «диаметр плода» ( $r = 0,41$ ). Тем не менее эти величины не столь высоки, чтобы обеспечить эффективный подбор компонентов гибридизации только на основании молекулярных маркеров (рис. 4). Возможно,



**Рис. 4.** Связь генетических дистанций с эффектом гетерозиса в  $F_1$  и константой СКС для признака «масса плодов с растения».

полученные данные являются результатом использования в основе эксперимента полной диаллельной схемы скрещивания, при которой оцениваются как прямые, так и реципрокные гибриды, в реализации продуктивного потенциала которых задействованы различные механизмы, обусловленные влиянием материнской цитоплазмы. Оценка корреляций анализируемых показателей, проведенная отдельно среди прямых и обратных гибридов, показала, что в каждой выборке характер связи несколько различается: ее сила возрастает у прямых гибридов ( $r = 0,44$ ) и уменьшается ( $r = 0,37$ ) для реципрокных гибридов, например, по признаку «масса плодов с растения».

По признаку же «диаметр плода» у реципрокных гибридов эти корреляции существенно возросли до  $r = 0,63$ . Но, если считать, что степень «связанности» двух величин более точно измеряется квадратом коэффициента корреляции, т. е.  $r^2 = 0,63^2 = 0,40$ , то можно сделать заключение, что вклад генетической дивергенции родительских линий в реализацию гетерозиса по диаметру плода у реципрокных гибридов  $F_1$  составил 40 %.

Поскольку в формировании гетерозиса у изученных нами гибридов  $F_1$  вклад СКС родительских линий был более важен, чем ОКС, нами была предпринята попытка найти связь между GD, оцененными с использованием RAPD-маркеров, и константами СКС  $s_{ij}$  (рис. 4). При подсчете корреляций оказалось, что по массе плодов с растения между GD линий и  $s_{ij}$  их значения  $r = 0,29$  статистически

недостовверны. Это дает основание считать, что роль аллельных и неаллельных взаимодействий генов в реализации данного признака в  $F_1$  существенно не связана с дивергенцией исходных родительских форм.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования было установлено наличие положительных ассоциаций между уровнем дивергенции исходных родительских форм и уровнем гетерозиса их гибридов, но недостаточно высоких для проведения надежного отбора компонентов скрещивания. Анализ полученных результатов, а также данных, опубликованных другими исследователями (Dekkers, Hospital, 2002; Renning *et al.*, 2008), свидетельствует о целесообразности дальнейших исследований по разработке эффективных методов отбора в селекции на гетерозис на основе ДНК-маркирования, поскольку при отсутствии информации о генетической составляющей исходного материала такой путь может служить единственным подходом, дающим возможность идентифицировать размах генетического пула селекционных коллекций и позволяет отбирать генетически неоднородный материал среди фенотипически сходных форм.

## ЛИТЕРАТУРА

Турбин Н.В., Хотыльёва Л.В., Тарутина Л.А. Диаллельный анализ в селекции растений. Минск: Наука и техника, 1974. 184 с.

- Becker H.C., Link W. Heterosis and hybrid breeding // 100 Years of genetics for plant breeding. Mendel, meiosis and marker. Brno (Czech Republic). 2000. P. 319–327.
- Birchler J., Auger D., Riddle N. In search of the molecular basis of heterosis // *Plant Cell*. 2003. V. 15. P. 2236–2239.
- Birchler J.A., Yao H., Chudalayandi S. *et al.* Heterosis // *The Plant Cell*. 2010. V. 22. P. 2105–2112.
- Cheres M.T., Miller J.F., Crane J.M., Knapp S.J. Genetic distance as a predictor of heterosis and hybrid performance within and between heterotic groups in sunflower // *Theor. Appl. Genet.* 2000. V. 100. P. 889–894.
- Dekkers J., Hospital F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations // *Nat. Rev. Genet.* 2002. V. 3. No. 1. P. 22–32.
- Fisher S., Melchinger A.E., Korzun V. *et al.* Molecular marker assisted broadening of the Central European heterotic groups in rye with Eastern European germplasm // *Theor. Appl. Genet.* 2010. V. 120. No. 2. P. 291–299.
- Frascaroli E., Canè M.A., Pè M.E. *et al.* QTL detection in maize testcross progenies as affected by related and unrelated testers // *Theor. Appl. Genet.* 2009. V. 118. P. 993–1004.
- Frei O.M., Stuber C.W., Goodman M.M. Use of allozymes as genetic markers for predicting performance in maize single cross hybrids // *Crop Sci.* 1986. V. 26(1). P. 37–42.
- Garcia A., Wang S., Melchinger A., Zeng Z.B. Quantitative trait loci mapping and the genetic basis of heterosis in maize and rice // *Genetics*. 2008. V. 180. P. 1707–1724.
- Jin-Xiong Shen, Ting-Dong Fu, Guang-Sheng Yang *et al.* Prediction of heterosis using QTLs for yield traits in rapeseed (*Brassica napus* L.) // *Euphytic*. 2006. V. 151. No. 2. P. 165–171.
- Moll R.H., Lonnquist J.H., Velez fortune J., Johnson E.C. The relationship of heterosis ad genetic divergence in maize // *Genetics*. 1965. V. 52. P. 139–144.
- Renming Z., Yinghua L., Zhenglin Y. *et al.* Prediction of hybrid grain yield performances in Indica Rice (*Oryza sativa* L.) with effect-increasing loci // *Mol. Breed.* 2008. V. 22. No. 3. P. 467–476.
- Selvaraj I., Nagarajan P., Thiyagarajan K., Bharathi M. Predicting the relationship between molecular marker heterozygosity and hybrid performance using RAPD markers in rice (*Oryza sativa* L.) // *Afr. J. Biothec.* 2010. V. 9(45). P. 7641–7653.
- Sprague G.F., Tatum L.A. General vs. specific combining ability in single crosses of corn // *J. Amer. Soc. Agron.* 1942. V. 34. P. 923–932.
- Syed N.H., Chen Z.J. Molecular marker genotypes, heterozygosity and genetic interactions explain heterosis in *Arabidopsis thaliana* // *Heredity*. 2005. V. 94. P. 295–304.

## USE OF RAPD MARKERS OPTIMIZES THE SELECTION OF SOURCE MATERIAL OF SWEET PEPPER (*CAPSICUM ANNUM* L.) IN BREEDING FOR HETEROSIS

**M.N. Shapturenko<sup>1</sup>, L.A. Tarutina<sup>1</sup>, T.V. Pechkovskaya<sup>1</sup>, L.A. Mishin<sup>2</sup>, L.V. Khotyleva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Genetics and Cytology, Belarus NAS, Minsk, Belarus,  
e-mail: Shapturenko@igc.bas-net.by;

<sup>2</sup> Institute of Vegetable Crops, Belarus NAS, Minsk, Belarus

### Summary

RAPD analysis of sweet pepper lines of various ecogeographical origins was made to study DNA screening efficiency for hybrid breeding. Genetic distances among parental lines were calculated. The collection was classified by UPGMA. Hybridization of polymorphic genotypes was carried out in 5 × 5 diallel cross. The combining ability of lines and the F<sub>1</sub> heterosis effect were evaluated. Combinations with high levels of heterosis for performance traits were revealed. The contributions of additive and dominant genes to the realization of the genetic potential of parental lines were determined. Our study showed that the specific combining ability of lines of the sweet pepper collection was more important for the formation of heterosis than the general combining ability. Positive correlations between DNA marker distances of parents and heterosis degree were found for some performance traits, however, their levels were low. We plan seeking specific DNA loci that would be positively associated with hybrid performance.

**Key words:** *Capsicum annum* L., sweet pepper, heterosis, combining ability, molecular markers, genetic distance.

УДК 576.311.342:633.63:511.137

## ГАРМОНИЧЕСКИЕ ПРОПОРЦИИ ЧИСЛА ХЛОРОПЛАСТОВ В ПОПУЛЯЦИЯХ ЗАМЫКАЮЩИХ КЛЕТОК УСТЬИЦ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (*BETA VULGARIS L.*)

© 2013 г. С.И. Малецкий, С.С. Юданова, Е.И. Малецкая

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

Поступила в редакцию 10 сентября 2012 г. Принята к публикации 12 февраля 2013 г.

Исследована изменчивость числа хлоропластов и числа пластотипов в замыкающих клетках устьиц сахарной свеклы. В качестве материала использованы три типа растений свеклы: самоопыленные потомства, популяция и коммерческие гетерозисные гибриды. Число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц варьирует: наименьшее число хлоропластов у гибридных растений, наибольшее число у инбредных линий и триплоидного гибрида. Наибольшее число пластотипов наблюдается у инбредных линий, наименьшее – у гибридов. В качестве интегральной характеристики ткани листа использована фрактальная размерность клеточной популяции, оценивающая в логарифмической шкале отношение среднего числа хлоропластов к числу пластотипов в клеточных популяциях. В экспериментальных выборках этот показатель варьировал от 1,17 до 1,23 у самоопыленных потомств и от 1,23 до 1,35 у гибридов (в среднем для гибридов он оказался равным 1,27).

**Ключевые слова:** замыкающие клетки устьиц, гармонические пропорции, пластотип, фрактальная размерность, числа Фибоначчи, хлоропласты.

Базовый компонент цитоплазмы растительной клетки – пластиды (хлоропласты, хромопласты, амилопласты) обладают собственным генетическим материалом и способностью к саморепродукции. Эти свойства пластид обуславливают их относительную автономию от других внутриклеточных структур. Хлоропласты встречаются в листьях, стеблях и зеленых плодах растений, а их число на клетку варьирует от нескольких штук до нескольких десятков (чаще 10–50 шт.) (Мокроносов, Федосеева, 1982).

Новый растительный эмбрион (семя) начинается с одной клетки (зиготы или апозиготы), содержащей ядро и цитоплазму с некоторым числом пропластид, из которых впоследствии формируются хлоропласты. Хлоропласты в клетках самоудваиваются и, как представляется, должны относительно равномерно распределяться между дочерними клетками в ходе цитокинеза (симметричное деление). Если бы

симметрия в распределении пластид сохранялась на протяжении всех циклов клеточных делений, то каждая клетка взрослого растения содержала бы столько же органелл, сколько их имела инициальная клетка. Однако в клеточных популяциях число хлоропластов варьирует не только в различных тканях, но даже в клетках одной и той же ткани (Мокроносов, Федосеева, 1982; Струк, Осипова, 1982).

Изменчивость числа органелл в клетках растений можно отнести к реализационной (или эпигенетической) изменчивости (Астауров, 1927; Струнников, 1989). Обозначим две вероятные причины вариации числа органелл в клетках. Во-первых, дочерние клетки получают неравное число органелл за счет асимметрии клеточных делений. Во-вторых, вариация числа хлоропластов в клетках связана с изменчивостью размеров (объема) клеточных ядер (эпигенетическая изменчивость) (D'Amato, 1985). О взаимозависимостях объемов ядра и цитоплазмы в



клетках известно давно, эта связь описывается правилом Р. Гертвига (Hertwig, 1903):

$$NP = \frac{V_n}{V_c - V_n}, \quad (1)$$

где  $NP$  – ядерно-плазменные отношения,  $V_n$  – объем ядра,  $V_c$  – объем цитоплазмы (Де Робертис и др., 1962).

Известно, что изменение объема ядра может быть связано с изменением числа геномов в ядрах клеток (эндоплоидия), что ведет и к изменению объема цитоплазмы клетки. Следствием этих внутриклеточных пертурбаций может стать увеличение или уменьшение числа органелл (хлоропластов) в цитоплазме. Иными словами, эпигеномная изменчивость в клеточных ядрах сопровождается эпипластомной изменчивостью числа хлоропластов в цитоплазме (Юданова и др., 2002, 2004). В ходе развития растений возможны различные варианты изменения плоидности ядер в клеточных популяциях: а) эндополиплоидия – кратное основному числу увеличение хромосомных наборов в ядре; б) эндогаплоидия – кратное основному числу уменьшение хромосомных наборов в ядре.

Для клеточных меристем свеклы присуща спонтанная миксоплоидность клеточных популяций (эпигеномная изменчивость) (Харечко-Савицкая, 1940; Lukaszewska, Sliwinska, 2007). Например, в меристеме диплоидного растения сахарной свеклы могут присутствовать клетки с различным набором хромосом в ядрах (гаплоидные, ди-, три- и тетраплоидные клетки), а уровень плоидности коррелирует с числом хлоропластов (Юданова и др., 2004). Впервые эта корреляция была выявлена японскими исследователями Н. Mochizuki и N. Sueoka в 1955 г. (коэффициент корреляции 0,9). По их данным, у диплоидных растений число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц варьировало от 12 до 16, у триплоидных – от 17 до 22 и у тетраплоидных – от 22 до 28 шт. на клетку (Mochizuki, Sueoka, 1955. Цит. по: Savitsky, 1966). Этим методом пользовались при массовом получении три- и тетраплоидных форм сахарной свеклы в 1950-е гг. (Панин и др., 1962; Savitsky, 1966). Асимметрия клеточных делений и изменчивость числа геномов на ядро определяют варибельность числа пластид в клеточных популяциях, формируя феномен эпигенетической изменчивости числа органелл на клетку.

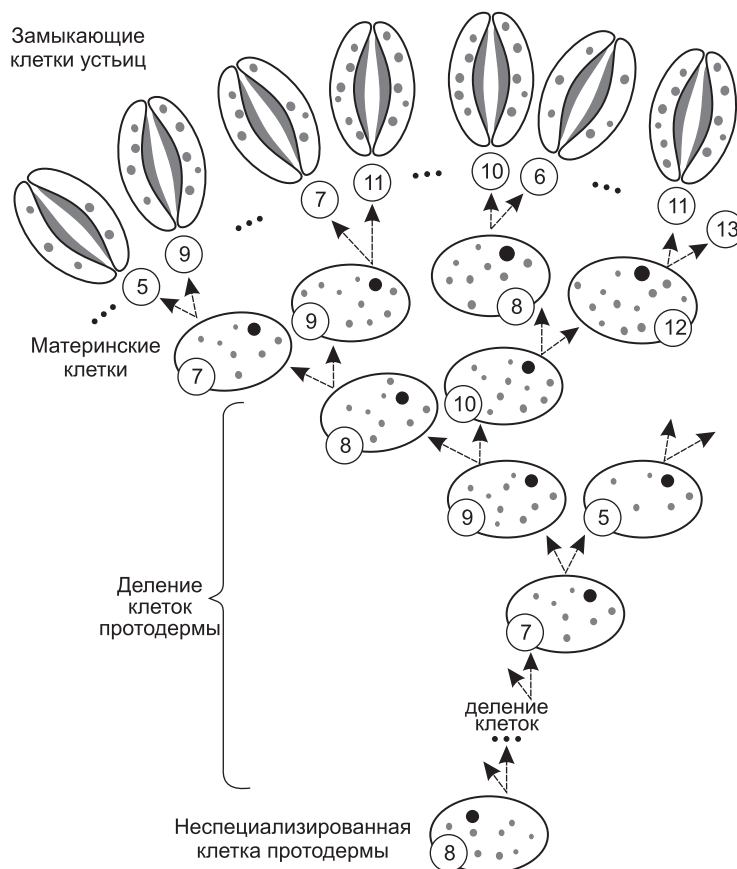
Рассматривая множество клеток с входящими в их состав органеллами, можно сказать, что в совокупности клетки листа или другого органа растения представляют сложную структуру, которую можно обозначить термином «пластидный фрактал, или цитофрактал». Фрактал – геометрическая фигура, состоящая из большого числа более или менее однородных частей, построенных по простым законам. Фракталы – удобная и наглядная абстракция, широко применяемая при моделировании естественных процессов. Как следует из литературы, эта абстракция позволяет описывать многие сложные природные системы, формируемые под действием очень небольшого числа простых закономерностей (Мандельброт, 2010).

Цитофрактал возникает и формируется вместе с возникновением и развитием ткани листа и представляет собой «генеалогическое древо», началом которому служит инициальная (примордиальная) клетка листа с определенным числом пластид (или пропластид) в цитоплазме (рис. 1). В ходе первого, а затем последующих клеточных делений (*генерирующее преобразование*) реализуется одна и та же итерационная процедура: клетка делится на две дочерние (цитокinesis) с равным или неравным числом пластид в них. После некоторого числа клеточных делений (поколений) формируется ткань листа, представленная множеством клеток с различным числом хлоропластов в цитоплазме, описываемых биномиальными распределениями.

Цель настоящей статьи – описать у самоопыленных потомств, межлинейных ди- и триплоидных гибридов и синтетической популяции сахарной свеклы следующие цитогенетические параметры: изменчивость числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц, числа пластидов в клеточных популяциях, размерность цитофрактала устьичных клеток, сформированного в тканях листа свеклы.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для исследования были взяты диплоидные формы свеклы селекции лаборатории популяционной генетики растений ИЦиГ СО РАН: а) самоопыленные потомства: БЦ-49-п-п (37 растений), РНС-6 и РНС-10 (19 и 10 растений соответственно); б) синтетическая



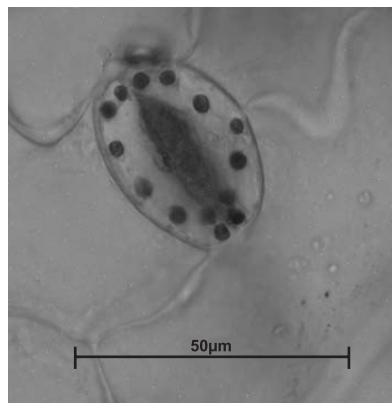
**Рис. 1** Схематическое изображение формирования изменчивости числа хлоропластов в популяции замыкающих клеток устьиц.

Цифра означает число хлоропластов в клетке.

популяция РНС (18 растений). Кроме того, в исследование были включены коммерческие гибриды сахарной свеклы иностранной селекции (11 диплоидных и 1 триплоидный гибриды): «Crocodil», «Leopard» (SES Vanderhave); «Ventura», «Mandarin» (Maribo seeds); «Zolea», «Berny», «Modus» «Achat» (Strube); «Klarina» (KWS); «Sylvetta», «Boruta» «Florata», «Triada», «Sucreta» (3x) (Syngenta). От каждого гибридного образца для наблюдения за числом хлоропластов в замыкающих клетках устьиц выбрано от 4 до 7 растений (табл.).

Подсчет числа хлоропластов проводили на листьях растений свеклы второго года жизни: брали листья среднего размера и исследовали эпидерму с нижней стороны листа. Для окрашивания хлоропластов на снятую эпидерму наносили каплю раствора азотнокислого серебра ( $\text{AgNO}_3$ ). По каждому препарату подсчитывали числа хлоропластов в 50 клетках (рис. 2). Общее

число исследованных клеток составило в целом по опыту 7550 шт. Всего число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и число пластотипов определены у 151 растения.



**Рис. 2.** Устьичная клетка с четырнадцатью хлоропластами.

Совокупное число пластид в отдельной клетке обозначается термином «пластотип». Любая клеточная ткань (популяция) представлена набором пластотипов. Величина  $Pt$  (plastotype) соответствует числу пластотипов в исследуемой ткани. Кроме числа пластотипов подсчитывали также среднее арифметическое число хлоропластов в каждой клеточной популяции ( $M$ ). Процесс клеточных делений продолжается до завершения роста листовой пластинки. Два клеточных параметра листовой ткани –  $M$  и  $Pt$  – образуют пропорцию ( $M : Pt$ ), которая динамически меняется в ходе онтогенеза. В итоге формируется клеточная ткань с определенным отношением числовых параметров  $M$  и  $Pt$ , которые характеризуют цитогенетический фрактал.

**Геометрическая модель клеточной популяции.** В качестве геометрической модели клеточной популяции использован фрактал. С математической точки зрения «фракталом называется множество, размерность Хаусдорфа-Базикевича для которого строго больше его топологической размерности» (Мандельброт, 2010. С. 31). В евклидовой геометрии под размерностью понимают число координат, необходимых для определения положения точки в пространстве, и различают одно-, двух- и трехмерные объекты. Для одномерных объектов (отрезок) увеличение линейного размера в два раза увеличивает его длину также в два раза ( $2^1$ ). Для двумерных объектов (прямоугольник) рост линейных размеров объекта в два раза приводит к увеличению его площади в четыре раза ( $2^2$ ). Для трехмерных объектов (куб) увеличение линейных размеров объекта в 2 раза приводит к увеличению его объема в 8 раз ( $2^3$ ).

Особенность фрактальных структур заключается в том, что их размерность не укладывается в привычные геометрические представления. Фракталы – это геометрические объекты с *дробной размерностью*, которые представляют собой фигуры, занимающие нишу между линией и поверхностью (*размерность от 1 до 2*) или поверхностью и трехмерной фигурой (*размерность варьирует от 2 до 3*). Иными словами, фракталы – это и не линия, и не поверхность, и не трехмерный объект, а нечто среднее между всеми ними (размерность таких объектов больше их топологической размерности –  $D_f > D_t$ ) (Мандельброт, 2010).

Как уже отмечено выше, множество генеалогически связанных между собой клеток, из которых состоит ткань листа, характеризуются нами двумя параметрами: числом *пластотипов в ткани* ( $Pt$ ) и *средним числом органелл на клетку* ( $M$ ). Среднее число органелл на клетку и число пластотипов в ткани листа можно связать формулой (2):

$$M = Pt^D, \quad (2)$$

где  $D$  – фрактальная размерность клеточных популяций по числу органелл (Мандельброт, 2010). Тогда фрактальную размерность клеточных популяций можно найти по формуле (3):

$$D = \ln M / \ln Pt. \quad (3)$$

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Средние значения числа хлоропластов и пластотипов в замыкающих клетках устьиц по всем выборкам приведены в табл. Всего хлоропласты просмотрены у 17 различных образцов свеклы, представленных 151 растением. Из таблицы видно, что число хлоропластов на клетку зависит, с одной стороны, от уровня ploидности генома, а с другой – от системы репродукции растений (самоопыление или скрещивание). Так, у диплоидных гетерозисных гибридов (см. табл.) среднее число хлоропластов ( $M$ ) варьировало от 12 до 15 шт. на клетку, тогда как у триплоидного гибрида («Sucrета») среднее число хлоропластов на клетку составило чуть более 18 шт. Найденные числа хлоропластов в клетках эпидермы листа у ди- и полиплоидных растений свеклы соответствуют данным, опубликованным ранее (Панин и др., 1962; Savitsky, 1966; Юданова и др., 2002, 2004). Отметим также, что при больших выборках различия между средними значениями числа хлоропластов у разных образцов свеклы всегда статистически достоверны и в настоящем сообщении из-за их громоздкости не приводятся.

Число пластотипов у 13 диплоидных гибридов в среднем варьировало от 7,4 до 8,6, тогда как у триплоидного гибрида это значение составило величину 9,4. Изменчивость числа хлоропластов и пластотипов зависит не только от ploидности ядер, но также и от состояния генома клеток, связанного со способами семенной репродукции. У синтетической популяции РНС (получена свободным переопылением

большого числа инбредных линий) среднее число хлоропластов на клетку составило 15,3, а число пластотипов – 11,7 (п/п 4) (табл.). У самоопыленных потомств, полученных после однократного самоопыления, отмечены большая изменчивость, чем у родительской популяции РНС (эффект инбридинга или инбредной депрессии), а также возрастание среднего числа хлоропластов на клетку – до 19–20 шт. (п/п 2–3). У инбредной линии БЦ-49-п-п среднее число хлоропластов ( $M$ ) на клетку оказалось равным 18. Таким образом, увеличенное число хлоропластов в устьичных клетках эпидермы свеклы наблюдается: а) в инбредных потомствах

сахарной свеклы; б) у полиплоидного (триплоидного) гибрида.

Сходный тип изменчивости присущ и другому параметру – числу пластотипов ( $Pt$ ) в ткани эпидермы листа. Среднее число пластотипов в клеточных популяциях диплоидных гибридов варьировало от 7,4 до 8,6, а у триплоидного («Sucreta») составило 9,4. У синтетической диплоидной популяции РНС это число составило 11,7, а у самоопыленных потомств (РНС-6 и РНС-9) – 12,3 и 12,9 соответственно. Большее число пластотипов характерно и для диплоидной линии БЦ-49-п-п – 11,1 на клетку. Таким образом, в инбредных потомствах наблюдается

Таблица

Характеристика популяций замыкающих клеток устьиц сахарной свеклы по числу хлоропластов, пластотипов и фрактальной размерности клеток

Обозначение образцов	Число исследованных растений	Характеристики популяций хлоропластов					
		Среднее число хлоропластов на клетку		Число пластотипов в популяции замыкающих клеток устьиц		Фрактальная размерность клеток	
		min – max	$M$	min – max	$Pt$	min – max	$D$
Самоопыленные потомства							
БЦ-49-п-п (2x)	37	13–22	18,0	8–14	11,1	1,07–1,41	1,23
РНС-6 (2x)	19	17–23	19,8	10–16	12,9	1,07–1,38	1,21
РНС-10 (2x)	12	14–22	18,8	11–15	12,3	1,21–1,25	1,17
Диплоидная популяция							
РНС (2x)	18	14–19	15,3	8–12	11,7	1,09–1,42	1,23
Диплоидные гибриды							
Sylvetta (2x)	5	11–17	13,0	7–9	8,0	1,13–1,36	1,23
Zolea (2x)	5	11–14	12,1	7–9	7,6	1,17–1,29	1,23
Crocodil (2x)	5	11–13	12,0	6–8	7,4	1,15–1,42	1,25
Mandarin (2x)	7	12–16	14,3	8–9	8,4	1,17–1,31	1,26
Leopard (2x)	4	14–17	14,9	7–10	8,5	1,13–1,45	1,27
Florata (2x)	5	12–15	13,0	7–8	7,4	1,24–1,32	1,28
Klarina (2x)	5	12–15	13,0	5–10	8,0	1,07–1,55	1,30
Berny (2x)	5	13–15	13,9	6–9	7,6	1,22–1,44	1,31
Triada (2x)	5	13–14	13,6	6–10	7,6	1,11–1,47	1,32
Modus (2x)	5	13–15	14,6	6–9	7,6	1,23–1,52	1,32
Ventura (2x)	4	13–16	14,4	7–9	7,5	1,20–1,41	1,33
Boruta(2x)	5	14–16	15,6	7–8	7,6	1,27–1,44	1,35
Гибрид (триплоидный)							
Sucreta (3x)	5	17–19	18,1	7–11	9,4	1,18–1,51	1,31
Итого	151						

большая изменчивость (нестабильность) числа пластотипов в клеточных популяциях, чем у гибридных растений (ди-, и триплоидных).

На основе цитогенетических параметров  $M$  и  $Pt$  подсчитана фрактальная размерность ( $D$ ) генеалогического древа замыкающих клеток устьиц эпидермы листа по каждому образцу (формула 3; табл.). Суммарно у всех исследованных образцов показатель  $D$  варьирует от 1,17 до 1,35. Значение этого показателя различно у самоопыленных потомств и у гибридов. Наименьшее значение (1,17) параметра  $D$  отмечено у инбредных растений, наибольшее значение – у гибридов (1,31–1,35). В самоопыленных потомствах этот показатель варьировал от 1,17 до 1,23. Подсчитав средневзвешенное значение  $D$  для 3 самоопыленных потомств (68 растений), находим, что это значение близко к величине 1,21. Средневзвешенное значение  $D$  для 14 гибридных потомств (83 растения) составило 1,27. Размерность замыкающих клеток устьиц в ткани эпидермы листа, равная 1,27, вероятно, является одной из цитогенетических констант эпидермальной ткани листа у гибридов сахарной свеклы.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Изменчивость числа хлоропластов в клетках эпидермальной ткани (замыкающих клетках устьиц) генетически связана с изменчивостью числа этих органелл в меристемной ткани. «По происхождению эпидерма – первичная покровная ткань, поскольку развивается непосредственно из верхнего слоя апикальной меристемы – протодермы... Замыкающие клетки отличаются от обычных клеток эпидермы наличием хлоропластов... В процессе индивидуального развития замыкающие клетки образуются так. Одна из клеток протодермы становится материнской, в результате ее деления образуются две клетки – дочерние. Они и развиваются как замыкающие...» (Хржановский, 1976. С. 81–82). Эпидермальные клетки наследуют (фиксируют) свойства материнских (протодермальных) клеток – их линейные размеры, плоидность клеточных ядер и число внутриклеточных органелл в цитоплазме. Поэтому изменчивость числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц в точности соответствует

изменчивости этого числа в меристематических клетках листового апекса.

Изменение отношения между объемом ядра и цитоплазмы, а также рост числа хлоропластов в клетках полиплоидов описаны ранее у многих видов растений. «Полиплоидия <...> сопровождается нарушением свойственных нормальной клетке отношений между ядром и цитоплазмой. <...> Не только общая масса клетки возрастает непропорционально увеличению числа наборов хромосом, но и количество хлоропластов в клетке у полиплоидов увеличивается не в строгом соответствии с увеличением количества хромосом» (Рыжков, 1962. С. 34).

В тканях листа диплоидных растений свеклы наблюдается вариация числа хлоропластов в клетках, связанная как с асимметрией клеточных делений, так и с вариациями объемов ядер клеток. Объемы клеточных ядер, в свою очередь, определяются уровнем тканевой миксоплоидии, который у диплоидных растений может меняться спонтанно или экспериментально. «Уровень миксоплоидии можно увеличить, обработав растения раствором колхицина, блокирующего веретено деления при кариокинезе. В итоге в клеточных популяциях снизится доля диплоидных и возрастет доля тетраплоидных клеток, а среднее число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц в миксоплоидном поколении  $C_0$  возрастет примерно на 25–30 %» (Юданова и др., 2004. С. 931).

Как показано выше (табл.), изменчивость числа хлоропластов, с одной стороны, вероятно, определяется асимметричностью клеточных делений, что, в свою очередь, связано с цитогенетической нестабильностью клеток и вызвано гомозиготностью геномов, возникающей при самоопылении. У инбредных растений увеличено как среднее число органелл в цитоплазме клеток, так и среднее число пластотипов в клеточных популяциях. Увеличение этих параметров у инбредных форм свеклы приводит к снижению фрактальной размерности устьичной ткани, если сравнивать эти параметры у инбредных и гибридных растений. Эти показатели оказываются близкими у инбредных линий и триплоидного гибрида, что свидетельствует о нестабильности клеточных популяций инбредных линий.

Более высокий уровень изменчивости клеточных популяций по числу хлоропластов

и числу пластотипов в замыкающих клетках устьиц у инбредных растений по сравнению с аналогичной изменчивостью этого же признака у гибридов свидетельствует о том, что наблюдаемую изменчивость следует отнести к эпигенетической изменчивости или к так называемой «реализационной изменчивости» (Струнников, 1989). Наиболее интересной особенностью этого типа изменчивости является то, что она обязана не генотипу растений, и не условиям их выращивания, а реальным процессам, складывающимся в ходе онтогенеза. Гомозиготность растений вызывает большую нестабильность в развитии инбредных растений по сравнению с гибридными растениями, и эту нестабильность можно выявить при анализе не только количественных признаков растений, но и цитогенетических (число органелл в клетках листа). Этот тип изменчивости впервые исследован и описан Б.Л. Астауровым (1927, 1974) и получил в литературе название – «правило Астаурова» (Бабков, 1985).

У гибридных растений отмечено меньшее число органелл на клетку и меньшее число пластотипов в популяциях клеток. Фрактальная размерность ( $D$ ) в популяциях устьичных клеток у различных образцов сахарной свеклы варьировала от 1,07 до 1,51, а средние значения показателя по 17 исследованным образцам менялись от 1,23 до 1,35. Отметим, что по этому показателю нет отличия диплоидных гибридов от триплоидного. В объединенной популяции гибридных растений среднее значение фрактальной размерности в популяции замыкающих клеток устьиц ( $D = 1,27$ ) (табл.) находится в соответствии с трансцендентной величиной – 1,272:  $\sqrt{\Phi} = \sqrt{1,618034 \dots} = 1,27202\dots$ , или  $4/\pi = 1,27202\dots$ , где  $\Phi$  – число «фи» (отношение Фибоначчи),  $\pi$  – трансцендентное число (отношение длины окружности к ее диаметру).

Можно думать, что найденное отношение (или фрактальный размер числа хлоропластов в популяции клеток листа сахарной свеклы) является одной из биологических констант (инвариантом), связанных с внутриклеточными пропорциями, обозначаемыми как «золотое сечение». Число 1,27 найдено у гибридных растений свеклы, тогда как у инбредных линий формируется иная пропорция. Как известно, первой группе растений (гибридам) присущ эффект гетерозиса

(гибридной мощности), а второй группе (инбредным растениям) – эффект депрессии.

Таким образом, показатели  $D$ , найденные у различных образцов клеточных популяций эпидермы листа, соответствует числам, обозначаемым в математике как  $p$ -числа, или числа Фибоначчи<sup>1</sup>, которым соответствуют золотые  $p$ -пропорции<sup>2</sup> (Стахов, 2006). Золотые пропорции (геометрическое понятие) представляют собой деление целого на две неравные части (например деление отрезка в крайнем и среднем отношении). А.П. Стаховым описан общий принцип деления целого на части, который назван «обобщенным принципом золотого сечения». Согласно обобщенному принципу, деление целого на части содержит в себе в качестве частных случаев как «принцип дихотомии» ( $p = 0$ ), так и «принцип золотого сечения» ( $p = 1$ ), а также другие гармонические пропорции ( $p \geq 2, 3, 4, \dots$ ) (Стахов, 2006), которые также наблюдаются в эксперименте.

Золотое сечение<sup>3</sup> – один из инвариантов и один из принципов самоорганизации живой материи. «По словам М. Борна, «наука – это не что иное, как попытка конструировать инварианты там, где они не очевидны. ... Идея инвариантов является ключом к рациональному понятию реальности» (Сороко, 1984. С. 72). «Через все значения слова «устойчивость», – пишет У.Р. Эшби, – проходит основная идея «инвариантности». Эта идея состоит в том, что хотя система в целом претерпевает последовательные изменения, некоторые ее свойства («инварианты») сохраняются неизменными. Таким образом, некоторое высказывание о системе, несмотря на непрерывное изменение, будет неизменно истинным» (Там же. С. 71). Описанные выше гармонические пропорции  $D$  по

<sup>1</sup> Ряд чисел 0, 1, 1, 2, 3, 5, 8, 13, 21, 34, 55, 89 и т. д. известен как ряд Фибоначчи. Каждый член числовой последовательности, начиная с третьего, равен сумме двух предыдущих  $2 + 3 = 5$ ;  $3 + 5 = 8$ ;  $5 + 8 = 13$ ;  $8 + 13 = 21$ ;  $13 + 21 = 34$  и т. д., а отношение смежных чисел ряда ( $a_{n+1}/a_n$ ) приближается к отношению золотого сечения (например,  $89/55 = 1,618\dots = \Phi$ ).

<sup>2</sup> «Между числами 2 и 1 находится бесконечное число иррациональных чисел, золотых  $p$ -пропорций, которые выражают более сложные «гармонии», чем классическая золотая пропорция = 1,618... (Стахов, 2006. С. 188).

<sup>3</sup> Золотое или гармоническое деление – это деление единичного отрезка в крайнем и среднем отношении. Термины «золотое деление, золотое сечение или божественная пропорция» ввел в конце XV в. Леонардо да Винчи».

числу органелл в клетках позволяют оценивать количественно реализационную изменчивость клеточных популяций растений.

Таким образом, число хлоропластов и пластотипов в замыкающих клетках устьиц варьирует как у гибридов, так и инбредных линий. Наибольшее число пластотипов наблюдается у инбредных линий, наименьшее – у гибридов. Фрактальная размерность, присущая клеточным популяциям, варьировала от 1,17 до 1,23 у самоопыленных потомств и от 1,23 до 1,35 у гибридов (в среднем для гибридов она оказалась равной 1,27).

Настоящая работа выполнялась при финансовой поддержке грантов РФФИ № 12-04-90000 Бел\_а, № 13-04-00012\_A и интеграционного гранта № 3 Президиумов СО РАН и НАН Беларуси.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Астауров Б.Л. Исследование наследственного изменения галтеров у *Drosophila melanogaster* // Журн. эксперим. биологии. 1927. Т. 3. Вып. 1/2. С. 1–61; вып. 3/4. С. 199–201.
- Астауров Б.Л. Исследование наследственных нарушений билатеральной симметрии в связи с изменчивостью одинаковых структур в пределах организма // Наследственность и развитие. Избр. тр. М.: Наука, 1974. С. 54–109.
- Бабков В.В. Принцип Астаурова: автономная изменчивость признаков // Московская школа эволюционной генетики. М.: Наука, 1985. С. 59–72.
- Де Робертис Е., Новинский В., Сазс Ф. Общая цитология. М.: Иностран. лит-ра, 1962. Гл. XII. С. 262–279.
- Мандельброт Б. Фрактальная геометрия природы. М.; Ижевск: Ижевский ин-т компьютерных исследований, НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2010. 656 с.
- Мокронос А.Т., Федосеева Г.П. Структурно-функциональные изменения фотосинтетического аппарата при полиплоидии // Популяционно-генетические аспекты продуктивности растений. Новосибирск: Наука, 1982. С. 45–62.
- Панин В.А., Панина Е.Б., Зосимович В.П., Лутков А.Н. Методика массового получения и отборов тетраплоидных форм сахарной свеклы. Киев: Изд-во АН УССР, 1962. 41 с.
- Рыжков В.Л. Полиплоидия и количественно-качественные отношения в генетике // Полиплоидия у растений. М.: Изд-во АН СССР, 1962. С. 33–38.
- Сороко Э.М. Структурная гармония систем. Минск: Наука и техника, 1984. 284 с.
- Стахов А.П. Золотое сечение, священная геометрия и математика гармонии // Метафизика. Век XXI: Сб. тр. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006. С. 174–215.
- Струк Т.И., Осипова З.А. Влияние гибридизации и полиплоидии на структурную организацию листа у сахарной свеклы // Популяционно-генетические аспекты продуктивности растений. Новосибирск: Наука, 1982. С. 77–87.
- Струнников В.А. Третья изменчивость // Природа. 1989. № 2. С. 17–27.
- Харечко-Савицкая Е.И. Цитология и эмбриология сахарной свеклы // Свекловодство. Киев: Госсельхозиздат, 1940. Т. 1. С. 453–550.
- Хржановский В.С. Система покровных тканей // Курс общей ботаники. М.: Высш. шк., 1976. С. 81–88.
- Юданова С.С., Малецкая Е.И., Малецкий С.С. Изменчивость числа хлоропластов в популяциях замыкающих клеток устьиц у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. 2002. Т. 38. № 1. С. 72–78.
- Юданова С.С., Малецкая Е.И., Малецкий С.И. Эпипластомная изменчивость числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. 2004. Т. 40. № 7. С. 930–939.
- D'Amato F. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerants // CRC Crit. Rev. Plant Sci. 1985. V. 3. No. 1. P. 73–112.
- Hertwig R. Über das Wechselverhältnis von Kern und Protoplasma // Sitzungsber. Ges. München, 1903. Bd. 18. H. 1. S. 77–100.
- Lukaszewska E., Sliwinska E. Most organs of sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) plants at the vegetative and reproductive stages of development are polysomatic // Sex. Plant Reproduction. 2007. V. 20. P. 99–107.
- Savitsky H.I. Effectiveness of selection for tetraploids plants in C<sub>0</sub> generation on the basis of the number of chloroplasts in stomata // Amer. Soc. Sugar Beet Technol. 1966. V. 13. No. 8. P. 655–661.

**HARMONIC PROPORTIONS OF CHLOROPLAST NUMBER  
IN STOMATA OF GUARD CELL POPULATIONS IN SUGAR BEET  
(*BETA VULGARIS* L.)**

**S.I. Maletskii, S.S. Yudanova, E.I. Maletskaya**

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

**Summary**

The variability of chloroplast number and plastotype number in stomata guard cell populations was analyzed. Experiments were done with three types of plants: inbred lines, a synthetic population and commercial heterosis hybrids. Chloroplast numbers in stomata guard cells of different plant groups are different: the greatest chloroplast number was recorded in inbred lines and triploid hybrid, and the smallest, in commercial hybrids. The greatest number of plastotypes was observed in inbred lines, and the smallest, in hybrids. The fractal dimension of stomata guard cell populations was used for characterization of tissue cells in sugar beet. It estimates in a logarithmic scale the ratio between the chloroplast number and plastotype number. In the samples studied, it varied from 1,17 to 1,23 in inbred lines and from 1,23 to 1,35 in commercial hybrids (average 1,272).

**Key words:** guard cells, harmonic proportions, plastotype, fractal dimension, Fibonacci numbers, chloroplasts.



УДК 575.162

## ПЕРЕНОС ТРАНСГЕНОВ *ARGOS-LIKE* И *AtEXPA10* В НЕТРАНСГЕННЫЕ ФОРМЫ ТАБАКА И ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ИХ КОНСТИТУТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ

© 2013 г. **Б.Р. Кулуев, Е.В. Михайлова, А.В. Чемерис**

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук,  
Уфа, Россия, e-mail: kuluev@bk.ru

Поступила в редакцию 19 июня 2012 г. Принята к публикации 14 февраля 2013 г.

Путем переопыления трансгенных по генам *ARGOS-LIKE* и *AtEXPA10* растений *Nicotiana tabacum* сорта Petit Havana SR1 с *Nicotiana tabacum* сорта Черный кубинский и вида *Nicotiana rustica* были получены гибридные растения. Методом ОТ-ПЦР было показано, что гибридные растения характеризуются высоким уровнем экспрессии трансгенов *ARGOS-LIKE* и *AtEXPA10*, что фенотипически выражалось увеличением размеров их листьев и стебля. Органы как трансгенных, так и гибридных растений увеличивались за счет возрастания размеров отдельных клеток. Наследование трансгенов было стабильным, а их фенотипические проявления варьировали от незначительных до превышающих таковые в родительских трансгенных растениях.

**Ключевые слова:** *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica*, *AtEXPA10*, *ARGOS-LIKE*, трансгенные растения, переопыление, клеточное растяжение, величина органов.

### ВВЕДЕНИЕ

Разработка методов создания трансгенных растений с увеличенными размерами органов является одним из новых направлений в растительной биотехнологии (Mizukami, Fischer, 2000; Hu *et al.*, 2003, 2006; Feng *et al.*, 2011). Для получения таких растений, например, могут быть использованы гены-регуляторы клеточного растяжения, так как увеличение размеров отдельных клеток приводит в конечном счете к увеличению размера органов (Cho, Cosgrove, 2000). Также для этих целей применяются гены, контролирующие число клеточных делений в зачатках органов (Mizukami, Fischer, 2000). Различные виды пасленовых широко используются в пищевых и декоративных целях. В связи с этим получение трансгенных растений этого семейства с увеличенными размерами органов является актуальной и коммерчески перспективной задачей. При этом, если методы получения трансгенных форм *Nicotiana*

*tabacum* определенных сортов, таких, как Petit Havana SR1 и других, относительно легко воспроизводимы, то же самое нельзя сказать про трансформацию других видов семейства пасленовых. Наиболее легким и быстрым способом получения трансгенных растений, относящихся к другим видам рода *Nicotiana*, может стать их переопыление с уже модифицированными табаками лабораторных сортов, которые были созданы в рамках фундаментальных исследований. Подобные эксперименты имеют значение как для проведения исследований процессов переопыления и фенотипических проявлений различных генов в гетерологичных условиях, так и в прикладных целях для получения гибридов хозяйственно важных трансгенных растений, которые могут оказаться носителями полезных генетических признаков.

Для получения трансгенных растений с измененными размерами органов в данной работе нами были использованы гены-регуляторы клеточного растяжения *ARGOS-LIKE* (*ARL*) и

*AtEXPA10*, выделенные из *Arabidopsis thaliana*. Белковый продукт гена *ARL* регулирует процессы клеточного роста (Hu *et al.*, 2006) и располагается на эндоплазматическом ретикулуме, и, видимо, относится к системе трансдукции фитогормональных сигналов от ауксинов и цитокининов к транскрипционным факторам (Feng *et al.*, 2011). Ген *AtEXPA10* *A. thaliana* кодирует белок из семейства экспансинов и активно экспрессируется в черешках и трихомах растущих листьев, а также в базальной области черешка (Cho, Cosgrove, 2000). Благодаря своим способностям разрыхлять клеточную стенку, экспансины стимулируют клеточное растяжение и таким образом участвуют в контроле роста клеток и органов растений (Шарова, 2007). Нами ранее было показано ощутимое влияние сверхэкспрессии гена *AtEXPA10* на величину вегетативных органов трансгенных растений табака за счет увеличения размеров клеток (Кулуев и др., 2012). Сверхэкспрессия гена *ARL* также приводит к увеличению конечных размеров органов у трансгенных растений (Hu *et al.*, 2006). Однако для применения генов *AtEXPA10* и *ARL* на практике необходимы также знания об эффективности их передачи и сохранения их фенотипических проявлений в гетерологичных условиях в ряду поколений. В связи с этим целью данного исследования стало изучение передачи и фенотипических проявлений трансгенов *AtEXPA10* и *ARL* в растениях в условиях контролируемого эксперимента. Объектом морфологических исследований были трансгенные растения табака и гибриды, полученные в ходе скрещивания трансгенных растений *Nicotiana tabacum* L. Petit Havana SR1 с нетрансгенными табаками сорта Черный кубинский вида *Nicotiana tabacum* L. и табаками вида *Nicotiana rustica* L. (махорка).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были задействованы нетрансгенные растения сорта Черный кубинский вида *N. tabacum* L. производства ООО «Агрофирма АЭЛИТА-ФЛОРА» и махорки *N. rustica* L. производства ОАО «ФЛОРА», которые в ходе эксперимента опылялись пыльцой трансгенных растений табака *N. tabacum* L. сорта Petit Havana SR1, содержащих гены

*AtEXPA10* или *ARL* *A. thaliana*. Ген *AtEXPA10* (NM\_102440.3) амплифицировали из геномной ДНК *A. thaliana* при помощи праймеров AtEXPF AGACGTAACATGGGTCATC и AtEXPR TGCCSTTTTAAACGGAAGCTG. Ген *ARL* (NM\_180078.3) был амплифицирован из геномной ДНК *A. thaliana* при помощи праймеров ARLF CTTCTTTAAATGATTCGTGAG и ARLR TTATTACATAAAAAGTGGAAG. Целевые гены клонировали в бинарных векторах серии pCambia, содержащих селективный ген устойчивости к гиромоцину и 35S промотор вируса мозаики цветной капусты, контролирующей в векторе транскрипцию целевого гена. Вектор pCambia1301 с геном *AtEXPA10* содержал также репортерный ген *GUS*, кодирующий β-глюкуронидазу. Трансгенные формы табака получали методом агробактериальной трансформации листовых дисков (Gallois, Marinho, 1994). Первичные трансгенные T<sub>0</sub>-побеги отбирали на селективной среде МС (Murashige, Skoog, 1962) с добавлением 1 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л НУК, содержащей 25 мг/л гиромоцина (Нуг). Перепыление нетрансгенных растений *N. tabacum* и *N. rustica* с трансгенными осуществляли искусственно путем нанесения пыльцы трансгенного табака на рыльце нетрансгенного растения одноразовой пластмассовой петлей. Перед этим проводилось изъятие тычинок цветков до образования на них пыльцы, чтобы предотвратить самоопыление. Для контроля наследования трансгенов семена, стерилизованные путем последовательного погружения в 70 %-й спирт и 15 %-ую белизну, проращивали на среде МС с добавлением гиромоцина. Сеянцы, в течение месяца погибавшие в чашках Петри, считались неимеющими гена устойчивости к гиромоцину. Сеянцы, активно растущие в чашках Петри, считались унаследовавшими ген устойчивости к антибиотику и пересаживались в почву. Все растения культивировали при температуре 25 °С с фотопериодом 16/8 ч (свет/темнота) и освещенностью около 10 клк в вегетационных сосудах объемом 450 мл, заполненных универсальным грунтом («Гера», Россия). Качественную оценку активности репортерного гена *GUS* в листьях растений определяли гистохимически при помощи субстрата x-gluc (Jefferson *et al.*, 1987). Из листьев исследуемых растений выделяли тотальную РНК, которую использовали в

качестве матрицы при построении первой цепи кДНК. Для ОТ-ПЦР гена *AtEXPA10* применили праймеры ATGGGTCATCTTGGGTTCTT и TTAACGGAACCTGTCCACCGG. Для ОТ-ПЦР гена *ARL* использовали праймеры GGAGATCATAACCGGAAAAACACGAGT и AGAAGAA GGCATGAAAGCAAGAACCA. Для ОТ-ПЦР мРНК гена, кодирующего  $\alpha$ -тубулин табака, использовали праймеры tubAF CAAGGTGCAAAGGGCTGTATGTATGA и tubAR GCACCAACTTCCTCGTAATCCTTTTC. ОТ-ПЦР проводили в следующих условиях: начальная денатурация (94 °C, 2 мин); 30 циклов амплификации со следующими параметрами: денатурация – 94 °C, 40 с; 2) отжиг – 56 °C, 40 с; синтез – 72 °C, 30 с.

Затем проводили инкубацию при 72 °C в течение 2 мин. Для изучения влияния экспрессии целевого гена на размеры органов растения в период цветения производились измерения длины стебля, средней длины трех нижних листьев и размера коробочек. Размер выборки по каждому варианту контрольных и опытных растений составлял от 3 до 18. Нетрансгенные растения сорта Черный кубинский вида *N. tabacum* L. и махорки *N. rustica* L. были обозначены как контроль-1. Трансгенные растения *N. tabacum* L. сорта Petit Havana SR1 обозначены как контроль-2. Гибриды растений сорта Petit Havana SR1 с сортом Черный кубинский или с махоркой были обозначены как контроль-3 (табл. 1, 2).

Таблица 1

Данные сравнительного морфологического анализа трансгенных по гену *ARL* растений табака и гибридных растений табака сорта Черный кубинский (ЧК), полученных при переопылении

Группа растений	Размер выборки	Параметр		
		высота стебля, см	длина листьев, см	площадь клеток эпидермиса листьев, мкм <sup>2</sup>
Контроль-1	3	94,0 ± 2,4	19,5 ± 0,3	25049 ± 1208
Контроль-2	3	79,0 ± 3,0	17,9 ± 0,2	15514 ± 770
<i>N. tabacum</i> SR1/ARL	10	100,3 ± 6,2	22,0 ± 0,3	23528 ± 915
Контроль-3	3	98,0 ± 3,8	19,0 ± 0,8	13961 ± 281
Гибриды ЧК × SR1/ARL:				
поколение F <sub>1</sub>	16	106,7 ± 7,4	21,7 ± 1,0	27778 ± 2066
поколение F <sub>2</sub>	8	111,0 ± 5,6	23,3 ± 0,5	39812 ± 1505

Таблица 2

Данные сравнительного морфологического анализа трансгенных по гену *AtEXPA10* растений табака с гибридными растениями *N. rustica*, полученных при переопылении

Группа растений	Размер выборки	Параметр		
		высота стебля, см	длина листа, см	площадь клеток эпидермиса листьев, мкм <sup>2</sup>
Контроль-1	3	45 ± 4	11,1 ± 0,8	16265 ± 804
Контроль-2	3	79 ± 3	17,9 ± 0,6	15514 ± 770
<i>N. tabacum</i> SR1/AtEXPA10	8	102 ± 3	21,0 ± 0,6	19330 ± 592
Контроль-3	3	44 ± 2	11,5 ± 0,5	16344 ± 702
Гибрид <i>N. rustica</i> /AtEXPA10 № 1	4	66 ± 3	15,3 ± 0,5	66690 ± 5985
Гибрид <i>N. rustica</i> /AtEXPA10 № 2	4	48 ± 2	11,0 ± 0,4	29870 ± 696
Гибрид <i>N. rustica</i> /AtEXPA10 № 3	4	56 ± 4	13,0 ± 0,3	48830 ± 3574
Гибрид <i>N. rustica</i> /AtEXPA10 № 4	4	37 ± 3	10,0 ± 0,9	32939 ± 1233
Гибрид <i>N. rustica</i> /AtEXPA10 № 5	4	42 ± 5	9,0 ± 0,8	33861 ± 2313

Согласно литературным данным в случае конститутивной экспрессии генов *ARL* и *AtEXPA10* *A. thaliana* увеличиваются размеры клеток как эпидермиса, так и мезофилла листьев (Cho, Cosgrove, 2000; Hu *et al.*, 2006). Поэтому было решено анализировать лишь размеры клеток нижнего эпидермиса листьев табака, так как измерение размеров клеток мезофилла более трудоемко и занимает много времени. Определение размеров и количества клеток нижнего эпидермиса листьев проводили при помощи универсального флюоресцентного микроскопа модели Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием оригинального программного обеспечения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

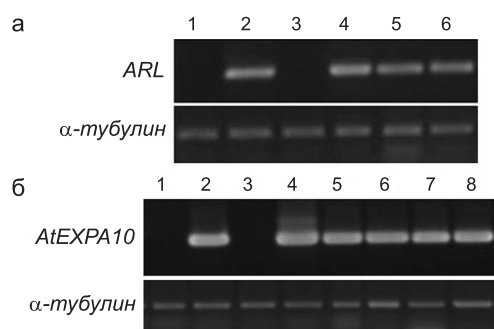
### Получение и анализ трансгенных растений *N. tabacum* сорта Petit Havana SR1, экспрессирующих гены *ARL* и *AtEXPA10* *A. thaliana*

Ген *ARL* был клонирован в бинарном векторе pCambia 1305.1, и на основе данной конструкции было получено 7 линий трансгенных растений табака, сеянцы которых на селективной среде демонстрировали соотношение выживших и погибших 3 : 1. В период цветения опытные растения по длине листьев и высоте стебля превосходили контрольные растения (контроль-2) в среднем на 23 и 27 % соответственно (табл. 1). Размеры клеток эпидермиса листьев у линий опытных растений были увеличены в среднем на 52 % по сравнению с контролем (контроль-2). На основе бинарного вектора pCambia 1301 нами ранее было получено 6 линий трансгенных по гену *AtEXPA10* растений табака (Кулуев и

др., 2012). В период цветения эти трансгенные растения второго поколения отличались увеличением длины листьев на 17 % и высоты стебля на 29 %, по сравнению с контролем-2 (табл. 2). Размеры клеток эпидермиса листьев у опытных растений увеличивались в среднем на 25 %. Методом ОТ-ПЦР было показано, что анализируемые трансгенные растения характеризуются высоким уровнем экспрессии целевых генов *ARL* и *AtEXPA10* (рис. 1).

### Морфологический анализ гибридных растений табака *N. tabacum* сорта Черный кубинский, экспрессирующих ген *ARL*

Для скрещивания с табаком сорта Черный кубинский использовали трансгенные по гену *ARL* растения табака сорта Petit Havana SR1, при этом переопыление происходило эффективно и без каких-либо препятствий. Образовавшиеся коробочки по размеру и количеству семян не отличались от таковых у родительских растений. Из 600 высеянных семян на среде с селективным антибиотиком взошло 85 %, причем 2/3 проростков были устойчивы к гигромицину. К условиям почвы было успешно акклиматизировано 16 гибридов табака Черный кубинский. В результате их самоопыления были также получены 8 растений второго поколения, которые проявили устойчивость к гигромицину. Для исключения влияния гетерозиса на размеры органов при морфологическом анализе в качестве контроля были использованы гибриды растений табака Черный кубинский с нетрансгенными растениями сорта Petit Havana SR1 (контроль-3). Некоторые линии опытных гибридных растений отличались значительным увеличением размеров органов, но в среднем



**Рис. 1.** Электрофореграммы результатов ОТ-ПЦР генов *ARL* и *AtEXPA10*.

а – экспрессия генов *ARL* и  $\alpha$ -тубулина в контрольных и опытных растениях. 1 – *N. tabacum* Petit Havana SR1; 2 – трансгенный по гену *ARL* *N. tabacum* Petit Havana SR1; 3 – *N. tabacum* сорта Черный кубинский; 4–6 – растения *N. tabacum* сорта Черный кубинский, переопыленные с трансгенными по гену *ARL* растениями *N. tabacum* Petit Havana SR1; б – экспрессия генов *AtEXPA10* и  $\alpha$ -тубулина в контрольных и опытных растениях. 1 – *N. tabacum* Petit Havana SR1; 2 – трансгенный по гену *AtEXPA10* *N. tabacum* Petit Havana SR1; 3 – *N. rustica*; 4–8 – растения *N. rustica*, переопыленные с трансгенными по гену *AtEXPA10* *N. tabacum* Petit Havana SR1.

гибриды первого поколения характеризовались увеличением высоты стебля на 9 %, а длины листьев – на 14 % (табл. 1). В то же время площади клеток эпидермиса листьев у всех гибридных растений были намного больше, чем у контрольных (контроль-3), и разница в среднем составила около 100 % (табл. 1). У гибридов второго поколения стебли были длиннее на 13 %, листья на 23 %, а клетки эпидермиса листьев на 185 % больше, чем у контрольных растений. Гибридные растения, имеющие относительно небольшие размеры листьев (12–14 см), характеризовались меньшей величиной клеток (в среднем 27993 мкм<sup>2</sup>). В целом размеры отдельных клеток эпидермиса у всех гибридных растений увеличивались в гораздо большей степени, чем размеры органов (табл. 1).

Для подтверждения эффективности передачи трансгенов был проведен ПЦР-анализ гибридов второго поколения. Во всех анализированных растениях содержался ген *ARL*. В гибридных растениях, характеризующихся увеличенными размерами органов, был зафиксирован высокий уровень экспрессии гена *ARL* (рис. 1, а).

#### Морфологический анализ гибридных растений табака *N. rustica*, экспрессирующих ген *AtEXPA10*

Для скрещивания с *N. rustica* использовались трансгенные по гену *AtEXPA10* растения *N. tabacum* сорта Petit Havana SR1. Около половины попыток переопыления не увенчались успехом. В результате было получено 20 коробочек, имеющих в среднем по 35 семян, что на порядок меньше количества семян, образующихся в результате самоопыления. Размеры коробочек с гибридными семенами были значительно меньше – 0,5 × 0,3 см, тогда как коробочки контрольного растения *N. rustica* имели размеры в среднем 1 × 1 см (рис. 2, а). Для дальнейшей работы была отобрана наиболее крупная коробочка (рис. 2, б), всхожесть содержащихся в ней семян при посеве на среду с селективным антибиотиком составила 61 %. Полученные проростки были использованы для морфологического анализа.

Пять растений были пересажены на почву и выращивались до стадии цветения. Затем были получены 5 линий гибридов второго

поколения, у которых были проведены измерения основных морфологических параметров (табл. 2) и анализ активности репортерного гена *GUS*. В качестве контроля использовали гибридные между нетрансгенными формами *N. tabacum* и *N. rustica* растения табака (контроль-3). Для морфологического анализа по каждому варианту растений было использовано по 3–4 растения.

Гибридные растения имели фенотип *N. rustica*, но с утолщенными листьями (рис. 3, з). По длине стебля и листьев лишь гибридные растения № 1 и № 3 характеризовались их значительным увеличением (табл. 2). Размеры органов других гибридов лишь немного превосходили или соответствовали контрольным растениям. Гистохимический анализ показал наличие активности гена *GUS* в гибридах № 1, № 3 и № 5 (рис. 3, ж). Эти же растения характеризовались наиболее значительным увеличением размеров клеток эпидермиса листьев (рис. 3, б, г, е). Увеличение размеров клеток наблюдалось и у двух *GUS*-отрицательных гибридов, но в гораздо меньшей степени (рис. 3, в, д).

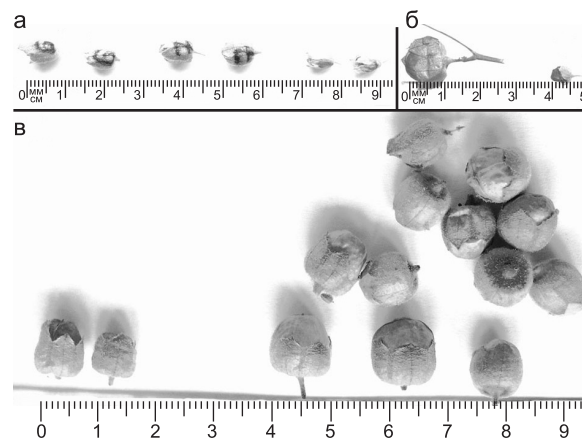
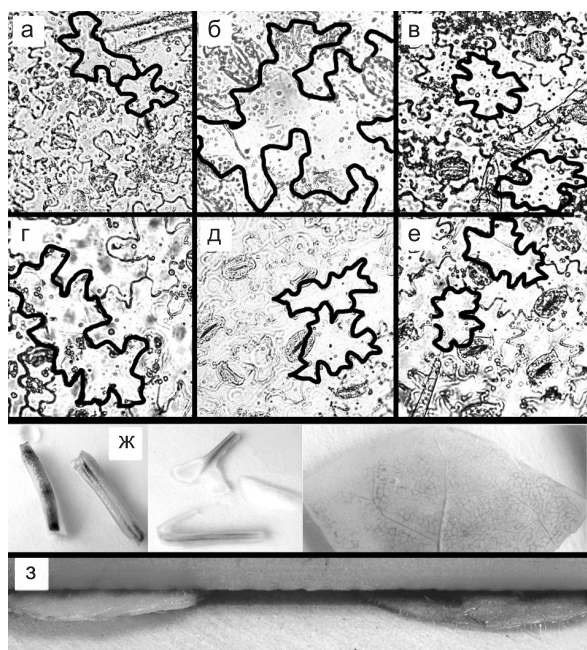


Рис. 2. Сравнение коробочек гибридных и диких форм растений *N. rustica*.

а – коробочки, полученные в результате опыления родительского нетрансгенного растения *N. rustica* пыльцой трансгенного по гену *AtEXPA10* табака Petit Havana SR1, семена которых оказались невсхожими; б – наиболее крупная коробочка, полученная в результате опыления родительского нетрансгенного растения *N. rustica* пыльцой трансгенного растения с геном *AtEXPA10* (слева), и коробочка, не содержащая семян (справа); в – коробочки, полученные в результате самоопыления родительского нетрансгенного растения *N. rustica* (слева), и коробочки, полученные в результате самоопыления гибридных растений *N. rustica* (справа).



**Рис. 3.** Морфологическая характеристика трансгенных по гену *AtEXPA10* и гибридных растений табака.

Клетки нижнего эпидермиса листьев (а–е): а – контрольное растение *N. rustica*; б – гибрид трансгенного растения и *N. rustica* № 1; в – гибрид № 2; г – гибрид № 3; д – гибрид № 4; е – гибрид № 5; ж – активность репортерного гена *GUS* в черешках и жилках листьев гибридных растений; з – сравнение толщины листьев *N. rustica* (справа) и ее гибрида с трансгенным растением (слева).

В среднем размеры клеток эпидермиса листьев у гибридных растений были увеличены на 160 % (табл. 2). Корреляции между размерами органов и величиной отдельных клеток в данном случае не обнаруживалось. Например, большие размеры клеток были характерны для гибридных растений № 5, но размеры их органов соответствовали контрольным растениям (табл. 2). Полученные гибриды также отличались увеличенным размером коробочек по сравнению с коробочками, полученными в результате самоопыления родительского нетрансгенного растения (рис. 2, в). Методом ПЦР было показано наличие репортерного гена *GUS* и целевого гена *AtEXPA10* во всех анализируемых гибридных растениях. Для 5 линий гибридных растений был проведен анализ экспрессии трансгена *AtEXPA10*, причем наибольшее количество мРНК целевого гена было характерно для гибридов № 1 (рис. 1, б,

4-я дорожка), которые отличались наибольшей степенью увеличения размеров клеток и органов.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Конститутивная экспрессия генов *ARL* и *AtEXPA10* в гетерологичных условиях так же, как и у *A. thaliana* (Cho, Cosgrove, 2000; Hu *et al.*, 2006), приводит к увеличению конечных размеров ряда органов. При этом в трансгенных растениях стимулируется в первую очередь клеточное растяжение, а количество клеток, наоборот, уменьшается. Видимо, в растениях существует компенсаторный механизм, регулируемый фитогормонами и транскрипционными факторами, который позволяет растениям поддерживать размеры органов, близкие к норме, несмотря на значительное увеличение размеров отдельных клеток. Несмотря на это, гены *ARL* и *AtEXPA10* все же могут быть применены на практике для получения хозяйственно важных растений с крупными размерами листьев и стебля, но, судя по нашим данным, степень увеличения органов, скорее всего, не будет превосходить 30 %. Для более существенного увеличения размеров органов, видимо, необходимо также стимулировать клеточное деление в зачатках органов (Mizukami, Fischer, 2000; Hu *et al.*, 2003) и в апикальной меристеме побега (Lenhard *et al.*, 2002), а также повышать уровень эндоредупликации (Sugimoto-Shirasu *et al.*, 2005). Кроме того, необходимо учитывать эффективность фотосинтеза, дыхания, биосинтеза белка и компонентов клеточной стенки, а также устойчивость растения к многочисленным неблагоприятным факторам среды.

Причиной увеличения размеров органов у полученных нами гибридных растений, видимо, являлся именно повышенный уровень экспрессии генов *ARL* и *AtEXPA10*, а не гетерозис, так как скрещивание нетрансгенных форм исследуемых сортов табака в наших исследованиях не приводило к увеличению длины листьев и, более того, иногда способствовало уменьшению размеров клеток (табл. 1). При переопылении трансгенных растений табака *N. tabacum* Petit Havana SR1 с другими видами и сортами табаков экспрессия трансгенов сохранялась на высоком уровне, а

их фенотипические проявления варьировали от незначительных до превышающих таковые в родительских трансгенных растениях. Это означает, что переопыление в принципе можно использовать в качестве одного из простых методов создания трансгенных форм растений, при этом их даже не надо вводить в культуру *in vitro*. Активность гена устойчивости к гигромицину в гибридах проявлялась гораздо чаще, чем активность репортерного гена *GUS*. Это, однако, не означает раздельную передачу этих двух маркерных генов в ходе переопыления, так как ПЦР-анализ показал наличие гена *GUS* в анализируемых гибридных растениях. Видимо, у части гибридных растений уровень экспрессии гена *GUS* сильно снижался или блокировался, несмотря на его наличие в геноме. Интересно отметить, что именно у гибридных растений с детектируемой активностью гена *GUS* наблюдалось более выраженное фенотипическое проявление целевого гена-регулятора клеточного растяжения. В результате переопыления представителей одного вида (*N. tabacum*) оплодотворение всегда было эффективным. При скрещивании же двух разных видов (*N. tabacum* и *N. rustica*) оплодотворение происходило гораздо реже и семян образовывалось меньше, чем при самоопылении. Методами ПЦР и ОТ-ПЦР были доказаны наличие и экспрессия целевых генов у гибридов второго поколения, что подтверждает возможность использования полученных нами трансгенных растений табака на практике, например, для декоративных целей или повышения урожайности.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ мол-а № 12-04-31292.

## ЛИТЕРАТУРА

- Кулуев Б.Р., Князев А.В., Лебедев Я.П., Чемерис А.В. Морфофизиологическая характеристика трансгенных растений табака, экспрессирующих гены экспансинов *AtEXPA10* арабидопсиса и *PnEXPA1* тополя // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 1. С. 108–117.
- Шарова Е.И. Экспансины – белки, размягчающие клеточные стенки в процессе роста и морфогенеза растений // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 6. С. 805–819.
- Cho H.T., Cosgrove D.J. Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 9783–9788.
- Feng G., Qin Z., Yan J. *et al.* Arabidopsis *ORGAN SIZE RELATED1* regulates organ growth and final organ size in orchestration with ARGOS and ARL // New Phytologist. 2011. V. 191. P. 635–646.
- Gallois P., Marinho P. Leaf disk transformation using *Agrobacterium tumefaciens*-expression of heterologous genes in tobacco // Methods Mol. Biol. 1994. V. 49. P. 39–48.
- Hu Y., Poh H., Chua N. The Arabidopsis *ARGOS-LIKE* gene regulates cell expansion during organ growth // Plant J. 2006. V. 47. P. 1–9.
- Hu Y., Xie Q., Chua N. The Arabidopsis auxin-inducible gene *ARGOS* controls lateral organ size // Plant Cell. 2003. V. 15. P. 1951–1961.
- Jefferson R.A. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system // Plant Mol. Biol. Rep. 1987. V. 5. P. 387–405.
- Lenhard M., Jurgens G., Laux T. The *WUSCHEL* and *SHOOT-MERISTEMLESS* genes fulfil complementary roles in Arabidopsis shoot meristem regulation // Development. 2002. V. 129. P. 3195–3206.
- Mizukami Y., Fischer R.L. Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 942–947.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473–497.
- Sugimoto-Shirasu K., Roberts G.R., Stacey N.J. *et al.* *RHL1* is an essential component of the plant DNA topoisomerase VI complex and is required for ploidy-dependent cell growth // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 18736–18741.

**TRANSFER OF *ARGOS-LIKE* AND *AtEXPA10* GENES  
INTO NONTRANSGENIC FORMS OF TOBACCO  
AND PHENOTYPIC EFFECTS OF THEIR CONSTITUTIVE EXPRESSION**

**B.R. Kuluev, E.V. Mikhaylova, A.V. Chemeris**

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center of RAS, Ufa, Russia,  
e-mail: kuluev@bk.ru

**Summary**

Hybrid plants were obtained by pollination of *Nicotiana rustica* and *Nicotiana tabacum* Black Cuban cultivar with pollen of transgenic *Nicotiana tabacum* plants of Petit Havana SR1 cultivar bearing the *ARGOS-LIKE* and *AtEXPA10* genes. RT-PCR analysis showed high levels of *ARGOS-LIKE* and *AtEXPA10* expression in the hybrids. It led to an increase in the sizes of their leaves and stems. Organs of both transgenic and hybrid plants were enlarged due to the enlargement of individual cells. The inheritance was stable, but the phenotypic effects varied from insignificant to levels exceeding those in parental transgenic plants.

**Key words:** *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica*, *ARGOS-LIKE*, *AtEXPA10*, transgenic plants, cross-pollination, cell expansion, organ size.



УДК 57.084.1: 633.1

## ОСНОВНЫЕ ПРИЧИНЫ НИЗКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ АЛЮМОУСТОЙЧИВЫХ РЕГЕНЕРАНТОВ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР

© 2013 г. Е.М. Лисицын

ГНУ Зональный научно-исследовательский институт сельского хозяйства Северо-Востока  
им. Н.В. Рудницкого Россельхозакадемии, Киров, Россия,  
e-mail: edaphic@mail.ru

Поступила в редакцию 26 сентября 2012 г. Принята к публикации 14 января 2013 г.

Алюмоустойчивость, проявляющаяся на клеточном уровне, открывает возможность получения устойчивых форм растений методом культуры ткани. На практике, однако, данный подход не нашел пока широкого применения, что чаще всего связывают с трудностями регенерации растений из каллусной культуры. Предлагаемая статья заостряет внимание читателей на иных причинах низкой эффективности данных подходов. Среди них – высокая внутрисортовая гетерогенность зерновых культур по признаку алюмоустойчивости; условность принятого на практике разделения генотипов на устойчивые и неустойчивые; получение кислото- и алюмоустойчивых регенерантов не только в стрессовых, но и в контрольных условиях без какого-либо действия изучаемого стрессора; недостатки методических подходов, связанные со специфичностью поведения алюминия в различных средах, когда неправильно подобранные состав или pH среды приводят к маскированию действия алюминия. В результате совместного действия всех упомянутых в статье причин предлагаемые методики создания высокоустойчивых регенерантов зерновых культур по продолжительности, затратам труда и материальных средств, а также эффективности значительно уступают традиционным методам внутрисортного отбора.

**Ключевые слова:** зерновые культуры, алюминий, pH, устойчивость, культура ткани, регенеранты, каллус, *in vitro*.

Подбор Al-устойчивых сортов и видов растений для широкомасштабного выращивания был рекомендован в качестве альтернативы химической мелиорации для преодоления алюмотоксичности кислых почв. Физиолого-биохимические механизмы устойчивости, проявляющиеся на клеточном уровне, дали повод некоторым исследователям постулировать возможность получения устойчивых к алюминию форм растений методом отбора в культуре ткани (Широких и др., 2009а, б, 2011). Соматональная изменчивость и клеточная селекция *in vitro* считаются принципиально новым инструментом создания растений с высоким потенциалом устойчивости к средовым абиотическим стрессорам (Bertin *et al.*, 1995; Biswas *et al.*, 2002; Mandal *et al.*, 2004; Roy, Mandal, 2005).

Эта изменчивость, природа которой до сих пор не установлена, вкуче с высокой чувствительностью изолированных клеток, по мнению некоторых исследователей (Внучкова и др., 1989; Muuuan *et al.*, 2003), делает целесообразным получение алюмоустойчивых соматоклонов сельскохозяйственных растений методом клеточной селекции. На практике, однако, данный подход не нашел широкого применения, что чаще всего связывают с трудностями регенерации растений из каллусной культуры (Komatsuda *et al.*, 1989; Литовкин и др., 1999; Овчинникова и др., 2004), с необходимостью оптимизировать условия регенерации практически для каждого генотипа (Бакулина, Широких, 2011).

Предложено остановиться на иных, неупомянутых большинством исследователей,

причинах низкой эффективности данных подходов. В первую очередь, следует упомянуть теоретические недостатки самой методики, поскольку, как справедливо отмечает М.А. Шишкин (2006), характер считываемой информации определяется особенностями восприятия того, кто ее считывает, и научные объяснения определяются в конечном счете не требованиями логики, а исходным концептуальным выбором исследователя.

**1. Все растения одного сорта самоопыляемых культур генетически одинаковы, а их различия по степени устойчивости обусловлены ненаследуемыми факторами.** На практике биотехнологам и селекционерам приходится работать с исходным материалом, представленным сортами, селекционными номерами и гибридами различных культур. Еще со времен В. Иогансена (начало XX в.) известно, что исходный материал для селекции должен быть генотипически гетерогенным, чтобы из него можно было отобрать выделяющиеся растения. Но подавляющее большинство современных сортов сельскохозяйственных культур созданы методами гибридизации, т. е. представляют собой популяции, в которых разные генотипы встречаются в различных пропорциях. Если для исследований в культуре *in vitro* отбирается материал с нескольких десятков и более растений даже одного сорта, вероятность того, что в результате будет отобран генетически гетерогенный материал намного выше, чем вероятность возникновения мутаций (которые считаются основным фактором, приводящим к получению регенерантов, отличающихся по уровню стрессоустойчивости от исходного материала). Мы в своих работах неоднократно указывали на высокую внутрисортную гетерогенность зерновых культур по признаку алюмоустойчивости (Lisitsyn, 2000; Лисицын, 2006; Тиунова, Лисицын, 2009).

**2. Различия сортов растений по алюмоустойчивости имеют биологическую природу.** В первую очередь стоит отметить, что принятое на практике разделение на устойчивые и неустойчивые генотипы скорее агрономическое – по степени снижения развития того или иного признака (чаще всего – продуктивности растений) в стрессовых условиях. Биологическая же устойчивость определяется способностью

растений производить жизнеспособные семена (Удовенко, 1995), т. е. и сорт, снизивший урожайность в стрессовых условиях на 10–20 %, и сорт, снизивший ее на 80–90 %, являются биологически устойчивыми, так как производят жизнеспособные семена, хотя и в разном количестве. Кроме того, до сих пор не найдено ни одного гена, специфически контролирующего именно устойчивость растений к алюминию, тогда как общее количество генов, активность которых изменяется при воздействии алюминия, исчисляется уже тысячами (Houde, Diallo, 2008). Следует также иметь в виду, что, согласно нашим исследованиям (Баталова, Лисицын, 2009; Щенникова, Лисицын, 2009), генетический контроль алюмоустойчивости у разных сортов одной и той же культуры может осуществляться разным количественным и качественным набором генов. Следует заметить, что нередко один и тот же генотип в одной публикации авторы называют устойчивым, а в другой – чувствительным. Так, например, случилось с генотипом ячменя 999-93, который в работе И.Г. Широких и др. (2009б) использован как алюмотолерантный сорт, а в их следующей работе (Широких и др., 2011) – как чувствительный к токсичности алюминия. Это выглядит вполне естественным, если признать факт относительности уровня алюмоустойчивости генотипа. Но, во-первых, при таком рассмотрении вывод о большей целесообразности использования в культуре *in vitro* сортов с низким уровнем алюмоустойчивости (Van Sint *et al.*, 1997; Roy, Mandal, 2005; Широких и др., 2009б) по сравнению с «устойчивыми» сортами не имеет теоретической основы. А во-вторых, он вообще ставит под сомнение сам принцип получения алюмоустойчивых растений как в культуре *in vitro*, так и традиционными способами. Необходимо указать и на отмечаемые практически всеми авторами генотипические различия по морфогенной и регенерационной способности. Условия, оптимальные для регенерации одного генотипа, оказываются неприемлемыми для других, т. е. получение конечных устойчивых регенерантов далеко не всегда определяется уровнем их потенциальной алюмоустойчивости.

**3. Устойчивость в культуре *in vitro* вырабатывается к тому фактору, который вводит в качестве стрессора.** Однако кислото-

алюмоустойчивые регенеранты получают и в контрольных условиях (Иванов, 2001; Зобова, Коньшева, 2007; Широких и др., 2009б) без какого-либо действия изучаемого стрессора. Стоит упомянуть также и то, что эффект любой мутации может быть фенотипирован, т. е. индуцирован *извне* без участия генетических изменений, причем он обнаруживает ту же самую морфогенетическую природу (Шишкин, 2006). Согласно теории эколого-генетической организации количественных признаков (Драгавцев и др., 1984) постоянных по составу генетических систем, отвечающих во всех возможных условиях роста за развитие какого-либо количественного признака, не существует. Установлено, что алюминий в зависимости от примененной концентрации имеет разный физиологический механизм токсичного действия, а в растениях функционируют различные генетические системы, определяющие ответную реакцию одного и того же генотипа при разных концентрациях токсиканта (Kochian *et al.*, 2004). Признается, что в управлении признаком алюмоустойчивости у разных растений, полученных в культуре *in vitro*, могут быть задействованы различные механизмы (Mandal *et al.*, 2004). Сама методика получения регенерантов растений в культуре *in vitro* предполагает воздействие на исходный биологический материал большим набором химических соединений, многие из которых могут оказывать мутагенное действие на клетки и ткани. Огромное значение отводится также соотношению фитогормонов и их количественному содержанию в среде (Широких и др., 2009а). Ну а если вспомнить, что одним из проявлений алюминиевой токсичности как раз является нарушение гормонального баланса в растениях, то искусственное изменение соотношения этих биологически активных веществ значительно изменяет сам характер воздействия алюминия на растение, либо усиливая его токсичность, либо сводя ее на нет. Поскольку алюминий как селективный агент вводится на поздних этапах культивирования, также возможно, что регенерантные растения, уже находящиеся в преадаптированном состоянии, гораздо легче переносят воздействие алюминия, и он теряет свою роль селективного агента. Тогда растения-регенеранты, имеющие более высокий уровень общей неспецифической устойчивости, будут

оценены как высокоустойчивые к алюминию, не будучи таковыми по своей природе. Другими словами, поскольку физиолого-биохимические реакции растений на алюминий являются не специфическими реакциями, а скорее реакциями общего ответа, то не всегда можно однозначно сказать, к какому из факторов вырабатывается устойчивость у регенерантов.

**4. В каллусной культуре проявляется устойчивость к почвенным стрессам**, но при этом у регенерантов на начальных этапах работы корневых систем нет вообще или они искусственно удаляются (Широких и др., 2009б). Таким образом, исследователи пытаются добиться адаптивных перестроек у тех органов растения, которые в принципе не должны и не будут в дальнейшем испытывать непосредственного действия стрессора. Кстати, необходимо отметить и то, что эффект от такого отбора также оценивается по степени угнетения развития надземных органов или физиологических реакций, происходящих в листьях – органах, не испытывающих прямого воздействия почвенного стрессора, а развивающихся в условиях законченной адаптивной перестройки растительного организма, который к тому времени мог испытать действие различных других средовых факторов. К сожалению, многие авторы не учитывают специфичность поведения алюминия в различных средах, и часто неправильно подобранный состав или pH среды приводят к маскированию действия алюминия. Известно, что наибольшую токсичность ионы трехвалентного алюминия имеют при pH среды 4,3 (Taylor *et al.*, 2000). Снижение величины pH при постоянной концентрации алюминия значительно снижает токсичность последнего (Kinraide, 1997). Например, при pH = 3,7 транспорт алюминия через клеточные мембраны снижается в 10 раз (Kinraide *et al.*, 1992), что объясняется занятием ионами водорода обменных сайтов мембран клеток корня (имеющих  $pK_a > 4$ ) (Kinraide, 1997). Кроме того, при pH ниже 4,0 происходит быстрая полинуклеарная агрегация ионов трехвалентного алюминия в комплексы, обозначаемые обычно как  $Al_{13}$ , которые в твердой фазе нетоксичны для растений (Kinraide, 1991). В результате исследователи, пытаясь создать алюминиевый стресс, на деле создают, например, кислотный стресс или стресс от недостатка элементов питания. Несомненно, устойчивые к

алюминию растения обладают устойчивостью и к повышенной кислотности, но обратное наблюдается далеко не всегда (Voigt, Staley, 2004; Yang *et al.*, 2005). В крайнем случае стрессовая ситуация, созданная в культуре *in vitro*, вообще не будет иметь никакого отношения к почвенным стрессам. Другая значимая методическая ошибка связана с правильным подбором концентрации стрессора. Например, О.Н. Шуплецова (2008. С. 444) в качестве одной из важных задач методики получения алюмоустойчивых регенерантов *in vitro* ставит «повышение жесткости селективных систем, адекватно моделирующих на клеточном уровне действие стрессора на растения *in vivo*». Стремясь повысить жесткость действия алюминия в рабочей среде (создать жесткие фоны отбора), необходимо учитывать особенности поведения алюминия в разных по химическому составу смесях. Так, при использовании сульфатной соли (Conner, Meredith, 1985; Campbell *et al.*, 1989; Van Sint *et al.*, 1997; Широких и др., 2009а, б, 2011) повышение концентрации алюминия ведет не к повышению жесткости стрессового воздействия, а, напротив, к его значительному снижению. Это вызвано тем, что в условиях среды Мурасиге-Скуга (Ramgareeb *et al.*, 1999) повышение содержания ионов  $Al^{3+}$  и  $SO_4^-$  приводит к значительному повышению образования алюнита (alunite) и соответственному снижению активности трехвалентного алюминия. Напомним, что токсичность алюминия определяется не концентрацией, а активностью ионов  $Al^{3+}$  (Kinraide, Parker, 1987). В итоге исследователи, формально усиливая жесткость фона отбора, на самом деле снижают его, что доказывается большим уровнем устойчивости некоторых регенерантов, полученных на мягких средах, по сравнению с жесткими средами отбора (Широких и др., 2009б).

**5. В культуре *in vitro* получают алюмоустойчивые регенеранты.** На наш взгляд, не совсем понятно, что авторы понимают под термином «получение» алюмоустойчивых регенерантов – отбор из предсуществующего разнообразия или же создание новых генотипов. В данном случае вопрос имеет принципиальное значение: если генотипы создаются, то мы имеем дело с генетическими перестройками, которые могут происходить только в результате мутаций. Принимается, что введение в культуру тканей

вызывает изменение генотипа автоматически, путем мутирования. При этом, как указывают И.Г. Широких и др. (2009б), в потомство первичных регенерантов передаются только точковые мутации, не вызывающие резкого снижения жизнеспособности растений. Авторы считают, что наличие полезных мутаций среди соматональных линий позволяет использовать соматональную изменчивость для создания нового исходного материала для селекции. Кроме того, по мнению авторов, при введении в культуру *in vitro* неустойчивого сорта вероятность возникновения полезных мутаций более высока, чем при использовании устойчивых сортов. Но, во-первых, об относительности понятий «устойчивый» и «неустойчивый» генотип мы уже указывали выше. А, во-вторых, согласно синтетической теории эволюции, новая изменчивость поставляется мутациями, возникающими случайно и ненаправленно, и влияние их на приспособленность организма не зависит от существующих на данный момент времени условий среды (Животовский, 2003). Иными словами, механизм возникновения новой изменчивости предполагает, что варианты, оказавшиеся адаптивными в данной среде, предсуществовали, т. е. уже находились в популяции раньше, до воздействия данного средового фактора. К тому же частота возникновения мутаций генов в культуре *in vitro*, по оценкам Р.Г. Бутенко (1999), составляет порядок величин  $10^{-5}$ – $10^{-7}$  на генерацию клеток. Конечно, частота эпигенетических мутаций выше ( $10^{-3}$  на генерацию клеток), но в этом случае часты инверсии, и наследование этих изменений в половом потомстве оценивается автором только как «возможно». В рамках генетической теории среда рассматривается лишь как «оценщик» наследственной изменчивости популяции. По мнению А.Л. Животовского (2003), частота возникновения приобретенного адаптивного признака с устойчивой передачей потомству невелика (на уровне частоты генных мутаций), и потому такие случаи трудно выявить. Показательно, на наш взгляд, замечание М. Иванова, касающееся популяций регенерантов, исходными эксплантами для которых служили сорта: «Фактором ограничения изменчивости, как генетической, так и морфологической, служит селективная гибель рекомбинантных гамет и зигот из-за их несбалансированности, поэтому

число особей – носителей летальных мутаций (альбинизм, стерильность пыльцы и колоса), погибающих на ранних стадиях формирования популяций растений-регенерантов, достаточно велико, в результате *de novo* сохраняется незначительная часть растений, преимущественно имеющая морфотип исходной формы» (Иванов, 2001. С. 22). Другими словами, даже если и возникают мутантные формы, очень велика вероятность того, что они не дойдут до стадии взрослого растения. Некоторые исследователи (Bertin *et al.*, 1995; Van Sint *et al.*, 1997) полагают, что факт различной устойчивости к стрессорам растений-регенерантов, полученных из одного и того же каллуса, подтверждает идею о возникновении соматклональной изменчивости в ходе культивирования *in vitro*, но основной причиной ее считают генетическую разнокачественность клеток эмбрионов (Chowdhury, Mandal, 2001), возникающую в результате особенностей двойного оплодотворения, что опять же приводит к идее о предсуществующем разнообразии. Другие авторы (Иванов, 2001), наоборот, различную устойчивость регенерантов из одного и того же каллуса объясняют недостатками методики. По их мнению, регенерация клеток из каллуса идет только на границе среда–каллус и затрагивает не все его клетки. В связи с этим не все чувствительные к стрессору клетки каллуса погибают, а могут дать начало неустойчивым к стрессору регенерантам.

Если же речь идет только об отборе наиболее приспособленных вариантов из предсуществующего разнообразия генотипов (вследствие генетического внутрисортного разнообразия), то мы имеем дело с длительной, дорогостоящей и крайне низкоэффективной альтернативой простому отбору к рулонной культуре, подобной той, что разработана и уже многие годы используется нами (Лисицын, 2003) для оценки уровня устойчивости растений и создания популяций высокоустойчивых растений различных зерновых культур.

В качестве подтверждения эффективности отбора кислото- или алюмоустойчивых регенерантов авторы обычно приводят результаты полевых испытаний (Иванов, 2001; Зобова, Кобышева, 2007; Широких и др., 2009а, б, 2011). Такой подход кажется не совсем правомерным по двум основным причинам. Во-первых, развитие

надземных органов хотя и находится в связи с особенностями развития корневых систем – объектов воздействия ионов водорода и алюминия, но эта связь далеко не однозначна, а сами надземные органы испытывают влияние различных средовых факторов. Например, в многолетних опытах с зерновыми культурами коэффициенты парных корреляций между уровнем алюмоустойчивости сорта (оцениваемым по депрессии роста корней в присутствии алюминия) и изменениями в развитии отдельных элементов структуры урожая или биохимических показателей листовых пластинок растений (алюмоокислый почвенный фон в сравнении с нейтральным) только в отдельных случаях достигали уровня  $r = 0,5$  (Лисицын, 2005). Гораздо чаще эти связи были статистически недостоверными. Во-вторых, все полевые исследования регенерантов имеют существенную методическую погрешность, которая лишает данные работы доказательной базы. Здесь имеется в виду принцип единственного отличия. Обыкновенно почему-то авторы сравнивают полученные в селективных условиях регенеранты либо с исходным сортом, либо с районированными сортами исследуемых культур. Однако единственно верным решением в данном случае является сравнение регенерантов, полученных в присутствии ионов алюминия с регенерантами, полученными в контрольных условиях, когда единственным отличием является отсутствие в среде отбора стрессового агента. Только при такой организации опыта можно однозначно говорить об эффективности предлагаемого метода.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все вышеизложенное позволяет заключить, что к настоящему времени теоретические вопросы, связанные с возможностью получения (создания) алюмоустойчивых регенерантов зерновых культур, остаются недостаточно разработанными. Такое положение дел приводит к необоснованности заявлений о возможности повышения уровня алюмоустойчивости растений путем использования отборов на селективных по алюминию средах в культуре *in vitro*. Полученные в этих условиях растения могут проявлять повышенную устойчивость к стрессору в ходе дальнейшего роста и развития, но, во-первых, это

не является закономерным и воспроизводимым результатом, а, во-вторых, получение высокоустойчивых регенерантов в контрольных средах сводит эффективность предлагаемых методик практически к нулю. Можно согласиться с тем теоретическим замечанием, что соматональная изменчивость является одним из вариантов использования внутрисортного полиморфизма по алюмоустойчивости. Но в то же время по продолжительности, затратам труда и материальных средств, а также эффективности подобные методики значительно уступают традиционным методам внутрисортного отбора.

Пока не будут решены вопросы, связанные с преодолением обозначенных выше теоретических и методических проблем, предложения о широком использовании в селекционной практике биотехнологических методов создания нового алюмоустойчивого материала зерновых культур являются, по крайней мере, преждевременными.

## ЛИТЕРАТУРА

- Бакулина А.В., Широких И.Г. Генотипическая реакция ячменя на антибиотики канамицин и цефотаксим в культуре *in vitro* // Биологический мониторинг природно-техногенных систем: Матер. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. Киров, 29–30 ноября 2011 г. Киров: ООО «Лобань», 2011. Ч. 2. С. 69–72.
- Баталова Г.А., Лисицын Е.М. Генетический контроль алюмоустойчивости овса на сортовом уровне // Съезд генетиков и селекционеров, посвящ. 200-летию со дня рожд. Ч. Дарвина. V съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров. М., 2009. Ч. 1. С. 179.
- Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Уч. пособие. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
- Внучкова В.А., Негтевич Э.Д., Чеботарева Т.М. и др. Использование методов *in vitro* в селекции ячменя на устойчивость к токсичности кислых почв // Докл. ВАСХНИЛ. 1989. № 7. С. 2–5.
- Драгавцев В.А., Литун Н.П., Шкель И.М., Нечипоренко Н.Н. Модель эколого-генетического контроля количественных признаков растений // Докл. АН СССР. 1984. Т. 274. № 3. С. 720–723.
- Животовский Л.А. Наследование приобретенных признаков: Ламарк был прав // Химия и жизнь. 2003. № 4. С. 22–26.
- Зобова Н.В., Коньшева Е.Н. Использование биотехнологических методов в повышении соле- и кислотоустойчивости ярового ячменя. Новосибирск: СО РАСХН, КНИИСХ, 2007. 124 с.
- Иванов М.В. Биотехнологические основы создания исходного материала ярового ячменя. СПб.–Пушкин: Изд-во ГНЦ ВИР, 2001. 205 с.
- Лисицын Е.М. Методика лабораторной оценки алюмоустойчивости зерновых культур // Докл. РАСХН. 2003. № 3. С. 5–7.
- Лисицын Е.М. Полиморфизм адаптивных реакций сорта на уровне морфологических и биохимических показателей // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 2006. Т. 162. С. 150–154.
- Лисицын Е.М. Потенциальная алюмоустойчивость сельскохозяйственных растений и ее реализация в условиях европейского северо-востока России: Дис. ... д-ра биол. наук. М., 2005. 361 с.
- Литовкин К.В., Игнатова С.А., Бондарь Г.П. Морфогенез в культуре незрелых зародышей изогенных линий ячменя // Цитология и генетика. 1999. Т. 33. № 5. С. 14–18.
- Овчинникова В.Н., Варламова Н.В., Мелик-Саркисов О.С. и др. Получение регенерантов у ярового ячменя *Hordeum vulgare* L. в культуре *in vitro* // Докл. РАСХН. 2004. № 3. С. 8–10.
- Тиунова Л.Н., Лисицын Е.М. Алюмоустойчивость образцов овса, созданных традиционными методами и методами клеточной селекции // Аграрная наука Северо-Востока. 2009. № 4 (15). С. 9–13.
- Удовенко Г.В. Устойчивость растений к абиотическим стрессам // Физиологические основы селекции растений. Т. 2. Ч. 2. СПб.: ВИР, 1995. С. 293–352.
- Широких И.Г., Огородникова С.Ю., Далькэ И.В., Шуплецова О.Н. Физиолого-биохимические показатели и продуктивность растений ячменя, регенерированных из каллуса в селективных системах // Докл. РАСХН. 2011. № 2. С. 6–9.
- Широких И.Г., Шуплецова О.Н., Широких А.А. Клеточная селекция ячменя на устойчивость к токсичности алюминия (08-04-13590) // Ориентированные фундаментальные исследования и их реализация в АПК России. Сергиев Посад. 2009а. С. 79–83.
- Широких И.Г., Шуплецова О.Н., Щенникова И.Н. Получение *in vitro* форм ячменя, устойчивых к токсическому действию алюминия в кислых почвах // Биотехнология. 2009б. № 3. С. 40–48.
- Шишкин М.А. Индивидуальное развитие и уроки эволюционизма // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 3. С. 179–198.
- Шуплецова О.Н. Клеточная селекция ячменя на устойчивость к эдафическим стрессам // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: Сб. статей IX Междунар. конф. М.: ИД ФБК-Пресс, 2008. С. 444–445.
- Щенникова И.Н., Лисицын Е.М. Напряженность стрессового воздействия и генетический контроль алюмоустойчивости ячменя // Съезд генетиков и селекционеров, посвящ. 200-летию со дня рожд. Ч. Дарвина. V Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров. М., 2009. Ч. 1. С. 369.
- Bertin P., Kinet J.M., Bouharmont J. Heritable chilling tolerance improvement in rice through somaclonal variation and cell line selection // Aust. J. Bot. 1995. V. 44. P. 91–105.
- Biswas J., Chowdhury B., Bhattacharya A., Mandal A.B. *In vitro* screening for increased drought tolerance in rice // *In vitro* Cell Dev. Biol. Plant. 2002. V. 38. P. 525–530.
- Campbell K.A.G., Carter T.E., Anderson J.M. Aluminium tolerance of soybean callus cultures: Comparison with greenhouse and solution culture screening methods // Soybean Genet. Newslett. 1989. V. 16. P. 191–195.

- Chowdhury B., Mandal A.B. Microspore embryogenesis and fertile plantlet regeneration in salt susceptible–salt tolerant rice hybrid // *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 2001. V. 65. P. 141–147.
- Conner A.J., Meredith C.P. Strategies for the selection and characterization of aluminium-resistant variants from cell cultures of *Nicotiana plumbaginifolia* // *Planta*. 1985. V. 166. P. 466–473.
- Houde M., Diallo A.O. Identification of genes and pathways associated with aluminum stress and tolerance using transcriptome profiling of wheat near-isogenic lines // *BioMed Central Genomics*. 2008. doi:10.1186/1471-2164-9-400.
- Kinraide T.B. Identity of the rhizotoxic aluminum species // *Plant Soil*. 1991. V. 134. P. 167–178.
- Kinraide T.B. Reconsidering the rhysotoxicity of hydroxyl, sulphate, and fluoride complex of aluminum // *J. Exp. Bot.* 1997. V. 48. P. 1115–1124.
- Kinraide T.B., Parker D.R. Cation amelioration of aluminium toxicity in wheat // *Plant Physiol.* 1987. V. 83. P. 546–551.
- Kinraide T.B., Ryan P.R., Kochian L.V. Interactive effects of Al<sup>3+</sup>, H<sup>+</sup> and other cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential // *Plant Physiol.* 1992. V. 99. P. 1461–1468.
- Kochian L.V., Hoekenga J.A., Pineros M.A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004. V. 55. P. 459–493.
- Komatsuda T., Enomoto S., Nakajima K. Genetics of callus proliferation and shoot differentiation in barley // *J. Heredity*. 1989. V. 80. No. 5. P. 345–350.
- Lisitsyn E.M. Intravarietal level of aluminum resistance in cereal crops // *J. Plant Nutrition*. 2000. V. 23. No. 6. P. 793–804.
- Mandal A.B., Basu A.K., Roy B. *et al.* Genetic management for improved aluminium and iron toxicity tolerance in rice – A review // *Indian J. Biotechnol.* 2004. V. 3. No. 3. P. 359–368.
- Muyuan Y.Z., Jianwei P., Lilin W. *et al.* Mutation induced enhancement of Al tolerance in barley cell lines // *Plant Sci.* 2003. V. 164. P. 17–23.
- Rangareeb S., Watt M.P., Marsh C., Cooke J.A. Assessment of Al<sup>3+</sup> availability in callus culture media for screening tolerant genotypes of *Cynodon dactylon* // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 1999. V. 56. P. 65–68.
- Roy B., Mandal A.B. Towards development of Al-toxicity tolerant lines in *indica* rice by exploiting somaclonal variation // *Euphytica*. 2005. V. 145. P. 221–227.
- Taylor G.J., McDonald-Stephens J.L., Hunter D.B. *et al.* Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cell of *Chara coralline* // *Plant Physiol.* 2000. V. 123. P. 987–996.
- Van Sint J.V., Costa de Macedo C., Kinet J., Bouharmont J. Selection of Al-resistant plants from a sensitive rice cultivar, using somaclonal variation, *in vitro* and hydroponic cultures // *Euphytica*. 1997. V. 97. P. 303–310.
- Voigt P.W., Staley T.E. Selection for aluminum and acid-soil resistance in white clover // *Crop Sci.* 2004. V. 44. P. 38–48.
- Yang J.L., Zheng S.J., He Y.F., Matsumoto H. Aluminum resistance requires resistance to acid stress: a case study with spinach that exudes oxalate rapidly when exposed to Al stress // *J. Exp. Bot.* 2005. V. 56. No. 414. P. 1197–1203.

## THE MAIN REASONS OF THE LOW EFFICIENCY OF OBTAINING ALUMINUM-RESISTANT REGENERANTS OF CEREAL CROPS

E.M. Lisitsyn

Rudnitskii North-East Agricultural Research Institute, Russian Academy of Agricultural Sciences,  
Kirov, Russia, e-mail: edaphic@mail.ru

### Summary

The mechanisms of aluminum resistance, acting at the cellular level, provide an opportunity of obtaining resistant forms of plants by the cell culture method. In practice, however, this approach has not become widely used because of difficulties of plant regeneration from callus culture. This article focuses the attention of readers on other causes of low efficiency of the approach. They include high intraspecific heterogeneity of cereal crops with regard to aluminum resistance; conventionality of the division of genotypes into resistant and sensitive, accepted in practice; appearance of acid- and aluminum-resistant regenerants not only under stress but also under control conditions without any action of the stress factor under study; lack of appropriate methods, connected to the specific behavior of aluminum in various media, when incorrectly chosen medium composition or pH conceal the action of aluminum. As a result of joint action of all reasons mentioned in the article, the offered techniques of creation of high-resistant regenerants of cereal crops are behind traditional methods of intravarietal selection in duration, labor consumption, cost, and efficiency.

**Key words:** cereal crops, aluminum, pH, resistance, tissue culture, regenerants, callus, *in vitro*.

УДК 577.21:581.5:576.858.8

## РОЛЬ КОРОТКИХ РНК В УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К БИОТИЧЕСКИМ И АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ

© 2013 г. В.И. Малиновский<sup>1</sup>, Г.Б. Боровский<sup>2</sup>, Е.Л. Горбылева<sup>2,3</sup>,  
И.В. Федосеева<sup>2,3</sup>, Е.Л. Таусон<sup>2</sup>, В.А. Соколов<sup>4</sup>, В.К. Войников<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток, Россия,  
e-mail: ibss@eastnet.febras.ru;

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт  
физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск,  
Россия, e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru, dzubina@sifibr.irk.ru,  
fedoseeva@sifibr.irk.ru, tauson@sifibr.irk.ru, vvk@sifibr.irk.ru;

<sup>3</sup> Национальный исследовательский Иркутский государственный технический университет,  
Иркутск, Россия;

<sup>4</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной  
и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук,  
Новосибирск, Россия, e-mail: sokolov@mcb.nsc.ru

Поступила в редакцию 20 сентября 2012 г. Принята к публикации 18 октября 2012 г.

Малые некодирующие РНК являются отдельным классом РНК, регулирующим множество физиологических процессов в растениях. В статье приведены литературные данные об образовании коротких РНК (siРНК и miРНК), обсуждается их роль в защите растений от биотических и абиотических стрессов, а также кратко рассматриваются методические приемы, позволяющие использовать данный класс РНК в качестве агентов для управления устойчивостью растений.

**Ключевые слова:** РНК-интерференция, miРНК, siРНК, вирусы растений, вирусные супрессоры, биотический стресс.

Одним из защитных механизмов растений является у молчание генов (RNA silencing или RNA interference) – регуляция экспрессии генов на основе специфического узнавания и дегградации РНК. Эпигенетический сайленсинг – это форма репрессии генетической активности, которая устанавливается в строго определенное время онтогенеза и затем наследуется во многих клеточных поколениях (Жимулев и др., 2004). В опытах с трансгенными растениями, в геном которых встраивали вирусные гены, вирусостойчивость коррелировала с разрушением трансгенной мРНК в цитоплазме (Lindbo *et al.*, 1993), сопровождалась накоплением коротких (примерно 25 нуклеотидов) двухцепочечных РНК (dsРНК) (Hamilton, Baulcombe, 1999) и была сиквенс-специфичной (English *et al.*, 1996). Сиквенс-специфичная устойчивость, или пост-

транскрипционное у молчание генов (post-transcriptional gene silencing, PTGS), проявлялась у трансгенных растений не только к первоначально использованному вирусу, но и к другим вирусам, имеющим гомологичные последовательности (Ratcliff *et al.*, 1999). В течение последнего десятилетия установлено, что короткие РНК (sRNA) играют ключевую роль в регуляции активности значительной доли транскриптома растений при абиотическом и биотическом стрессе (см. обзоры Guleria *et al.*, 2011; Contreras-Cubas *et al.*, 2012; Khraiwesh *et al.*, 2012). Список воздействий, запускающих регуляторный ответ организма через sRNA, включает в себя реакцию на патогены, освещение, водный стресс, минеральное питание, солевой стресс, гипоксию, механический стресс и изменения температуры (Guleria *et al.*, 2011). Примечательно, что



активность системы образования sRNA также контролируется через sRNA (Vaucheret *et al.*, 2004). Таким образом, в растении функционирует регуляторная сеть стресс-чувствительных sRNA, перестраивающая метаболизм клетки при стрессе (Khraiwesh *et al.*, 2012).

Согласно современным представлениям (Дорохов, 2007), известно три механизма у молкания генов у растений: цитоплазматическое у молкание трансгенных и вирусных РНК, у молкание эндогенных мРНК, транскрипционное у молкание генов.

### ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЕ УМОЛКАНИЕ РНК

Синтезированная трансгеном одноцепочечная (ss) мРНК превращается в dsРНК при участии фермента растения-хозяина РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp). При заражении растений РНК-содержащими вирусами в клетках синтезируется вирусная RdRp, которая образует вирусную репликативную dsРНК. Эти dsРНК включают механизм сиквенс-специфичной деградации РНК, индуцируя повышение активности специфической РНКазы III, гидролизующей dsРНК. Этот фермент впервые был выявлен в клетках *Drosophila melanogaster* и получил название Dicer (Bernstein *et al.*, 2001). У растений аналогичный фермент назвали Dicer-like (DCL).

У *Arabidopsis thaliana* L. DCL1 участвует в образовании микроРНК (miРНК), DCL2 – коротких интерферирующих РНК (siРНК), DCL3 ответственен за модификацию хроматина, DCL4 – трансдействующих siРНК. MiРНК – dsРНК длиной 21–25 нуклеотидов с двумя некомплементарными 3'-нуклеотидами образуются при нарезании клеточных шпилечных РНК. SiРНК – dsРНК длиной 21–25 нуклеотидов с двумя некомплементарными 3'-нуклеотидами и монофосфатом на 5'-конце образуются при нарезании длинных трансгенных и вирусных dsРНК. Трансдействующие siРНК подобно miРНК комплементарно взаимодействуют с мРНК другого локуса.

Ферменты DCL являются мультикомпонентными белками и содержат один или более доменов, связывающих dsРНК, сигнал ядерной локализации, двухдоменную хеликазу, двухдоменную

РНКазу III, а также PIWI, Argonaute (Ago), Zwiille (PAZ) домен, обеспечивающий специфическое взаимодействие с двумя неспаренными 3'-нуклеотидами. Кроме того, все известные ферменты DCL содержат домен Duf283 с неизвестной функцией. В результате взаимодействия dsРНК с DCL2 каждая цепь dsРНК разрезается в двух местах, отстоящих друг от друга на 2 нуклеотида, с образованием siРНК.

На следующем этапе siРНК расплетаются АТФ-зависимой хеликазой и одна цепь (guide strand) включается в так называемый комплекс RISC (RNA-induced silencing complex), где комплементарно связывается с вирусной РНК-мишенью. Белок Ago, основной компонент RISC, разрезает РНК-мишень в участке комплементарного взаимодействия с siРНК. Белки Ago выявлены в составе RISC у всех изученных организмов.

### УМОЛКАНИЕ ЭНДОГЕННЫХ мРНК, ВЫЗВАННОЕ miРНК

Этот механизм регуляции экспрессии генома растений осуществляется с помощью miРНК. У растений miРНК образуются в три этапа при участии DCL1. Сначала синтезированная РНК-полимеразой II pri-miРНК превращается в pre-miРНК, которая преобразуется в более короткий предшественник. Затем формируется зрелая miРНК (Kurihara, Watanabe, 2004). У *Arabidopsis thaliana* идентифицирован белок HASTY, необходимый для переноса зрелых miРНК или комплекса miРНК-DCL1 из ядра в цитоплазму (Bollman *et al.*, 2003). На всех этапах созревания miРНК участвует dsРНК-связывающий белок HYL1, способный входить в комплекс с DCL1 и Ago (Kurihara *et al.*, 2006). Затем miРНК, подобно siРНК, взаимодействует с RISC, где комплементарно связывается с эндогенными мРНК, и белок Ago разрезает РНК-мишень. Количество идентифицированных растительных мРНК, у которых есть специфические miРНК-партнеры, постоянно увеличивается.

Так, например, было показано, что в регуляции устойчивости растений к патогенам участвует группа miРНК, где главную роль играют miR482 и miR2118. Все члены этой группы различаются между собой в последовательности нуклеотидов и по содержанию в различных

видах растений, но все они влияют на нуклеотид-связывающий сайт (NBS) и лейцин-богатые повторы (LRR) мРНК. Это приводит к разрушению мРНК и продукции вторичных siРНК при участии RdRp6 (Shivaprasad *et al.*, 2012).

Jones-Rhoads и Bartel в 2004 г. обнаружили новые miРНК, мишенями которых являются гены, кодирующие супероксиддисмутазы, лакказы и АТФ-сульфуриказы (APS). Показано, что экспрессия специфической miR395 увеличивалась при сульфатном голодании. РНК-мишенями miR395 являются гены, кодирующие АТФ-сульфуриказы Aps1, Aps3 и Aps4, белки, участвующие в первой стадии накопления неорганического сульфата. R. Sunkar и J. Zhu (2004) обнаружили несколько новых miРНК (miR393, miR397b, miR402, miR319c, miR389a) в проростках *Arabidopsis thaliana* после обработки различными абиотическими стрессами: обработка холодом, абсцизовой кислотой, подсушивание, гиперосмотический стресс. В пшенице было обнаружено различное накопление малых РНК в ответ на тепловой стресс. Например, образование miR172 значительно снижалось, тогда как содержание miR156, miR159, miR160, miR166, miR168, miR169, miR393 и miR827 увеличивалось в условиях повышенной температуры.

### ТРАНСКРИПЦИОННОЕ УМОЛКАНИЕ ГЕНОВ

Впервые этот механизм был выявлен у трансгенных растений табака со встроенной последовательностью кДНК вирида веретеновидности клубней картофеля, которая метилировалась после заражения виридом. M. Wassenegger с соавт. (1994) пришли к заключению, что реплицирующаяся виридная РНК вызывает специфичное метилирование гомологичных последовательностей в растительном геноме. Этот феномен получил название РНК-зависимое метилирование ДНК. Позже было показано (Mette *et al.*, 2000), что экспрессия dsРНК промоторных последовательностей включает сиквенс-специфичное метилирование этих промоторов с последующим транскрипционным умолканием. Этот процесс осуществляется при участии специфических siРНК и модифицированного гистона (Zilberman *et al.*, 2003). В РНК-зависимом метилировании ДНК *de novo*

участвуют ДНК метилтрансферазы 1 и 2, а гистондиацетилаза 6 усиливает их активность, что приводит к изменению гетерохроматина в участке локуса-мишени (Matzke *et al.*, 2004).

В то же время 2'-О-метилирование 3' терминальной рибозы коротких РНК при участии метилтрансферазы HUA ENHANCER1 повышало их стабильность. Стабильность коротких РНК также увеличивалась РНК-связывающими белками и при образовании комплементарных РНК и *cis*-элементов в последовательности нуклеотидов коротких РНК (Ji, Chen, 2012).

Дальнейшее исследование механизмов РНК-интерференции у трансгенных растений выявило существование множества путей биогенеза miРНК и регуляции экспрессии генов. В зависимости от последовательности ДНК (малокопийные гены, транспозонные элементы, прямые и инвертированные повторы, повторы генов рРНК и др.) могут быть задействованы различные механизмы транскрипционной репрессии и отчасти эти механизмы могут перекрываться друг с другом. Показано, что РНК-зависимое метилирование ДНК в растениях играет важную роль во многих процессах, таких, как инактивация транспозонов и повторов в геноме, регуляция экспрессии эндогенных генов в ходе развития растений и в ответ на стрессовые воздействия (Маренкова, Дейнеко, 2010).

### РАСПРОСТРАНЕНИЕ УМОЛКАНИЯ ГЕНОВ ПО РАСТЕНИЮ

Во многих работах показано, что умолкание генов, возникнув в какой-нибудь клетке, распространяется по растению, вызывая системное умолкание гена-мишени (Voinnet, Baulcombe, 1997; Fagard, Vaucheret, 2000; Mlotshwa *et al.*, 2002; Ryabov *et al.*, 2004; Tournier *et al.*, 2006). Сигнал умолкания перемещался от клетки к клетке по плазмодесмам (ближний транспорт) на расстояние 10–15 клеток от места индукции и по флоэме в другие органы (дальний транспорт). Возможно, эти два вида транспорта имеют различные механизмы, так как они неодинаково ингибировались солями кадмия, вирусными белками и генными мутациями (Ueki, Citovsky, 2001; Himber *et al.*, 2003; Schwach *et al.*, 2005). Так как в процессе транспорта сигнал умолкания генов может сильно разбавляться, то

необходима его амплификация в клетках-реципиентах. Она осуществляется при участии RdRp и хеликазы (Himber *et al.*, 2003; Schwach *et al.*, 2005). Сигнал умолкания генов транспортируется как вверх, так и вниз по растению, но вверх более активно (Sonoda, Nishiguchi, 2000).

Природа сигнала умолкания генов пока неясна. Показано, что распространение умолкания всегда строго сиквенс-специфично, что может служить свидетельством того, что сигнал является или dsРНК или siРНК (Himber *et al.*, 2003; Mallory *et al.*, 2003; Melnyk *et al.*, 2011). Во флоэмном соке растений были обнаружены как короткие (Yoo *et al.*, 2004), так и более длинные молекулы РНК (Haywood *et al.*, 2005). В соке также был найден низкомолекулярный белок, способный связывать 25-нуклеотидные ssРНК. Было показано, что он может содействовать ближнему транспорту этих РНК, но не dsРНК (Yoo *et al.*, 2004).

#### ВИРУСНЫЕ СУПРЕССОРЫ УМОЛКАНИЯ ГЕНОВ

Несмотря на наличие у растений эффективного защитного механизма, основанного на сиквенс-специфичном узнавании и деградации вирусных РНК, многие вирусы поражают растения. В ходе эволюции вирусы приобрели способность преодолевать клеточную защиту. Как указывал Ю.Л. Дорохов (2007), два способа – быстрая сборка вирионов и компартментализация – были известны задолго до открытия умолкания генов. Сборка вирионов и компартментализация являются эффективной защитой вирусного генома от воздействий. Кроме того, вирусы содержат гены, кодирующие супрессоры умолкания генов. Первым известным и одним из наиболее изученных супрессоров является специфичная протеиназа (**helper component-proteinase**, HC-Pro), кодируемая потивирусами. Так, было показано, что в трансгенных растениях табака, экспрессирующих встроенный ген *hs-pro*, увеличивалось накопление вирусов (Shams-Bakhsh *et al.*, 2007). Такой эффект был обусловлен тем, что HC-Pro подавляет умолкание генов (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Kasschau, Carrington, 2001). В настоящее время супрессоры идентифицированы примерно у 30 вирусов растений и животных (Omarov, Scholthof, 2012). Вирусные супрессоры

ингибируют накопление коротких РНК, а также некоторые из них способны связываться с siРНК и miРНК (Дорохов, 2007). Опыты с вирусными супрессорами показали наличие в растительных клетках двух пулов белков Ago1, которые специфично взаимодействуют с miРНК и siРНК (Schott *et al.*, 2012). Также было установлено, что мутанты X-вируса картофеля, не способные подавлять умолкание генов, не могли транспортироваться от клетки к клетке (Bayne *et al.*, 2005). Вирусные супрессоры влияли на развитие растений и формирование симптомов заболевания (Shen *et al.*, 2012). Однако было показано, что в растениях табака кальмодулин-подобный белок (rgs-CaM) связывается с вирусными супрессорами и тем самым нейтрализует их действие (Nakahara *et al.*, 2012).

#### МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

Интерферирующие РНК могут репрессировать экспрессию гена-мишени двумя различными путями: через расщепление mРНК и через транскрипционную инактивацию. В растениях оба процесса могут быть запущены путем трансформации соответствующих последовательностей в специализированных векторах для РНК-интерференции. Классические векторы этого типа сконструированы таким образом, что после транскрипции клонированных в них последовательностей в растительной клетке образуются протяженные dsРНК. Эти dsРНК далее взаимодействуют с ферментами DCL3 и DCL4, которые превращают dsРНК в siРНК. Образующиеся siРНК могут направлять прямое метилирование цитозина в гомологичном участке соответствующего геномного локуса либо, будучи инкорпорированными в Ago1, могут вызывать расщепление гомологичных mРНК (Hirai, Kodama, 2008).

Распространенными являются технологии умолкания генов растений с использованием конструкций, представляющих собой часть целевого гена в смысловой и антисмысловой ориентации, разделенных спейсером. Транскрипция такой конструкции приводит к образованию шпилечной структуры, где роль «стебля» выполняют фрагменты гена, комплементарно

соединяясь друг с другом, а спейсер образует петлю (RNA Interference ..., 2009).

Для у молкания генов часто применяется конститутивная трансформация, при этом конструкции клонируются в стандартных экспрессирующих бинарных векторах. В качестве примера для клонирования длинных шпилечных конструкций приведем векторы, позволяющие собрать эти структуры с помощью Gateway-клонирования, например pHELLSGATE (Helliwell, Waterhouse, 2003) и pANDA (Miki *et al.*, 2004). Gateway-клонирование основано на том, что ВР-клоназа переносит ПЦР-продукт целевого гена, фланкированный двумя attB сайтами, в донорный вектор (pDONR), несущий два attP сайта. После рекомбинации attB и attP сайтов фрагмент ДНК встраивается в структуру донорного вектора и фланкирован attL сайтами (attL1-ДНК-attL2). LR-клонажной реакцией он переносится в вектор, несущий две независимые Gateway кассеты, разделенные интронным спейсером (attR1-ccdB2-attR2-интрон-attR2-ccdB-attR1). Кассеты Gateway идентичны, за исключением того, что их рекомбинационные сайты attR1 и attR2 инвертированы относительно друг друга и две копии клонированной последовательности расположены «голова к голове» в результирующем экспрессирующем векторе (Karimi *et al.*, 2007). Был разработан целый ряд векторов на основе pHELLSGATE (Craft *et al.*, 2005; Wielopolska *et al.*, 2005). Преимуществом Gateway-клонирования является возможность переносить между векторами фрагменты ДНК, соблюдая их ориентацию и рамку считывания, а также избежать необходимости рестрикции и лигирования (Earley *et al.*, 2006).

Для стандартного клонирования были созданы векторы pHANNIBAL (Wesley *et al.*, 2001), pKANNIBAL (Helliwell, Waterhouse, 2005), pSAT (Yelin *et al.*, 2007), pSH (Hirai *et al.*, 2007). В этих векторах используются ПЦР-фрагменты целевого гена, полученные с помощью праймеров, содержащих рестрикционные сайты, и клонированные справа и слева от спейсера, для образования впоследствии «стебля» шпилечной структуры.

В литературе также описано тканеспецифичное у молкание генов, при котором экспрессия происходила под контролем промоторов (ARETALA1 или LFY), активных в лепестках

и чашелистиках (Schwab *et al.*, 2006; RNA Interference ..., 2009).

Альтернативой конститутивной трансформации является транзиентная, или временная, трансформация. Это необходимо, когда у молкание целевого гена является летальным или имеет большой плейотропный эффект (An *et al.*, 2003). К таким методам можно отнести использование плазмидных (Johansen *et al.*, 2001) и вирусных векторов (An *et al.*, 2003; RNA Interference ..., 2009). Существуют также векторы с индуцибельными промоторами. Так, были описаны конструкции, экспрессия которых индуцировалась спиртом, повышенной температурой (Chen *et al.*, 2003; Masclaux *et al.*, 2004). Дизайн векторов для у молкания генов растений подробно рассмотрен в обзоре S. Hirai и H. Kodama (2008).

К технологиям транзиентного у молкания генов также относятся такие методы, как обстрел, электропорация или ПЭГ-опосредованная трансформация протопластов или семян частицами с вектором (или только вектором), содержащим шпилечную конструкцию (An *et al.*, 2003; Zentella *et al.*, 2002).

Помимо трансформирования растений вектором со шпилечной конструкцией известны работы, в которых транзиентная РНК-интерференция достигалась трансформацией протопластов двудольных и однодольных растений непосредственно siРНК, а также dsРНК (An *et al.*, 2003; Vanitharani *et al.*, 2003; Bart *et al.*, 2006). Такие методологические подходы позволяют ускорить экспериментальный процесс с одной стороны и исследовать экспрессию генов, «выключение» которых губительно для растительной клетки.

Описана также технология у молкания генов с использованием miРНК. Так, с помощью сайт-направленного мутагенеза была заменена часть последовательности pre-miРНК на amiРНК (artificial miРНК) длиной 21 нуклеотид. Показано, что такое у молкание генов может быть конститутивным, индуцибельным и тканеспецифичным (Schwab *et al.*, 2006).

Феномен у молкания генов открыл широкие перспективы как для фундаментальной науки, так и для практического применения. В настоящее время уже имеются примеры использования механизма у молкания генов для

создания вирусо- и стрессоустойчивых растений путем трансгенеза (Рукавцова и др., 2010; Arif *et al.*, 2012).

Работа поддержана интеграционным грантом № 84 СО РАН и грантом 12-II-CO-06-016 ДВО РАН.

## ЛИТЕРАТУРА

- Дорохов Ю.Л. «Умолкание» генов у растений // Молекулярная биология. 2007. Т. 41. № 4. С. 579–592.
- Жимулев И.Ф., Беляева Е.С., Колесникова Т.Д., Волкова Е.И. Интеркалярный гетерохроматин и проблема сайленсинга // Информ. вестник ВОГиС. 2004. Т. 8. № 2. С. 81–85.
- Маренкова Т.В., Дейнеко Е.В. Инактивирование генов у растений на уровне транскрипции // Генетика. 2010. Т. 46. № 5. С. 581–592.
- Рукавцова Е.Б., Алексеева В.В., Бурьянов Я.И. Применение РНК интерференции в метаболической инженерии растений // Биоорганическая химия. 2010. Т. 36. № 2. С. 159–169.
- An C., Sawada A., Fukusaki E., Kobayashi A. A transient RNA interference assay system using *Arabidopsis* protoplasts // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2003. V. 67. P. 2674–2677.
- Anandalakshmi R., Pruss G.J., Ge X. *et al.* A viral suppressor of gene silencing in plants // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. No. 22. P. 13079–13084.
- Arif M., Azhar U., Arshad M. *et al.* Engineering broad-spectrum resistance against RNA viruses in potato // Transgenic Res. 2012. V. 21. No. 2. P. 303–311.
- Bart R., Chern M., Park C.-J. *et al.* A novel system for gene silencing using siRNAs in rice leaf and stem-derived protoplasts // Plant Methods. 2006. V. 2. P. 13–21.
- Bayne E.H., Rakitina D.V., Morozov S.Y., Baulcombe D.C. Cell-to-cell movement of potato potyvirus X is dependent on suppression of RNA silencing // Plant J. 2005. V. 44. No. 3. P. 471–482.
- Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M., Hannon G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference // Nature. 2001. V. 409. No. 6818. P. 363–366.
- Bollman K.M., Aukerman M.J., Park M.Y. *et al.* HASTY, the *Arabidopsis* ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis // Development. 2003. V. 130. No. 8. P. 1493–1504.
- Chen S., Hofius D., Sonnewald U., Börnke F. Temporal and spatial control of gene silencing in transgenic plants by inducible expression of double-stranded RNA // Plant J. 2003. V. 36. No. 5. P. 731–740.
- Contreras-Cubas C., Palomar M., Reyes J.L., Covarrubias A. Non-coding RNAs in the plant response to abiotic stress // Planta. 2012. V. 236. P. 943–958.
- Craft J., Samalova M., Baroux C. *et al.* New pOp/LhG4 vectors for stringent glucocorticoid-dependent transgene expression in *Arabidopsis* // Plant J. 2005. V. 41. P. 899–918.
- Earley K.W., Haag J.R., Pontes O. *et al.* Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics // Plant J. 2006. V. 45. P. 616–629.
- English J.J., Mueller E., Baulcombe D.C. Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes // Plant Cell. 1996. V. 8. No. 2. P. 179–188.
- Fagard M., Vaucheret H. Systemic silencing signal(s) // Plant Mol. Biol. 2000. V. 43. No. 2/3. P. 285–293.
- Guleria P., Mahajan M., Bhardwaj J., Yadav S.K. Plant small RNAs: biogenesis, mode of action and their roles in abiotic stresses // Genomics, Proteomics and Bioinformatics. 2011. V. 9. I. 6. P. 183–199.
- Hamilton A.J., Baulcombe D.C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants // Science. 1999. V. 286. No. 5441. P. 950–952.
- Haywood V., Yu T.S., Huang N.C., Lucas W.J. Phloem long-distance trafficking of gibberellic acid-insensitive RNA regulates leaf development // Plant J. 2005. V. 42. No. 1. P. 49–68.
- Helliwell C., Waterhouse P. Constructs and methods for high throughput gene silencing in plants // Methods. 2003. V. 30. P. 289–295.
- Helliwell C.A., Waterhouse P.M. Constructs and methods for hairpin RNA-mediated gene silencing in plants // Methods Enzymol. 2005. V. 392. P. 24–35.
- Himber C., Dunoyer P., Moissiard G. *et al.* Transitivity-dependent and independent cell-to-cell movement of RNA silencing // EMBO J. 2003. V. 22. No. 17. P. 4523–4533.
- Hirai S., Kodama H. RNAi vectors for manipulation of gene expression in higher plants // Open Plant Sci. J. 2008. V. 2. P. 21–30.
- Hirai S., Oka S., Adachi E., Kodama H. The effects of spacer sequence on silencing efficiency of plant RNAi vectors // Plant Cell Rep. 2007. V. 26. P. 651–659.
- Ji L., Chen X. Regulation of small RNA stability: methylation and beyond // Cell Res. 2012. V. 22. P. 624–636.
- Johansen L.K., Carrington J.C. Silencing on the Spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system // Plant Physiol. 2001. V. 126. No. 3. P. 930–938.
- Karimi M., Depicker A., Hilson P. Recombinational cloning with plant gateway vectors // Plant Physiol. 2007. V. 145. P. 1144–1154.
- Kasschau K.D., Carrington J.C. Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro // Virology. 2001. V. 285. No. 1. P. 71–81.
- Khraiwesh B., Zhu J.-K., Zhu J. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants // BBA. 2012. V. 1819. P. 137–148.
- Kurihara Y., Takashi Y., Watanabe Y. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis // RNA. 2006. V. 12. No. 2. P. 206–212.
- Kurihara Y., Watanabe Y. *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. No. 34. P. 12753–12758.
- Lindbo J.A., Silva-Rosales L., Proebsting W.M., Dougherty W.G. Induction of a highly specific antiviral state in

- transgenic plants: implication for regulation of gene expression and virus resistance // *Plant Cell*. 1993. V. 5. No. 12. P. 1749–1759.
- Mallory A.C., Mlotshwa S., Bowman L.H., Vance V.B. The capacity of transgenic tobacco to send a systemic RNA silencing signal depends on the nature of the inducing transgene locus // *Plant J*. 2003. V. 35. No. 1. P. 82–92.
- Masclaux F.G., Charpentreau M., Takahashi T. *et al.* Gene silencing using a heat-inducible RNAi system in *Arabidopsis* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 321. P. 364–369.
- Matzke M., Aufsatz W., Kanno T. *et al.* Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing // *Biochim. Biophys. Acta*. 2004. V. 1677. No. 1/3. P. 129–141.
- Melnik C.W., Molnar A., Baulcombe D.C. Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals // *EMBO J*. 2011. V. 30. No. 17. P. 3553–3563.
- Mette M.F., Aufsatz W., van der Winden J. *et al.* Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA // *EMBO J*. 2000. V. 19. No. 19. P. 5194–5201.
- Miki D., Shimamoto K. Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice // *Plant Cell Physiol*. 2004. V. 45. P. 490–495.
- Mlotshwa S., Voinnet O., Mette M.F. *et al.* RNA silencing and the mobile silencing signal // *Plant Cell*. 2002. V. 14. Suppl: S289–S301.
- Nakahara K.S., Masuta C., Yamada S. *et al.* Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. No. 25. P. 10113–10118.
- Omarov R.T., Scholthof H.B. Biological chemistry of virus-encoded suppressors of RNA silencing: an overview // *Methods Mol. Biol.* 2012. No. 894. P. 39–56.
- Ratcliff F.G., MacFarlane S.A., Baulcombe D.C. Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses // *Plant Cell*. 1999. V. 11. No. 7. P. 1207–1216.
- RNA Interference: Methods for Plants and Animals / Ed. T. Doran, C. Helliwell. CABI, 2009. 257 p.
- Ryabov E.V., van Wezel R., Walsh J., Hong Y. Cell-to-cell, but not long-distance, spread of RNA silencing that is induced in individual epidermal cells // *J. Virol.* 2004. V. 78. No. 6. P. 3149–3154.
- Schott G., Mari-Ordonez A., Himber C. *et al.* Differential effects of viral silencing suppressors on siRNA and miRNA loading support the existence of two distinct cellular pools of ARGONAUTE1 // *EMBO J*. 2012. V. 31. No. 11. P. 2553–2565.
- Schwab R., Ossowski S., Riester M. *et al.* Highly specific gene silencing by artificial micro RNAs in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2006. V. 18. P. 1121–1133.
- Schwach F., Vaistij F.E., Jones L., Baulcombe D.C. An RNA-Dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal // *Plant Physiol*. 2005. V. 138. No. 4. P. 1842–1852.
- Shams-Bakhsh M., Canto T., Palukaitis P. Enhanced resistance and neutralization of defense responses by suppressors of RNA silencing // *Virus Res*. 2007. V. 130. No. 1/2. P. 103–109.
- Shen W.J., Ruan X.L., Li X.S. *et al.* RNA silencing suppressor Pns11 of rice gall dwarf virus induces virus-like symptoms in transgenic rice // *Arch. Virol.* 2012. V. 157. No. 8. P. 1531–1539.
- Shivaprasad P.V., Chen H.M., Patel K. *et al.* A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs // *Plant Cell*. 2012. V. 24. No. 3. P. 859–874.
- Sonoda S., Nishiguchi M. Graft transmission of post-transcriptional gene silencing: target specificity for RNA degradation is transmissible between silenced and non-silenced plants, but not between silenced plants // *Plant J*. 2000. V. 21. No. 1. P. 1–8.
- Sunkar R., Zhu J.K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2004. V. 16. P. 2001–2019.
- Tournier B., Tabler M., Kalantidis K. Phloem flow strongly influences the systemic spread of silencing in GFP *Nicotiana benthamiana* plants // *Plant J*. 2006. V. 47. No. 3. P. 383–394.
- Ueki S., Citovsky V. RNA commutes to work: Regulation of plant gene expression by systemically transported RNA molecules // *BioEssays*. 2001. V. 23. No. 12. P. 1087–1090.
- Vanitharani R., Chellappan P., Fauquet C.M. Short interfering RNA-mediated interference of gene expression and viral DNA accumulation in cultured plant cells // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. No. 2. P. 169632–169636.
- Vaucheret H., Vazquez F., Crete P., Bartel D.P. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathways are crucial for plant development // *Genes Dev*. 2004. V. 18. P. 1187–1197.
- Voinnet O., Baulcombe D.C. Systemic signaling in gene silencing // *Nature*. 1997. V. 389. No. 6651. P. 553.
- Wassenegger M., Heimes S., Riedel L., Sanger H.L. RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants // *Cell*. 1994. V. 76. No. 3. P. 567–576.
- Wesley S.V., Helliwell C.A., Smith N.A. *et al.* Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants // *Plant J*. 2001. V. 27. P. 581–590.
- Wielopolska A., Townley H., Moore I. *et al.* A high-throughput inducible RNAi vector for plants // *Plant Biotechnol. J*. 2005. V. 3. P. 583–590.
- Yelin M.D., Chung S.M., Frankman E.L., Tzfira T. pSAT RNA interference vectors: a modular series for multiple gene down-regulation in plants // *Plant Physiol*. 2007. V. 145. P. 1272–1281.
- Yoo B.-C., Kragler F., Varkonyi-Gasic E. *et al.* A systemic small RNA signaling system in plants // *Plant Cell*. 2004. V. 16. No. 8. P. 1979–2000.
- Zentella R., Yamauchi D., Ho T.D. Molecular dissection of the gibberellin/abscisic acid signaling pathways by transiently expressed RNA interference in barley aleurone cells // *Plant Cell*. 2002. V. 14. P. 2289–2301.
- Zilberman D., Cao X., Jacobsen S.E. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation // *Science*. 2003. V. 299. No. 5607. P. 716–719.

**ROLE OF SMALL RNAs IN PLANT DEFENSE  
AGAINST BIOTIC AND ABIOTIC STRESSES****V.I. Malinovsky<sup>1</sup>, G.B. Borovskii<sup>2</sup>, E.L. Gorbyleva<sup>2,3</sup>,  
I.V. Fedoseeva<sup>2,3</sup>, E.L. Tauson<sup>2</sup>, V.A. Sokolov<sup>4</sup>, V.K. Voinikov<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Biology and Soil Science, Far East Branch, RAS, Vladivostok, Russia,  
e-mail: [ibss@eastnet.febras.ru](mailto:ibss@eastnet.febras.ru)

<sup>2</sup> Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS, Irkutsk, Russia,  
e-mail: [borovskii@sifibr.irk.ru](mailto:borovskii@sifibr.irk.ru), [dzubina@sifibr.irk.ru](mailto:dzubina@sifibr.irk.ru),  
[fedoseeva@sifibr.irk.ru](mailto:fedoseeva@sifibr.irk.ru), [tauson@sifibr.irk.ru](mailto:tauson@sifibr.irk.ru), [vvk@sifibr.irk.ru](mailto:vvk@sifibr.irk.ru);

<sup>3</sup> National Research Irkutsk State University, Irkutsk, Russia;

<sup>4</sup> Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS, Novosibirsk, Russia

**Summary**

Small non-coding RNAs are a specific class of RNAs that regulate a variety of physiological processes in plants. Small RNAs (siRNAs and miRNAs), the pathways of formation and, particularly, their putative functions in plant defense against biotic and abiotic stresses are concisely reviewed. Techniques that enable use of this class of RNA as agents for managing plant resistance are discussed.

**Key words:** RNA interference, miRNA, siRNA, phytoviruses, viral suppressors, biotic stress.

УДК 575.113:577.322.4:577.214

## РЕКОНСТРУКЦИЯ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *yfiA* *ESCHERICHIA COLI* В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

© 2013 г. Т.М. Хлебодарова<sup>1</sup>, Д.Ю. Ощепков<sup>1</sup>, Н.В. Тикунова<sup>3</sup>,  
И.В. Бабкин<sup>3</sup>, А.Д. Груздев<sup>1</sup>, В.А. Лихошвай<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,

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

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,  
Новосибирск, Россия;

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 3 декабря 2012 г. Принята к публикации 20 февраля 2013 г.

С использованием компьютерного ресурса SiteCon и методов математического моделирования проведены реконструкция структуры регуляторной области гена *yfiA* *E. coli* и оценка сложности механизмов его экспрессии в условиях окислительного стресса. Моделирование динамики ответа на окислительный стресс клеток *E. coli*, трансформированных плазмидой pYfi-gfp, показало, что максимальное совпадение с экспериментальными данными наблюдается в модели, предполагающей комплексное воздействие, которое осуществляется, по-видимому, через ряд транскрипционных факторов (ТФ). Поиск в регуляторной области гена *yfiA* *E. coli* потенциальных сайтов связывания ТФ показал высокий уровень достоверности распознавания для ТФ MagA, IscR, MetJ, PurR и SoxS, которые прямо или косвенно могут участвовать в ответе этого гена на окислительный стресс, а также для ТФ CRP, глобального регулятора катаболизма углеводов. Гель-шифт-анализ с очищенными рекомбинантными белками ТФ CRP, MagA и SoxS *E. coli* подтвердил их присутствие в промоторе гена *yfiA* *E. coli*, что позволяет объяснить чувствительность этого гена к митомycinу и радикал-образующим агентам.

**Ключевые слова:** *Escherichia coli*, *yfiA*, GFP, регуляция транскрипции.

### ВВЕДЕНИЕ

Ген *yfiA* *Escherichia coli* кодирует структуру белка рУ (RaiA), который, как известно, стабилизирует рибосомы и участвует в регуляции элонгации трансляции в условиях стресса (Maki *et al.*, 2000; Agafonov *et al.*, 2001; Agafonov, Spirin, 2004; Wilson, Nierhaus, 2004; Vila-Sanjurjo *et al.*, 2004; Ueta *et al.*, 2005). Данные микрочип-эксперимента свидетельствуют о чувствительности гена *yfiA* *E. coli* к различным внешним воздействиям (Pomposiello *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2001; Khil, Camerini-Otero, 2002; Schembri *et al.*, 2003). К настоящему времени в литературе нет исследований структуры промотора гена *yfiA* *E. coli*. В связи с тем, что АТГ кодон гена *yfiA*

расположен на расстоянии 35 нуклеотидов от конца рамки считывания впередилежащего гена *b2596*, предполагалось, что он входит в структуру оперона, включающего также и ген *ectD* (*b2595*), так как расстояние между последними также не превышало 30 нуклеотидов (EMBL/GenBank:U00096). Существование оперона с единой регуляцией для трех вышеперечисленных генов было подвергнуто нами сомнению на основании результатов работы К. Salmon с соавт. (Salmon *et al.*, 2003). В ней было показано, что гены *ectD* и *yfiA* по-разному реагируют на отсутствие кислорода и присутствие транскрипционного фактора FNR. В то же время экспрессии гена *b2596*, расположенного между генами *ectD* и *yfiA*, обнаружено не было (Salmon *et al.*,



2003). Кроме того, ранее при исследовании экспрессии оперона *rheLA* был обнаружен старт транскрипции, расположенный на расстоянии 30 нуклеотидов от начала старта трансляции впередилежащего гена *URF1* (синоним *yfiA*) практически в пределах гена *b2596* (Hudson *et al.*, 1984). Эти данные позволили нам поставить под сомнение существование гена *b2596* и предположить наличие независимого промотора для гена *yfiA* в пределах последовательности от конца гена *ectD* до ATG кодона гена *yfiA* (Tikunova *et al.*, 2007). Последние данные по аннотации генома *E. coli* также поставили существование гена *b2596* под сомнение (Riley *et al.*, 2006).

Ранее, исходя из вышеперечисленных данных, мы выделили потенциальную регуляторную область гена *yfiA* в пределах от -242 до +38 от старта транскрипции, обнаруженного в работе Hudson с соавт. (1984). На основе этой последовательности и репортерного гена *gfp* мы создали геносенсор, который отвечал, в частности, на оксидативный стресс ( $H_2O_2$ ) и специфическое повреждение структуры ДНК (митомицин С) (Tikunova *et al.*, 2007), однако механизмы реализации этих ответов оставались неизвестными. Данные микрочип-эксперимента также свидетельствуют о чувствительности гена *yfiA* *E. coli* к перекиси водорода, особенно в *OxyR*-мутантах (Schembri *et al.*, 2003), митомицину С (Ueta *et al.*, 2005) и кислородному голоданию, которое зависит от присутствия транскрипционного фактора FNR (Salmon *et*

*al.*, 2003). Мы использовали компьютерные методы анализа промоторной области гена *yfiA* *E. coli*, метод аппроксимации экспериментальных данных рациональными полиномами для анализа сложности механизмов экспрессии гена *yfiA* *E. coli* в условиях окислительного стресса и гель-шифт-анализ для экспериментального подтверждения ряда выявленных потенциальных регуляторов этого гена.

## МЕТОДЫ

**Компьютерные методы.** Для анализа структуры потенциальной регуляторной области гена *yfiA* *E. coli* был использован метод SiteCon, позволяющий эффективно распознавать сайты связывания транскрипционных факторов (ССТФ). Метод заключается в выявлении набора консервативных контекстно зависимых конформационных и физико-химических свойств, определенных для позиций выравнивания ССТФ и дальнейшего сравнения выявленных консервативных свойств со свойствами анализируемой последовательности (Oshchepkov *et al.*, 2004). Для распознавания потенциальных сайтов в промоторе гена *yfiA* были созданы обучающие выборки экспериментально доказанных ССТФ PurR, MetJ, MarA, SoxS, IscR и Crp. Объем выборки для каждого ТФ и длина сайтов приведены в табл. 1. Сайты были выровнены относительно наиболее часто встречающихся нуклеотидов и использованы

Таблица 1

Потенциальные сайты связывания транскрипционных факторов, выявленные методом SiteCon, в структуре промотора гена *yfiA* *E. coli*

ТФ	Длина сайтов в выборке	Объем выборки	Параметры потенциальных сайтов связывания			
			позиции	P*	уровень недо-предсказания	уровень пере-предсказания
PurR	31	16	-125/-98	0,819	0,2500	1/2776
MetJ	23	24	-111/-91	0,737	0,5000	1/11106
MarA	31	16	-78/-47	0,827	0,7500	1/19987
SoxS	30	18	-74/-48	0,740	0,5556	1/1851
IscR	42	4	-73/-32	0,756	0,2500	1/2776
Crp	60	39	-51/-30	0,830	0,9231	1/100000
MetJ	23		-31/-12	0,712	0,4583	1/3570

Примечание. \* P – уровень конформационного сходства с известными сайтами связывания.

для анализа. Для оценки достоверности распознавания нами были оценены величины ошибок первого и второго рода, недопредсказания и перепредсказания соответственно. При этом контроль качества распознавания для ошибки 1-го рода был произведен по методике jack-knife с последовательным исключением одной последовательности из выборки и обучением по оставшейся части выборки. Контроль ошибки второго рода производился путем распознавания сайтов связывания в последовательности длиной 100 т.п.о., которая была создана путем случайного перемешивания нуклеотидов обучающей выборки. Таким образом, нуклеотидный состав негативной и обучающей выборок был одинаковым. Для каждой выборки значения рассчитывались в виде таблицы ошибок, где в соответствие порогу распознавания были поставлены значения ошибок 1-го и 2-го родов. Для оценки достоверности каждого обнаруженного сайта брались значения ошибок 1-го и 2-го родов из таблицы, посчитанной для данного типа сайтов, и для порога, на котором был обнаружен соответствующий сайт. Исходя из этого мы считаем, что чем ниже значение ошибки 2-го рода (перепредсказания) для сайта, тем меньше вероятность обнаружить данный сайт на этом пороге в последовательности данной длины по случайным причинам и тем выше достоверность его распознавания.

**Метод моделирования.** Для теоретической оценки сложности механизма  $H_2O_2$ -зависимой регуляции эффективности функционирования промоторов генов *yfiA* и *katG* *E.coli* был использован метод аппроксимации экспериментальных данных рациональными полиномами, описанный ранее (Лихошвай и др., 2009).

При оценке параметров функционирования промотора гена *yfiA* *E. coli* использовали экспериментальные значения флюоресценции клеток линии MC4100 *E. coli*, трансформированных репортерной плазмидой pYfi-gfp, в момент достижения максимального ответа на стресс через 60 мин после начала воздействия  $H_2O_2$ , которые были получены ранее (Tikunova *et al.*, 2007). Интенсивность флюоресценции репортерного белка GFP при разных концентрациях перекиси водорода интерпретировали как величину относительной активности промотора. В силу условности шкалы измерения уровня флюо-

ресценции белка GFP экспериментальные точки, соответствующие временному срезу 60 мин, были нормированы на величину интенсивности флюоресценции при концентрации перекиси водорода, равной 0,5 mM.

В качестве контрольного был использован геносенсор на основе промотора гена *katG* *E. coli*, разработанный нами ранее на той же базовой основе, что и геносенсор *E. coli/pYfi-gfp*. При оценке параметров были использованы собственные экспериментальные данные (Khlebodarova *et al.*, 2007). Значения взяты в момент максимального ответа на стресс через 40 мин после начала воздействия перекиси. Экспериментальные точки, соответствующие временному срезу 40 мин, были нормированы на величину фоновой интенсивности флюоресценции клеток в отсутствие перекиси водорода.

**Экспериментальные методы.** Для получения рекомбинантных белков транскрипционных факторов Crp, SoxS, FNR и MarA *E. coli* на основе известных нуклеотидных последовательностей этих генов (GenBank: U00096) были рассчитаны праймеры для ПЦР: 5'-CTCTCCATGGTGCTTGGCAAACCGC-3' и 5'-GAGAGGGATCCACGAGTGCCGTAACGACGATG-3', 5'-AAAACCATGGATGTCCCATCAGAAAATATTCAGG-3' и 5'-CTTTGGATCC TAGGCGGTGGCGATAATCG-3', 5'-CTGGACATGTTAAAATTGACAAATATCAATTACGG-3' и 5'-CTGGAGATCTGGCAACGTTACGCGTAGACCA-3', 5'-CTCCTCATGACGATGTCCA GACGCAATACTGA-3' и 5'-TCCTAGATCTGCTGTTGTAATGATTTAATGGATGTA AAAAG-3' соответственно.

Праймеры для ТФ Crp и SoxS включали сайты рестрикции *Bam*HI и *Bsp*19I, а для FNR и MarA – *Bgl*II, *Cci*I или *Pci*I. Полученные амплифицированные фрагменты были расчетной длины и клонированы в вектор pOPE-110 (Crp, SoxS) или pQE60 (FNR, MarA) по соответствующим сайтам. Рекомбинантные белки были наработаны и очищены с помощью Ni-хелатной хроматографии согласно протоколу производителя (QIAGEN).

Гель-шифт-анализ с рекомбинантными очищенными белками проводили, как описано (Cameron, Redfield, 2006). Олигонуклеотидный дуплекс, моделирующий потенциальный сайт связывания ТФ MarA в промоторе гена *yfiA*

*E. coli*, был синтезирован и соответствует последовательности 5'-AAGATTCGTTGACAAAAAGTGACAAAATTAT в позиции -78/-47 от старта транскрипции.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Теоретический анализ потенциального регуляторного района гена *yfiA* *E. coli*

Как указывалось выше, проведенные ранее исследования (Tikunova *et al.*, 2007) подтвердили наше предположение о существовании собственного промотора у гена *yfiA* *E. coli* в пределах выделенной нами последовательности от конца открытой рамки считывания впередилежащего гена *ectD* (b2595) до ATG-кодона гена *yfiA*. Однако вопрос о существовании регуляции экспрессии *yfiA* (b2597) со стороны промотора гена *ectD* (b2595) оставался открытым. Дополнительно мы провели исследование нуклеотидной последовательности между генами *ectD* и *yfiA* с использованием Интернет-доступного пакета программ RNASHapes (Steffen *et al.*, 2006). На расстоянии 30 нуклеотидов от конца открытой рамки считывания гена *ectD* был обнаружен канонический Rho-независимый терминатор транскрипции, структура которого

(AAAACGGCAGCcccttgaGCTGCCGTTTT) позволяет формирование потенциальной шпильки с энергией 16,7 ккал/моль. Это значение достаточно хорошо соответствует энергии наиболее часто встречающихся экспериментально идентифицированных Rho-независимых терминаторов транскрипции у *E. coli* (de Hoop *et al.*, 2005) и в совокупности с данными микрочип-эксперимента (Salmon *et al.*, 2003) позволяет предположить отсутствие регуляции гена *yfiA* со стороны впередилежащего гена *ectD* (b2595).

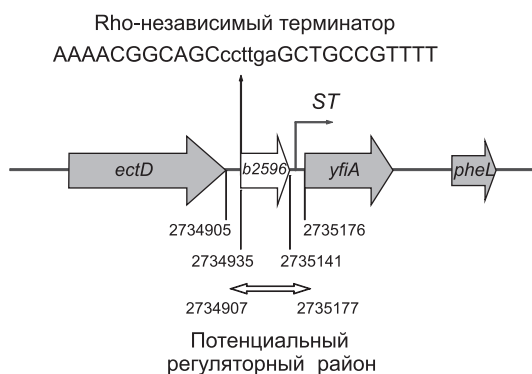
Таким образом, потенциальная промоторная область гена *yfiA* *E. coli* составляет 230 пар нуклеотидов от конца сайта терминации транскрипции гена *ectD* до ATG-кодона гена *yfiA* и включает открытую рамку считывания гена b2596. Структура этой области представлена на рис. 1.

Клонированная последовательность потенциальной промоторной области гена *yfiA* *E. coli* включает часть Rho-независимого потенциального терминатора транскрипции впередилежащего гена *ectD* (Tikunova *et al.*, 2007).

### Модель функционирования геносенсора *E. coli/pYfi-gfp* в условиях окислительного стресса

Данные микрочип-эксперимента свидетельствуют о том, что высокая чувствительность гена *yfiA* *E. coli* к перекиси водорода не связана с присутствием ТФ ОхуR, который является основным сенсором окислительного стресса. Более того, у ОхуR-мутантов уровень индукции гена *yfiA* перекисью водорода существенно выше такового у дикого типа (Zheng *et al.*, 2001). Для оценки сложности механизма регуляции активности гена *yfiA* *E. coli* в условиях окислительного стресса были использованы собственные экспериментальные данные по влиянию различных концентраций  $H_2O_2$  на флюоресценцию клеток геносенсора *E. coli/pYfi-gfp* (Tikunova *et al.*, 2007), которые были нормированы, как описано в разделе «Методы». Их численные значения приведены в табл. 2.

Для описания эффективности функционирования промотора гена *yfiA* *E. coli* под действием  $H_2O_2$  использовали рациональный полином вида:



**Рис. 1.** Структура потенциального регуляторного района гена *yfiA* *E. coli*.

Указано расположение открытых рамок считывания генов *ectD*, *b2596*, *yfiA* и *pheL* старта транскрипции (СТ), обнаруженного в работе Hudson с соавт. (1984), потенциального Rho-независимого терминатора транскрипции гена *ectD* и границы потенциального промотора гена *yfiA*. Позиции указаны в координатах полного генома *E. coli* (GenBank: U00096).

$$V_{n,m}(s) = \left[ 1 + \frac{w + v \left[ \frac{s}{k_1} \right]^n}{\left[ 1 + \left[ \frac{s}{k_1} \right]^n \right] \left[ 1 + \left[ \frac{s}{k_2} \right]^m \right]} \right] / \left[ 1 + \frac{w + v \left[ \frac{s_0}{k_1} \right]^n}{\left[ 1 + \left[ \frac{s_0}{k_1} \right]^n \right] \left[ 1 + \left[ \frac{s_0}{k_2} \right]^m \right]} \right], \quad (1)$$

где  $n$  и  $m$  – параметры, которые характеризуют комплексность влияния перекиси на активацию и репрессию промотора соответственно;  $k_1, k_2$  – константы, которые имеют размерность концентрации и определяют эффективность влияния перекиси на активность промотора;  $w$  – отношение активности промотора в отсутствие перекиси водорода к величине фонового сигнала флюоресценции;  $v$  – отношение константы эффективности инициации транскрипции активированного промотора к величине фонового сигнала флюоресценции. Величины параметров  $n$  и  $m$  характеризуют совокупную сложность механизма регуляции активности промотора перекисью водорода. Чем выше значения  $n$  и  $m$ , тем большая сложность механизма прогнозируется.

Результаты аппроксимации модели (1) к экспериментальным данным (табл. 2) приведены на рис. 2. Видно, что при  $n = 1,3$  и  $m = 2,8$  функция (1) хорошо описывает динамику ответа рYfi-gfp на стресс. Отсюда следует, что активность промотора гена *yfiA* *E. coli* регулируется через комплексный механизм и осуществляется, по-видимому, через несколько ТФ, которые могут действовать как активаторы и как ингибиторы.

Биохимический смысл значений  $n$  и  $m$  на данном этапе анализа не может быть одно-

значно распознан. Они могут отражать и количество сайтов связывания транскрипционных факторов, через которые действует перекись, и возможную каскадность механизма регуляции, и синергические взаимодействия транскрипционных факторов. Данные, использованные в настоящей работе, не позволяют разделить эти гипотезы.

Косвенно обоснованность того, что механизм ингибирования промотора гена *yfiA* в присутствии перекиси водорода связан с молекулярно-генетическими процессами, а не является следствием гибели клеток в исследуемом интервале концентраций, можно продемонстрировать при оценке предложенным методом сложности механизма регуляции экспрессии гена *katG* *E. coli* в условиях оксидативного стресса, который, как известно, осуществляется через OxyR-зависимый механизм (Tartaglia *et al.*, 1989).

Для этой оценки использованы собственные экспериментальные данные по влиянию различных концентраций  $H_2O_2$  на флюоресценцию клеток *E. coli/pKat-gfp* геносенсора (Khlebodova *et al.*, 2007), которые были нормированы, как описано в разделе «Методы». Их численные значения приведены в табл. 2.

Таблица 2

Уровни индукции флюоресценции клеток геносенсоров *E. coli/pYfi-gfp* и *E. coli/pKat-gfp* различными концентрациями перекиси водорода

Концентрация $H_2O_2$ (мМ)	Значение сигнала (усл.ед)	
	<i>E. coli/pYfi-gfp</i>	<i>E. coli/pKat-gfp</i>
0	0,32	1
0,5	1	2,17
1	1,36	2,92
2	0,86	3,5
4	1,89	4,0
8	1,13	4,7

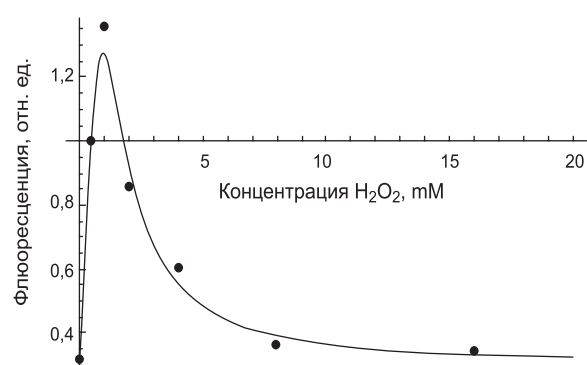


Рис. 2. Аппроксимация динамики экспрессии гена *yfiA* в условиях окислительного стресса.

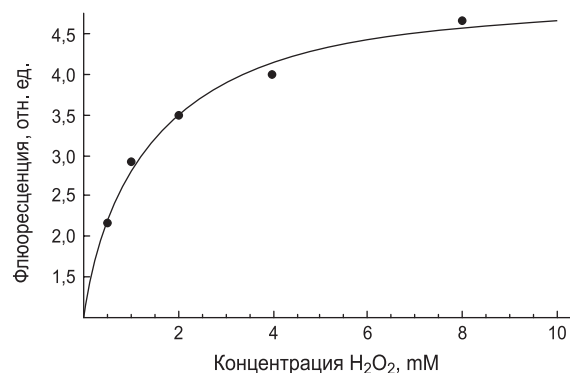
Сплошная линия – теоретическая кривая, точки – экспериментальные значения, отражающие относительную активность функционирования промотора *yfiA* через 60 мин после воздействия различных концентраций  $H_2O_2$ . Расчеты выполнены при  $w = 0$ ,  $v = 111$ ,  $k_1 = 8,1$ ,  $k_2 = 0,97$ ,  $n = 1,3$ ,  $m = 2,8$ .

Результаты аппроксимации модели (1) к экспериментальным данным приведены на рис. 3. Видно, что при  $n = 1$  и  $m = 0$  функция (1) хорошо описывает динамику ответа  $p_{Kat-gfp}$  на стресс, что согласуется с известным фактом наличия в данном промоторе сайта ТФ OxyR, через который и осуществляется активация промотора перекисью водорода (Tartaglia *et al.*, 1989).

Видно также, что концентрации перекиси водорода выше 2,0 мМ не снижают уровень ответа геносенсора *E. coli/pKat-gfp* на присутствие токсического агента. Эти данные косвенно свидетельствуют о специфичности ответа геносенсора *E. coli/pYfi-gfp* на воздействие  $H_2O_2$  в интервале концентраций от 2,0 до 8 мМ (рис. 2), однако для выяснения конкретных механизмов его ингибирования в этом интервале концентраций  $H_2O_2$  необходимы дополнительные исследования.

#### Анализ структуры потенциального промотора гена *yfiA* *E. coli* методом SiteCon

Поскольку на основании математического анализа был сделан вывод о том, что регуляция экспрессии гена *yfiA* в условиях окислительного стресса носит сложный комплексный характер, был проведен поиск в последовательности промотора гена *yfiA* потенциальных сайтов связывания ТФ, которые прямо или косвенно могут участвовать в этом ответе. Наибольший интерес для нас представляли сайты, достоверность распознавания которых достаточно высока. Мы оценили этот уровень по ошибке второго рода (уровню перепредсказания) и ограничили его снизу. Уровень перепредсказания отражает количество потенциальных сайтов, которые могут быть найдены в случайной последовательности по случайным причинам на данном пороге распознавания, и поэтому данный параметр может быть использован как простая оценка уровня достоверности предсказания. В дальнейшем рассматривали только те потенциальные сайты, уровень перепредсказания которых был меньше, чем 1/2400 нуклеотидов при длине анализируемой последовательности 240 нуклеотидов. Исключение было сделано для ТФ SoxS, достоверность предсказания которого была несколько ниже этой оценки. В



**Рис. 3.** Соответствие функции  $V_{n,m}$  динамике экспрессии гена *katG* в условиях окислительного стресса при предположении активации его промотора через один сайт ( $n = 1$ ,  $m = 0$ ).

Сплошная линия — теоретическая кривая, точки — экспериментальные значения экспрессии промотора *katG* *E. coli* через 40 мин после воздействия различных концентраций  $H_2O_2$ . Расчеты выполнены при  $k_1 = 1,275$ ,  $w = 0,6$ ,  $v = 7,23$ .

табл. 1 приведен список потенциальных сайтов связывания ТФ в промоторе гена *yfiA*, которые удовлетворяют вышеозначенным ограничениям. Таких сайтов оказалось 7, и принадлежат они 6 ТФ: MarA, IscR, MetJ, PurR, CRP и SoxS. Транскрипционные факторы MarA, IscR, MetJ, PurR и SoxS прямо или косвенно участвуют в ответе на окислительный стресс, а ТФ Crp является глобальным регулятором генов катаболизма углеводов и в целом может влиять на уровень стрессового ответа в зависимости от присутствия в среде глюкозы и уровня внутриклеточного сАМФ (Ishizuka *et al.*, 1994).

В табл. 1 сайты расположены в порядке их удаленности от старта транскрипции. Согласно данным табл. 1, выявленные потенциальные сайты связывания ТФ имеют достаточно высокий уровень конформационного сходства с известными экспериментально подтвержденными сайтами и небольшую величину вероятности их выявления по случайным причинам. Среди выявленных сайтов максимальный уровень достоверности показан для сайтов связывания ТФ Crp, MarA и MetJ, а наименьший — для IscR, PurR и SoxS.

Из данных табл. 1 следует, что центр сайта связывания Crp расположен на расстоянии –40 нуклеотидов от предполагаемого старта транскрипции. Эта позиция близка к позиции (–41,5), характерной для Crp-зависимых про-

моторов класса II (Rhodius *et al.*, 1997; Savery *et al.*, 1998). Совпадение позиций сайтов связывания для ТФ MarA и SoxS неудивительно, так как эти транскрипционные факторы имеют близкую структуру сайтов связывания, которая называется *marbox* (Martin *et al.*, 1999). Положение центра потенциального сайта MarA относительно старта транскрипции находится в позиции –63, а сайта SoxS – в позиции –61,5, что соответствует структуре *mar/sox*-зависимых промоторов класса I (Martin *et al.*, 2002). Что касается ТФ IscR, то он содержит в своей структуре [2Fe-2S] кластер, подобно семейству Mar/Sox/Rob транскрипционных факторов, а его последовательность имеет сходство с последовательностью ТФ MarA (Schwartz *et al.*, 2001). В связи с этим перекрывание его потенциального сайта связывания с последовательностью *marbox* также возможно.

В промоторной области гена *yfiA* выявлено три сайта связывания для транскрипционных репрессоров MetJ и PurR. Обнаружение в промоторе гена *yfiA* специфических регуляторов пуринового и метионинового биосинтеза кажется маловероятным, но высокая достоверность сайта MetJ в позиции –101 относительно старта транскрипции и характерное для репрессоров расположение второго сайта между боксами –35 и –10 РНК полимеразы требуют экспериментальной проверки возможности наличия этих сайтов в структуре гена *yfiA*. Анализ известных механизмов регуляции транскрипции этих двух репрессоров выявил следующую особенность. Их транскрипция репрессируется ТФ Fur, а экспрессия Fur прямо зависит от активности ТФ OxyR, SoxS и Crp (De Lorenzo *et al.*, 1988; Zheng *et al.*, 1999). Подтверждение существования этих сайтов в промоторе гена *yfiA* может свидетельствовать о наличии непрямого регуляции экспрессии гена *yfiA* в условиях оксидативного стресса.

Таким образом, комплексная чувствительность экспрессии гена *yfiA* к перекиси водорода может быть объяснена наличием как прямой активации промотора гена *yfiA* окисляющими агентами через сайты связывания ТФ SoxS и IscR, которые чувствительны к радикал-образующим агентам, так и непрямого его активацией через сайты связывания ТФ MarA, MetJ и PurR, экспрессия которых в присутствии перекиси

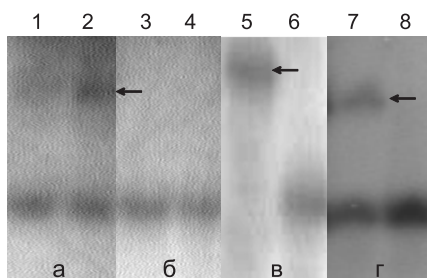
водорода зависит от сенсоров окислительного стресса ТФ SoxS и/или OxyR (Dempse, 1996; Zheng *et al.*, 1999).

Наличие сайта связывания Crp свидетельствует о возможности прямой зависимости уровня стрессового ответа клеток от источника питания и той роли, которую ТФ Crp играет в регуляции экспрессии *yfiA* (Ishizuka *et al.*, 1994). Более того, положение этого сайта в промоторе позволяет предположить возможность функционального взаимодействия Crp с IscR, SoxS и MarA транскрипционными факторами (табл. 1).

### Экспериментальный анализ структуры промотора гена *yfiA E. coli*

На первом этапе для анализа были выбраны потенциальные сайты ТФ Crp, MarA, FNR и SoxS. Сайты связывания ТФ Crp и MarA были выявлены нами в промоторе гена *yfiA* с очень высоким уровнем достоверности: 1/100000 и 1/19987 соответственно. Предпосылкой для проверки сайта связывания ТФ FNR послужили данные микрочип-эксперимента, в которых экспрессия гена *yfiA* зависит от присутствия этого фактора, и тот факт, что в его потенциальной регуляторной области находится последовательность, близкая по структуре сайту связывания ТФ FNR (Salmon *et al.*, 2003). Уровень распознавания этой последовательности как сайта связывания ТФ FNR методом SITECON составил 1/549, что значительно выше выбранного нами уровня ограничения. Потенциальный сайт ТФ SoxS представлял интерес с двух точек зрения. Во-первых, он был выявлен в позиции –61,5, что соответствует структуре *mar/sox*-зависимых промоторов класса I (Martin *et al.*, 2002). Во-вторых, уровень его распознавания был чуть выше выбранного нами ограничения. В совокупности анализ этих сайтов позволял уточнить критический уровень распознавания метода SITECON.

На рис. 4 представлены результаты взаимодействия последовательности промотора гена *yfiA E. coli* (а, б, в) и последовательности потенциального сайта связывания MarA (AAG ATTCGTTGACAAAAAGTGACAAAATTAT) из промотора гена *yfiA* (г) в позиции –78/–47 с рекомбинантными очищенными белками ТФ SoxS (2), FNR (4), Crp (6) и MarA (7).



**Рис. 4.** Результаты анализа взаимодействия промотора гена *yfiA* *E. coli* (а, б, в) и олигонуклеотидного дуплекса, моделирующего сайт связывания ТФ MarA гена *yfiA* (г), с очищенными белками ТФ SoxS (2), FNR (4), Crp (5) и MarA (7) *E. coli* методом EMSA.

Стрелками показано положение комплексов ДНК/белок с ТФ SoxS (дорожка 2), Crp (дорожка 5) и MarA (дорожка 7).

Видно отсутствие сайта связывания ТФ FNR промоторе гена *yfiA* (рис. 4, б, дорожка 4), что совпадает с низкой оценкой уровня его распознавания методом SITECON (1/549) и позволяет предположить не прямые механизмы его влияния на экспрессию гена *yfiA*. Действие FNR на экспрессию гена *yfiA* в анаэробных условиях может быть связано с участием FNR в активации транскрипции гена ТФ ArcA (Compan *et al.*, 1994), который репрессирует транскрипцию стрессовой *groS*-полимеразы (Mika, Hengge, 2005). Участие *groS*-полимеразы в транскрипции гена *yfiA* не показано, однако известно, что продукт гена *yfiA* появляется в клетке при изменении плотности культуры и в ответ на холодовый шок (Agafonov *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2004). Эти стрессовые воздействия реализуются через *groS*-полимеразу (Takayanagi *et al.*, 1994) и позволяют предположить ее участие в транскрипции гена *yfiA*.

Что касается потенциальных сайтов связывания ТФ Crp, MarA и SoxS, то результаты, представленные на рис. 4, подтверждают их наличие в структуре промотора *yfiA* *E. coli* и позволяют объяснить чувствительность этого гена к митомцину и окислительным агентам (Tikunova *et al.*, 2007).

Также полученные нами результаты позволяют не рассматривать в качестве потенциальных те сайты, которые выявлены методом SiteCon с уровнем перепредсказания выше 1/1800.

Таким образом, теоретически было показано, что сложная динамика экспрессии гена

*yfiA* *E. coli* в условиях окислительного стресса является отражением комплексного воздействия нескольких ТФ. Подтверждением этому было выявление в структуре его регуляторного района потенциальных ССТФ MarA, IscR, MetJ, PurR и SoxS, которые прямо или косвенно могут участвовать в ответе этого гена на окислительный стресс. Наличие сайтов связывания ТФ SoxS и MarA подтверждено экспериментально. Также выявлено, что экспрессия гена *yfiA* *E. coli* может зависеть от присутствия в среде глюкозы и уровня внутриклеточного сАМФ, в связи с наличием в структуре его промотора экспериментально подтвержденного сайта связывания ТФ CRP.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 10-01-00717), Программ Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (проект 6.8) и СО РАН (интеграционный проект № 80) и гранта НШ-5278.2012.4.

## ЛИТЕРАТУРА

- Лихошвай В.А., Степанова Т.Ю., Задорожный А.В. и др. Экспрессия гена *dps* *Escherichia coli* в присутствии токсических агентов: анализ и математическое моделирование // Информ. вестник ВОГиС. 2009. Т. 13. № 4. С. 731–740.
- Agafonov D.E., Kolb V.A., Spirin A.S. Ribosome-associated protein that inhibits translation at the aminoacyl-tRNA binding stage // EMBO Rep. 2001. V. 2. P. 399–402.
- Agafonov D.E., Spirin A.S. The ribosome-associated inhibitor A reduces translation errors // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 320. P. 354–358.
- Cameron A.D., Redfield R.J. Non-canonical CRP sites control competence regulons in *Escherichia coli* and many other gamma-proteobacteria // Nucl. Acids Res. 2006. V. 34. P. 6001–6014.
- Compan I., Touati D. Anaerobic activation of *arcA* transcription in *Escherichia coli*: roles of Fnr and ArcA // Mol. Microbiol. 1994. V. 11. P. 955–964.
- de Hoon M.J., Makita Y., Nakai K., Miyano S. Prediction of transcriptional terminators in *Bacillus subtilis* and related species // PLoS Comput Biol. 2005. V. 1. No. 3. P. e25.
- De Lorenzo V., Herrero M., Giovannini F., Neilands J.B. FUR (ferric uptake regulation) protein and CAP (catabolite-activator protein) modulate transcription of *fur* gene in *Escherichia coli* // Eur. J. Biochem. 1988. V. 173. P. 537–546.
- Demple B. Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* *soxRS* oxidative stress regulon – a review // Gene. 1996. V. 179. No. 1. P. 53–57.
- Hudson G.S., Davidson B.E. Nucleotide sequence and transcription of the phenylalanine and tyrosine operons

- of *Escherichia coli* K12 // J. Mol. Biol. 1984. V. 180. P. 1023–1051.
- Ishizuka H., Hanamura A., Inada T., Aiba H. Mechanism of the down-regulation of cAMP receptor protein by glucose in *Escherichia coli*: role of autoregulation of the *crp* gene // The EMBO J. 1994. V. 13. P. 3077–3082.
- Khil P.P., Camerini-Otero R.D. Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli* // Mol. Microbiol. 2002. V. 44. P. 89–105.
- Khlebodarova T.M., Tikunova N.V., Kachko A.V. *et al.* Application of bioinformatics resources for genosensor design // J. Bioinform. Comput. Biol. 2007. V. 5. P. 507–520.
- Maki Y., Yoshida H., Wada A. Two proteins, YfiA and YhbH, associated with resting ribosomes in stationary phase *Escherichia coli* // Genes Cells. 2000. V. 5. P. 965–974.
- Martin R.G., Gillette W.K., Rhee S., Rosner J.L. Structural requirements for marbox function in transcriptional activation of *mar/sox/rob* regulon promoters in *Escherichia coli*: sequence, orientation and spatial relationship to the core promoter // Mol. Microbiol. 1999. V. 34. P. 431–441.
- Martin R.G., Rosner J.L. Genomics of the *marA/soxS/rob* regulon of *Escherichia coli*: identification of directly activated promoters by application of molecular genetics and informatics to microarray data // Mol. Microbiol. 2002. V. 44. P. 1611–1624.
- Mika F., Hengge R. A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA, and RssB coordinates synthesis and proteolysis of sigmaS (RpoS) in *E. coli* // Genes Dev. 2005. V. 19. No. 22. P. 2770–2781.
- Oshchepkov D.Y., Vityaev E.E., Grigorovich D.A. *et al.* SITE-CON: a tool for detecting conservative conformational and physicochemical properties in transcription factor binding site alignments and for site recognition // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. P. W208–W212.
- Pomposiello P.J., Bennik M.H., Demple B. Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate // J. Bacteriol. 2001. V. 183. P. 3890–3902.
- Rhodus V.A., West D.M., Webster C.L. *et al.* Transcription activation at class II CRP-dependent promoters: the role of different activating regions // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 326–332.
- Riley M., Abe T., Arnaud M.B. *et al.* *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot—2005 // Nucl. Acids Res. 2006. V. 34. No. 1. P. 1–9.
- Salmon K., Hung S.P., Mekjian K. *et al.* Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of oxygen availability and FNR // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 29837–29855.
- Savery N.J., Lloyd G.S., Kainz M. *et al.* Transcription activation at Class II CRP-dependent promoters: identification of determinants in the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit // The EMBO J. 1998. V. 17. No. 12. P. 3439–3447.
- Schembri M.A., Kjaergaard K., Klemm P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms // Mol. Microbiol. 2003. V. 8. P. 253–267.
- Schwartz C.J., Giel J.L., Patschkowski T. *et al.* IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. No. 26. P. 14895–14900.
- Steffen P., Voss B., Rehmsmeier M. *et al.* RNAsHapes: an integrated RNA analysis package based on abstract shapes // Bioinformatics. 2006. V. 22. No. 4. P. 500–503.
- Takayanagi Y., Tanaka K., Takahashi H. Structure of the 5' upstream region and the regulation of the *rpoS* gene of *Escherichia coli* // Mol. Gen. Genet. 1994. V. 243. P. 525–531.
- Tartaglia L.A., Storz G., Ames B.N. Identification and molecular analysis of oxyR-regulated promoters important for the bacterial adaptation to oxidative stress // J. Mol. Biol. 1989. V. 210. P. 709–719.
- Tikunova N.V., Khlebodarova T.M., Kachko A.V. *et al.* A computational-experimental approach to designing a polyfunctional genosensor derived from the *Escherichia coli* gene *yfiA* promoter // Dokl. Biochem. Biophys. 2007. V. 417. No. 6. P. 357–361.
- Ueta M., Yoshida H., Wada C. *et al.* Ribosome binding proteins YhbH and YfiA have opposite functions during 100S formation in the stationary phase of *Escherichia coli* // Genes Cells. 2005. V. 10. No. 12. P. 1103–1112.
- Vila-Sanjurjo A., Schuwirth B.S., Hau C.W., Cate J.H. Structural basis for the control of translation initiation during stress // Nat. Struct. Mol. Biol. 2004. V. 11. No. 11. P. 1054–1059.
- Wilson D.N., Nierhaus K.H. The how and Y of cold shock // Nat. Struct. Mol. Biol. 2004. V. 11. No. 11. P. 1026–1028.
- Zheng M., Doan B., Schneider T.D., Storz G. OxyR and SoxRS regulation of *fur* // J. Bacteriol. 1999. V. 181. No. 15. P. 4639–4643.
- Zheng M., Wang X., Templeton L.J. *et al.* DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide // J. Bacteriol. 2001. V. 183. No. 15. P. 4562–4570.



**RECONSTRUCTION OF MECHANISMS REGULATING THE EXPRESSION OF THE *ESCHERICHIA COLI YFIA* GENE UNDER STRESS CONDITIONS**

**T.M. Khlebodarova<sup>1</sup>, D.Yu. Oshchepkov<sup>1</sup>, N.V. Tikunova<sup>3</sup>,  
I.V. Babkin<sup>3</sup>, A.D. Gruzdev<sup>1</sup>, V.A. Likhoshvai<sup>1,2</sup>**

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

<sup>2</sup> Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia;

<sup>3</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

The regulatory region of the *Escherichia coli yfiA* gene was reconstructed by using the SiteCon web resource and mathematical modeling, and its expression complexity under oxidative stress was assessed. Simulation of the response of *E. coli* cells transformed with pYfi-gfp plasmid to oxidative stress indicated that the maximum agreement with experimental data was achieved in a model implying a complex action, apparently mediated by several transcription factors (TFs). The regulatory region of the *yfiA* gene was searched for potential TF binding sites, and highly reliable recognition was predicted for TFs MarA, IscR, MetJ, PurR, and SoxS, which directly or indirectly participate in the response of the gene to oxidative stress, and for CRP, a global regulator of carbohydrate catabolism. The presence of binding sites for CRP, MarA, and SoxS in the *E. coli yfiA* promoter was confirmed by electrophoretic mobility shift assay with purified recombinant TFs. This fact explains the sensitivity of *yfiA* to mitomycin and radical-forming agents.

**Key words:** *Escherichia coli*, *yfiA*, GFP, transcription regulation.

УДК 575.1: 575.858: 575.174.015.3: 577.213.3

## ИЗМЕНЧИВОСТЬ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНА СУБЪЕДИНИЦЫ I ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ С У ВИДОВ РОДОВ *Aedes* И *Ochlerotatus* (DIPTERA: CULICIDAE)

© 2013 г. **Н.В. Храброва<sup>1</sup>, Ю.В. Андреева<sup>1</sup>, О.В. Ваулин<sup>2</sup>, С.С. Алексеева<sup>1</sup>, А.К. Сибатаев<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт биологии и биофизики Томского государственного университета, Томск, Россия, e-mail: hrabrova@yandex.ru;

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 7 декабря 2012 г. Принята к публикации 18 декабря 2012 г.

Анализировали возможность использования взятого за стандарт при баркодинге фрагмента ДНК митохондриального гена субъединицы I цитохромоксидазы С для видовой идентификации 15 видов комаров родов *Aedes* и *Ochlerotatus* (Diptera: Culicidae), собранных в Томской и Кемеровской областях, и 14 видов комаров, нуклеотидные последовательности которых были получены из базы данных GenBank. Различия между особями одного вида в среднем составили 0,6 % (значения от 0 до 1,6 %), между видами в пределах одного рода – 7,8 % (0,7–13,1 %), между видами разных родов – 14,2 % (9,7–17,6 %). Для четырех пар видов (3,7 %) выявленные различия оказались меньше 2 %, т. е. не превысили порог межвидовых различий, принятый в системе штрихкодирования. В то же время для *Och. euedes* и *Ae. vexans* выявлена значительная внутривидовая изменчивость, соответственно 1,6 % и 1,4 %, которая, однако, не превышает пороговые значения, принятые для внутривидовой дивергенции.

**Ключевые слова:** *Aedes*, *Ochlerotatus*, субъединица I цитохромоксидазы С (COI), штрихкодирование, филогения, дивергенция.

### ВВЕДЕНИЕ

Традиционные таксономические методы систематики, основанные на использовании морфологических критериев, трудоемки и часто недостаточно надежны для идентификации видов. В настоящее время для таксономических исследований необходимо применение междисциплинарного подхода, который включал бы комплекс данных – морфологических, экологических и молекулярно-генетических (Krzywinski, Besansky, 2003).

Достоверная и быстрая идентификация возбудителей заболеваний и их переносчиков имеет особое значение в медицинской энтомологии. При помощи молекулярно-генетических под-

ходов видовой диагностики можно проводить быструю и надежную идентификацию организмов на любой стадии развития, что, в свою очередь, позволяет выявить механизм передачи возбудителей и эпидемиологическую роль переносчиков (Cywinska *et al.*, 2006).

Несмотря на то что к кровососущим насекомым привлечено более пристальное внимание энтомологов и в целом они изучены более подробно, чем многие другие виды животных, наши представления о таксономии комаров остаются неполными. Со времени создания современной системы классификации комаров (Edwards, 1932) число описанных видов комаров увеличилось более чем вдвое – с 1400 до 3200 (Zavortink, 1990; Harbach, Kitching,

1998). Описание новых видов в последние десятилетия, прежде всего, связано с широким применением молекулярных методов (Beebe *et al.*, 2001; Alquezar *et al.*, 2010).

Для видовой идентификации комаров исследователями применялись разнообразные подходы, включая электрофорез белков (Van Bortel *et al.*, 1999), ДНК–ДНК гибридизацию (Cooper *et al.*, 2002), а также методы, основой которых служит полимеразная цепная реакция. Для поиска видоспецифичных признаков применяли микросателлитный анализ, анализ длин рестриционных фрагментов ДНК (RFLP), метод случайным образом амплифицированной ДНК (RAPD) (Goswami *et al.*, 2005; Храброва и др., 2006). В основе большинства подходов лежит изучение изменчивости в специфичных ядерных локусах, чаще всего мишенью исследований является рДНК (Kent *et al.*, 2004; Smith, Fonseca, 2004; Kampen, 2005; Marrelli *et al.*, 2005). Показано, что митохондриальный ген субъединицы I цитохромоксидазы *c* (COI) может служить стандартным участком ДНК для целей биоидентификации (Hebert *et al.*, 2003a, b). Идентификация образцов по последовательности стандартного участка гена COI называется ДНК-штрихкодированием, или баркодингом (англ. barcoding).

Участок гена COI представлен сотнями копий на клетку, обычно лишен вставок/делений и по сравнению с другими белок-кодирующими генами трети нуклеотидные позиции этого гена характеризуются высокой частотой нуклеотидных замен. Изменения аминокислотных последовательностей в этом гене происходят медленнее, чем в любом другом митохондриальном гене, что увеличивает разрешающую способность таксономического анализа и облегчает создание праймеров. В последнее время увеличилось количество работ по популяционной генетике и систематике, использующих митохондриальную ДНК (в частности, ген субъединицы I цитохромоксидазы *c*) в качестве маркера (Cywinska *et al.*, 2006; Полуконова и др., 2009; Бачевская, Переверзева, 2010; Воронова и др., 2011; Удалов, Беньковская, 2011; Laboudi *et al.*, 2011; Gibson *et al.*, 2012).

В настоящем исследовании анализировалась возможность использования нуклеотидных последовательностей участка гена COI для

идентификации видов комаров родов *Aedes* и *Ochlerotatus* из популяций Томской и Кемеровской областей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для настоящей работы служили личинки комаров IV возраста родов *Aedes* и *Ochlerotatus*, собранные на территории Томской и Кемеровской области (табл. 1).

Сбор личинок проводили по стандартной методике (Гуцевич и др., 1970). Личинки фиксировались в 96 %-м этаноле. Морфологическая идентификация личинок проводилась с использованием стереомикроскопов МБС-12 (Россия), Olympus SZX9 (Япония) по определителям (Гуцевич и др., 1970; Гуцевич, Дубицкий, 1981).

Выделение ДНК проводили с использованием набора Invisorb® Spin DNA Extraction Kit (Invitek, Германия) по методике, прилагаемой к набору. Для амплификации 5'-части митохондриального гена субъединицы I цитохромоксидазы *c* использовали стандартные праймеры: LCO1490 (5'-GGTCAACAATCATAAAGATA TTGG-3') и HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGT-GACCAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994). Реакционная смесь содержала однократный ПЦР-буфер (60 mM Tris – HCl, 25 mM KCl, 10 mM 2 – меркаптоэтанол, 0,1 %-й Тритон X – 100), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ каждого dNTP, 1 единицу активности Taq ДНК-полимеразы

**Таблица 1**  
Места сбора комаров

Место сбора	Географические координаты
Томская область	
г. Томск	56°30'00" N, 84°58'00" E
с. Чаинск	57°56'00" N, 82°35'00" E
с. Тахтамышево	56°23'00" N, 84°52'00" E
с. Тимирязевское	56°29'32" N, 84°54'13" E
с. Михайловка	57°16'27" N, 85°47'03" E
с. Коларово	56°21'00" N, 84°56'00" E
Кемеровская область	
г. Гурьевск	54°17'00" N, 85°56'00" E
д. Дмитриевка	54°28'10" N, 85°19'42" E
пос. Белогорск	55°01'04" N, 88°29'23" E
д. Алаево	56°09'08" N, 84°54'00" E

(«СибЭнзим», г. Новосибирск), по 5 пмоль праймеров LCO1490 и HCO2198, 20 нг геномной ДНК и деионизованную воду до объема 15 мкл. Амплификацию проводили в программируемом термоциклере Bio-Rad® S1000™ Thermal Cycler (США). Условия амплификации: первичная денатурация ДНК – 3 мин при 95 °С, затем 35 циклов, включающих три этапа: 1 мин при 94 °С, 1 мин при 55 °С, 1,5 мин при 72 °С; финальная достройка цепей – 7 мин при 72 °С.

Нуклеотидные последовательности участка гена COI определяли для 1–6 особей каждого вида комаров в прямом и обратном направлении. Секвенирование проводили на приборе 3130 Genetic Analyzer с использованием BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Всего были получены нуклеотидные последовательности протяженностью 538 п.н. для 68 образцов (15 видов комаров рода *Aedes* и рода *Ochlerotatus*, собранных на территории Томской и Кемеровской областей). В анализ также были включены 57 последовательностей 14 видов рода *Aedes* и рода *Ochlerotatus* из базы данных ДНК (GenBank). Каждый вид суммарно был представлен 1–23 последовательностями мтДНК (табл. 2).

Для редактирования нуклеотидных последовательностей применяли программу Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems, США) и SeqMan™ II (DNASTAR Inc). Выравнивание последовательностей проводили с помощью программы ClustalW (Higgins *et al.*, 1996). Для построения схем филогенетических связей использовались пакеты программ NETWORK 4.6.0.0. и MEGA5 (Bandelt *et al.*, 1999; Tamura *et al.*, 2011).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе морфологических признаков личинок комаров было определено 12 видов рода *Ochlerotatus* и 3 вида рода *Aedes* (табл. 2). Для 8 представителей рода *Ochlerotatus* было выявлено перекрывание видоспецифичных признаков *Och. cantans* и *Och. annulipes*, и поэтому для них было введено обозначение *Och. cantans/annulipes*. Эти особи были поделены на 4 «морфологические группы»: 1) личинки с морфологическими признаками *Och. cantans* – жабры одной длины с седлом или длиннее; стиг-

Таблица 2

Образцы нуклеотидных последовательностей видов комаров родов *Aedes* и *Ochlerotatus*

Вид	Образцы ДНК	n
<i>Och. excrucians</i> Walker, 1856	T	12
	GB	11
<i>Och. cantans / annulipes</i> Meigen, 1818 / Meigen, 1830	T	8
	GB	1
<i>Och. cantans</i>	GB	1
<i>Och. annulipes</i>	GB	1
<i>Och. euedes</i> Howard, Dyar et Knab, 1913	T	5
	GB	4
<i>Och. behningi</i> Martini, 1926	T	5
<i>Och. cyprius</i> Ludlow, 1920	K	2
<i>Och. riparius</i> Dyar et Knab, 1907	GB	3
<i>Och. cataphylla</i> Dyar, 1916	T	2
	GB	3
<i>Och. pullatus</i> Coquilett, 1904	GB	4
<i>Och. pionips</i> Dyar, 1919	K	2
<i>Och. caspius</i> Pallas, 1771	T	1
	GB	3
<i>Och. dorsalis</i> Meigen, 1830	T	3
	GB	8
<i>Och. intrudens</i> Dyar, 1919	T	5
	GB	2
<i>Och. diantaeus</i> Howard, Dyar et Knab, 1917	T	6
	GB	2
<i>Och. communis</i> De Geer, 1776	T	4
	GB	7
<i>Och. punctor</i> Kirby, 1837	T	7
<i>Ae. vexans</i> Meigen, 1830	T	5
	GB	4
<i>Ae. cinereus</i> Meigen, 1818	GB	4
<i>Ae. rossicus</i> Dolbeshkin, Gorickaja et Mitrofanova, 1930	T	1
Всего		125

Примечание. Т – Томская область; К – Кемеровская область; GB – GenBank.

мальная пластинка с характерным по строению задним отростком рычага: между основаниями направленных назад боковых ветвей имеется в различной степени развитая срединная ветвь в форме продолговатого листка (чаще слаборазвитая); передний клапан сильнее развит в длину, чем у других видов (рис. 1, а, б); 2) личинки с морфологическими признаками *Och. annulipes* –

жабры немного короче седла, стигмальная пластинка с двухраздельным задним отростком рычага обычного для рода строения (рис. 1, б, г); 3) личинки, совмещающие черты обоих видов, – жабры немного короче седла, стигмальная пластинка характерного для *Och. cantans* строения (рис. 1, б, в); 4) особи с длинными жабрами и стигмальной пластинкой обычного для рода строения (рис. 1, а, г). Сравнение нуклеотидных последовательностей исследуемого региона мтДНК показало отсутствие связи между «морфогруппой» и вариантом последовательности мтДНК.

Таким образом, для выделяемых нами образцов *Och. cantans/annulipes* наблюдается несоответствие морфологических и генетических критериев идентичности.

Для оценки генетической дивергенции применяли двухпараметрическую модель Кимуры

(K2P). Внутривидовые различия составили в среднем 0,6 % (0–1,6 %), что превышает соответствующие средние значения для мотыльков и птиц – 0,3 % (Hebert *et al.*, 2003а, 2004) и комаров из КНР – 0,4 % (Wang *et al.*, 2012) и сопоставимы с результатами, полученными для канадских комаров – 0,6 % (Cywinska *et al.*, 2006). Различия между видами в пределах одного рода в среднем составили 7,8 % (0,8–13,1 %), между видами разных родов – 14,3 % (9,7–17,6 %). Для четырех пар видов (3,7 % от общего числа попарных сравнений видов в пределах одного рода) выявленные различия оказались меньше 2 %: *Och. excrucians* и *Och. cantans / annulipes* (0,8 %), *Och. pullatus* и *Och. pionips* (1,1 %), *Och. caspius* и *Och. dorsalis* (1,6 %), *Och. intrudens* и *Och. diantaeus* (0,9 %). В то же время наблюдается значительная внутривидовая изменчивость у *Och. euedes* и *Ae. vexans* (1,6 и

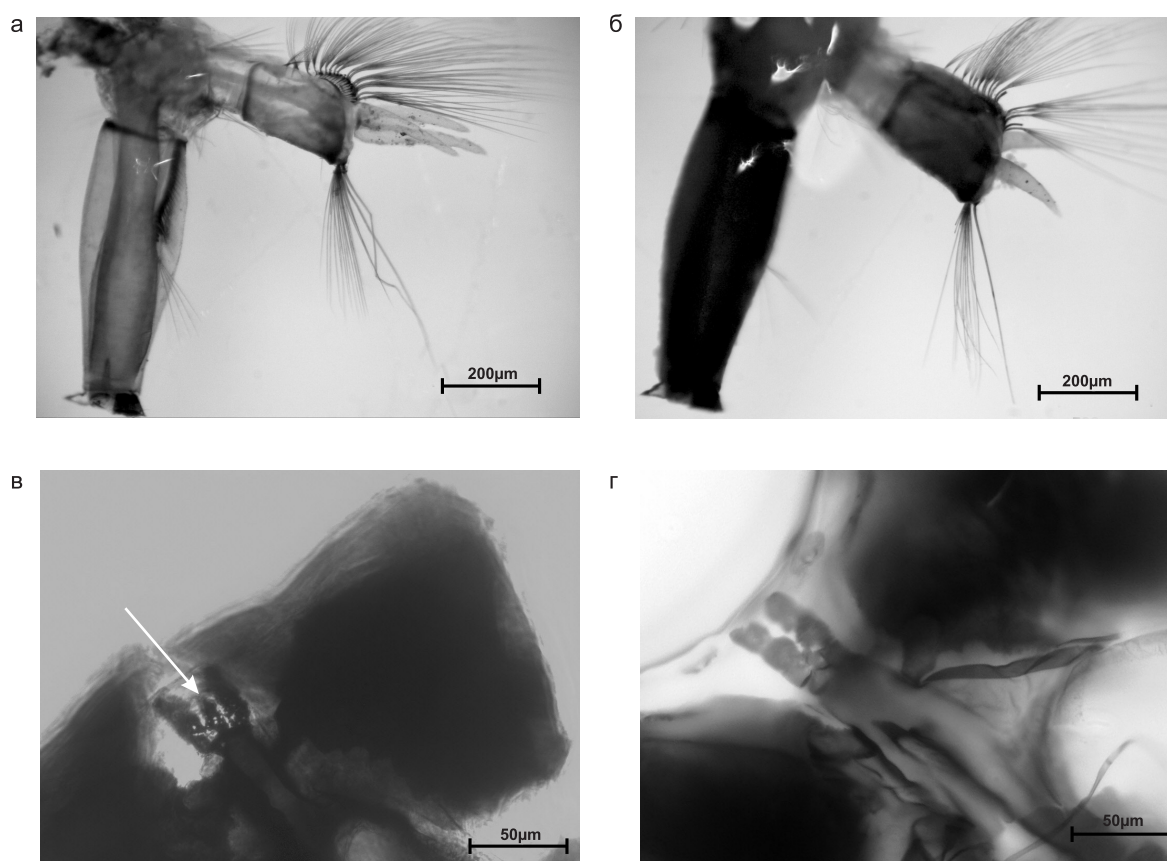


Рис. 1. Хвостовая часть личинки IV возраста и задний отросток рычага стигмальной пластинки.

а – жабры равны длине седла или длиннее; б – жабры короче седла; в – двухраздельный задний отросток рычага со срединной ветвью в форме продолговатого листка между основаниями направленных назад боковых ветвей (лепесток обозначен стрелкой); г – двухраздельный задний отросток рычага обычного для рода строения.

1,4 % соответственно), однако эти значения не превышают пороговые уровни, принятые для внутривидовой дивергенции.

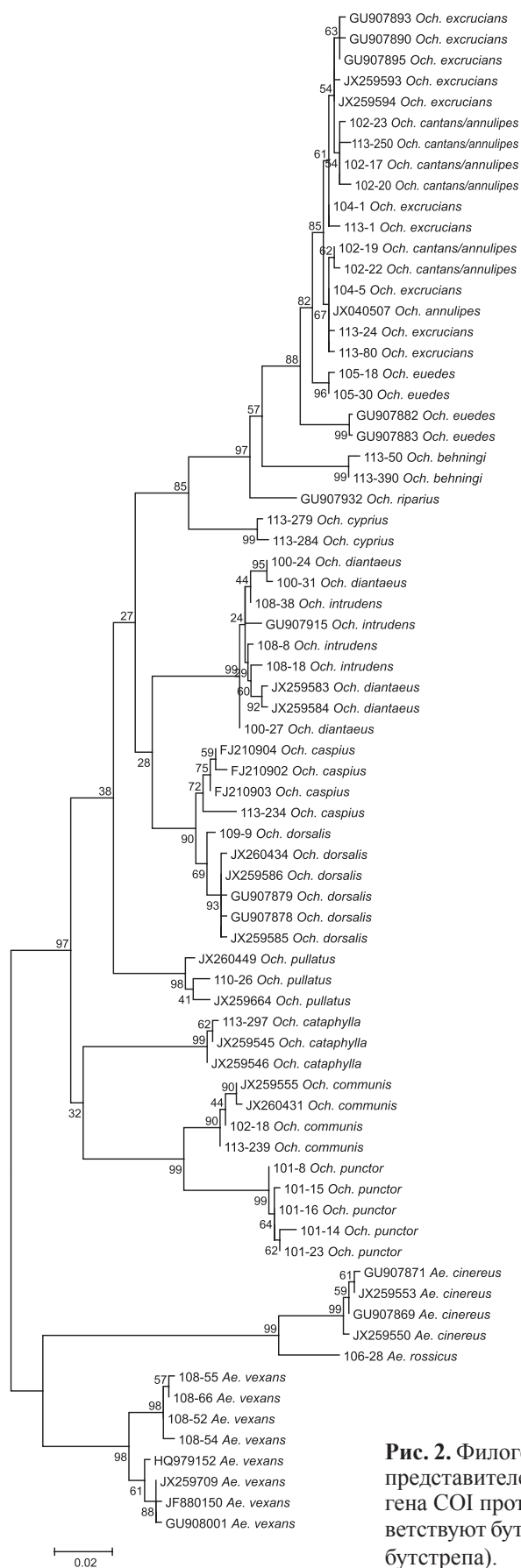
В связи с тем, что многие изученные нами нуклеотидные последовательности участка гена COI особей одного вида являются идентичными, для построения филогенетического дерева из набора одинаковых последовательностей, относящихся к одному виду, оставляли только одну последовательность. Последовательность из базы данных, относящаяся к виду *Och. cantans*, не полностью перекрывается с другими, поэтому мы исключили ее из построения филогенетического дерева, но включили в построение медианной сети (рис. 4.) Филогенетическое дерево изученных представителей родов *Aedes* и *Ochlerotatus* приведено на рис. 2. Большинство особей одного вида группируются вместе, независимо от источника последовательностей. Явное разделение кластеров наблюдается в пределах двух видов – *Och. euedes* и *Ae. vexans*. Нуклеотидные последовательности особей *Och. euedes*, полученные в ходе наших исследований, и нуклеотидные последовательности, взятые из GenBank, распределяются по разным кластерам. То же характерно и для особей вида *Ae. vexans*.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективная ДНК-система видовой идентификации должна соответствовать трем основным условиям: 1) возможность получения из любого организма участка ДНК, выбранного в качестве маркерного; 2) простота анализа данных секвенирования; 3) информативность маркерной последовательности должна быть достаточной для видовой идентификации (Cuwinska *et al.*, 2006). В то же время наши исследования показали, что эти условия не выполняются в полной мере для участка митохондриального гена COI, который принят в качестве стандартного для системы штрихкодирования. Согласно нашим данным, нижняя граница межвидовых различий не соответствует пороговым значениям. В системе штрихкодирования порогом внутри- и межвидовых различий служит уровень дивергенции 2 %. Однако 4 пары видов (*Och. excrucians* и *Och. cantans/annulipes*, *Och. pullatus* и *Och. pionips*,

*Och. caspius* и *Och. dorsalis*, *Och. diantaeus* и *Och. intrudens*) невозможно дискриминировать с помощью баркодинга. В этих случаях виды имеют очень близкие или перекрывающиеся выявленные наборы вариантов фрагмента гена COI (рис. 2–4). Усредненные внутри этих пар видов значения меры генетического расстояния K2P имели значения от 0,7 до 1,6 %. В этих группах видов размах внутривидовой изменчивости оказывался сравнимым или же превышал среднее значение межвидовой дифференциации. В паре видов *Och. diantaeus/Och. intrudens* особей разных видов, но с идентичными вариантами мтДНК нами не выявлено, в то же время наборы замен, характерных для этих видов, настолько плотно перекрываются, что можно прогнозировать выявление особей с одинаковой последовательностью ДНК, используемой для баркодинга, но относящихся к разным видам. Аналогичная ситуация прослеживается для группы образцов *Och. excrucians*, *Och. cantans*, *Och. annulipes* и *Och. cantans/annulipes* (рис. 4). Группы образцов *Och. excrucians* и *Och. cantans/annulipes* «пересекаются» на медианной сети. Примечательно, что образец *Och. annulipes* оказался идентичным одному из образцов *Och. excrucians*. Подобная картина перекрывания изменчивости по мтДНК была отмечена ранее для групп видов-двойников рода *Anopheles* (Thelwell *et al.*, 2000; Michel *et al.*, 2005). Невозможность разделения с помощью анализа последовательности COI показана для пары близкородственных индийских видов рода *Ochlerotatus* – *Och. portonovoensis* и *Och. wardi* (Kumar *et al.*, 2007). Таким образом, отсутствие дифференциации по COI для изученных нами групп близких видов *Ochlerotatus* является интересным, но не уникальным результатом. В то же время в отличие от групп видов-двойников *Anopheles* морфологический критерий, как правило, эффективен для разделения видов *Ochlerotatus* неразличимых с помощью баркодинга.

Несмотря на то что для ряда видов *Ochlerotatus* характерны близкие или перекрывающиеся наборы вариантов фрагмента гена COI, морфологические критерии для определения этих видов на личиночной стадии являются надежными. Так, личинки *Och. excrucians* очень хорошо отличаются от других исследованных нами видов строением стигмальной пластинки – расстояние между вершинами задних клапанов

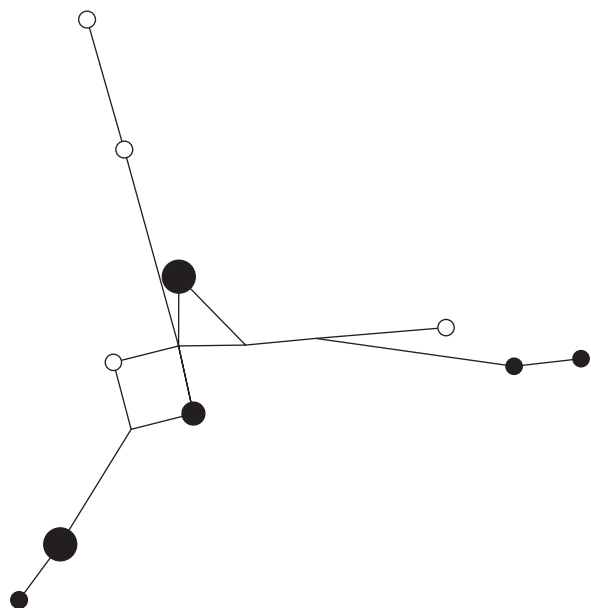


**Рис. 2.** Филогенетическое дерево максимального правдоподобия для представителей родов *Aedes* и *Ochlerotatus*, построенное по участку гена COI протяженностью 538 п.н. Числа в основаниях ветвей соответствуют бутстреп-оценкам в процентах (проведено 1000 итеграций бутстрепа).

значительно превышает продольный диаметр пластинки; на вершинах задних клапанов имеются крючковидно изогнутые и утолщенные волоски. *Och. pullatus* и *Och. pionips* различаются длиной и толщиной антенн головы. У *Och. caspius* сифональный пучок состоит из 5–10 ветвей и лежит за серединой дыхательной трубки, тогда как у *Och. dorsalis* пучок из 3–5 (редко больше) ветвей и располагается у середины дыхательной трубки. *Och. diantaeus* можно легко отличить от других видов невооруженным глазом – длина его усиков превышает длину головы.

В ходе работы нами выявлена явная дивергенция между последовательностями ДНК по гену COI *Och. euedes*, полученными от особей, собранных нами в Томской области, с одной стороны, и последовательностями ДНК *Och. euedes* США и Канады (взятыми из GenBank). Аналогичная картина прослеживается и для вида *Ae. vexans*. Возможными причинами расхождения групп изучаемых последовательностей могут служить либо ошибочная идентификация, либо существование истинной дивергенции внутри этих видов, т. е. наличие подвидов или видов-сиблингов. В Сибири отмечено присутствие обоих подвидов *Ae. vexans* – *Ae. v. vexans* и *Ae. v. nipponii*, которые отличаются по морфологическим признакам имаго, тогда как личинки их неразличимы (Гуцевич и др., 1970). В то же время для форм *Ae. v. vexans* и *Ae. v. nipponii* выявлена идентичность штрихкодов (Cywinska et al., 2006). Для выяснения истинной причины внутривидовой изменчивости *Ae. vexans* необходимо проведение дополнительных исследований с использованием морфологического анализа имаго. Что касается *Och. euedes*, то личинки этого вида, обитающие в Томской области, обладают характерными морфологическими чертами и без труда определяются.

Также следует отметить, что вид *Ae. rossicus* по участку гена COI значительно отличается от вида *Ae. cinereus* (GenBank) (4,6%); *Ae. rossicus* был впервые описан в 1930 г. в качестве само-



**Рис. 3.** Медианная сеть по участку гена COI образцов видов *Och. intrudens* (белый) и *Och. diantaeus* (черный). Размер кружков пропорционален числу образцов с соответствующей последовательностью ДНК.

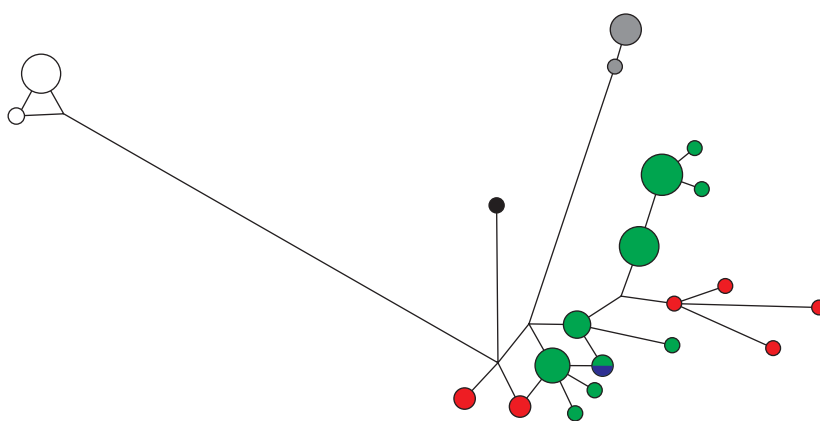
стоятельного вида (Долбешкин и др., 1930). Позже некоторые отечественные авторы рассматривали *Ae. rossicus* как подвид *Ae. cinereus* (Гуцевич и др., 1970; Гуцевич, Дубицкий, 1981). Если в основном томе «Каталога комаров мира» (Knight, Stone, 1977) *Ae. rossicus* рассматривался в качестве вида, то во втором приложении к «Каталогу комаров мира» (Ward, 1984) его статус

был понижен до подвидового. Р.М. Горностаева приходит к выводу о том, что *Ae. rossicus* – самостоятельный вид (Горностаева, 2000, 2005; Gornostaeva, 2003, 2004). Результаты нашего исследования являются дополнительным подтверждением видового статуса *Ae. rossicus*.

В дальнейшем особое внимание следует уделить вопросу видовой идентификации и дивергенции *Och. cantans* и *Och. annulipes*, так как на данном этапе исследований как морфологический, так и молекулярно-генетический анализы свидетельствуют о возможности гибридизации или существовании переходных форм.

В ряде случаев точная видовая идентификация комаров оказывается затруднительной, так как для некоторых видов четкие диагностические признаки выявлены либо только для личиночной, либо только для имагинальной стадий развития. Это обуславливает необходимость включения имаго видов *Ochlerotatus* в комплекс дальнейших морфологических и молекулярно-генетических исследований.

Хотя метод ДНК-штрихкодирования в последнее время и получил широкое распространение, однако его использование для целей видовой диагностики комаров не является абсолютно надежным. Нами показано, что для ряда видов, хорошо различимых по морфологии, тем не менее, межвидовые различия по участку гена COI могут (1) не соответствовать пороговым значениям, принятым в системе



**Рис. 4.** Медианная сеть по последовательности ДНК фрагмента гена COI некоторых видов рода *Ochlerotatus*. Размер кружков пропорционален числу образцов с соответствующим вариантом последовательности ДНК.

Обозначения: серый цвет – *Och. euedes*, собранные нами в Томской и Кемеровской областях; белый – последовательности *Och. euedes*, представленные в базе данных и собранные в Северной Америке; черный – *Och. cantans*; зеленый – *Och. excrucians*; синий – *Och. annulipes*; красный – ДНК образцов, промежуточных по морфологии между *Och. cantans* и *Och. annulipes*.



штрихкодирования, или (2) даже в ряде случаев наблюдаются «перекрывания» спектра изменчивости у близких видов. Следовательно, интерпретацию результатов ДНК-штрихкодирования необходимо проводить с осторожностью, учитывая и сопоставляя данные молекулярной генетики и морфологии.

Авторы выражают искреннюю признательность А.В. Симаковой и А.Т. Колесникову за помощь в сборе материала. Авторы благодарны И.К. Захарову за ценные замечания, сделанные при подготовке рукописи статьи.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (№ 12-04-90826-МОЛ\_РФ\_НР; № 12-04-31964-МОЛ\_А), гранта Министерства образования РФ (№ 4.5612.2011) и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» № 30.30.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Бачевская Л.Т., Переверзева В.В. Внутривидовой полиморфизм фрагмента гена цитохрома b митохондриальной ДНК кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum) из рек восточной Камчатки и северного побережья Охотского моря // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 3. С. 537–545.
- Воронова Н.В., Курченко В.П., Буга С.В. Подбор молекулярно-генетических маркеров для видовой диагностики тлей и построения филогенетических систем // Тр. Белорус. гос. ун-та. Сер. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. 2011. Т. 6. Ч. 1. С. 181–192.
- Горностаева Р.М. Список комаров (сем. Culicidae) европейской части России // Паразитология. 2000. Т. 34. Вып. 5. С. 428–434.
- Горностаева Р.М. К ревизии комаров подрода *Aedes* (Diptera: Culicidae) Палеарктики // Паразитология. 2005. Т. 39. Вып. 6. С. 457–507.
- Гуцевич А.В., Дубицкий А.М. Новые виды комаров фауны Советского Союза // Паразитол. Сб. 1981. Т. 30. С. 97–165.
- Гуцевич А.И., Мончадский А.С., Штакельберг А.А. Комары семейства Culicidae // Фауна СССР. Насекомые двукрылые. Л.: Наука, 1970. Т. 3. Вып. 4. 384 с.
- Долбешкин Б.И., Горицкая В.В., Митрофанова Ю.Г. Описание нового вида рода *Aedes* (in sp.) из Восточной Европы // Паразитол. Сб. Зоол. музея АН СССР. 1930. Т. 1. С. 253–260.
- Полуконова Н.В., Дёмин А.Г., Мюге Н.С., Шайкевич Е.В. Сравнение *Chironomus usenicus* и *Ch. curabilis* с видами группы *plumosus* (Diptera) по гену митохондриальной ДНК COI и рисунку дисков политенных хромосом // Генетика. 2009. Т. 45. № 8. С. 1029–1035.
- Удалов М.Б., Беньковская Г.В. Популяционная генетика колорадского жука: от генотипа до фенотипа // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2011. Т. 15. № 1. С. 156–172.
- Храброва Н.В., Сибатаев А.К., Стегний В.Н. Молекулярно-генетические маркеры для идентификации представителей комплекса *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) // Матер. I Всерос. совещ. по кровососущим насекомым. СПб.: ЗИН РАН, 2006. С. 211–213.
- 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.
- Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. No. 1. P. 37–48.
- 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 Papua New Guinea // Insect Mol. Biol. 2001. V. 10. No. 5. P. 407–413.
- Cooper R.D., Waterson D.G.E., Frances S.P. et al. Speciation and distribution of the members of the *Anopheles punctulatus* (Diptera: Culicidae) group in Papua New Guinea // J. Med. Entomol. 2002. V. 39. P. 16–27.
- Cywinska A., Hunter F.F., Hebert P.D.N. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes // Med. Vet. Entomol. 2006. V. 20. P. 413–424.
- Edwards F.W. Genera Insectorum. Diptera, Family Culicidae. Fascicle 194. Brussels: Desmet-Verteneuil, 1932.
- Folmer M., Black W., Hoeh R. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Mol. Marine Biol. Biotechnol. 1994. V. 3. No. 5. P. 294–299.
- Gibson C.M., Kao R.H., Blevins K.K., Travers P.D. Integrative taxonomy for continental-scale terrestrial insect observations // PLoS ONE. 2012. V. 7. No. 5. e37528. doi:10.1371/journal.pone.0037528.
- Gornostaeva R.M. The status taxa of subgenus *Aedes* (Diptera: Culicidae: *Aedes*): *Ae. cinereus* Meigen, 1818, *Ae. esoensis* Yamada, 1921, *Ae. rossicus* Dolbeshkin, Gorickaja, and Mitrofanova, 1930, *Ae. geminus* Peus, 1970. I. Overview // Eur. Mosq. Bull. 2003. No. 15. P. 22–26.
- Gornostaeva R.M. The status taxa of subgenus *Aedes* (Diptera: Culicidae: *Aedes*): *Ae. cinereus* Meigen, 1818, *Ae. esoensis* Yamada, 1921, *Ae. rossicus* Dolbeshkin, Gorickaja, and Mitrofanova, 1930, *Ae. geminus* Peus, 1970. II. Illustrations // Eur. Mosq. Bull. 2004. No. 18. P. 20–30.
- Goswami G., Raghavendra K., Nanda N. et al. PCR-RFLP of mitochondrial cytochrome oxidase subunit II and ITS2 of ribosomal DNA: markers for the identification of members of the *Anopheles culicifacies* complex (Diptera: Culicidae) // Acta Tropica. 2005. V. 95. P. 92–99.
- Harbach R.E., Kitching I.J. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera) // Syst. Entomol. 1998. V. 23. P. 327–370.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S., deWaard J.R. Biological identifications through DNA barcodes // Proc. Roy. Soc. Lond. 2003a. Series B. V. 270. P. 313–321.
- Hebert P.D.N., Ratnasingham S., deWaard J.R. Barcoding animal life: CO1 divergences among closely allied spe-

- cies // Proc. Roy. Soc. Lond. 2003b. Series B. V. 270. P. 596–599.
- Hebert P.D.N., Stoeckle M.Y., Zemplak T.S., Francis C.M. Identification of birds through DNA barcodes // Public Library Sci. Biol. 2004. V. 2. P. 1657–1663.
- Higgins D.G., Thompson J.D., Gibson T.J. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments // Methods Enzymol. 1996. V. 266. P. 383–402.
- Kampen H. Integration of *Anopheles beklemishevi* (Diptera: Culicidae) in a PCR assay diagnostic for palaeartic *Anopheles maculipennis* sibling species // Parasitol. Res. 2005. V. 97. P. 113–117.
- Kent R.J., West A.J., Norris D.E. Molecular differentiation of colonized human malaria vectors by 28S ribosomal DNA polymorphism // Amer. J. of Tropical Medicine and Hygiene. 2004. V. 71. P. 514–517.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // J. Mol. Evol. 1980. V. 16. P. 111–120.
- Knight K.L., Stone A. A catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae). 2nd ed. The Thomas Say Foundation. 1977. V. 6. P. 70–72.
- Krzywinski J., Besansky N.J. Molecular systematics of *Anopheles*: from subgenera to subpopulations // Annu. Rev. Entomol. 2003. V. 48. P. 111–139.
- Kumar N.P., Rajavel A. R., Natarajan R., Jambulingam P. // J. Med. Entomol. 2007. V. 44(1). P. 1–7.
- Laboudi M., Faraj Ch., Sadak A. DNA barcodes confirm the presence of a single member of the *Anopheles maculipennis* group in Morocco and Algeria: *An. sicaultiis* conspecific with *An. labranchiae* // Acta Tropica. 2011. V. 118. P. 6–13.
- Marrelli M.T., Floeter-Winter L.M., Malafronte R.S. et al. Amazonian malaria vector anopheline relationships interpreted from ITS2 rDNA sequences // Med. Vet. Entomol. 2005. V. 19. P. 208–218.
- 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.
- Smith J.L., Fonseca D.M. Rapid assays for identification of members of the *Culex (Culex) pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae) // Am. J. Tropical Med. Hygiene. 2004. V. 70. P. 339–345.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. No. 10. P. 2731–2739.
- Thelwell N.J., Huisman R.A., Harbach R.E. et al. Evidence for mitochondrial introgression between *Anopheles bwambae* and *Anopheles gambiae* // Insect Mol. Biol. 2000. V. 9. No. 2. P. 203–210.
- Van Bortel W., Trung H.D., Manh N.D. et al. Identification of two species within the *Anopheles minimus* complex in northern Vietnam and their behavioural divergences // Tropical Med. Intern. Health. 1999. V. 4. P. 257–265.
- Wang G., Li C., Guo X. et al. Identifying the main mosquito species in China based on DNA barcoding // PLoS ONE. 2012. V. 7. No. 10. e47051. doi:10.1371/journal.pone.0047051
- Ward R.A. Second supplement to a catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae) // Mosq. Syst. 1984. V. 16. No. 3. 233 p.
- Zavortink T.J. Classical taxonomy of mosquitoes – a memorial to John N. Belkin // J. Am. Mosquito Control Assoc. 1990. V. 6. P. 593–599.

## VARIABILITY OF MITOCHONDRIAL CYTOCHROME OXYDASE SUBUNIT I GENE SEQUENCE IN SPECIES OF THE GENERA *Aedes* AND *Ochlerotatus* (DIPTERA: CULICIDAE)

N.V. Khrabrova<sup>1</sup>, Yu.V. Andreeva<sup>1</sup>, O.V. Vaulin<sup>2</sup>, S.S. Alekseeva<sup>1</sup>, A.K. Sibataev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Biology and Biophysics, Tomsk State University, Tomsk, Russia, e-mail: khrabrova@yandex.ru;

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

### Summary

Sequence variation in the 538-bp fragment from the 5' end of the COI region was analyzed to test its usefulness in the identification of 15 mosquito species of the genera *Aedes* and *Ochlerotatus* (Diptera: Culicidae) from Tomsk and Kemerovo regions and 14 species from GenBank. The divergences between congeneric species averaged 7,8 % (from 0,7 to 13,1 %), whereas those for conspecific individuals averaged 0,57 % (0 to 1,6 %). The sequences for four species pairs (3,7 %) showed < 2 % divergence. In most cases, individuals of a single species grouped closely together, but deeper divergences were detected in two species (*Och. euedes* and *Ae. vexans*).

**Key words:** *Aedes*, *Ochlerotatus*, COI, barcoding, phylogeny, divergence.

УДК 575.113:591.463.2:611.013.12:575.22.5:599.323.4

## СПЕРМАТОГЕННАЯ ФУНКЦИЯ У МЫШЕЙ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ BALB/cLac, DD/He И ИХ F<sub>1</sub> РЕЦИПРОКНЫХ КРОССОВ

© 2013 г. М.А. Клещев, А.В. Осадчук, Л.В. Осадчук

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: losadch@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 6 июля 2012 г. Принята к публикации 17 сентября 2012 г.

Ранее было установлено, что инбредная линия мышей DD/He по сравнению с другими 13 исследованными в этом отношении линиями обладает наиболее низкой долей подвижных и морфологически аномальных сперматозоидов. Линия BALB/cLac, напротив, характеризуется самой высокой долей подвижных и аномальных сперматозоидов. Было сделано предположение, что сниженная доля подвижных сперматозоидов у мышей линии DD/He, а также высокая доля аномальных сперматозоидов у BALB/cLac обусловлены мутациями в генах Y-хромосомы. Для того чтобы проверить эту гипотезу, у самцов F<sub>1</sub> реципрокных кроссов DD/He × BALB/cLac и BALB/cLac × DD/He исследовали подвижность и морфологию сперматозоидов, а также количество сперматозоидов в каудальных эпидидимисах, массу тела и семенников. Установлены эффекты гетерозиса по всем изучаемым признакам, за исключением доли подвижных сперматозоидов. Выявлено влияние отцовских эффектов на долю атипичных сперматозоидов и массу семенников, что может указывать на участие генов (гена) Y-хромосомы в генетическом контроле этих признаков. Обнаружены материнские эффекты на долю подвижных сперматозоидов.

**Ключевые слова:** инбредные линии мышей, сперматогенез, реципрокные скрещивания.

### ВВЕДЕНИЕ

Сперматогенез представляет собой серию высокоспециализированных, строго регулируемых процессов, включающих митоз, мейоз и дифференцировку клеток-предшественников сперматозоидов. Этот процесс проходит в эпителии извитых семенных канальцев семенников. Развитие и поддержание сперматогенеза у взрослых особей зависят от функционирования клеток Сертоли семенника и контролируются гонадотропинами (ЛГ и ФСГ) и стероидными гормонами (тестостерон и эстрадиол). Сформированные сперматозоиды из семенных канальцев поступают в придаток семенника – эпидидимис, где они созревают и приобретают подвижность. Нормальное протекание процессов формирования сперматозоидов в семенниках и их созревания в эпидидимисе в конечном итоге формирует качество спермы –

совокупность признаков, определяющих ее оплодотворяющую способность. Основными показателями качества спермы считаются концентрация сперматозоидов в эякуляте, доля подвижных сперматозоидов и доля морфологически аномальных форм сперматозоидов (Kishikawa *et al.*, 1999; Guzick *et al.*, 2001).

В настоящее время механизмы генетического контроля сперматогенной функции изучаются главным образом с использованием нокаутных мышей, у которых блокирование функции определенного гена-кандидата приводит к резкому снижению количества и/или качества сперматозоидов и потере фертильности (Adham *et al.*, 2005; Verhoeven *et al.*, 2010). Такие животные являются моделями репродуктивных патологий и служат для выявления причин мужского бесплодия и способов его коррекции. Другой подход к изучению генетической и физиологической регуляции сперматогенеза связан с

использованием инбредных линий мышей. У лабораторных мышей показана существенная межлинейная изменчивость по показателям качества спермы, которая основана, по-видимому, на генах «мягкого» действия, фенотипическое проявление которых не препятствует процессу размножения. Очевидно, что с такими генами связан наблюдаемый в популяциях животных полиморфизм по репродуктивной функции (Осадчук, Науменко, 1983). Поэтому мыши инбредных линий могут служить удобной моделью для изучения генетических основ естественной изменчивости по сперматогенной функции, которой уделяется существенно меньше внимания по сравнению с исследованием генетически и фармакологически измененных животных – моделей репродуктивных патологий.

Ранее нами у 13 линий лабораторных мышей была выявлена существенная фенотипическая изменчивость по спермопродукции, доле подвижных сперматозоидов и доле морфологически аномальных головок сперматозоидов. Было установлено, что животные линии DD/He обладают наиболее низкой долей подвижных сперматозоидов по сравнению с другими 12 линиями. У самцов линии BALB/cLac показана самая высокая среди этих линий доля аномальных головок сперматозоидов при относительно высокой доле подвижных сперматозоидов (Осадчук и др., 2012). Наличие у этих двух линий указанных особенностей сперматогенной функции с сильным «негативным» эффектом на фертильность делает их интересной моделью для изучения генетических причин нарушения фертильности. Представляет интерес поиск генов, мутации в которых могли бы обусловить столь аномальные показатели качества сперматозоидов у животных линий BALB/cLac и DD/He. Сейчас известно уже более 200 генов, участвующих в формировании качества спермы (Zheng, Yang, 2010), но важнейшее значение имеют гены, лежащие на Y-хромосоме, которые контролируют развитие семенников, пролиферацию и дифференцировку клеток Сертоли и клеток-предшественников сперматозоидов (Delbridge, Graves, 1999). Мутации в этих генах имеют, как правило, сильное фенотипическое проявление и могут быть ассоциированы с существенным уменьшением продукции сперматозоидов или даже их отсутствием (Navarro-Costa *et al.*, 2010),

повышенным числом аномальных форм сперматозоидов (Krzanowska *et al.*, 1995; Styryna *et al.*, 2003) и сниженными показателями их подвижности. Можно предположить, что мутации генов, лежащих на Y-хромосоме, могут быть причиной сниженной подвижности сперматозоидов у линии DD/He, а также высокой доли морфологически аномальных сперматозоидов у BALB/cLac. Следует отметить, что у линии DD/He обнаружены две неконсервативные мутации гена *styu*, расположенные в функционально важном районе (I63T в домене HMGbox) белка UR-2. Ген *styu* Y-хромосомы участвует в формировании эмбриональных семенников и определении пола. Кроме того, этот ген экспрессируется у взрослых особей в мужских половых клетках и клетках Сертоли (Krzanowska *et al.*, 1995; Harley *et al.*, 2003; Kashimada, Koopman, 2010). Представляло интерес оценить влияние Y-хромосомы на сперматогенные показатели у мышей инбредных линий BALB/cLac и DD/He, контрастных по подвижности и морфологии сперматозоидов.

Было проведено реципрокное скрещивание мышей линий BALB/cLac и DD/He. У самцов инбредных линий и их реципрокных гибридов (F<sub>1</sub>) были оценены количество сперматозоидов в каудальных эпидидимисах, доля подвижных и морфологически аномальных сперматозоидов. Дополнительно как для реципрокных гибридов, так и для родительских инбредных линий анализировались масса тела и семенников.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Животные

Экспериментальные животные содержались в стандартных условиях вивария ИЦиГ СО РАН. Для эксперимента использовали самцов инбредных линий мышей BALB/cLac и DD/He. Реципрокных гибридов первого поколения получали путем скрещивания самок линии BALB/cLac с самцами линии DD/He (гибриды BALB × DD) и самок линии DD/He с самцами BALB/cLac (гибриды DD × BALB) в возрасте 2–3 месяцев. В возрасте 30 дней потомство отсаживали от матери, формируя однополые группы по 4–6 самцов. Животных содержали в стандартных пластиковых клетках размером

36 × 20 × 15 см при свободном доступе к воде и пище, фиксированном световом дне (12 ч света: 12 ч темноты) и температуре (+22 °С). Сперматогенные и морфометрические параметры оценивали у самцов в возрасте 90–95 дней. Для снятия эффектов группового содержания за пять дней до забоя самцов рассаживали в индивидуальные клетки поодиночке. Количество самцов каждого генотипа составляло от 25 до 34 (всего 115 особей).

### Показатели качества сперматозоидов

Самцов взвешивали, после декапитации выделяли и взвешивали оба семенника и каудальных эпидидимиса. Эпидидимисы немедленно помещали в 200 мкл среды F-12(HAM) : DMEM (в соотношении 1 : 1) с 3 %-й бычьей сывороткой, мелко измельчали, добавляли 800 мкл той же среды и встряхивали на шейкере в течение 10 мин. Полученную взвесь фильтровали через нейлоновые фильтры Falcon (диаметром сетки 70 мкм) в пластиковые пробирки. Долю подвижных сперматозоидов определяли с использованием анализатора фертильности спермы SFA-500-2 (НПФ «Биола», Москва). Количество сперматозоидов в аликвоте суспензии сперматозоидов, окрашенной 1 %-м раствором эозина, подсчитывали визуально в камере Горяева с использованием светового микроскопа при увеличении ×200. Результаты пересчитывали на 1 мл исходной суспензии, что соответствовало количеству сперматозоидов в обоих эпидидимисах.

Для подсчета аномальных головок сперматозоидов суспензию окрашенных 1 %-м раствором эозина сперматозоидов наносили на предметное стекло и делали мазок. Мазок фиксировали канадским бальзамом и покрывали покровным стеклом. Исследовали первые 300 сперматозоидов под световым микроскопом при увеличении ×400 по описанной методике (Даев, Дукельская, 2003).

### Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку данных проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), пакет компьютерных программ STATISTICA (версия 6.0).

Для сравнения групп в рамках дисперсионного анализа применяли тест множественного сравнения Дункана (Duncan's test). Данные в рисунках и таблице представлены как средняя арифметическая и ее ошибка (Mean ± SEM).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При сравнении самцов инбредных линий и их F<sub>1</sub> реципрокных кроссов установлена существенная генетическая изменчивость по массе тела ( $F_{3,119} = 67,323, p < 0,01$ ), семенников ( $F_{3,120} = 79,698, p < 0,01$ ), количеству сперматозоидов ( $F_{3,111} = 43,573, p < 0,01$ ), доле подвижных ( $F_{3,109} = 34,038, p < 0,01$ ) и аномальных сперматозоидов ( $F_{3,115} = 453,48, p < 0,01$ ).

Масса тела (табл.) у самцов двух реципрокных кроссов была достоверно ( $p < 0,01$ , Duncan's test) выше массы тела самцов родительских линий, при этом масса тела самцов BALB × DD была достоверно выше, чем масса тела самцов DD × BALB ( $p < 0,01$ , Duncan's test).

Масса семенников у самцов генотипа BALB × DD была достоверно выше, чем у самцов обеих инбредных линий и самцов генотипа DD × BALB ( $p < 0,01$ , Duncan's test). Масса семенников гибридов DD × BALB была достоверно выше, чем у животных линии BALB/Lac ( $p < 0,01$ , Duncan's test) и DD/He ( $p < 0,01$ , Duncan's test).

Количество сперматозоидов у самцов обоих реципрокных гибридов (рис., а) было достоверно выше, чем у самцов инбредных линий ( $p < 0,01$ , Duncan's test). При этом количество сперматозоидов у гибридов BALB × DD не отличалось от такового у гибридов BALB × DD.

### Таблица

Морфометрические показатели самцов мышей двух инбредных линий и их F<sub>1</sub> реципрокных кроссов

Генотип	Масса тела, г	Масса семенников, мг
BALB/cLac	25,03 ± 0,44	164,58 ± 3,37
DD/He	25,61 ± 0,37	206,19 ± 2,84
BALB × DD	31,73 ± 0,40	271,80 ± 8,34
DD × BALB	29,63 ± 0,32	229,59 ± 4,27

Примечание. Количество животных в группе варьировало от 25 до 32.

Доля подвижных сперматозоидов (рис., б) у самцов обоих реципрокных кроссов была достоверно ниже, чем у самцов линии BALB/cLac, но достоверно выше, чем у самцов линии DD/He ( $p < 0,01$ , Duncan's test). Доля подвижных сперматозоидов была достоверно выше у гибридов BALB  $\times$  DD, чем у гибридов DD  $\times$  BALB ( $p < 0,05$ , Duncan's test).

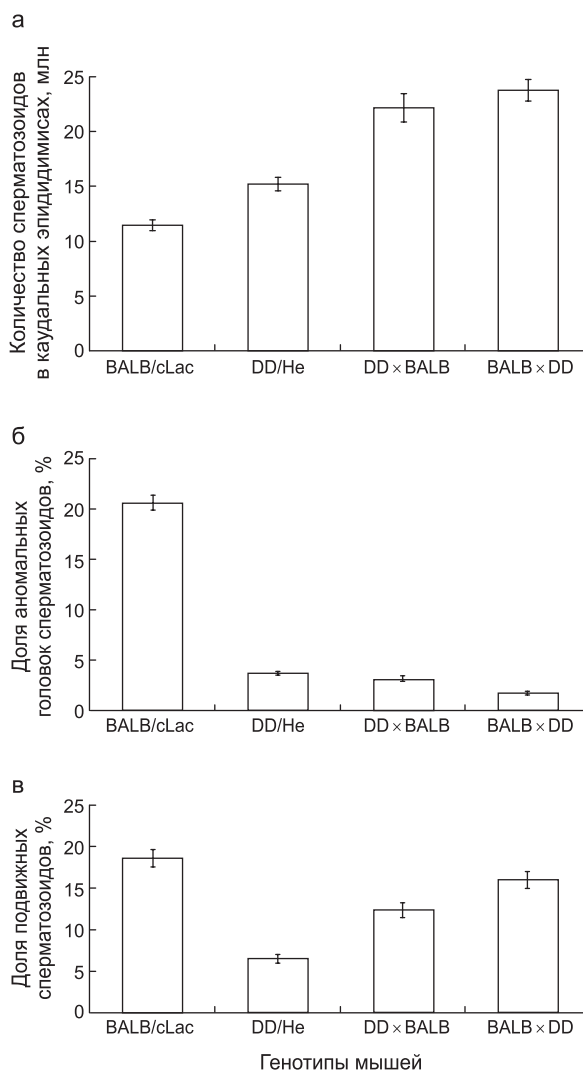
Доля аномальных головок сперматозоидов (рис., в) у самцов гибридов BALB  $\times$  DD была достоверно ниже, чем у самцов инбредных линий ( $p < 0,01$ , Duncan's test). Доля аномальных головок сперматозоидов у гибридов DD  $\times$  BALB не отличалась от таковой у самцов линий DD/He, но была достоверно ниже, чем у самцов линии BALB/cLac. Доля аномальных головок у самцов DD  $\times$  BALB была достоверно выше, чем у самцов BALB  $\times$  DD ( $p < 0,05$ , Duncan's test).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В результате настоящего исследования установлена существенная генетическая изменчивость у самцов лабораторных мышей по количеству сперматозоидов в каудальных эпидидимисах, доле подвижных и атипичных сперматозоидов, т. е. по ключевым показателям параметров сперматогенеза, определяющим их фертильность.

Доля аномальных головок сперматозоидов у самцов линии BALB/cLac была в 5 раз выше, чем у самцов линии DD/He, а доля подвижных сперматозоидов у самцов линии DD/He была почти в 3 раза ниже, чем у самцов линии BALB/cLac. Эти результаты соответствуют ранее полученным данным относительно особенностей сперматогенеза у животных линии BALB/cLac и DD/He (Kishikawa *et al.*, 1999; Осадчук и др., 2012).

Самцы реципрокных гибридов обладали большей массой тела и семенников по сравнению с самцами инбредных линий. Кроме того, количество сперматозоидов у животных обоих реципрокных кроссов было почти в два раза выше, чем у животных исходных инбредных линий. Реципрокные гибриды характеризовались меньшей долей аномальных головок сперматозоидов по сравнению с самцами родительских инбредных линий. Таким образом, самцы реципрокных гибридов характеризуются лучшим



**Рис.** Количество сперматозоидов в каудальном отделе эпидидимиса (а), доля аномальных головок сперматозоидов (б) и доля подвижных сперматозоидов (в) у самцов мышей инбредных линий DD/He и BALB/cLac и их F<sub>1</sub> реципрокных кроссов. Количество животных в группе варьировало от 25 до 32.

качеством спермы по сравнению с животными родительских инбредных линий. Уже давно известно, что при скрещивании животных или растений двух инбредных линий гибриды F<sub>1</sub> более жизнеспособны, имеют большую массу тела, быстрее растут, оставляют больше потомков по сравнению с родительскими линиями (эффект гетерозиса) (Chen, 2010; Hannon *et al.*, 2011). Результаты настоящего исследования показывают, что эффект гетерозиса может проявляться в отношении количества и качества сперматозоидов. Поскольку количество спер-

матозоидов является ключевым показателем, определяющим оплодотворяющую способность спермы (Guzick *et al.*, 2001), то можно предположить, что повышение спермопродукции у гибридов F<sub>1</sub> играет существенную роль в повышении их плодовитости.

Результаты исследования качества сперматозоидов у самцов F<sub>1</sub> реципрокных гибридов двух контрастных по подвижности сперматозоидов линий не подтвердили гипотезу об однозначной связи возможных мутаций генов, лежащих на Y-хромосоме, с низкой подвижностью сперматозоидов у самцов линии DD/He. По доле подвижных сперматозоидов реципрокные гибриды занимали промежуточное положение между линиями BALB/cLac и DD/He, что может свидетельствовать об аддитивных аутоматных эффектах на данный признак. Оказалось, что доля подвижных сперматозоидов у самцов F<sub>1</sub> – потомков матерей линии – BALB была существенно выше, чем у самцов – потомков матерей линии DD, что может говорить о вкладе генов (гена) X-хромосомы в формирование этого признака. Нельзя также исключить влияние других материнских факторов: цитоплазматической наследственности, пре- и постнатальных материнских эффектов.

Доля аномальных головок сперматозоидов у F<sub>1</sub> потомков отцов линии BALB/cLac была выше, чем у F<sub>1</sub> потомков отцов линии DD/He. Это позволяет сделать предположение о существенном влиянии отцовского генотипа (генов Y-хромосомы) на долю аномальных головок сперматозоидов. Влияние отцовского генотипа отмечено также и в отношении массы семенников. Масса семенников у самцов гибридов BALB × DD была достоверно выше, чем у самцов DD × BALB.

Полученные результаты позволяют предположить, что показатели сперматогенеза у реципрокных гибридов линий BALB/cLac и DD/He детерминируются большим числом генов, принадлежащих как отцовскому, так и материнскому генам. Отмечено существенное влияние отцовского генотипа на долю атипичных головок сперматозоидов и массу семенников, что позволяет предположить наличие генов (гена) на Y-хромосоме, контролирующих эти признаки. Обнаружены материнские эффекты на долю подвижных сперматозоидов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 09-04-00930).

## ЛИТЕРАТУРА

- Даев Е.В., Дукельская А.В. Индукция аномалий спермиевых головок у половозрелых самцов мышей линии СВА феромоном самок мышей 2,5-диметилпиразином // Генетика. 2003. Т. 39. № 7. С. 969–974.
- Осадчук А.В., Науменко Е.В. Генетико-эндокринные и этологические механизмы дифференциального размножения. Сообщение I. Сравнительно-генетический анализ базального уровня тестостерона в плазме крови, относительной массе семенников и придаточных половых желез у самцов лабораторных мышей // Генетика. 1983. Т. 19. № 8. С. 1265–1273.
- Осадчук Л.В., Тупикин А.Е., Морозов И.В. и др. Фенотипическая вариабельность сперматогенеза и поиск ассоциаций с генным полиморфизмом у мышей 13 инбредных линий // Генетика. 2012. Т. 48. № 7. С. 1–9.
- Adham I.M., Eck T.J., Mierau K. *et al.* Reduction of spermatogenesis but not fertility in Creb3l4-deficient mice // Mol. Cell. Biol. 2005. V. 25. P. 7657–7664.
- Chen J.C. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor // Trends Plant Sci. 2010. V. 15. P. 1–28.
- Delbridge M.L., Graves J.M. Mammalian Y chromosome evolution and the male-specific functions of Y chromosome-borne genes // Rev. Reprod. 1999. V. 4. P. 101–109.
- Hannon R.M., Meek H.T., Acosta W., Maciel R.C. Sex-specific heterosis in line crosses of mice selectively bred for high locomotor activity // Behav. Genet. 2011. V. 41. P. 615–624.
- Harley V.R., Clarkson M.J., Argentaro A. The molecular action and regulation of the testis-determining factors SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9] // Endocr. Rev. 2003. V. 24. P. 466–487.
- Guzick D., Overstreet J., Factor-Litvak P. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men // N. Engl. J. Med. 2001. V. 345. P. 1388.
- Zheng F., Yang P.J. Regulation of male fertility by X-linked genes // J. Androl. 2010. V. 31. P. 79–84.
- Kashimada K., Koopman P. Sry: the master switch in mammalian sex determination // Development. 2010. V. 137. P. 3921–3930.
- Kishikawa H., Tateno H., Yanagimachi R. Chromosome analysis of BALB/c mouse spermatozoa with normal and abnormal head morphology // Biol. Reprod. 1999. V. 61. P. 809–812.
- Krzanowska H., Styrna J., Wabik-Sliz B. Analysis of sperm quality in recombinant inbred mouse strains: correlation of sperm head shape with sperm abnormalities and with the incidence of supplementary spermatozoa in the perivitelline space // J. Reprod. Fertil. 1995. V. 104. P. 347–354.
- Navarro-Costa P., Gonzlves J., Plancha C.E. The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility // Hum. Reprod. Update. 2010. V. 16. P. 525–542.

Styrna J., Kilarski W., Krzanowska H. Influence of the CBA genetic background on spermmorphology and fertilization efficiency in mice with a partial Y chromosome deletion // *Reproduction*. 2003. V. 126. P. 579–588.

Verhoeven G., Willems A., Denolet E., Swinnen V. Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models // *Phil. Trans. R. Soc.* 2010. V. 365. P. 1537–1556.

## SPERMATOGENESIS INDICES IN INBRED STRAINS DD/HE AND BALB/cLac AND THEIR F<sub>1</sub> RECIPROCAL CROSSES

**M.A. Kleshchev, L.V. Osadchuk, A.V. Osadchuk**

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

### Summary

We have shown that among 13 inbred mice strains males the DD/He strain has the lowest proportion of mobile sperm and moderate sperm count and proportion of abnormal sperm heads. Males of the BALB/cLac strain have the highest proportion of mobile sperm and abnormal sperm heads, but a moderate sperm count. It is known that Y chromosome genes are important for spermatogenesis. Thus, Y chromosome mutations may be responsible for interstrain differences in spermatogenic parameters. Reciprocal cross can be a useful tool to examine the effect of the Y chromosome on sperm count and the proportions of mobile and morphologically abnormal sperm. The sperm count in DD/He males is higher than in BALB/cLac ones, but both crosses show equal values, exceeding those in the paternal strains. Males of cross BALB/cLac × DD/He have a higher proportion of mobile sperm than males of DD/He × BALB/cLac. The greatest proportion of abnormal sperm heads has been recorded in the BALB/cLac strain. The proportions of abnormal sperm heads in the hybrids were small but little different from each other.

**Key words:** inbred mice strains, spermatogenesis, reciprocal cross.



УДК 615.277.3:577.213:576.376:612.017.1

## ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ, ВОЗНИКАЮЩИЕ В ОРГАНИЗМЕ МЫШЕЙ, ОБРАБОТАННЫХ СОЧЕТАНИЕМ ЦИКЛОФОСФАНА И ЭКЗОГЕННОЙ ДНК

© 2013 г. **Е.В. Долгова<sup>1</sup>, В.П. Николин<sup>1</sup>, Н.А. Попова<sup>1</sup>, А.С. Проскурина<sup>1</sup>,  
К.Е. Орищенко<sup>1</sup>, Е.А. Алямкина<sup>1</sup>, Я.Р. Ефремов<sup>1</sup>, С.И. Байбородин<sup>1</sup>,  
Е.Р. Черных<sup>2</sup>, А.А. Останин<sup>2</sup>, С.С. Богачев<sup>1</sup>, Т.С. Гвоздева<sup>3</sup>, Е.М. Малкова<sup>4</sup>,  
О.С. Таранов<sup>4</sup>, В.А. Рогачев<sup>1</sup>, А.В. Панов<sup>5</sup>, С.Н. Загребельный<sup>6</sup>, М.А. Шурдов<sup>7</sup>**

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

<sup>2</sup> Институт клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, Россия;

<sup>3</sup> Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия;

<sup>4</sup> ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирск, Россия;

<sup>5</sup> WellsStar College of Health & Human Services, Kennesaw State University Kennesaw,  
Georgia, USA;

<sup>6</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,  
Новосибирск, Россия;

<sup>7</sup> ООО «Панаген», Горно-Алтайск, Россия

Поступила в редакцию 7 сентября 2012 г. Принята к публикации 4 октября 2012 г.

Синергичное действие цитостатика циклофосфана (ЦФ) и фрагментированной ДНК приводит к болезни и гибели экспериментальных мышей (Долгова и др., 2011–2013). Обнаруженный эффект «отсроченной смерти» наиболее ярко проявляется при введении ДНК в период 18–30 ч после инъекции ЦФ (промежуток времени, обозначенный как «окно смерти»).

В настоящем исследовании установлено, что обработка экзогенной ДНК приводит к непрерывному апоптозу клеток костного мозга (ККМ), протекающему в ходе всего времени введения препарата ДНК (18–30 ч). При этом экзогенная ДНК, как аллогенная, так и принадлежащая к различным таксономическим группам, приводит к апоптозу ККМ. Наиболее сильно апоптоз индуцирует ДНК плазмиды.

Анализ динамики гибели и восстановления популяций ККМ животных, находящихся в агонистической фазе развития заболевания, свидетельствует о том, что при общей нормализации количества гематопозитических прогениторных клеток (CD34+) к 15-му дню после инъекции ЦФ количество популяции ККМ размером 12–20 мкм до конца наблюдения (агонистическая фаза заболевания последней отвечающей мышкы) сохраняется на минимальной отметке (3–4 % против 35–40 % в контроле). При этом количество клеток указанной популяции ККМ соответствует времени максимальной лейкопении, индуцированной цитостатиком и наблюдающейся на 3–7-е сут. после инъекции ЦФ. Сравнительный анализ мазков ККМ обеих групп животных предполагает, что в популяции ККМ, выделенных из мышей группы ЦФ+ДНК, отсутствуют молодые формы клеток, формирующих лимфоцитарный росток крови. При этом в мазках периферической крови выявляются бластные формы незрелых предшественников.

Проведенное патоморфологическое исследование показывает, что в сроки эксперимента начиная с 9-х сут. и позднее у мышей, подвергавшихся воздействию ЦФ в сочетании с экзогенной ДНК, происходят выраженные изменения морфологии легких, печени, поджелудочной железы, органов иммунокомпетентной системы и головного мозга. Характер выявленных патологических изменений указывает на преобладание воспалительных реакций в легких, печени, поджелудочной железе и

тканях головного мозга. Подтверждением этому служат структурные эквиваленты функционального истощения лимфоидных органов (тимус, селезенка, лимфатические узлы).

Предположительной причиной гибели животных является полиорганная недостаточность, вызванная акцидентальной инволюцией периферийных лимфоидных органов на фоне системного воспаления. Оба процесса связаны с инъекциями фрагментированной экзогенной ДНК в организм экспериментальных животных в «окно смерти», представляющее собой промежуток времени репарации двуцепочечных разрывов, индуцированных ЦФ.

**Ключевые слова:** циклофосфан, экзогенная ДНК, клетки костного мозга, апоптоз, системное воспаление, акцидентальная инволюция лимфоидных органов.

## ВВЕДЕНИЕ

В предыдущих исследованиях было установлено, что инъекции экзогенной ДНК в промежуток времени 18–30 ч после введения ЦФ приводят к болезни и гибели экспериментальных животных. При этом именно КKM в первую очередь подвержены деструктивному воздействию синергичного влияния двух препаратов (Долгова и др., 2012, 2013). Отрезок времени 18–24 ч после введения цитостатика является завершающим этапом репарации всей массы двуцепочечных разрывов (ДЦР), сформированных к 12-му ч после введения ЦФ (Долгова и др., 2011). Предполагалось, что фрагменты экзогенной ДНК, достигнув КKM, принимают участие в процессе репарации ДЦР, индуцированных межцепочечными сшивками (МЦС), внося деструктивные изменения в молекулярные клеточные системы, что приводило к непоправимым изменениям в организме мышей, сопровождающимся болезнью и гибелью животных (Долгова и др., 2013). Таким образом, общая характеристика начала и развития патологического процесса должна складываться из анализа результатов деструктивных процессов, произошедших в костном мозге, и на уровне гистологического анализа срезов органов, затронутых патологическими изменениями.

В настоящей работе были проведены полная характеристика состояния популяций КKM, а также патологоморфологический анализ тканей и органов мышей, находящихся в агонистической стадии заболевания, что позволило определить причину гибели экспериментальных животных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Анализ распределения КKM по клеточному циклу

Из трубчатых костей фосфатно-солевым буфером (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 8 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) вымывали красный костный мозг. Около 400 тыс. клеток фиксировали в 60 %-м метаноле при 4 °С в течение 1 ч. Клетки осаждали центрифугированием при 400 g, 4 °С, 5 мин. Осадок ресуспендировали в 400 мкл фосфатно-солевого буфера, обрабатывали панкреатической РНКазой (конечная концентрация 200 мкг/мл) в течение 30 мин при 37 °С. Добавляли 20 мкл пропидиума йодида (5 мг/мл) и окрашивали клетки 10 мин при комнатной температуре (Krishan, 1975).

Распределение клеток по клеточному циклу, а также профиль распределения КKM по относительному размеру определяли при помощи проточного цитофотометра BD FACSAria (Becton Dickinson, США).

### Анализ количества зрелых предшественников (CD34+) и предшественников лимфоидного ряда в костном мозге мышей

КKM мышей, которым вводили ЦФ 200 мг/кг, а также мышей, находящихся на разных этапах развития заболевания после совместных инъекций ЦФ 200 мг/кг и ДНК человека (по 0,5 мг каждый час в период времени 18–30 ч после инъекции цитостатика), вымывали по описанной выше методике. После осаждения

центрифугированием клетки ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере с 0,1 %  $\text{NaN}_3$ , 1 % FBS. К 1 млн клеток добавляли 5 мкг антител (FITC Rat anti-Mouse CD34, BD Pharmingen) и, соответственно, 5 мкг изотип-контроля (FITC Rat IgG2a, к Isotype Control, BD Pharmingen) и инкубировали 40 мин при 4 °С. Процент CD34+ клеток определяли при помощи проточного цитофотометра BD FACSAria относительно результатов изотип-контроля в каждом образце. Процент предшественников лимфоидного и эритроидного ряда смотрели относительно всей анализируемой ядродержащей популяции костного мозга.

Количество клеток CD34+ и предшественников лимфоидного ряда считали в пересчете на абсолютное количество ККМ, содержащихся в бедренных и больших берцовых костях интактных мышей, а также в периоды снижения и восстановления клеточности костного мозга на фоне инъекции ЦФ (см. раздел «Результаты»). Для определения клеточности костный мозг полностью вымывался из трубчатых костей большим объемом фосфатно-солевого буфера. Затем при помощи лизирующего буфера (0,15 М  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 мМ Tris-HCl pH 7,5, 0,5 мМ ЭДТА) разрушали эритроциты и считали в камере Горяева количество ядродержащих ККМ.

#### **Метод заливки 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 физрастворе объемом 80 мкл и обрабатывали лизирующим буфером (50 мМ 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 М ЭДТА и хранили при 4 °С. Перед электрофорезом ядра, фиксированные в агарозе, отмывали в ТЕ буфере (10 мМ Tris-HCl, pH 7,6; 1 мМ ЭДТА) в течение 30 мин.

#### **Получение срезов ядер на конфокальном микроскопе**

Вымытые физиологическим раствором ККМ осаждали центрифугированием при 4 °С, 400 g в течение 5 мин. Затем фиксировали в фиксаторе метанол : ледяная уксусная кислота (3 : 1) в течение часа (Макгрегор, Варли, 1986). Суспензию клеток наносили на влажное обезжиренное стекло, препарат высушивали на воздухе, наносили каплю Antifade DABCO, содержащего 0,4 мкг/мл DAPI, и анализировали на конфокальном микроскопе LSM 510 META (Zeiss).

#### **Приготовление препаратов метафазных пластинок**

Мышам внутривенно вводили ЦФ 200 мг/кг и через 18 ч ККМ вымывали средой для культивирования клеток RPMI-1640. Затем клетки один раз промывали этой же средой и осаждали центрифугированием при 400 g, 5 мин, 4 °С. По 30 млн клеток инкубировали с 10 мкг ДНК человека в 500 мкл среды в течение 4 ч. За полтора часа до окончания инкубации в среду добавляли колхицин до конечной концентрации 0,4 мкг/мл. По окончании инкубации из клеток готовили препараты метафазных пластинок в точности по стандартной методике (Макгрегор, Варли, 1986). Препараты окрашивали красителем Гимза и анализировали на микроскопе Axioskop 2 Plus (Zeiss), используя объектив Ч 100 и программу AxioVision.

#### **Патологоанатомический анализ тканей и органов погибших мышей**

Для гистологического анализа забирали следующие органы: головной мозг (кора полушарий, ствол и мозжечок), тимус, трахея, легкое, сердце, лимфоузлы, селезенка, печень, поджелудочная железа, кишка тонкая и кишка толстая, почки, надпочечники, органы репродуктивной системы (матка, яичники, яйцеводы).

Кусочки органов фиксировали в 4 %-м параформальдегиде, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли ксилолом, заливали в парафин. Парафиновые срезы тол-

щиной до 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (Волкова, Елецкий, 1971). Просмотр препаратов и микрофотосъемка проводились на световом микроскопе AxioImager Z1 (Zeiss, Германия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Характеристика динамики апоптоза ККМ в группах мышей, получавших ЦФ и ЦФ+ДНК

В предыдущих исследованиях было показано, что инъекции экзогенной ДНК в определенное время после введения цитостатика ЦФ приводят к заболеванию и гибели мышей (Долгова и др., 2011). Также было определено, что именно ККМ в первую очередь подвергаются совместному воздействию двух препаратов (Долгова и др., 2012, 2013).

Постоянные трудности в выделении высокомолекулярной геномной ДНК из ККМ мышей, находящихся под воздействием ЦФ и экзогенной ДНК, вероятно, указывали на то, что материал ядер этих клеток находится в дезинтегрированном состоянии. Поскольку известно, что ЦФ сам по себе приводит к апоптозу популяций предшественников костного мозга, то предполагалось, что именно апоптотическая дезинтеграция хроматина является причиной деградации ДНК, которая обнаруживается при выделении ее геномной фракции.

Была проведена серия экспериментов по оценке степени апоптотической деградации ККМ и продолжительности апоптотического процесса в двух группах животных, получавших ЦФ как монопрепарат и ЦФ в сочетании с экзогенной ДНК, инъецированной в «окно смерти». Оказалось, что если инъецировать экзогенную ДНК в указанный промежуток времени, то индуцированный к 16 ч апоптоз не прекращается и продолжается вплоть до последней инъекции ДНК. Для контрольной группы, получавшей только ЦФ, апоптотическое возбуждение нормализуется через 24 ч после введения ЦФ (рис. 1).

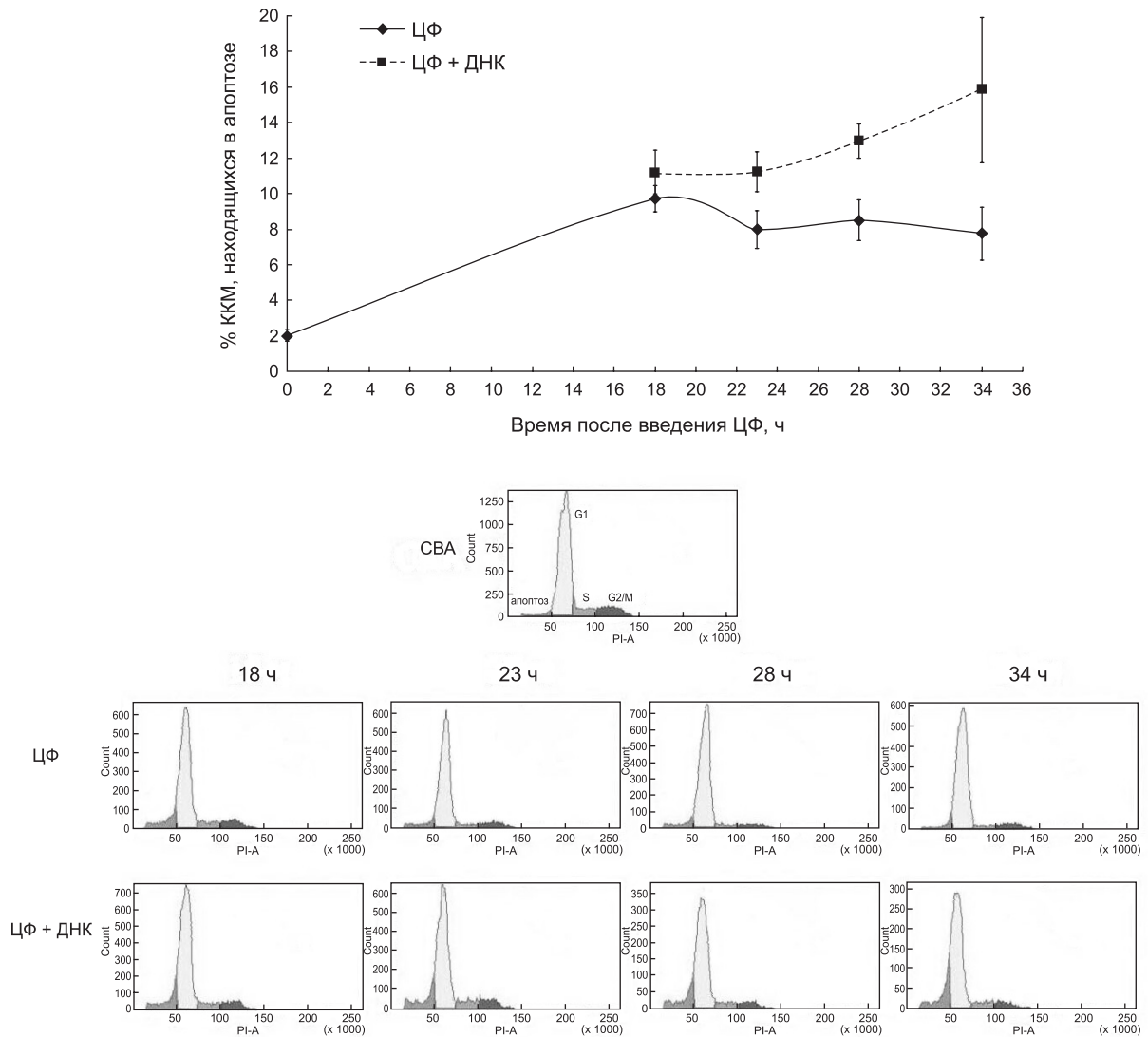
Проведенный анализ геномной ДНК селезенки свидетельствовал о том, что клетки этого иммунокомпетентного органа также находятся в стадии апоптотической деградации (рис. 2).

Наличие апоптоза в ККМ экспериментальных мышей было подтверждено дополнительно при помощи срезов ядер, сделанных на конфокальном сканирующем лазерном микроскопе (рис.3).

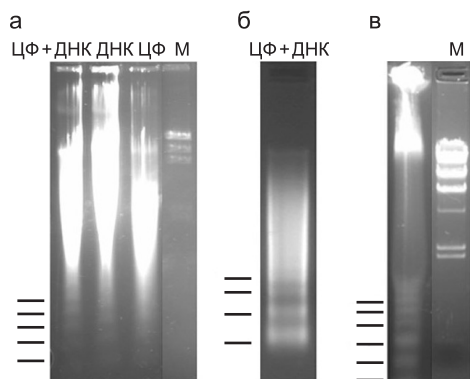
Чтобы определить, каким образом ДНК, относящаяся к различным таксономическим группам, воздействует на ККМ, три группы мышей обрабатывали ЦФ, ЦФ+ДНК человека и ЦФ+плазмидная ДНК (pEGFP-N1). Результаты такой обработки представлены на рис. 4. Оказалось, что ДНК плазмиды приводит к индукции апоптоза в 98 % ККМ, в то время как ЦФ+ДНК человека и ЦФ в виде монопрепарата соответственно в 58 и 43 %.

### Оценка степени вырожденности некоторых популяций ККМ после обработки мышей одним ЦФ и в сочетании с препаратом экзогенной ДНК

Предполагалось, что гибель мышей в первую очередь связана с нарушениями гомеостаза костномозговых предшественников. Проведенные молекулярные исследования, характеризующие поведение экзогенного материала в цитоплазме и во внутриядерном пространстве ККМ, свидетельствовали о том, что фрагменты экзогенной ДНК могут активировать аварийные лигазные системы (Derbyshire *et al.*, 1994; Lees-Miller, Meek, 2003; Lee *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Долгова и др., 2011). Такая активация должна приводить к несанкционированному объединению двуцепочечных концов хромосом, находящихся в этот промежуток времени в ожидании репарации по механизму деликатной гомологичной рекомбинации. При анализе метафазных пластинок, выделенных из костного мозга мышей после введения ЦФ и ЦФ в сочетании с инъекциями ДНК человека в «окно смерти», было установлено, что в группе мышей, получавших два препарата, не менее 65 % метафаз демонстрируют эффект пульверизации хромом. В группе мышей, получавших один ЦФ, количество метафаз в таком состоянии оценено как 42 % от общего числа проанализированных пластинок. В частном случае такое аварийное лигирование может приводить к интеграции экзогенного материала в состав реципиентной хромосомы. На такую возможность указывают

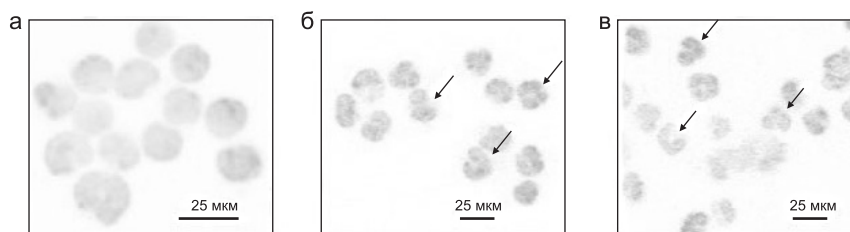


**Рис. 1.** Анализ апоптоза ККМ, выделенных из мышей после инъекции ЦФ (200 мг/кг) в виде монопрепарата и в сочетании с инъекциями ДНК человека каждый час в промежутке времени 18–30 ч по 0,5 мг.



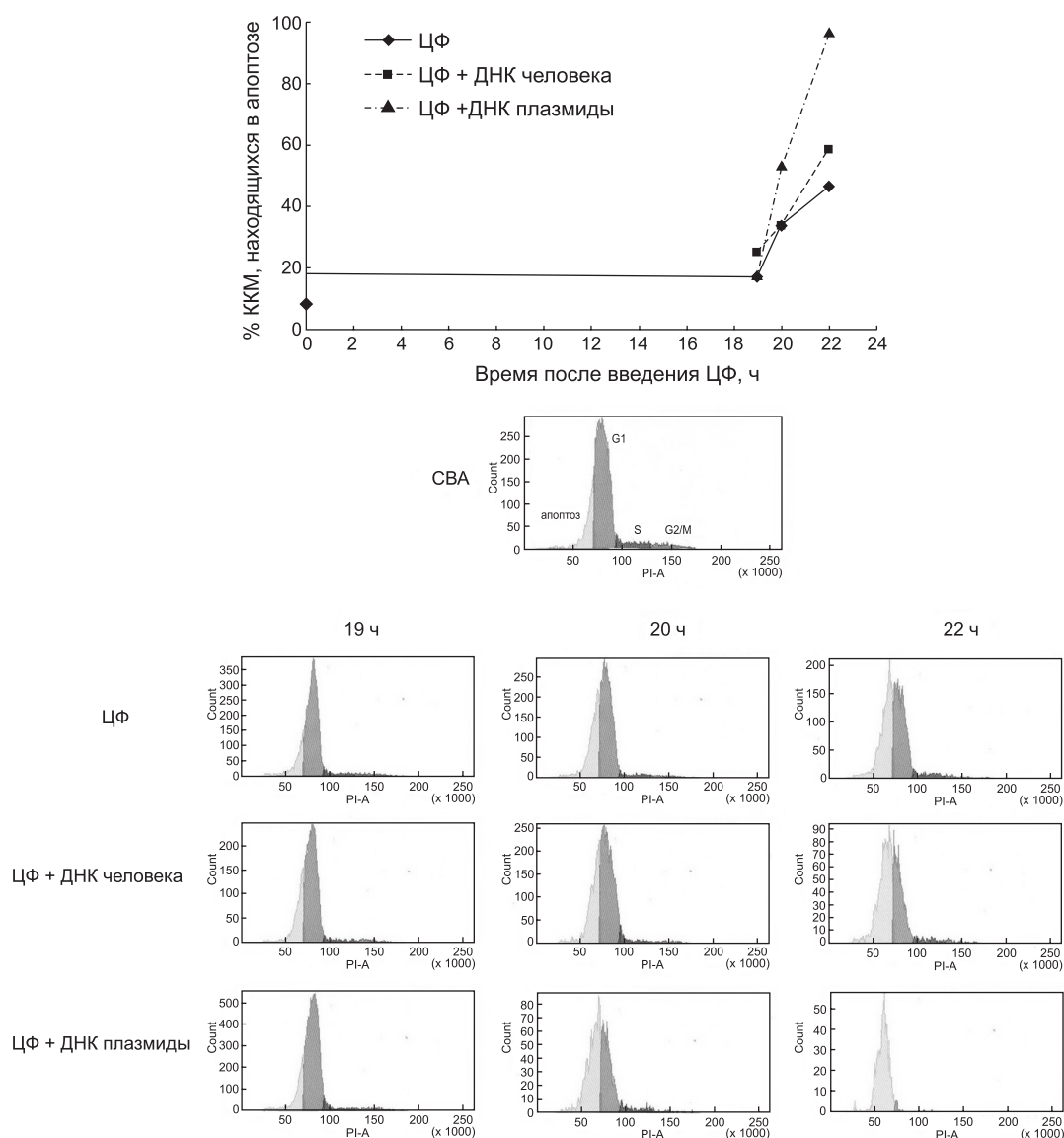
**Рис. 2.** Апоптотическая фрагментация геномной ДНК, выделенной из клеток селезенки (а) и ККМ (б), залитых в блоки легкоплавкой агарозы, после инъекций мышам ЦФ (200 мг/кг) в сочетании с инъекциями ДНК человека каждый час в промежутке времени 18–30 ч по 0,5 мг (ЦФ+ДНК), при 12-кратных инъекциях ДНК по 0,5 мг в виде монопрепарата (ДНК) и через 30 ч после инъекции ЦФ в виде монопрепарата (ЦФ); (в) – электрофорез геномной ДНК, выделенной из ККМ мыши, залитых в блоки легкоплавкой агарозы, сгенерированных экстракорпорально через 18 ч после инъекции ЦФ (200 мг/кг) и инкубированных в течение 2 ч с 2,5 мкг ДНК *Alu* повтора, синтезированного в ПЦР.

М – маркер молекулярного веса  $\lambda$ HindIII. Поперечные черты показывают олигонуклеосомное расщепление хроматина, происходящее в процессе апоптоза.



**Рис. 3.** Срезы ядер ККМ intactных мышей (а), мышей через 30 ч после инъекции ЦФ 200 мг/кг (б) и сразу после инъекций ЦФ и ДНК человека каждый час в промежуток времени 18–30 ч по 0,5 мг (в), выполненные на конфокальном микроскопе LSM 510 META (Zeiss).

Окраска по DAPI, стрелками указаны ядра, находящиеся на начальной стадии апоптотической дезинтеграции.



**Рис. 4.** Анализ апоптоза ККМ, выделенных из мышей после инъекции ЦФ (200 мг/кг) в виде монопрепарата и в сочетании с инъекциями ДНК человека и ДНК плазмиды rEGFP-N1 начиная с 18 ч каждый час по 0,5 мг и 0,1 мг соответственно.

результаты экспериментов, проведенных в ранних исследованиях (Долгова и др., 2011).

Полученные данные предполагали, что непрекращающийся апоптоз в ККМ связан с постоянным присутствием фрагментов экзогенной ДНК в ядре клеток, принадлежащих костному мозгу. Такое присутствие нарушает корректный ход репарации и приводит к аберрантному митозу и гибели клеток вследствие нарушения целостности хромом (рис. 5).

Продолжительная опустошительная гибель ККМ должна была приводить к явным изменениям в соотношении популяций костномозговых предшественников. В связи с этим был проведен анализ состава CD34+ прогениторных клеток и общий анализ изменения состава популяции ККМ в ходе развития заболевания. Результаты исследования представлены на рис. 6, 7. Оказалось, что популяция CD34+ клеток восстанавливается и сохраняется у больных мышей в такой же динамике, как и в группе мышей, получавших только ЦФ (рис. 6).

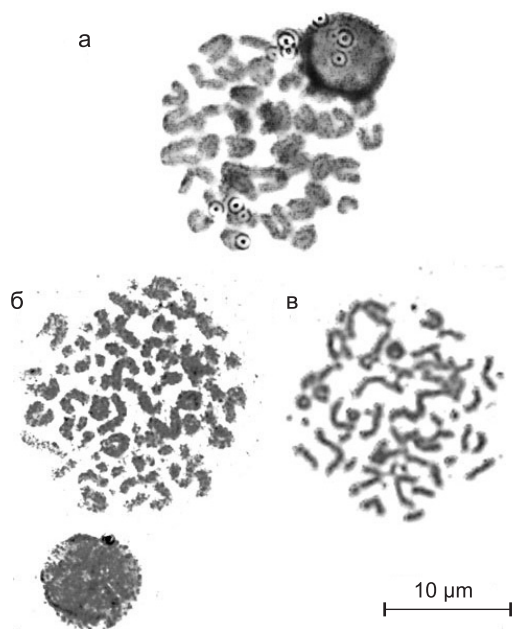
Обнаружено, что основной характеристикой со стороны костномозговых предшественников

болеющих мышей является исчезновение популяции клеток размером 12–20 мкм (рис. 7).

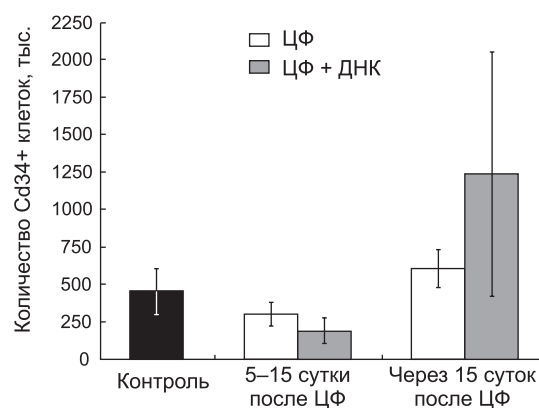
Проведенный анализ форменных элементов в отпечатках костного мозга, полученных из грудины болеющих животных, свидетельствует о том, что в популяции ККМ отсутствуют молодые формы клеток, из которых формируется лимфоцитарный росток крови (табл. 1, рис. 8). Анализ мазков периферической крови больных животных выявил в них присутствие незрелых форм клеток-предшественников (рис. 8, б).

### Патологоанатомический анализ тканей и органов погибших мышей

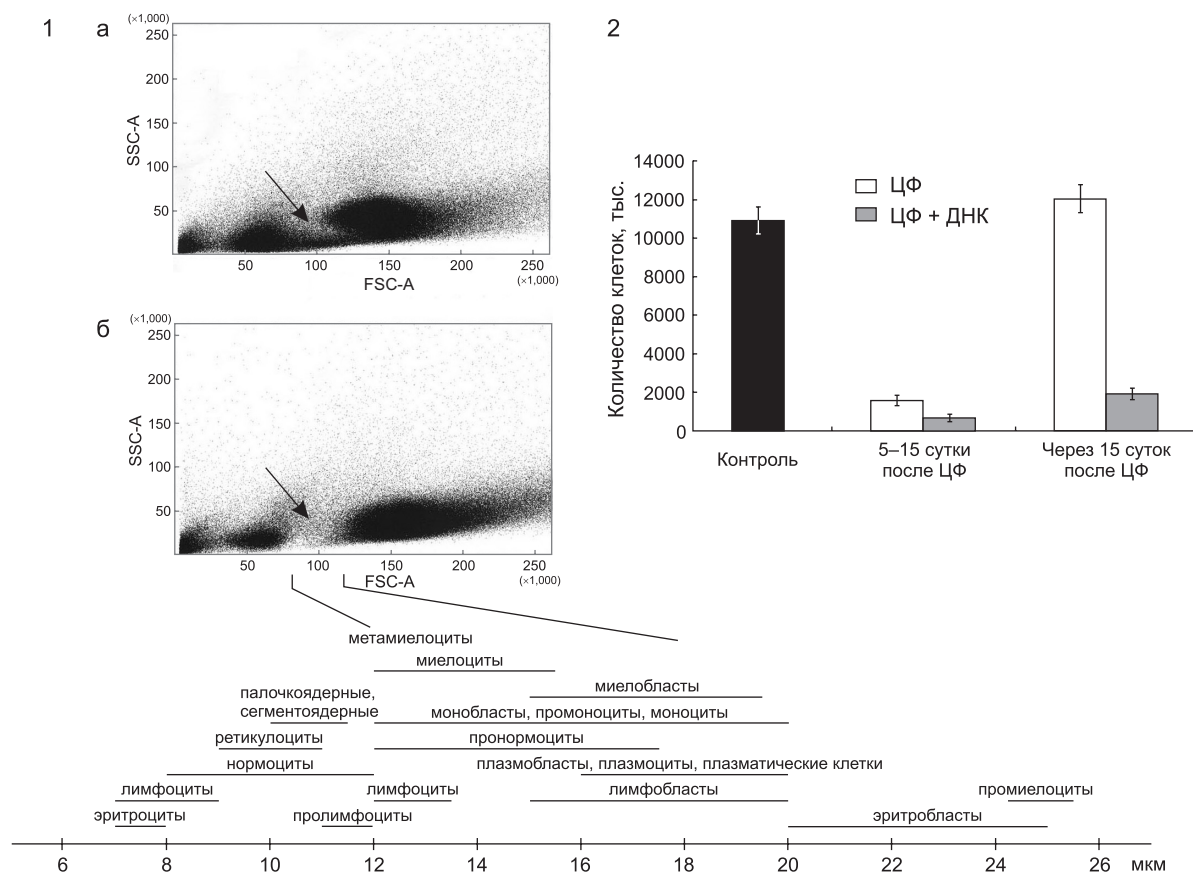
Как показали проведенные эксперименты, феномен «отсроченной смерти» имеет выраженный дозозависимый эффект (Долгова и др., 2011). Основными симптомами болезни были следующие: общее угнетение двигательной активности, обильное потение, лихорадка, отек морды; выпадение волос на затылке и мордочке; неоткрывание глаз, судороги, параличи. Иногда мыши погибали сразу без видимых симптомов болезни. Иногда мыши выздоравливали после характерных симптомов болезни. Проведенный патоморфологический анализ выявил деструктивные изменения в органах и тканях экспериментальных мышей.



**Рис. 5.** Метафазные пластинки intactных мышей (а), мышей после инъекций ЦФ и ДНК человека в «окно смерти» (б) и мышей после инъекции ЦФ (в). Отчетливо виден эффект pulverизации хромосом в случае ЦФ и ЦФ+ДНК.

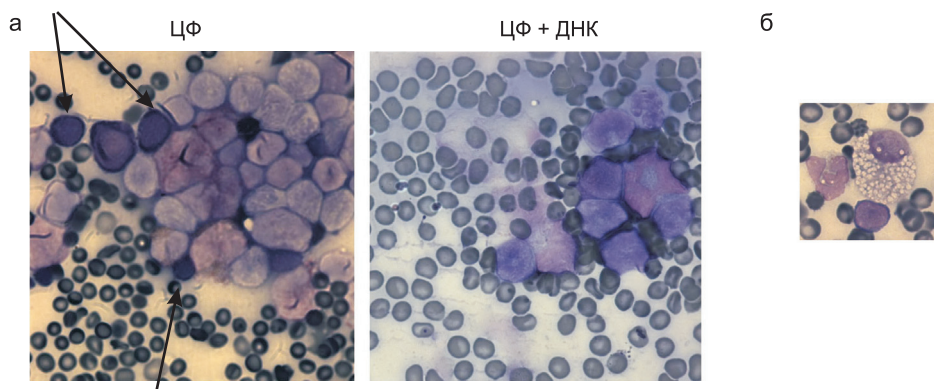


**Рис. 6.** Абсолютное количество зрелых CD34+ предшественников в костном мозге intactных мышей, мышей после инъекции ЦФ и ЦФ в сочетании с ДНК человека в период снижения клеточности костного мозга на 5–15-е сут на фоне инъекции цитостатика и в период восстановления состава костного мозга до исходного состояния по прошествии 15 сут с момента инъекции ЦФ.



**Рис. 7.** Изменение популяционного состава ККМ после инъекций ЦФ и цитостатика в сочетании с экзогенной ДНК.

1 – профиль распределения ККМ мышей по их относительному размеру, полученный при помощи проточного цитофотометра BD FACSAria (Bio-Rad). Стрелками показано облако клеток, представляющее собой негранулированное предшественники лимфоидного ряда, которые в нормальном количестве восстанавливаются начиная с 15 суток в костном мозге мышей после инъекции ЦФ (а) и не восстанавливаются в костном мозге мышей после инъекций ЦФ и ДНК человека (б). Внизу приведена схема распределения всех форм ККМ мышей по размеру в нм. Линиями обозначен размер популяции клеток (12–20 мкм), отсутствующей в костном мозге больных мышей; 2 – абсолютное количество клеток предшественников лимфоидного ряда в костном мозге intactных мышей (контроль), мышей после инъекции ЦФ и ЦФ в сочетании с ДНК человека в период снижения клеточности костного мозга на 5–15-е сут на фоне инъекции цитостатика и в период восстановления состава костного мозга до исходного состояния по прошествии 15 сут с момента инъекции ЦФ.



**Рис. 8.** Анализ мазков периферической крови экспериментальных мышей.

а – клетки костного мозга мышей после воздействия ЦФ в виде монопрепарата и в комбинации с препаратом экзогенной ДНК человека. Стрелки указывают на клетки лимфоцитарного ряда; б – незрелые формы клеток-предшественников в крови больных мышей.



Таблица 1

Клеточный состав крови и костного мозга мышей  
после введения ЦФ и ЦФ+ДНК после восстановления (21 сут и более)

Тип клеток	Костный мозг		Кровь	
	ЦФ+ДНК	ЦФ	ЦФ+ДНК	ЦФ
Гранулоцитарный ряд (зрелые клетки + предшественники)	69	58		
Сегментоядерные нейтрофилы			39	28
Палочкоядерные нейтрофилы			3	1
Эозинофилы			4	1
Моноцитарный ряд	23	27	49	31
Лимфоцитарный ряд	Полное отсутствие молодых форм	17 (Зрелые клетки + предшественники)		
Лимфоциты	5		27	40

В органах мышей, исследованных в сроки от 2 до 6 сут, не обнаружено визуально заметных морфологических отклонений от контрольных животных. Начиная с 9 сут и далее определяются достаточно яркие признаки нарушения структуры со стороны легких, печени, иммунокомпетентных органов и головного мозга. В *легких* наблюдается интенсивная воспалительная реакция, проявляющаяся отеком межальвеолярных перегородок, кровоизлияниями, массивной воспалительно-клеточной инфильтрацией перибронхиальных и периваскулярных пространств с переходом на респираторный отдел легкого (рис. 9, 1). В *печени* на первый план выступают многочисленные мелкоочаговые лимфоидноклеточные инфильтраты внутри долек, а также по ходу желчных протоков и сосудов портальной системы (рис. 9, 2). Местами внутридольковые инфильтраты сопровождаются деструкцией отдельных гепатоцитов. Дольчато-балочная структура органа в целом остается интактной. Признаков репаративной активности соединительной ткани не наблюдается. У одной из мышей описанные поражения легких и печени сопровождаются крупноочаговым некрозом *поджелудочной железы* (рис. 9, 3). Практически все мыши данной группы демонстрируют признаки ответной реакции со стороны иммунокомпетентной системы. Так, со стороны *тимуса* отмечается снижение плотности коркового вещества, что находит отражение в визуальном стирании его

границы с областью мозгового слоя (рис. 9, 4). *Селезенка* многих животных характеризуется заметным сокращением как числа фолликулов в целом, так и уменьшением их размеров до масштаба периартериальной зоны (рис. 9, 5). *Лимфатические узлы* в унисон с изменением морфологии тимуса и селезенки также показывают сокращение количества фолликулов в пределах корковой зоны (рис. 9, 6). Кроме того, во многих случаях отмечается заметный отек ретикулярной ткани мозгового вещества. В *головном мозге* как у животных из группы ЦФ+ДНК, так и у контрольных животных (получавших инъекцию ЦФ) наблюдаются очаговые лимфоидноклеточные инфильтраты в коре полушарий мозга либо изолированно, либо в сочетании с аналогичными клеточными скоплениями в перивентрикулярных и других отделах головного мозга (данные не приведены).

Со стороны других органов патологических изменений структуры не выявлено.

Характер выявленных патологических изменений указывает на преобладание воспалительных реакций в легких, печени, поджелудочной железе и тканях головного мозга. Подтверждением этому служат структурные эквиваленты функционального истощения лимфоидных органов (тимус, селезенка, лимфатические узлы).

В отношении наличия воспалительных изменений головного мозга можно предполагать, что скорее всего, они связаны не с условиями экспе-

римента, а с наличием у мышей такой широко распространенной патологии, как хронический лимфоцитарный хориоменингит. Вместе с тем более яркое проявление данной патологии у животных, подвергавшихся сочетанному воздействию препаратов (ЦФ+ДНК), возможно, указывает на значительно большее угнетение иммунной системы (рис. 7, 9).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Массированные инъекции экзогенной ДНК сами по себе и на фоне репаративных процессов при репарации МЦС в активно пролиферирующих клетках организма индуцируют несколько деструктивных процессов, связанных с гуморальной интервенцией и появлением многочисленных генетических дефектов в клетках, образующих функциональные системы организма, которые затем объединяются в один патологический процесс, идущий сразу по нескольким направлениям и затрагивающий одновременно несколько систем организма.

Общая картина начала и развития патологического процесса складывается из анализа результатов деструктивных процессов, произошедших в костном мозге, и на уровне гистологического анализа срезов органов, затронутых патологическими изменениями. В течение всего времени введения экзогенной ДНК (18–30 ч) наблюдается ярко выраженный непрерывающийся апоптоз. В контроле у мышей, обработанных ЦФ, пик погибших клеток отмечается в 12–14 ч после инъекции ЦФ. Процесс гибели клеток завершается к 24 ч и совпадает по времени с концом репарации ДЦР. Инъекции экзогенной ДНК начиная с 18 ч приводят к непрерывающемуся апоптозу, продолжающемуся до последней анализируемой точки – 32 ч после введения цитостатика. Показано, что интенсивность апоптоза зависит от таксономической близости экзогенной ДНК (рис. 4).

Состояние различных популяций костномозговых предшественников в ходе развития патологического процесса было оценено одновременно с патологоанатомическим анализом дегенеративных изменений в органах экспериментальных мышей, находящихся в агонистической фазе развития заболевания и затронутых патологическим процессом.

Общее количество ККМ в обеих группах снижается до минимального значения на 3-и сут после введения цитостатика и составляет около 20 млн клеток. Через 15 сут происходит полное восстановление популяции костномозговых предшественников до исходного уровня 35 млн клеток.

Динамика изменения количества плюрипотентных предшественников CD34+ в обеих группах до 25-х сут от начала эксперимента практически идентична, а процент предшественников не отличается от нормы и составляет 1,2–1,4 %.

При сравнении цитометрических облаков различных популяций ККМ с использованием бокового светорассеивания (SSC) было обнаружено, что в процессе развития патологического процесса из костного мозга исчезает и больше не появляется популяция клеток с размером 12–20 мкм. Анализ содержания форменных элементов в мазках костного мозга животных свидетельствует о том, что в популяции ККМ мышей, обработанных ЦФ и экзогенной ДНК и находящихся в агонистической фазе развития болезни, отсутствуют молодые формы предшественников лимфоидного ряда. Отмечено, что у болеющих животных в крови появляются незрелые бластные формы клеток, чего никогда не наблюдается у здоровых мышей и мышей, находящихся под воздействием ЦФ как монопрепарата, и что является индикатором патологических изменений процесса кроветворения.

Одновременно с указанными изменениями в костном мозге в тканях нескольких органов экспериментальных мышей обнаруживаются явные дегенеративные изменения. У всех подопытных животных в агонистической фазе развития болезни наблюдаются воспалительные инфильтраты в легких, печени, головном мозге. В поджелудочной железе одного животного был обнаружен обширный некроз. Периферические лимфоидные органы практически полностью опустошены. Инволюция тимуса, селезенки и лимфатических узлов характеризуется стиранием границы кортикального и мозгового слоев и исчезновением лимфоцитов из зон депонирования.

Таким образом, можно увидеть три ярко выраженных деструктивных изменения на клеточном и органном уровнях: 1) исчезает популяция

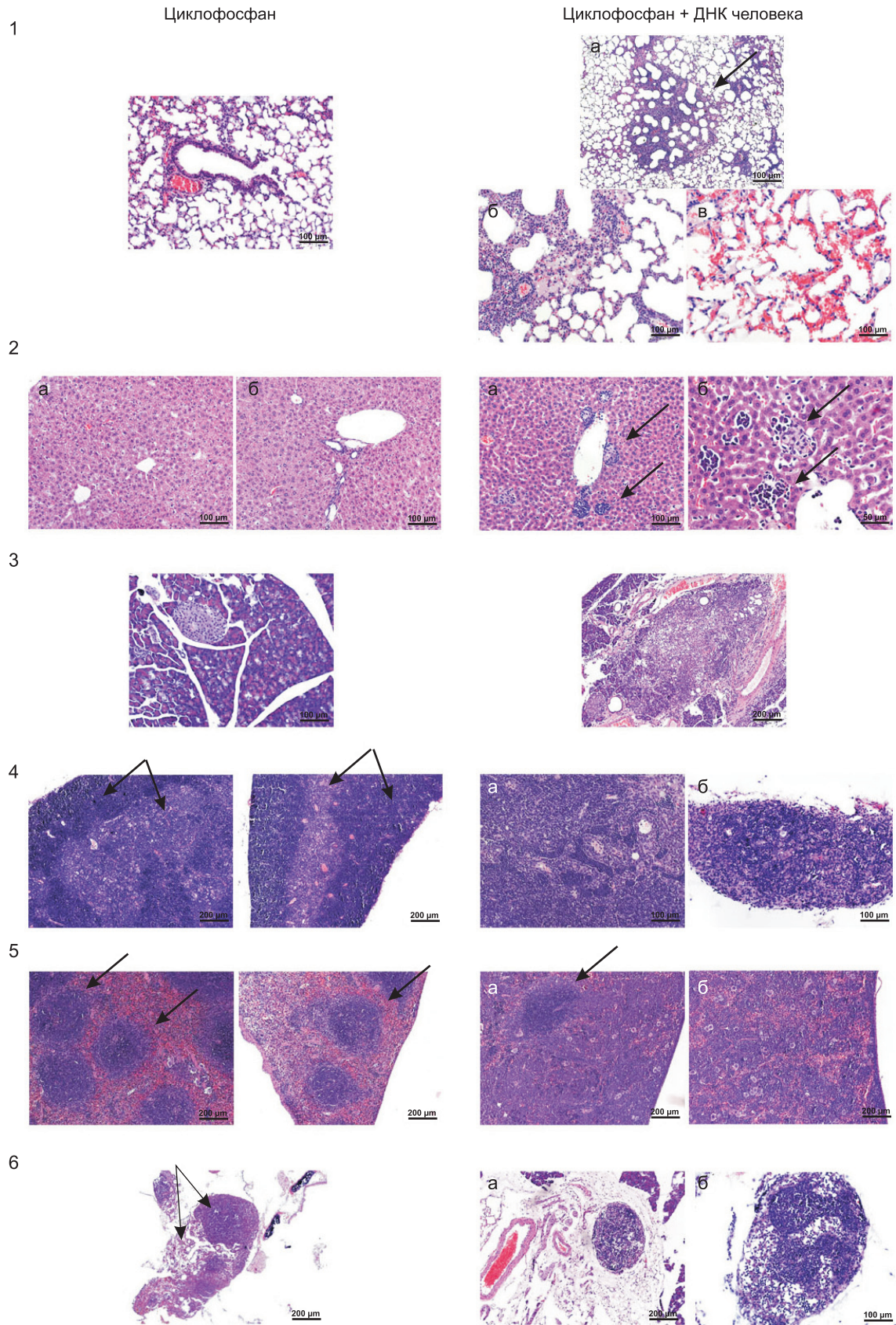


Рис. 9. Патологоанатомический анализ тканей и органов экспериментальных мышей.

**Левый блок:** контрольные мыши, получившие инъекцию ЦФ 200 мг/кг.

1 – интактная легочная паренхима; 2 – центральные вены печеночных долек, сохранено дольчато-балочное строение (а), область печеночных триад, в междольковой соединительной ткани определяются профили кровеносных сосудов и выводных протоков (б); 3 – паренхима поджелудочной железы, островок Лангерганса среди внешнесекреторных ацинусов; 4 – обзорная микрофотография паренхимы тимуса, демонстрирующая топографическое взаимоотношение коркового и мозгового слоя паренхимы (указаны стрелками); 5 – паренхима селезенки отчетливо дифференцирована на красную и белую пульпу, крупные лимфоидные фолликулы белой пульпы селезенки указаны стрелками; 6 – региональный лимфоузел, стрелками указаны корковая (более светлая) и мозговая зоны (более темная), которые имеют отчетливое разграничение.

**Правый блок:** мыши, которые находились на конечных стадиях заболевания, получившие совместные инъекции ЦФ 200 мг/кг и ДНК человека по 0,5 мг каждый час в промежутки времени 18–30 ч после инъекции ЦФ.

1 – плотный очаг воспалительной клеточной инфильтрации в паренхиме легкого (а), очаг воспаления с выраженной гиперемией сосудов и интенсивной экссудацией в альвеолы легкого (б), массивные кровоизлияния в паренхиму легкого (в); 2 – стрелками указаны множественные лимфоидноклеточные инфильтраты в паренхиме печени (а), очаги – инфильтраты в паренхиме печени крупным планом (б); 3 – крупный очаг некроза поджелудочной железы; 4 – снижение плотности заселения лимфоцитами корковой зоны тимуса на фоне обилия их в синусоидах мозгового слоя (а), резкое стирание границы между корковым и мозговым отделами паренхим тимуса (б); 5 – умеренно выраженная редукция фолликулов белой пульпы селезенки, стрелкой указан единственный имеющийся на срезе фолликул (а), резко выраженная редукция фолликулов белой пульпы селезенки, на срезе нет ни одного фолликула (б); 6 – региональный лимфоузел с уменьшенной плотностью коркового вещества, фолликулы слабо дифференцированы, синусы мозгового слоя умеренно расширены (а), синусы мозгового отдела резко расширены, фолликулы корковой зоны редуцированы (б).

клеток, формирующая лимфоидный росток крови, и в периферической крови появляются бластные формы, которые в норме никогда не покидают костномозговой отдел; 2) происходит акцидентальная инволюция периферийных лимфоидных органов; 3) индуцируется системный воспалительный процесс.

Мы полагаем, что все три процесса начинают развиваться одновременно, интегрируют между собой и формируют петлю событий, приводящих к иммунодефициту, связанному с акцидентальной инволюцией периферийных лимфоидных органов на фоне системного воспаления и невозможности восполнить опустошенные селезенку, тимус и лимфоузлы новыми иммунными Т- и В-лимфоцитами вследствие нарушения способности функции плюрипотентных CD34+ клеток развиваться в направлении белого ростка крови.

Полученные результаты позволяют провести анализ возможных механизмов, вызывающих: а) исчезновение из костного мозга популяции клеток, составляющих белый росток крови; б) акцидентальную инволюцию периферийных лимфоидных органов; в) системный воспалительный процесс.

**Исчезновение популяции клеток, формирующей белый росток крови, из костного мозга больных мышей** может быть связано с нарушениями в механизмах, определяющих плюрипотентность CD34+ СКК. Поскольку популяция CD34+ СКК восстанавливается и в полном объеме присутствует в костном мозге

обеих групп мышей независимо от стадии заболевания животных, обработанных двумя препаратами, можно предположить, что CD34+ клетки перестают продуцировать потомков, определяющих развитие лимфоидного ростка крови. Известно, что СКК могут развиваться в два независимых ростка крови – миелоидный и лейкоцитарный (Афанасьева и др., 2004; Orkin, Zon, 2008). Вследствие воздействия экзогенной ДНК в период «окно смерти» происходит утрата функциональной возможности этих клеток развиваться в направлении белого ростка. При этом при обработке ЦФ в виде монопрепарата не происходит редукции функциональной потенции СКК. Непонятным остается механизм, определяющий восстановление анализируемой популяции клеток CD34+ через 15 сут до исходного уровня в обеих группах животных, и одновременную потерю ими своих функций в группе мышей, обработанных ЦФ+ДНК. Плюрипотентная стволовая клетка обладает максимальной из всех известных типов клеток генетической пластичностью (Кругляков и др., 2008; Rossi *et al.*, 2008; Silva, Smith, 2008; Yu, Thomson, 2008). Возможно, это ее свойство сохраняет ей жизнеспособность при одновременном нарушении ее способности развиваться в клетки белого ростка крови.

Одним из вариантов исчезновения цитометрического облака является следующее. Одновременно с функциональной дегенерацией СКК погибают все коммитированные потомки, которые в перспективе могли развиваться в Т- и

В-лимфоциты. Гибель индуцируется экзогенной ДНК и связана с ее участием в процессе репарации ДЦР в этом типе клеток-предшественниц. Предполагается, что появление фрагментов экзогенной ДНК в клетках, находящихся под воздействием ЦФ в стадии репарации ДЦР, активирует агрессивные аварийные лигазные системы (Derbyshire *et al.*, 1994; Lees-Miller, Meek, 2003; Lee *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005), что приводит к хромосомным аномалиям и аберрантному митозу, сопровождающимся гибелью клетки. При длительном постоянном притоке фрагментированной экзогенной ДНК происходит, во-первых, ужесточение процесса некорректной репарации (о чем свидетельствует высокий процент пульверизированных метафаз в группе экспериментальных мышей) и, во-вторых, индуцируется перманентный апоптоз ККМ. Такие жесткие условия, по-видимому, приводят к полной элиминации популяции клеток лейкоцитарного кроветворного ростка. Возможно, что эти условия могут быть дополнительно усилены нарушениями в происходящей RAG рекомбинации в клетках-предшественниках В-лимфоцитов, которая также может быть раскоординирована присутствием в клетках фрагментов экзогенной ДНК. Следовательно, к указанным деструктивным процессам может присоединиться еще один. Присутствие фрагментов экзогенной ДНК в этот момент времени в предшественниках В-лимфоцитов может повлиять на формирование репертуара генов иммуноглобулинов, полностью купируя их разнообразие вследствие нарушения корректного воссоединения кодирующих их генов при RAG рекомбинации (реорганизация V-, D-, J-сегментов генов иммуноглобулинов, осуществляемая RAG-рекомбиназой) (Fugmann, 2001; Cook *et al.*, 2007; Kotnis *et al.*, 2009).

Принципиально возможен еще один вариант исчезновения популяции молодых форм. Предположим, что нарушилась функция СКК продуцировать формы клеток, формирующих белый росток. Молодые формы, уже присутствующие в костном мозге к этому времени, не погибают, а продолжают дифференцировку, превращаясь в зрелые формы. При этом область их первоначального присутствия опустеет и не сможет быть заполнена в связи с дефектами в СКК, возникших в результате воздействия ЦФ и ДНК.

**Акцидентальная инволюция** периферийных лимфоидных органов связана с петлей акселерации иммунной недостаточности, которая начинается с массового апоптоза активно пролиферирующих клеток, вызванного действием цитостатика и доведенного до предела инъекциями экзогенной ДНК, что хорошо видно на примере апоптоза лимфоцитов селезенки и костного мозга (рис. 2). Вследствие апоптотической деградации хроматина в крови опытных животных появляется огромное количество нуклеосомных мономеров разной степени гидролиза. Нуклеосомы в свою очередь индуцируют уже некроз лимфоцитов (Decker *et al.*, 2003, 2005; Проскуряков и др., 2005), что приводит к нарастающей иммунной недостаточности. Поскольку происходит гибель как В-, так и Т-лимфоцитов, формируется комбинированный иммунодефицит гуморального и клеточного типа. Следствием возникшего иммунодефицита является увеличение инфекционной нагрузки, связанной с активацией в условиях недостаточности иммунной системы оппортунистических инфекций (Rosen *et al.*, 1995; Buckley, 2000; Harty *et al.*, 2000; Lekstrom-Himes, Gallin, 2000; De Gregorio, Merrell, Falkow, 2004; Monack *et al.*, 2004; Rappuoli, 2004; Kaufmann, Schaible, 2005). Возникшие очаговые или захватывающие весь орган воспалительные процессы, вызванные или активностью сапрофитов, или активизацией бактериально-вирусной палитры комменсалов (Medzhitov, 2007), приводят к оттоку из лимфоидных органов остатков лимфоцитов, сохранившихся после атаки сначала ЦФ и экзогенной ДНК, и затем собственными нуклеосомами. Одновременно с этим погибшие от некроза лимфоциты также представляют собой очаги, индуцирующие воспалительные реакции, что в еще большей степени усиливает акселеративную петлю и способствует формированию системного воспалительного процесса (Andrews, 2005). В результате произошедших событий периферийные лимфоидные органы полностью опустошаются и больше не содержат иммунокомпетентных клеток. Одновременно с этим исчезает возможность повторного заселения иммунными клетками соответствующих зон иммунных органов вследствие разрушения ростков кроветворения.

Можно полагать, что массивные инъекции экзогенной ДНК на фоне действия ЦФ и

следующая за этим индукция некроза лимфоцитов имеет сходство с описанными в литературе раздражителями (Афанасьева и др., 2004), приводящими к инволюции тимуса и представляющими собой обширные травмы, интоксикацию, инфекцию. При указанных типах поражения организма возникают стресс-реакции, при которых происходит массивный выброс лимфоцитов в кровь и наблюдается массовая гибель клеток в самом органе, особенно в корковом веществе. В дополнение к этому в таких условиях наблюдается фагоцитоз макрофагами внешне неизмененных лимфоцитов. В связи с указанными процессами становится менее заметной граница коркового и мозгового вещества. Именно такая гистологическая картина наблюдается при анализе срезов как тимуса, так и селезенки и лимфатических узлов у мышей экспериментальной группы ЦФ+ДНК. Одновременно с этим массовый апоптоз в костном мозге и селезенке показан экспериментально и представлен на электрофореграммах (рис. 2). Известно, что генетические дефекты в генах иммуноглобулинов или физическое отсутствие Т- и В- клеток приводят к возникновению восприимчивости к пиогенным инфекциям, развитие которых проявляется в пневмониях (Мейл и др., 2007), которые выявляются в разной степени у всех экспериментальных мышей в агонистической фазе развития болезни. В анализируемой ситуации возможно двойное деструктивное воздействие на В- и Т-клетки. В первом случае происходит физическая элиминация всех групп указанных типов клеток из костного мозга и периферических лимфоидных органов. Во втором случае происходят нарушения в конечной организации множественности генов иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов вследствие участия фрагментов экзогенной ДНК в репаративном процессе при репарации ДЦР как интермедиатов репарации МЦС. В этом случае RAG соматическая рекомбинация не происходит и репертуар иммунногенных молекул не формируется. Такая возможность показана в работе Е.В. Долговой с соавт. (2013), где приводятся экспериментальные доказательства нарушения репаративного процесса при репарации ДЦР в районах хромосом, содержащих умеренные повторяющиеся последовательности, присутствием фрагментов экзогенной ДНК.

**Системный воспалительный процесс**, обнаруживаемый при гистологическом анализе органов экспериментальных мышей, может иметь несколько путей возникновения. Как уже было сказано, при акселерации иммунодефицита происходит активизация оппортунистической и аукоотрофной инфекции, присутствующей в организме мышей. У иммунокомпрометированных мышей процесс может диссеминировать почти во все ткани организма. Нейтрофилы и макрофаги инфильтруются в области инфекции, фагоцитируют патоген и секреторируют в кровь противовоспалительные цитокины. Если инфекция распространена по всему организму, то наблюдается цитокиновая интервенция, приводящая к повреждению тканей сосудов и образованию петли акселерации воспаления. Синдромами такого повышения количества цитокинов в крови животных может являться лихорадка (что постоянно наблюдается у животных в агонистической фазе развития болезни), диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови и тромбоз с нарушением сосудистой проницаемости, выходом плазмы в ткань, циркуляторным коллапсом и геморрагическим некрозом ткани сосудов. Механизм повреждения связан, в первую очередь, с присутствием в крови ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1. Эти цитокины активируют клетки эндотелия сосудов в направлении экспрессии молекул межклеточной адгезии и тканевого тромбопластина, что приводит к повышению адгезии циркулирующих клеток, отложению фибрина и развитию тромбозов. Новые очаги некрозов приводят к образованию очередной петли акселерации воспаления, заканчивающейся полиорганной недостаточностью и летальным исходом. Усиление эффекта воспаления может происходить в результате некроза лимфоцитов, которые в этом случае представляют собой мишень для иммунокомпетентных клеток, секретирующих противовоспалительные цитокины. В данном случае воспалительный процесс связан с активностью нейтрофилов и макрофагов, привлекаемых к очагу поражения (Warren *et al.*, 1989; Merrell, Falkow, 2004; Monack *et al.*, 2004; Rouse, Suvas, 2004). Похожая картина разрушения тканей наблюдается у мышей, подвергнутых воздействию цитостатика ЦФ и экзогенной ДНК. Обнаруженный обширный некроз в поджелудочной

железе одного из подопытных животных, а также инфильтрации вокруг кровеносных сосудов в печени всех заболевших животных, инфильтрации в легких и головном мозге опытных мышей в агонистической стадии развития болезни могут косвенно свидетельствовать о развитии описанного процесса.

Одновременно с цитокиновой интервенцией, связанной с ослаблением иммунитета, которое произошло в результате инволюции периферических иммунных органов, развития системного воспаления и массовой инфильтрации в некротических очагах иммунокомпетентных клеток при появлении в организме большого количества фрагментированной двуцепочечной экзогенной ДНК, описано явление сверхэкспрессии интерферонов первого типа всеми клетками организма, включая иммунокомпетентные клетки (Ishii, Akira, 2006; Martin, Elkon, 2006; Shiota *et al.*, 2006; Coban *et al.*, 2008; Takeshita, Ishii, 2008). Также показано, что препараты экзогенной ДНК, в том числе и препарат, используемый в настоящем исследовании, вызывает сверхпродукцию всей палитры цитокинов, включая ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 в клетках мононуклеарной фракции периферической крови человека (Рыкова и др., 2001). Можно полагать, что два направления цитокиновой интервенции будут накладываться друг на друга, приводя к максимальному деструктивному эффекту.

Существует еще одна принципиальная возможность акселерации воспаления, связанная с аутоиммунными проявлениями, возникающими при одновременном появлении в организме большого количества антигенов, как это происходит в указанных экспериментах. При этом формируются комплексы связывающие иммунные комплексы. Если формируется большое количество таких комплексов, а системы, ответственные за их удаление (мононуклеарные фагоциты, эритроциты, комплемент), перегружены, как это представляется в проведенных экспериментах, то комплексы откладываются в тканях, включая головной мозг и стенки кровеносных сосудов (гиперчувствительность III типа). Крупные иммунные комплексы могут формироваться в легких и удаляются из кровотока в печени, селезенке и способны запускать механизмы воспалительных процессов. При непосредственном взаимодействии с базофилами и тромбоцитами (через FC-рецептор) они инду-

цируют высвобождение вазоактивных аминов и параллельно стимулируют макрофаги, вызывая выделение цитокинов ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1, играющих важную роль в развитии воспаления. Вместе с тем иммунные комплексы активируют систему комплемента с образованием анафилоксинов C3a и C5a. Эти фрагменты стимулируют выброс вазоактивных аминов и секрецию хемотаксических факторов тучными клетками и базофилами. Компонент C5a также служит хемоаттрактантом для базофилов, эозинофилов и нейтрофилов. Активация комплемента носит неадекватный характер и возникает порочный круг, влекущий дальнейшее повреждение тканей и усиление воспалительной реакции (Whaley, 1987; Napirei *et al.*, 2000; Ravetch, 2002). Данные, полученные при патологоанатомическом исследовании органов больных мышей, предполагают и такую возможность возникновения и прогрессии воспалительного процесса.

В заключение к проделанной работе можно сказать следующее. Индуктором всего многообразия возможных патологических явлений в организме экспериментальных мышей является фрагментированная экзогенная ДНК. Будучи вовлеченной в репаративный процесс при репарации ДЦР, индуцированных действием ЦФ, экзогенная ДНК нарушает правильный ход репаративного процесса, в частности в ККМ, что приводит к абберрантному митозу и гибели всей популяции костномозговых предшественников, ответственных за развитие иммунной системы мыши. Одновременно с исчезновением популяции уже существующих предшественников белого ростка кроветворения происходит разрушение функции CD34+ СКК производить потомков, формирующих этот росток. В организме перестают образовываться новые иммунные клетки. В таких условиях на фоне развивающегося системного сепсиса происходит иммунологический коллапс. Возникает полиорганная недостаточность, приводящая к растянутой во времени гибели экспериментальных животных.

## ЛИТЕРАТУРА

- Афанасьева Ю.И., Кузнецова С.Л., Юрина Н.А. Гистология, цитология и эмбриология. М.: Медицина, 2004. 768 с.  
Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии и гистологической техники. М.: Медицина, 1971. 272 с.  
Долгова Е.В., Николин В.П., Попова Н.А. и др. Интерна-

- лизация экзогенной ДНК во внутренние компартменты клеток костного мозга мышей // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012. Т. 16. № 2. С. 397–414.
- Долгова Е.В., Прокопенко А.В., Николин В.П. и др. Характеристика изменения количества умеренных повторов в геноме клеток костного мозга экспериментальных мышей на фоне инъекции циклофосфана и экзогенной ДНК человека // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2013. 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 // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2011. Т. 15. № 4. С. 674–689.
- Кругляков П.В., Соколова И.Б., Полицев Д.Г. Стволовые клетки дифференцированных тканей взрослого организма // Цитология. 2008. Т. 50. № 7. С. 557–567.
- Макгрегор Г., Варли Дж. Методы работы с хромосомами животных: Пер. с англ. М.: Мир, 1986. С. 31.
- Мейл Д., Бростофф Дж., Рот Д.Б., Ройтт А. Иммунология: Пер. с англ. М.: Логосфера, 2007. 568 с.
- Проскуряков С.Я., Гавай В.П., Конопляников А.Г. Иммунология некроза и апоптоза // Биохимия. 2005. Т. 70. С. 1593–1605.
- Рыкова Е.Ю., Лактионов П.П., Власов В.В. Активирующее влияние ДНК на иммунную систему // Усп. соврем. биологии. 2001. Т. 121. С. 160–171.
- Andrews N.W. Membrane repair and immunological danger // EMBO Rep. 2005. V. 6. No. 9. P. 826–830.
- Buckley R.H. Primary immunodeficiency diseases due to defects in lymphocytes // N. Engl. J. Med. 2000. V. 343. No. 18. P. 1313–1324.
- Coban C., Koyama S., Takeshita F. *et al.* Molecular and cellular mechanisms of DNA vaccines // Hum. Vaccin. 2008. V. 4. P. 453–456.
- Cook R., Wu C.C., Kang Y.J., Han J. The role of the p38 pathway in adaptive immunity // Cell. Mol. Immunol. 2007. V. 4. No. 4. P. 253–259.
- De Gregorio E., Rappuoli R. Inside sensors detecting outside pathogens // Nat. Immunol. 2004. V. 5. No. 11. P. 1099–1100.
- Decker P., Wolburg H., Rammensee H.G. Nucleosomes induce lymphocyte necrosis // Eur. J. Immunol. 2003. V. 33. No. 7. P. 1978–1987.
- Decker P., Singh-Jasuja H., Haager S. *et al.* Nucleosome, the main autoantigen in systemic lupus erythematosus, induces direct dendritic cell activation via a MyD88-independent pathway: consequences on inflammation // J. Immunol. 2005. V. 174. No. 6. P. 3326–3334.
- 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.
- Fugmann S.D. RAG1 and RAG2 in V(D)J recombination and transposition // Immunol. Res. 2001. V. 23. No. 1. P. 23–39.
- Harty J.T., Tvinnereim A.R., White D.W. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection // Annu. Rev. Immunol. 2000. V. 18. P. 275–308.
- Ishii K.J., Akira S. Innate immune recognition of, and regulation by, DNA // Trends Immunol. 2006. V. 27. P. 525–532.
- Kaufmann S.H., Schaible U.E. Antigen presentation and recognition in bacterial infections // Curr. Opin. Immunol. 2005. V. 17. No. 1. P. 79–87.
- Kotnis A., Du L., Liu C. *et al.* Non-homologous end joining in class switch recombination: the beginning of the end // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2009. V. 364. No. 1517. P. 653–665.
- Krishan A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining // J. Cell Biol. 1975. V. 66. No. 1. P. 188–193.
- 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.
- Lekstrom-Himes J.A., Gallin J.I. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes // N. Engl. J. Med. 2000. V. 343. No. 23. P. 1703–1714.
- Martin D.A., Elkon K.B. Intracellular mammalian DNA stimulates myeloid dendritic cells to produce type I interferons predominantly through a toll-like receptor 9-independent pathway // Arthritis Rheum. 2006. V. 54. P. 951–962.
- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response // Nature. 2007. V. 449. No. 7164. P. 819–826.
- Merrell D.S., Falkow S. Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis // Nature. 2004. V. 430. No. 6996. P. 250–256.
- Monack D.M., Mueller A., Falkow S. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system // Nat. Rev. Microbiol. 2004. V. 2. No. 9. P. 747–765.
- Napirei M., Karsunky H., Zevnik B. *et al.* Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice // Nat. Genet. 2000. V. 25. No. 2. P. 177–181.
- Orkin S.H., Zon L.I. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology // Cell. 2008. V. 132. No. 4. P. 631–644.
- Ravetch J.V. A full complement of receptors in immune complex diseases // J. Clin. Invest. 2002. V. 110. No. 12. P. 1759–1761.
- Rosen F.S., Cooper M.D., Wedgwood R.J. The primary immunodeficiencies // N. Engl. J. Med. 1995. V. 333. No. 7. P. 431–440.
- Rossi D.J., Jamieson C.H., Weissman I.L. Stem cells and the pathways to aging and cancer // Cell. 2008. V. 132. No. 4. P. 681–696.
- Rouse B.T., Suvas S. Regulatory cells and infectious agents: detentes cordiales and contraire // J. Immunol. 2004. V. 173. No. 4. P. 2211–2215.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Shirota H., Ishii K.J., Takakuwa H., Klinman D.M. Contribution of interferon-beta to the immune activation induced by double-stranded DNA // Immunology. 2006. V. 118. P. 302–310.



- Silva J., Smith A. Capturing pluripotency // *Cell*. 2008. V. 132. No. 4. P. 532–536.
- Takeshita F., Ishii K.J. Intracellular DNA sensors in immunity // *Curr. Opin. Immunol.* 2008. V. 20. P. 383–388.
- 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.
- Warren J.S., Yabroff K.R., Remick D.G. *et al.* Tumor necrosis factor participates in the pathogenesis of acute immune complex alveolitis in the rat // *J. Clin. Invest.* 1989. V. 84. No. 6. P. 1873–1882.
- Whaley K. Complement and immune complex diseases // *Complement in Health and Disease* / Ed. K. Whaley. Lancaster: MTP Press Ltd, 1987.
- Yu J., Thomson J.A. Pluripotent stem cell lines // *Genes Dev.* 2008. V. 22. No. 15. P. 1987–1997.

## PATHOLOGICAL CHANGES IN MICE TREATED WITH CYCLOPHOSPHAMIDE AND EXOGENOUS DNA

**E.V. Dolgova<sup>1</sup>, V.P. Nikolin<sup>1</sup>, N.A. Popova<sup>1</sup>, A.S. Proskurina<sup>1</sup>, K.E. Orishchenko<sup>1</sup>, E.A. Alyamkina<sup>1</sup>, Ya.R. Efremov<sup>1</sup>, S.I. Baiborodin<sup>1</sup>, E.R. Chernykh<sup>2</sup>, A.A. Ostanin<sup>2</sup>, S.S. Bogachev<sup>1</sup>, T.S. Gvozdeva<sup>3</sup>, E.M. Malkova<sup>4</sup>, O.S. Taranov<sup>4</sup>, V.A. Rogachev<sup>1</sup>, A.S. Panov<sup>5</sup>, S.N. Zagrebelnyi<sup>5</sup>, M.A. Shurdov<sup>6</sup>**

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

<sup>2</sup> Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk, Russia;

<sup>3</sup> Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia;

<sup>4</sup> Research Center for Virology and Biotechnology Vector, Koltsovo, Russia;

<sup>5</sup> WellsStar College of Health & Human Services,

Kennesaw State University Kennesaw, Georgia, USA;

<sup>6</sup> Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia;

<sup>7</sup> OOO Panagen, Gorno-Altaysk, Russia

### Summary

The synergic action of the cytostatic drug cyclophosphamide (CP) and fragmented exogenous DNA causes illness and death in mice (Dolgova *et al.*, 2011–2013). The observed «delayed death» effect was most clearly pronounced when the DNA preparation was administered 18 to 30 hours after CP treatment. This time span is designated as «death window».

It was found that injections of exogenous DNA result in sustained increase in bone marrow cell (BMC) apoptosis, which occurs throughout the time of DNA administration (18–30 hours). Exogenous DNA, both allogeneic and belonging to various taxa induces BMCs apoptosis. Plasmid DNA has the greatest effect on apoptosis induction.

The analysis of reduction and restoration of BMC subpopulations as the mice progressed to death revealed a virtually complete loss of the 12–20-mkm fraction of the cell population (about 3–4 % vs. 35–40 % in the control), which corresponds to the maximum leukopenia on day 3 after CP treatment. However, the relative amount of CD34+ hematopoietic stem cells (HSCs) from day 15 and till the end of the observation constituted 1,2–1,4 %, which corresponds to the wild-type range. Comparison of BMC smears from the sternal bone marrow of the CP and CP+DNA groups of mice indicates that the BMC populations isolated from CP+DNA animals lack young committed lymphopoiesis progenitor cells. Moreover, the affected mice had immature blast cell types in their blood, which was never observed in healthy or CP-treated mice.

Pathological and morphological analyses show that starting from posttreatment day 9, mice that received CP+DNA preparations displayed pronounced morphological changes in their lungs, liver, pancreas, central and peripheral immune system organs, and brain. Most of the pathological changes observed are consistent with severe inflammatory response. This suggestion is proven by structural equivalents of functional involution of lymphoid organs, such as thymus, spleen, and lymph nodes.

We speculate that the death of treated animals resulted from multiple organ dysfunctions caused by accidental involution of lymphoid organs and the systemic inflammatory response syndrome, both associated with injections of fragmented exogenous DNA into experimental animals within the «death window», which corresponds to the final step in the repair of the majority of CP-induced double-strand breaks.

**Key words:** cyclophosphamide, exogenous DNA, bone marrow cells, apoptosis, systemic inflammation, accidental involution of lymphoid organs.

УДК 577.95;575;592/599

## РЕДЕРИВАЦИЯ ПУТЕМ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНОВ ЛИНИЙ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ И КРЫС

© 2013 г. С.Я. Амстиславский<sup>1,2</sup>, Т.Н. Игонина<sup>1</sup>, И.Н. Рожкова<sup>1</sup>,  
Е.Ю. Брусенцев<sup>1</sup>, А.А. Роговая<sup>2</sup>, Д.С. Рагаева<sup>2</sup>, В.А. Напримеров<sup>1,3</sup>,  
Е.А. Литвинова<sup>1</sup>, И.Ф. Плюснина<sup>1,2</sup>, А.Л. Маркель<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,  
Новосибирск, Россия;

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования Новосибирский государственный  
аграрный университет, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 17 сентября 2012 г. Принята к публикации 12 декабря 2012 г.

Редеривация позволяет очистить колонии лабораторных мышей и крыс от специфических патогенов и перевести их в SPF (specified pathogen free) статус. В данной работе приведены результаты редеривации двух уникальных линий крыс, селекционированных в ИЦиГ СО РАН: ручных крыс-пасюков, крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ) и линии мышей ICR. SPF-статус редеривированных крыс был подтвержден при помощи животных-индикаторов, называемых также сентинелами (sentinel animals). В статье предложена оптимизированная модель редеривации лабораторных животных, которая включает в себя набор эмбриотехнологических методов, таких, как замораживание и криоконсервация эмбрионов, их очистка путем отмывки в стерильных средах, культивирование 48 ч и, наконец, трансплантация реципиентам (SPF-статуса). В результате применения этой модели по отношению к мышам линии ICR удалось получить 39 потомков, рожденных в условиях SPF-вивария. Следует отметить, что эффективность процедуры вполне соответствует международным стандартам, причем все три линии демонстрировали характерный фенотип после прохождения всех процедур редеривации.

**Ключевые слова:** крысы НИСАГ, ручные крысы, мыши ICR, трансплантация эмбрионов, редеривация.

### ВВЕДЕНИЕ

По мере повышения стандартов в биологических исследованиях все большее значение уделяется животным SPF-статуса. Работа на таких животных позволяет получать более точные результаты, а также уменьшить число экспериментальных животных в группах за счет уменьшения неконтролируемой изменчивости (Nicklas *et al.*, 2002; Shek, 2008). Поскольку имеется много ценных в генетическом отношении линий мышей и крыс, по-прежнему разводимых в конвенциональных условиях, актуальной задачей является

освобождение этих линейных животных от патогенов и перевод их в SPF-статус (редеривация) (Morrell, 1999; Брусенцев и др., 2011).

В то же время не существует единого способа редеривации. Иногда для этих целей применяют подсадку новорожденных мышат от инфицированной линии приемным матерям неинфицированной линии (Watson *et al.*, 2005; Artwohl *et al.*, 2008; Yeom *et al.*, 2009). Другой распространенный способ заключается в том, что еще не родившихся, но практически сформированных особей извлекают путем гистерэктомии из доноров непосредственно перед

родами и отдают на вскармливание суррогатным матерям SPF-статуса (Marcotte *et al.*, 1996; Masy *et al.*, 2000; Glage *et al.*, 2007). Эти методы до сих пор применяют в ряде лабораторий, хотя они не обеспечивают полной защиты от патогенов, проникающих через фето-плацентарный барьер, т. е. существует риск заражения плода от матери (Le Monnier *et al.*, 2006). Экспериментально показано, например, что подсадка новорожденных мышат на воспитание приемным матерям SPF-статуса позволяет избавиться лишь от некоторых вирусных и бактериальных инфекций, другие вирусы (такие, как murine poxvirus) и бактерии (*Helicobacter hepaticus*) при этом не устраняются (Yeom *et al.*, 2009).

Трансплантация эмбрионов в сочетании с их отмывкой в стерильных средах позволяет избавиться от подавляющего большинства известных патогенов, и этот способ в настоящее время является наиболее распространенным для редеривации лабораторных животных в ведущих генетических центрах мира в силу своей технологичности, воспроизводимости и эффективности в отношении подавляющего большинства изученных патогенов (Carthew *et al.*, 1983; Homberger, 1997; Morrell, 1999; Rall *et al.*, 2000; Van Keuren, Saunders, 2004; Ike *et al.*, 2007; Fray *et al.*, 2008).

Несмотря на то что редеривация путем трансплантации эмбрионов считается «золотым стандартом» для очистки линий мышей и крыс от патогенов и придания им SPF-статуса (Mahabir *et al.*, 2008), эмбриотрансплантацию часто сочетают с другими эмбриотехнологическими процедурами, такими, как криоконсервация эмбрионов (Morrell, 1999) или экстракорпоральное оплодотворение (Suzuki *et al.*, 1996; Mahabir *et al.*, 2009).

Задачей данной работы был перевод в SPF-статус двух уникальных линий крыс, полученных путем селекции в ИЦиГ СО РАН, а именно ручных крыс-пасюков, представляющих собой модель доместикационного процесса (Plyusnina *et al.*, 2011), и крыс НИСАГ, являющихся генетической моделью артериальной гипертензии (Маркель, 1985; Markel *et al.*, 1999). Другой задачей данной работы были выбор и оптимизация модели редеривации. С этой целью был проведен эксперимент по редеривации мышей линии ICR, причем модель редеривации

включала как классическую отмывку эмбрионов путем проводки через стерильные среды, так и замораживание/криоконсервацию, размораживание и культивирование эмбрионов в течение двух суток перед трансплантацией. Были исследованы такие параметры, влияющие на эффективность данной модели, как унилатеральная/билатеральная трансплантация, а также синхронизация в развитии эмбриона и стадии псевдобеременности реципиента.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Экспериментальные животные: редеривуемые линии мышей и крыс

**Ручные крысы-пасюки.** Линия ручных крыс-пасюков была получена путем селекции на отсутствие агрессии по отношению к человеку из диких серых крыс-пасюков *Rattus norvegicus* (Plyusnina *et al.*, 2009, 2011). Отбор осуществлялся на основе теста на перчатку, в котором оценку поведения по отношению к человеку проводили по балльной системе (Naumenko *et al.*, 1989; Plyusnina, Oskina, 1997). Работа проведена на линии ручных крыс 12-го поколения инбредных скрещиваний (общее число поколений селекции – 75). Характерной особенностью поведения крыс этой линии является высокая толерантность к взятию их в руки, средний балл поведенческой реакции на человека крыс-доноров составлял  $+3,30 \pm 0,01$  при максимальной балльной оценке +4.

**Крысы линии НИСАГ.** Линия крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ) (Маркель, 1985; Markel *et al.*, 1999) является признанной в мире оригинальной моделью гипертонической болезни человека (Rapp, 2000). В работе были использованы крысы инбредной сублинии альбиносов 77-го поколения селекции. Важнейшей характеристикой крыс линии НИСАГ является повышенное артериальное давление (АД) (Маркель, 1985; Markel *et al.*, 1999; Амстиславский и др., 1999). Имеются выраженные онтогенетические и половые различия этого показателя у крыс НИСАГ. У молодых самцов НИСАГ в возрасте 1,5 месяца среднее АД в покое достигает 150 мм рт. ст., а у взрослых 4-месячных самцов оно составляет уже

170 мм рт. ст.; после достижения этого уровня АД самцов крыс НИСАГ меняется мало, оставаясь примерно на этом же уровне и у стареющих животных в возрасте 8 месяцев (Амстиславский, 2006). В то же время у взрослых самок среднее АД в покое лишь слегка превышает 150 мм рт. ст. (Амстиславский и др., 1999). Артериальное давление, измеренное в покое, у взятых в эксперимент самок-доноров крыс линии НИСАГ было  $156,3 \pm 5,9$  мм рт. ст.

**Мыши ICR.** Аутбредные мыши линии ICR отличаются высокой плодовитостью и низким уровнем эмбриональной смертности (Карих и др., 1999). Часто используются в качестве доноров эмбрионов и/или матерей-реципиентов (Luo *et al.*, 2011; Omar Farouk *et al.*, 2011; Kolbe *et al.*, 2012), а также в качестве животных-индикаторов микробиологического статуса (Williams *et al.*, 2005; Baze *et al.*, 2006; Lindstrom *et al.*, 2011).

Линейные крысы («ручные» и НИСАГ) и мыши (ICR) – доноры эмбрионов содержались в условиях конвенционального вивария при естественном освещении, свободном доступе к сбалансированному корму и воде.

### Животные-реципиенты

В качестве реципиентов для трансплантации эмбрионов линии ручных крыс были использованы линейные крысы Sprague-Dawley SPF-статуса, полученные из контролируемого источника (питомник лабораторных животных «Пушино», Россия). Эти крысы характеризуются высокой плодовитостью и хорошими показателями материнской заботы (Holinka, Carlson, 1976; Chapin *et al.*, 1993; Wilkinson *et al.*, 2000).

В качестве реципиентов для трансплантации эмбрионов после процедур редеривации крыс НИСАГ из сублинии альбиносов использованы редеривированные крысы ручной линии, полученные в условиях SPF-вивария.

В качестве реципиентов для трансплантации эмбрионов после процедур редеривации мышей линии ICR были использованы межлинейные гибриды F1, рожденные в условиях SPF-вивария в результате скрещивания линий C57BL, и BALB/c, завезенные из контролируемого источника (питомник лабораторных животных

«Пушино», Россия). Все животные-реципиенты содержались в SPF-виварии ИЦиГ СО РАН при круглогодичных стандартных параметрах условий содержания в соответствии с требованиями GLP: комфортной температуре 22–24 °С, свободном доступе к пище и воде и режиме освещения 12 ч день – 12 ч ночь.

### Схема редеривации линейных мышей и крыс

**Линия ручных крыс-пасюков.** Эмбрионы ручных крыс-пасюков получали после забоя животных путем дислокации шейных позвонков и последующего извлечения репродуктивных органов. Эмбрионы вымывали из яйцеводов и матки и оценивали при помощи стереомикроскопа МБС 10 (ЛЗСОС, Россия) в условиях стерильного бокса вивария конвенциональных животных ИЦиГ СО РАН, помещали в соломинку и переносили в редеривационный блок SPF-вивария, где проводили первичную отмывку эмбрионов перед передачей в лабораторию. В лаборатории эмбрионы отмывали от возможных патогенов путем последовательной проводки по одному эмбриону через 10 пассажей на свежую стерильную среду EMCARE Holding Solution (ICPbio reproduction, США), содержащую антибиотики в соответствии с рекомендациями (Stringfellow *et al.*, 1998). Процедура отмывки занимала в среднем 30 мин. Сразу после отмывки эмбрионы трансплантировали подготовленным крысам-реципиентам, как описано в соответствующем разделе.

**Крысы линии НИСАГ.** Редеривация крыс линии НИСАГ происходила согласно схеме, описанной выше для крыс-пасюков ручной линии, с тем существенным отличием, что процессы получения и трансплантации эмбрионов были разобщены, так как эмбрионы замораживали в соответствии с описанной ниже стандартной программой замораживания и хранили в криобанке при температуре жидкого азота. Через 2–20 недель после криохранения эмбрионы размораживали и в дальнейшем проводили процедуры очистки и трансплантации в соответствии с вышеописанной схемой для крыс-пасюков ручной линии.

**Мыши линии ICR.** Редеривация мышей линии ICR происходила согласно схеме, описан-

ной выше для крыс линии НИСАГ, т. е. после получения эмбрионов производили сначала их замораживание и криоконсервацию, а лишь затем подвергали дальнейшим процедурам редеривации. Однако имелось два весьма существенных отличия от протокола, примененного нами для крыс линии НИСАГ. Первое отличие заключалось в том, что эмбрионы мышей в отличие от эмбрионов крыс после проведения процедур отмывки не трансплантировали, а культивировали 48 ч, как описано ниже. После культивирования отбирали для трансплантации те эмбрионы, которые развивались в культуре и достигли стадии бластоцисты. Второе отличие заключалось в том, что во время проводки (отмывки) через стерильные среды эмбрионы находились на подогреваемом столике (НТ 007, Minitube, Германия).

#### **Получение преимплантационных эмбрионов**

Проводили контролируемое спаривание самок-доноров с самцами той же линии в возрасте 2–4 мес. Определение фертильного спаривания проводили по наличию сперматозоидов во влагалищных мазках (у крыс) и по наличию влагалищных пробок (у мышей) согласно стандартной методике (Hogan *et al.*, 1986). Для получения преимплантационных эмбрионов на стадии морулы эмбрионы вымывали через 96 ч после оплодотворения (4-й день) у крыс и через 72 ч (3-й день) у мышей. Яйцеводы и матку промывали средой для вымывания эмбрионов EMCARE Complete Ultra Flushing Solution (ICPbio reproduction, США). Полученные эмбрионы оценивали при помощи микроскопа МБС-10 (Россия), при этом производили первичную выбраковку и переносили через 2–3 капли среды EMCARE Holding Solution (ICPbio reproduction, США). Затем эмбрионы помещали в соломины 0,25 мл (IMV Technologies, Франция) в среде EMCARE Holding Solution (ICPbio reproduction, США) в случае крыс-пасюков или в среде с криопротектором этиленгликолем (EMCARE Ethylene Glycol 1,5 M, ICPbio reproduction, США) в случае крыс НИСАГ и мышей ICR. Далее соломины транспортировали в блок редеривации SPF-вивария, где проводили дезинфекцию соломин путем об-

работки 70 %-м раствором спирта и подвергали замораживанию и криоконсервации, по методу описанному ниже.

#### **Замораживание и криоконсервация эмбрионов**

Полученные из конвенционального вивария соломины с эмбрионами в криопротекторе (EMCARE Ethylene Glycol 1,5 M, ICPbio reproduction, США) замораживали в соответствии со «стандартным методом» быстрого программного замораживания (Leibo, Songsasen, 2002) на установке CL 8800 (Cryologic, Австралия). Эмбрионы после инкубации с этиленгликолем при комнатной температуре помещали в соломину, которую загружали в программный замораживатель. Замораживание начиналось при температуре +18 °С. Соломины с эмбрионами выдерживали при этой температуре одну минуту, после чего охлаждали до –7 °С со скоростью 1 °С в минуту. Через одну минуту после достижения этой температуры производили «сидинг» путем прикосновения к соломине переохлажденным пинцетом и выдерживали 9 мин при этой температуре. Затем охлаждали соломины с эмбрионами со скоростью 0,3 °С в минуту до температуры –35 °С, выдерживали 10 мин при этой температуре и быстро помещали в жидкий азот.

Замороженные эмбрионы хранили в жидком азоте до дня постановки на культивирование или трансплантации их самкам-реципиентам.

#### **Размораживание эмбрионов, их очистка и отбор**

Соломины с замороженными эмбрионами доставали из жидкого азота и опускали на 10 с в водяную баню, нагретую до 37 °С. Затем проводили отмывку размороженных эмбрионов путем проведения их через 10 капель стерильной, содержащей антибиотика, среды EMCARE Holding Solution (ICPbio reproduction, США), после чего отбирали эмбрионы хорошего и отличного качества без повреждений в прозрачной оболочке в соответствии с рекомендациями (Stringfellow *et al.*, 1998). Отобранные эмбрионы подготавливали к трансплантации (крысы) или культивированию (мыши).

### Культивирование эмбрионов мышей

В чашку Петри помещали капли среды M16 (Sigma) объемом 50 мкл, покрывали их парафиновым маслом и ставили в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 12 ч для уравнивания. Размороженные и отмытые в 10 каплях стерильной среды эмбрионы мышей линии ICR переносили в ранее подготовленные и уравновешенные в условиях 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °С и 80 %-й влажности капли со средой для культивирования и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Эмбрионы культивировали в течение 48 ч, после чего отбирали развивающиеся эмбрионы на стадии бластоцисты для дальнейшей трансплантации самкам-реципиентам.

### Оценка жизнеспособности эмбрионов путем флюоресцентного окрашивания

Жизнеспособность эмбрионов крыс оценивали до замораживания (свежеполученные эмбрионы) и после криоконсервации (в пределах 30–40 мин после оттаивания) методом двойной окраски флюоресцентными красителями: диацетатом флюоресцеина (FDA – fluorescein diacetate Sigma) и йодистым пропидием (PI – propidium iodide, Sigma) (Jones, Senft, 1985). При применении данного метода в одном эмбрионе можно видеть как живые бластомеры, окрашенные диацетатом флюоресцеина, так и мертвые бластомеры, окрашенные йодистым пропидием.

Для возбуждения и детекции флюоресцентного сигнала после экспозиции эмбрионов в растворе FDA использовались фильтр возбуждения 470/40 нм и фильтр эмиссии 525/50 нм. Для возбуждения и детекции флюоресцентного сигнала после экспозиции эмбрионов в растворе PI использовались соответственно фильтры 545/30 нм и 620/60 нм.

Для приготовления маточных растворов флюоресцентных красителей 0,002 г диацетата флюоресцеина растворяли в 200 мл ацетона и 0,0125 г йодистого пропидия растворили в 25 мл фосфатного буфера. Эмбрионы крыс отмывали в 3 каплях среды EMCARE Holding Solution (ICRbio reproduction, США) и затем в 2 каплях фосфатно-солевого буфера (PBS, Sigma). Затем эмбрионы переносили в 0,25 мл PBS и в затемненном помещении добавляли 10 мкл

маточного раствора йодистого пропидия и 10 мкл маточного раствора диацетата флюоресцеина, выдерживали в течение 3–4 мин, после чего производили визуальную оценку и фотографирование эмбрионов при помощи флюоресцентного микроскопа Leica M205FA (Leica Microsystems, Germany).

Эмбрионы, у которых все бластомеры флюоресцировали зеленым, считали жизнеспособными (Mohr, Trounson, 1980). Те эмбрионы, у которых во время оценки на световом микроскопе были выявлены повреждения и при окрашивании йодистым пропидием имелись флюоресцирующие в красной области спектра бластомеры, считали нежизнеспособными (Сайфитдинова, 2008).

### Трансплантация эмбрионов самкам-реципиентам

Проводили контролируемое спаривание самок-реципиентов с фертильными самцами (крысы) или со стерильными самцами (мыши) в SPF-зоне с целью получения беременных и псевдобеременных животных SPF-статуса. Первым днем беременности считали день обнаружения сперматозоидов в мазке у крыс, а первым днем псевдобеременности считали день появления влажной пробки у мышей.

Трансплантацию эмбрионов производили в рог(а) матки реципиента согласно стандартной методике (Hogan *et al.*, 1986). Для трансплантации крысиных эмбрионов использовали самок-реципиентов 4-го дня беременности (считая день покрытия первым днем). Животных наркотизировали, затем вводили подкожно 0,02 мл амоксициллина (амоксициллина тригидрат, 150 мг/мл). Готовили операционное поле согласно правилам асептики: сбрасывали шерсть в зоне операционного поля и обрабатывали кожу 70 %-м раствором спирта. Применяли правосторонний вертикальный оперативный доступ: самку клали на левый бок и делали разрез кожи и подлежащего мышечного слоя в области расположения матки (в дорзо-вентральном направлении на 5 мм каудальнее нижних ребер). Пинцетом захватывали подушку сальника и извлекали наружу вместе с яичником, яйцеводом и верхним отделом матки. На место перехода яйцевода в рог матки накладывали лигатуру

и с помощью стерильного капилляра вводили в матку 6–10 эмбрионов, предварительно отмытых в стерильных средах. Разрез зашивали узловым швом и припудривали антибиотиком (амоксициллина тригидрат), затем обрабатывали операционный шов бетедином. В качестве реципиентов для трансплантации эмбрионов от ручных серых крыс использовали самок линии Sprague-Dawley, спаренных с самцами той же линии. Потомков редеривуемой линии в помете отличали по серой окраске шерсти, так как собственные потомки линии Sprague-Dawley имели белую окраску шерсти. В качестве реципиентов для трансплантации эмбрионов от крыс НИСАГ использовали самок линии ручных крыс-пасюков, спаренных с самцами той же линии. Потомков редеривуемой линии в помете отличали по белой окраске шерсти, так как собственные потомки линии ручных крыс-пасюков имели серую окраску шерсти.

Самки-реципиенты мышинных эмбрионов были разделены на 3 группы: первая группа – 3-й день псевдобеременности, трансплантация 10–12 эмбрионов в 1 рог матки; вторая группа – 3-й день псевдобеременности, трансплантация по 7–9 эмбрионов в оба рога матки; третья группа – 4-й день псевдобеременности, трансплантация по 7–9 эмбрионов в оба рога матки. Хирургическую операцию проводили в том же порядке, что и на крысах, однако не накладывали лигатуру в области перехода яйцевода в матку. Поскольку мышинные эмбрионы трансплантировали псевдобеременным самкам, все рожденные потомки были получены из трансплантированных эмбрионов.

Для поддержания температуры тела в оптимальном режиме (в целях избегания переохлаждения) наркотизированные животные во время операции находились при температуре 37 °С на подогреваемом операционном столике.

### Наркоз

Крыс-реципиентов наркотизировали путем внутрибрюшинного введения 0,1 мг/кг медетомедина гидрохлорида (Domitor 1 mg/ml, Orion-Corporation, Finland) и через 10 мин – 12,5 мг/кг золетила (Zoletil, Virbac Sante Animale, Франция).

Мышей-реципиентов наркотизировали путем внутрибрюшинного введения 0,25 мг/кг медетомедина гидрохлорида и через 10 мин – 50 мг/кг золетила.

### Оценка микробиологического статуса потомков редеривуемых линий с помощью иммунодефицитных животных-«индикаторов»

Самки-реципиенты вместе с рожденными потомками находились в карантинном блоке, где они проходили проверку на наличие патогенов. Контроль микробиологического статуса редеривированных животных в ЦКП «SPF-виварии» ИЦиГ СО РАН проводили с использованием иммунодефицитных животных-«индикаторов» (sentinel) линии SCID (Weisbroth *et al.*, 1998; Каркищенко, Грачева, 2010). Иммунодефицитные, атимичные, мыши не устойчивы к любой паразитарной атаке, что приводит к развитию у них признаков болезненного поведения и приводит к гибели или развитию патологии внутренних органов, а также к появлению спонтанных новообразований (Каркищенко, Грачева, 2010). Двух иммунодефицитных мышей с известным микробиологическим статусом линии SCID в возрасте 6 недель помещали в отдельные индивидуально вентилируемые клетки и в течение 6 недель экспонировали подстилкой дважды в неделю из 10 клеток редеривированных крыс линии ручных серых крыс (Weisbroth *et al.*, 1998). По окончании экспозиции проводили эвтаназию углекислым газом, брали мазок на липкую ленту с анальной области, кусочек шерсти, проводили патологоанатомическое вскрытие, извлекали кишечник, делали смыв из легкого и ротовой полости. Из клетки собирали образцы фекальных шариков для определения наличия яиц эндопаразитов методом флотации (Weisbroth *et al.*, 1998; Reuter, Dysko, 2003; Каркищенко, Грачева, 2010). По результатам проведения всех тестов на экто-, эндопаразитов, наличие/отсутствие клинических проявлений бактериальной и вирусной инфекций и результатам патологоанатомического вскрытия мышей линии SCID делали заключение о микробиологическом статусе редеривированных крыс линии ручных пасюков.



### **Оценка линейных характеристик редеривированных животных**

Характерной особенностью поведения серых крыс ручной линии является высокая толерантность к взятию их в руки (Plyusnina *et al.*, 2009, 2011). Оценку этого поведенческого показателя проводили по балльной системе в тесте на перчатку (Plyusnina, Oskina, 1997). Потомков от рожденных трансплантантов обоих полов в возрасте 2 мес. тестировали на перчатку.

Для измерения базального артериального давления (АД) у крыс линии НИСАГ применяли сфигмографический метод (tail-cuff method) (Bunag, 1984). С этой целью у крыс, находящихся под легким эфирным наркозом, регистрировали пульс хвостовой артерии при помощи чувствительного датчика, соединенного с осциллографом. Затем в манжету, надетую на хвост, нагнетался воздух и при помощи манометра определяли давление в манжете в момент исчезновения пульсовой волны. Этот принцип является общепринятым при измерении систолического АД у крыс. АД измеряли у 2–3-месячных самцов крыс линии НИСАГ, полученных от скрещивания самцов и самок, прошедших редеривацию в SPF-виварии. В качестве сравнения использовали крыс линии НИСАГ из конвенционального вивария.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

### **Проверка жизнеспособности эмбрионов мышей и крыс после примененных процедур замораживания–криоконсервации–оттаивания**

**Культивирование эмбрионов мышей после криоконсервации для проверки их жизнеспособности.** Всего было исследовано 77 эмбрионов, извлеченных у мышей линии ICR на третий день после спаривания на стадии дробления (до морулы включительно) и прошедших полный цикл замораживания–криоконсервации–оттаивания, из них 76 поставлено на культивирование (рис. 1, а).

Из поставленных на культивирование зародышей через 48 ч нахождения в культуре 54 эмбриона достигли стадии бластоцисты, причем бластоцисты были как ранние, так и

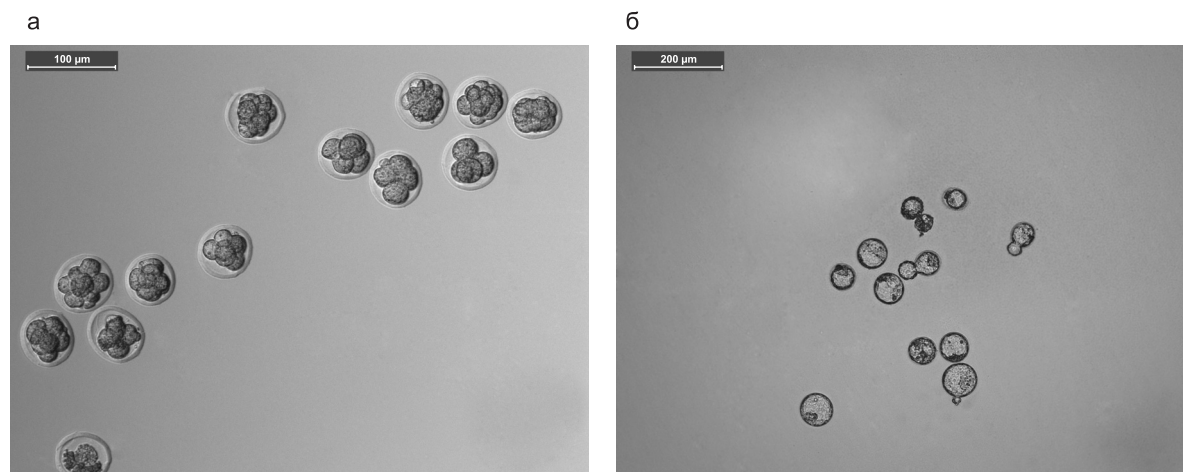
поздние, включая стадии вылупляющейся и вылупившейся бластоцисты (рис. 1, б), что является объективным показателем того, что эти эмбрионы сохранили жизнеспособность после криоконсервации. Остальные эмбрионы не развивались и дегенерировали через 48 ч, т. е. они не пережили процедуры криоконсервации.

Этот эксперимент был сделан в 4 независимых группах эмбрионов в разные дни, и в каждом из повторов было взято 12–25 зародышей. Доля развивающихся зародышей по четырем независимым повторам составила  $72,6 \pm 7,6\%$ . Таким образом, обобщенные цифры по трем повторам свидетельствуют о том, что в среднем  $72,6\%$  всех зародышей мышей, прошедших процедуру замораживания и криоконсервации, сохраняют жизнеспособность и потенциал к дальнейшему развитию.

**Оценка жизнеспособности эмбрионов крыс до и после криоконсервации методами световой и флюоресцентной микроскопии.** Для проверки жизнеспособности эмбрионов крыс до и после замораживания и криоконсервации был использован метод инкубации с флюоресцентными красителями. Было разморожено и окрашено 23 эмбриона крыс линии НИСАГ. Из них 18 эмбрионов сохраняли жизнеспособность, как показал тест с витальным красителем FDA. У остальных эмбрионов крыс после замораживания и криоконсервации либо отсутствовала оболочка, либо были погибшие бластомеры, как показал тест инкубации с PI (такие бластомеры не окрашивались FDA, однако их ядра окрашивались PI) (рис. 2, а). Эксперимент по оценке жизнеспособности крыс после криоконсервации с помощью флюоресцентной микроскопии был проделан в трех повторах. Доля живых зародышей, определенная при помощи этого метода, составила в среднем  $79,35 \pm 6,40$  (рис. 2, а, б).

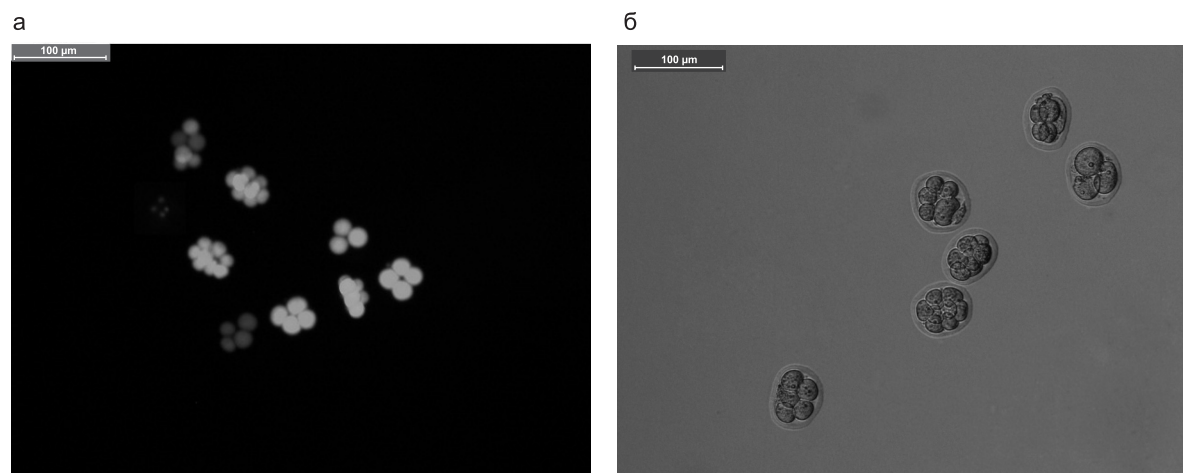
### **Эффективность различных процедур трансплантации эмбрионов при редеривации мышей линии ICR**

Эмбрионы мышей линии ICR были трансплантированы псевдобеременным гибридным самкам в трех группах. В группе, в которой эмбрионы не были подвергнуты культивированию, а после размораживания и стандартной



**Рис. 1.** Эмбрионы мышей линии ICR.

а – после замораживания и криоконсервации; б – после замораживания, криоконсервации и культивирования в течение 48 ч.



**Рис. 2.** Эмбрионы крысы после замораживания и криоконсервации.

а – флуоресцентная микроскопия после окраски с FDA (Sigma-Aldrich, США) и PI (Sigma-Aldrich, США); б – световая микроскопия.

десятикратной отмывки в стерильных средах были трансплантированы непосредственно в рог матки на третий день псевдобеременности, из 9 реципиентов лишь 2 принесли потомство, причем не более 3 потомков на родившую самку. В целом по этой группе лишь 4 эмбриона из 89 прошли полное развитие до рождения потомства (4,5 %).

В двух других экспериментальных группах доля эмбрионов, развившихся после трансплантации самкам-реципиентам до рождения, была достоверно выше, чем в первой группе (табл. 1).

В этих двух группах эмбрионы после размораживания перед трансплантацией реципиентам подвергали не только стандартной отмывке в стерильных средах, но и культивированию в течение 48 ч. Наилучшие результаты были получены в группе, в которой эмбрионы трансплантировали в один рог матки на третий день псевдобеременности реципиента. Из 7 самок 3 принесли потомство, причем число потомков в выводках было от 3 до 9. Именно в этой группе был зарегистрирован случай рекордно большого числа эмбрионов (90 %), родившихся после трансплантации одному

Таблица 1

Результаты редеривации/трансплантации эмбрионов мышей ICR гибридным реципиентам в разные дни псевдобеременности в один или оба рога матки после криоконсервации и культивирования *in vitro*

День псевдобеременности самки-реципиента	Число пересаженных эмбрионов	Число реципиентов		Число потомков		
		всего	родивших (доля от общего числа, %)	всего	разброс в группе родивших самок	доля развившихся потомков от общего числа пересаженных эмбрионов, %
Трансплантация эмбрионов в один рог матки (без культивирования)						
3	89	9	2 (22,2)	4	1–3	4,5
Трансплантация эмбрионов после культивирования <i>in vitro</i> в один рог матки						
3	79	7	3 (42,8)	15	3–9	18,9**
Трансплантация эмбрионов после культивирования <i>in vitro</i> в оба рога матки						
4	124	8	4 (50,0)	20	3–7	16,1*

Примечание. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  по сравнению с группой, в которой культивирование отсутствовало.

из реципиентов; этой самке-реципиенту было пересажено 10 эмбрионов и родилось 9 потомков. В целом по этой группе 15 эмбрионов из 79 трансплантированных прошли полное развитие до рождения потомства (18,9 %). В группе, в которой эмбрионы после размораживания, отмывки и культивирования пересаживали в оба рога матки на 4-й день псевдобеременности реципиентов, из 8 самок четыре принесли потомство. В целом по этой группе 20 эмбрионов из 124 трансплантированных прошли полное развитие до рождения потомства (16,1 %), причем величина выводков была от 3 до 7 потомков.

#### Линейные характеристики и микробиологический статус потомков после применения комплекса процедур редеривации на крысах

**Ручные крысы-пасюки.** После прямой трансплантации 38 эмбрионов ручных крыс 6 реципиентам два реципиента принесли потомство. Всего родилось 3 потомка ручных крыс, что составляет 7,9 % от числа пересаженных эмбрионов. Микробиологический статус этого потомства проверяли с помощью животных-индикаторов (сентинел) – линии мышей SCID. В течение 6-недельного срока у мышей линии SCID, в клетку к которым добавляли подстилку от редеривированных крыс, не наблюдалось

каких-либо признаков заболевания, и динамика увеличения веса соответствовала возрастным характеристикам, свойственным данной линии мышей. По окончании срока проверки мыши были подвергнуты эвтаназии. При вскрытии не было выявлено патологических изменений внутренних органов.

Путем обычного разведения (естественного размножения) в условиях SPF-вивария было получено следующее поколение от редеривированных крыс ручной линии. Животные этой группы были проанализированы в тесте на перчатку и показали высокие баллы ручного поведения. Средний балл по 12 самцам, рожденным после процедур редеривации в SPF-виварии, составил  $3,4 \pm 0,1$ . Средний балл по 13 самкам этой группы составил  $3,3 \pm 0,1$ .

Таким образом, тест с мышами-сентинелами подтвердил SPF-статус редеривированной линии ручных серых крыс, а проведенное тестирование продемонстрировало, что эти животные проявляют ручное поведение, характерное для данной линии.

**Крысы линии НИСАГ.** После трансплантации 90 эмбрионов крыс НИСАГ 9 реципиентам 3 самки реципиента принесли потомство. Всего родилось 6 потомков крыс линии НИСАГ, что составляет 6,7 % от числа пересаженных эмбрионов.

Путем естественного размножения в условиях SPF-вивария было получено следующее

поколение от редеривированных крыс данной линии. У 2-месячных самцов, полученных в результате такого разведения, был исследован уровень базального АД в покое в сравнении с самцами линии НИСАГ того же возраста и поколения селекции, полученными в условиях конвенционального вивария ИЦиГ СО РАН. У 7 самцов из группы редеривированных крыс НИСАГ среднее АД составило  $174,4 \pm 3,5$  мм рт. ст. У 12 самцов НИСАГ из конвенционального вивария среднее АД составило  $176,9 \pm 1,6$  мм рт. ст. Различий между этими группами обнаружено не было.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время как благодаря традиционной селекции, так и при помощи современных генноинженерных методов получено большое число различных линий мышей, моделирующих те или иные генетически обусловленные патологии человека (Abbott, 2004; Амстиславский, Трукшин, 2010). Одной из главных современных тенденций в экспериментальной работе на лабораторных животных является уменьшение числа экспериментальных животных за счет повышения их качества, так называемый принцип редукции (Festing, 2004). С этой целью конвенциональных животных подвергают редеривации, освобождая от патогенной нагрузки, и переводят в SPF-статус (Morrell, 1999; Sheck, 2008; Брусенцев и др., 2011).

С 1980-х годов перенос эмбрионов от доноров, несущих патогены, к «чистым» реципиентам SPF-статуса широко используется в качестве метода редеривации (Carthew *et al.*, 1983; Homberger, 1997; Morrell, 1999; Van Keuren, Saunders, 2004; Ike *et al.*, 2007; Fray *et al.*, 2008). Этот метод является многоэтапным, требующим четкой работы группы квалифицированных сотрудников (Брусенцев и др., 2011). Несмотря на длительность и трудоемкость, именно трансплантацию эмбрионов в сочетании с их многократной отмывкой в стерильных средах можно считать «золотым стандартом редеривации», т. е. оптимальным способом очистки животных от подавляющего большинства патогенов (Carthew *et al.*, 1983; Homberger, 1997; Morrell, 1999; Van Keuren, Saunders, 2004; Ike *et al.*, 2007; Fray *et al.*, 2008).

Очистка извлеченных эмбрионов непосредственно перед их трансплантацией осуществляется путем отмывания их в стерильной питательной среде. Эту процедуру обычно осуществляют путем переноса зародышей по одному из капли в каплю (Mahabir *et al.*, 2007). При работе с эмбрионами сельскохозяйственных животных существует достаточно жестко регламентированный протокол, при котором отмывание осуществляют последовательно через 10 капель (Stringfellow, 1998). При работе с лабораторными грызунами столь жесткого регламента нет (Mahabir *et al.*, 2008). В данной статье приведены результаты работы по редеривации двух линий крыс и одной линии мышей, что является частью плановой работы по переводу ценных и уникальных генотипов, имеющихся в коллекции ИЦиГ СО РАН, из конвенционального вивария в SPF-виварий ИЦиГ СО РАН. В ходе работы мы придерживались жесткого протокола, принятого для сельскохозяйственных животных, и эмбрионы перед трансплантацией отмывали путем 10-кратного переноса через капли стерильной среды EM-CARE Holding Solution (ICPbio reproduction, США). Данная среда содержит три антибиотика: стрептомицин, амфотерицин и канамицин (персональное сообщение д-ра Ла Фальцы, компания Инвитроген, 2011).

Эффективность используемого протокола очистки после прямой трансплантации эмбрионов от линии ручных крыс реципиентам линии Spague-Dawley была проверена на животных-«индикаторах» микробиологического статуса (сентинелы). Использование животных-индикаторов является хорошо апробированным методом мониторинга колоний лабораторных животных на наличие патогенов (Sheck, 2008). Установлено, что животные-индикаторы могут быть того же или другого вида и должны иметь известный микробиологический статус (Weisbroth *et al.*, 1998). В данном исследовании в качестве животных-индикаторов использовали бестимусных мышей линии SCID, свободных от условно-патогенной и патогенной флоры, SOPF-статуса. Голые бестимусные мыши являются прекрасными индикаторами, поскольку у них имеется выраженный иммунодефицит и они особенно чувствительны к воздействию патогенов (Каркищенко, Грачева,

2010). По результатам проведения всех тестов на экто-, эндопаразитов, наличие/отсутствие клинических проявлений бактериальной и вирусной инфекций и патологоанатомического вскрытия был подтвержден SPF-статус редуцированных крыс.

Кроме практических задач, а именно перевода в SPF-статус уникальных линий крыс, полученных в ИЦиГ СО РАН, целью данной работы была оптимизация модели редеривации лабораторных грызунов, причем эта часть исследования была проведена в основном на мышах линии ICR. Мышь является одним из самых распространенных видов животных в биомедицинских исследованиях (Taft, 2008). Предпосылками этому служат сходство геномов мыши и человека (Waterston *et al.*, 2002), а также небольшой размер, короткая беременность, высокие репродуктивные способности мыши и изученное в деталях преимплантационное развитие эмбрионов (Handyside, Hunter, 1986; Hardy, Spanos, 2002).

При редеривации линий лабораторных мышей часто кроме трансплантации эмбрионов и соответствующих отмывок в стерильных средах используют такие вспомогательные технологии, как криоконсервация зародышей и семени, ЭКО, культивирование определенных стадий развития зародышей и гамет (Suzuki *et al.*, 1996; Morrell, 1999; Mahabir *et al.*, 2009). При этом, однако, следует помнить, что всевозможные дополнительные манипуляции с зародышами и гаметами перед их трансплантацией реципиенту, как правило, снижают эффективность всей процедуры в целом (Hardy *et al.*, 2002). Между тем четко регламентированного общепринятого протокола при редеривации лабораторных мышей и крыс путем трансплантации нет (Брусенцев и др., 2011).

Известно, что у мышей эффективность трансплантации в оба рога матки выше, чем при трансплантации в один рог (Wiebold, Becker, 1987). Наши результаты не подтвердили (но и не опровергли) выводы ранних исследований на мышах. Достоверных различий в эффективности процедуры после трансплантации эмбрионов в оба или один рог матки получено не было, однако это может быть связано с тем, что группы были малочисленными, и необходимы дальнейшие исследования для окончательных выводов.

Этиленгликоль считается одним из наименее токсичных криопротекторов (Moore, Bonilla, 2006), что было экспериментально подтверждено при программном замораживании преимплантационных эмбрионов мыши на различных стадиях развития (Emiliani *et al.*, 2000). При программном замораживании дробящихся эмбрионов мышей с 1,2–1,5 молярным раствором этиленгликоля в качестве криопротектора и последующем их культивировании *in vitro* до стадии бластоцисты развивалось 66–76 % размороженных зародышей (Miyamoto, Ishibashi, 1977; Emiliani *et al.*, 2000), что сопоставимо с полученными нами в аналогичных условиях результатами культивирования (72,5 %).

Показано, что конечный результат замораживания и криоконсервации мышинных зародышей зависит не только от примененного протокола замораживания, но и от генетической конституции эмбриона (Schmidt *et al.*, 1987; Dinnyes *et al.*, 1995). В работе Schmidt с соавт. (1987), например, был использован сходный протокол программного замораживания, как и в наших исследованиях, хотя в качестве криопротектора применен глицерин, а не этиленгликоль. Авторы данной работы продемонстрировали различную выживаемость зародышей 24 различных линий и стоков мышей после процедур замораживания и криоконсервации. Выживаемость зародышей, оцениваемая в данном случае по развитию *in vitro*, была от 27 до 75 %, причем имела место характерная выживаемость для каждого генотипа (повторяемость результатов).

В нашем исследовании при трансплантации эмбрионов мышей после их криоконсервации, последующей 10-кратной отмывки и культивирования в течение 48 ч эффективность процедуры оказалась достоверно выше, чем в группе, в которой культивирование не проводили. Причем это возрастание эффективности комплекса процедур редеривации при добавлении этапа культивирования подтвердилось как при трансплантации в один рог матки, так и при трансплантации в оба рога матки самок-реципиентов. Достигнутая в результате добавления этапа культивирования эффективность процедуры вполне соответствует мировым стандартам. В частности, в работе J.M. Morrell (1999) для редеривации линий мышей при переводе их в SPF-статус использовали те же самые

процедуры, что и в нашем исследовании (криоконсервацию эмбрионов, их отмывку после размораживания и трансплантацию псевдобеременным самкам-реципиентам), но не проводили культивирование зародышей после их отмывки. Эффективность редеривации по соотношению рожденных потомков к числу пересаженных зародышей в нашем исследовании оказалась выше, но лишь в тех двух группах, в которых применяли культивирование зародышей (Morgell, 1999).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что культивирование зародышей непосредственно перед трансплантацией после их криоконсервации и 10-кратной отмывки способствует повышению эффективности процедуры в целом. Одним из вероятных объяснений этому может быть то, что после культивирования зародышей в применявшейся нами системе редеривации они находились в оптимальной стадии синхронизации с реципиентами, т. е. стадия развития эмбриона опережала стадию развития псевдобеременности реципиента. Именно такого рода небольшая разница по срокам развития между эмбрионом и реципиентом (в пользу эмбриона) считается оптимальной при трансплантации эмбрионов у лабораторных животных (Pfaff *et al.*, 2000).

Как показали результаты анализа, в тесте с окрашиванием флюорохромами и последующим флюоресцентно-микроскопическим анализом более 79 % крысиных зародышей сохраняют жизнеспособность после примененных нами процедур замораживания и криоконсервации, что соответствует данным литературы по замораживанию эмбрионов других линий крыс в сходных условиях с применением этиленгликоля в качестве криопротектора (Miyamoto, Ishibashi, 1977; Pfaff *et al.*, 2000). Тем не менее при последующей трансплантации таких эмбрионов процент развившихся до рождения крысят был низким. Одним из объяснений такого несоответствия результатов, полученных *in vitro* и *in vivo*, может быть токсичность этиленгликоля, применяемого нами в качестве криопротектора, по отношению к крысиным зародышам, поскольку некоторые авторы указывают на токсические эффекты экспозиции ранних эмбрионов в этиленгликоле, которые проявляются не сразу, а на поздних этапах развития зародыша крысы

(Klug *et al.*, 2001). Другим возможным фактором, снижающим эффективность редеривации крыс, может быть сама модель трансплантации, так как показано, что для крыс очень важна синхронизация донора и реципиента, причем наиболее эффективные результаты трансплантации имеют место тогда, когда стадия развития эмбриона на момент трансплантации на 12 ч опережает стадии псевдобеременности реципиента (Han *et al.*, 2004). Таким образом, примененная нами на крысах модель редеривации нуждается в некоторой доработке, причем одним из перспективных направлений повышения эффективности этой модели может быть культивирование крысиных эмбрионов после их криоконсервации аналогично тому, как это было в случае редеривации мышей.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Елене Алексеевне Галустян и Ольге Николаевне Никитиной за помощь в работе с эмбрионами мышей и крыс; Никите Анатольевичу Морозову за помощь в замораживании и криоконсервации биологического материала; Наталье Юрьевне Сальниковой за организацию работ с реципиентами SPF-статуса; Виктории Витальевне Мак за помощь в организации работ с мышами и крысами в условиях конвенционального вивария.

## ЛИТЕРАТУРА

- Амтиславский С.Я. Эмбриотехнологические подходы к сохранению исчезающих видов млекопитающих: Дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск, 2006, 265 с.
- Амтиславский С.Я., Маркель А.Л., Якобсон Г.С. Повышение артериального давления у приемных матерей крыс НИСАГ и Вистар: эффект перекрестного воспитания потомства // Росс. физиол. журн. им. Сеченова. 1999. Т. 85. С. 1496–1502.
- Амтиславский С.Я., Трукшин И.С. Криобанк эмбрионов млекопитающих: выбор приоритетов и оптимальных репродуктивных технологий // Онтогенез. 2010. № 1. С. 19–31.
- Брусенцев Е.Ю., Напимеров В.А., Амтиславский С.Я. Редеривация как способ очистки лабораторных животных // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2011. Т. 15. № 1. С. 102–113.
- Карих Т.Л., Молокеев А.В., Никулин Л.Г. Генетическая и биологическая характеристика неинбредных мышей колонии ICR // Генетика. 1999. № 3. С. 366–370.
- Каркищенко Н.Н., Грачева С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в

- биомедицинских исследованиях. М.: Профиль-2С, 2010. 358 с.
- Маркель А.Л. Генетическая модель индуцированной стрессом артериальной гипертензии // Изв. Ан. СССР. Сер. биол. 1985. Вып. 3. С. 466–469.
- Сайфитдинова А.Ф. Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов: Уч.-метод. пособие. СПб.: СОЛО, 2008. 72 с.
- Abbott A. Genetisists prepare for deluge of mutant mice // Nature. 2004. V. 432. P. 541.
- Artwohl J.E., Purcell J.E., Fortman J.D. The use of cross-foster rederivation to eliminate murine norovirus, *Helicobacter* spp., and murine hepatitis virus from a mouse colony // J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 2008. V. 47. No. 6. P. 19–24.
- Baze W.B., Steinbach T.J., Fleetwood M.L. *et al.* Karyomegaly and intranuclear inclusions in the renal tubules of sentinel ICR mice (*Mus musculus*) // Comp. Med. 2006. V. 56. No. 5. P. 435–438.
- Bunag R.D. Measurement of blood pressure in rats // Handbook of Hypertension / Ed. W. De Jong. Amsterdam: Elsevier Science, 1984. V. 4. P. 1–12.
- Carthew P., Wood M.J., Kirby C. Elimination of Sendai (parainfluenza type 1) virus infection from mice by embryo transfer // J. Reprod. Fertil. 1983. V. 69. No. 1. P. 253–257.
- Chapin R.E., Gulati D.K., Barnes L.H., Teague J.L. The effects of feed restriction on reproductive function in Sprague-Dawley rats // Fundam. Appl. Toxicol. 1993. V. 20. No. 1. P. 23–29.
- Dinnyes A., Wallage G.A., Rall W.F. Effect of genotype on the efficiency of mouse embryo cryopreservation by vitrification or slow freezing methods // Mol. Reprod. Dev. 1995. V. 40. P. 429–435.
- Emiliani S., Van den Bergh M., Vannin A.S. *et al.* Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts // Hum. Reprod. 2000. V. 15. No. 4. P. 905–910.
- Festing M. F. The choice of animal model and reduction // Altern. Lab. Anim. 2004. V. 32. Suppl. 2. P. 59–64.
- Fray M.D., Pickard A.R., Harrison M., Cheeseman M.T. Upgrading mouse health and welfare: direct benefits of a large-scale rederivation programme // Lab. Anim. 2008. V. 42. No. 2. P. 127–139.
- Glage S., Dorsch M., Hedrich H.J., Bleich A. Rederivation of *Helicobacter hepaticus*-infected Mongolian gerbils by Caesarean section and cross-fostering to rats and mice // Lab. Anim. 2007. V. 41. No. 1. P. 103–110.
- Han M.S., Niwa K., Kasai M. *In vivo* development of vitrified rat embryos: effects of timing and sites of transfer to recipient females // Biol. Reprod. 2004. V. 70(2). P. 425–429.
- Handyside A.H., Hunter S. Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation // Roux's Arch. Dev. Biol. 1986. V. 195. P. 519–526.
- Hardy K., Spanos S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo // J. Endocrinol. 2002. V. 172. P. 221–236.
- Hardy K., Wright C., Rice S. *et al.* Future developments in assisted reproduction in humans // Reproduction. 2002. V. 123(2). P. 171–183.
- Hogan B., Constantiny F., Lacy E. Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. N.Y.: Spring Harbor Laboratory, 1986.
- Holinka C.F., Carlson A.D. Pup attraction to lactating Sprague-Dawley rats // Behav. Biol. 1976. V. 16. No. 4. P. 489–505.
- Homberger F.R. Enterotropic mouse hepatitis virus // Lab. Anim. 1997. V. 31. No. 2. P. 97–115.
- Ike F., Bourgade F., Ohsawa K. *et al.* Lymphocytic choriomeningitis infection undetected by dirty-bedding sentinel monitoring and revealed after embryo transfer of an inbred strain derived from wild mice // Comp. Med. 2007. V. 57. No. 3. P. 272–281.
- Jones K.H., Senft J.A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide // J. Histochem. Cytochem. 1985. V. 33(1). P. 77–79.
- Klug S., Merker H.J., Jäckh R. Effects of ethylene glycol and metabolites on *in vitro* development of rat embryos during organogenesis // Toxicol. In Vitro. 2001. V. 15(6). P. 635–642.
- Kolbe T., Palme R., Touma C., Rüllicke T. Repeated use of surrogate mothers for embryo transfer in the mouse // Biol. Reprod. 2012. V. 86. No. 1. P. 1–6.
- Leibo S.P., Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species // Theriogenology. 2002. V. 57. P. 303–326.
- Le Monnier A., Join-Lambert O.F., Jaubert F. *et al.* Invasion of the placenta during murine listeriosis // Infect. Immun. 2006. V. 74(1). P. 663–672.
- Lindstrom K.E., Carbone L.G., Kellar D.E. *et al.* Soiled bedding sentinels for the detection of fur mites in mice // J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 2011. V. 50. No. 1. P. 54–60.
- Luo C., Zuciga J., Edison E. *et al.* Superovulation strategies for 6 commonly used mouse strains // J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 2011. V. 50. No. 4. P. 471–478.
- Macy J.D. Jr., Weir E.C., Compton S.R. Dual infection with *Pneumocystis carinii* and *Pasteurella pneumotropica* in B cell-deficient mice: diagnosis and therapy // Comp. Med. 2000. V. 50. No. 1. P. 49–55.
- Mahabir E., Bauer B., Schmidt J. Rodent and germplasm trafficking: risks of microbial contamination in a high-tech biomedical world // ILAR J. 2008. V. 49. No. 3. P. 347–355.
- Mahabir E., Bulian D., Needham J., Schmidt J. Lack of transmission of mouse minute virus (MMV) from *in vitro*-produced embryos to recipients and pups due to the presence of cumulus cells during the *in vitro* fertilization process // Biol. Reprod. 2009. V. 81(3). P. 531–538.
- Marcotte H., Levesque D., Delanay K. *et al.* Pneumocystis carinii infection in transgenic B cell-deficient mice // J. Infect. Dis. 1996. V. 173. No. 4. P. 1034–1037.
- Markel A.L., Maslova L.N., Shishkina G.T. *et al.* Developmental Influences on Blood Pressure Regulation in ISIAH Rats // Handbook of Hypertension / Eds R. McCarty, D.A. Blizard, R.L. Chevalier. Elsevier Science, 1999. V. 19. P. 493–526.
- Miyamoto H., Ishibashi T. Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol // J. Reprod. Fertil. 1977. V. 50(2). P. 373–375.
- Mohr L., Trounson A. The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability in the mouse // J. Reprod. Fert. 1980. V. 58. P. 189–196.
- Moore K., Bonilla A.Q. Cryopreservation of mammalian

- embryos: the state of the art // *Annu. Rev. Biomed. Sci.* 2006. V. 8. P. 19–32.
- Morrell J.M. Techniques of embryo transfer and facility decontamination used to improve the health and welfare of transgenic mice // *Lab. Anim.* 1999. V. 33. No. 3. P. 201–206.
- Naumenko E.V., Popova N.K., Nikulina E.M. *et al.* Behavior, adrenocortical activity, and brain monoamines in Norway rats selected for reduced aggressiveness towards man // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1989. V. 33. P. 85–91.
- Nicklas W., Baneux P., Boot R. *et al.* FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on Health Monitoring of Rodent and Rabbit Colonies). Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units // *Lab. Anim.* 2002. V. 36. No. 1. P. 20–42.
- Omar Farouk F.N., Stott D., Vlad M. Mouse embryo co-culture with autologous cumulus cells and fetal development post-embryo transfer // *Anim. Sci. J.* 2011. V. 82. No. 3. P. 420–427.
- Pfaff R.T., Agca Y., Liu J. *et al.* Cryobiology of rat embryos I: determination of zygote membrane permeability coefficients for water and cryoprotectants, their activation energies, and the development of improved cryopreservation methods // *Biol. Reprod.* 2000. V. 63(5). P. 1294–302.
- Plyusnina I.Z., Oskina I.N. Behavioral and adrenocortical responses to open-field test in rats selected for reduced aggressiveness toward humans // *Physiol. Behav.* 1997. V. 61(3). P. 381–385.
- Plyusnina I.Z., Oskina I.N., Tibeikina M.A., Popova N.K. Cross-fostering effects on weight, exploratory activity, acoustic startle reflex and corticosterone stress response in Norway gray rats selected for elimination and for enhancement of aggressiveness towards human // *Behav. Genet.* 2009. V. 39. P. 202–212.
- Plyusnina I.Z., Solov'eva M.Y., Oskina I.N. Effect of domestication on aggression in gray Norway rats // *Behav. Genet.* 2011. V. 41. No. 4. P. 583–592.
- Rall W.F., Schmidt P.M., Lin X. *et al.* Factors affecting the efficiency of embryo cryopreservation and rederivation of rat and mouse models // *ILAR J.* 2000. V. 41. No. 4. P. 221–227.
- Rapp J.P. Genetic analysis of inherited hypertension in the rat // *Physiol. Rev.* 2000. V. 80(1). P. 135–172.
- Reuter J.D., Dysko R.C. Quality assurance/surveillance monitoring programs for rodent colonies // *Laboratory animal medicine and management* / Eds J.D. Reuter, M.A. Suckow. www.ivis.org, Ithaca, 2003. N.Y., USA. P. 1–11.
- Schmidt H.M., Schiewe M.C., Wildt D.E. The genotypic response of mouse embryos to multiple freezing variables // *Biol. Reprod.* 1987. V. 37. P. 1121–1128.
- Sheck W.R. Role of housing modalities on management and surveillance strategies for adventitious agents of rodents // *ILAR J.* 2008. V. 49. No. 3. P. 316–325.
- Stringfellow D.A. Recommendation for the sanitary handling of *in vivo*-derived embryos // *Manual of the International Embryo Transfer Society.* 1998. P. 79–84.
- Suzuki H., Yorozu K., Watanabe T. *et al.* Rederivation of mice by means of *in vitro* fertilization and embryo transfer // *Exp. Anim.* 1996. V. 45. No. 1. P. 33–38.
- Taft R.A. Virtues and limitations of the preimplantation mouse embryo as a model system // *Theriogenology.* 2008. 69(1). P. 10–16.
- Van Keuren M.L., Saunders T.L. Rederivation of transgenic and gene-targeted mice by embryo transfer // *Transgenic Res.* 2004. V. 13. No. 4. P. 363–371.
- Waterston R., Lindblad-Toh K., Birney E. *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome // *Nature.* 2002. V. 420. P. 520–562.
- Watson J., Thompson K.N., Feldman S.H. Successful rederivation of contaminated immunocompetent mice using neonatal transfer with iodine immersion // *Comp. Med.* 2005. V. 55. No. 5. P. 465–469.
- Weisbroth S.H., Peters R., Riley L.K., Sheck W. Microbiological assessment of laboratory rats and mice // *ILAR.* 1998. V. 39(4). P. 272–290.
- Wiebold J.L., Becker W.C. Inequality in function of the right and left ovaries and uterine horns of the mouse // *J. Reprod. Fert.* 1987. V. 79. P. 125–134.
- Wilkinson J.M., Halley S., Towers P.A. Comparison of male reproductive parameters in three rat strains: Dark Agouti, Sprague-Dawley and Wistar // *Lab. Anim.* 2000. V. 34. P. 70–75.
- Williams C., Greenstein G., Kopec A., Hargaden M. Microbiological evaluation of a newly constructed animal facility // *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* 2005. V. 44. No. 2. P. 7–11.
- Yeom S.C., Yu S.A., Choi E.Y. *et al.* Prevalence of *Helicobacter hepaticus*, murine norovirus, and *Pneumocystis carinii* and eradication efficacy of cross-fostering in genetically engineered mice // *Exp. Anim.* 2009. V. 58. No. 5. P. 497–504.



## REDERIVATION BY EMBRYO TRANSFER IN STRAINS OF LABORATORY MICE AND RATS

S.Ya. Amstislavsky<sup>1,2</sup>, T.N. Igonina<sup>1</sup>, I.N. Rozhkova<sup>1</sup>, E.Yu. Brusentsev<sup>1</sup>, A.A. Rogovaya<sup>2</sup>,  
D.S. Ragaeva<sup>2</sup>, V.A. Naprimerov<sup>1,3</sup>, E.A. Litvinova<sup>1</sup>, I.Z. Plyusnina<sup>1,2</sup>, A.L. Markel<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia;

<sup>3</sup> State Higher Education Institution Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

### Summary

Rederivation allows laboratory animal populations to be purged from specified pathogens and thus turns these animals to the SPF (specified pathogens free) status. Results of the redерivation of two unique rat strains selected at the Institute of Cytology and Genetics and one mouse strain are presented. The two rat strains are: tame Norway rats and rats with Inherited Stress Induced Arterial Hypertension (ISIAH strain). The ICR mouse strain has been named as abbreviation of the Institute of Cancer Research wherefrom these mice were distributed to laboratories all over the world. The SPF status of the rats after redерivation was confirmed by the method of indicator animals (sentinel animals). The optimized model of redерivation offered here involves a combination of such embryotechnological methods as freezing/cryopreservation of embryos, their washing through the number of fresh volumes of sterile media, growing in vitro for 48 hours, and subsequent transfer into either one or both uterine horns of recipient females. Application of this model to redерivation of ICR mice yielded 39 pups born in an SPF vivarium. It should be noticed that the effectiveness of the procedure met international standards, and characteristic features of phenotype were retained in all the three strains after redерivation.

**Key words:** ISIAH rats, tame rats, ICR mice, embryo transfer, redерivation.

УДК 57(092):575.22:577.1

## ИСТОРИЧЕСКАЯ РОЛЬ ИОСИФА АБРАМОВИЧА РАПОПОРТА В ГЕНЕТИКЕ. ПРОДОЛЖЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ХИМИЧЕСКОГО МУТАГЕНЕЗА

© 2013 г. Н.С. Эйгес

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия,  
e-mail: volchenkos@mail.ru

Поступила в редакцию 6 марта 2013 г. Принята к публикации 13 марта 2013 г.



Год назад, 14 марта 2012 г., исполнилось 100 лет со дня рождения всемирно известного ученого-генетика Иосифа Абрамовича Рапопорта, лауреата Ленинской премии, Героя Социалистического Труда, номинанта на Нобелевскую премию за открытие явления и метода химического мутагенеза. И.А. Рапопорт известен своими героическими подвигами во время Великой Отечественной войны и вкладом в Победу. Его 100-летие широко отмечалось научной общественностью. В московском Институте биологии развития

им. Н.К. Кольцова РАН, который прежде назывался Институтом экспериментальной биологии, позже – Институтом цитологии, гистологии и эмбриологии, где Иосиф Абрамович работал до 1948 г. и где им были проведены многие исследования и сделаны выдающиеся открытия, конференцию проводила доктор биологических наук, профессор Ольга Георгиевна Строева, супруга и соратник И.А. Рапопорта. На Украине (откуда родом Иосиф Абрамович) в Белоцерковском аграрном национальном университете конференцию вел С.П. Васильковский. В.В. Моргун провел заседание, посвященное памяти Рапопорта в Институте физиологии растений и генетики НАН в Киеве. С.П. Васильковский и В.В. Моргун принимали участие в совещаниях по химическому мутагенезу, проводимых И.А. Рапопортом в 1950–1990-е гг. В Алуште 100-летие И.А. Рапопорта отмечалось на съезде Общества генетиков и селекционеров Украины. Также эта дата отмечалась в Харькове и Уфе (Башкортостан).

И.А. Рапопорту принадлежат два крупных открытия XX века: один из источников наследственной изменчивости – химический мутагенез и ненаследственной модификационной изменчивости в форме фенотипической активации. Оба открытия исходят из двух основополагающих трудов Иосифа Абрамовича. Они отражены соответственно в двух книгах: «Микрогенетика» (Рапопорт, 1965, 2010) и «Феногенетический анализ независимой и зависимой дифференцировки» (Рапопорт, 1993). После уничтожения этих книг в годы лысенковщины «Микроге-

нетика» в 2010 г. была переиздана О.Г. Строевой, внесший неоценимый вклад в анализ и популяризацию трудов И.А. Рапопорта. Книга «Феногенетический анализ независимой и зависимой дифференцировки» была несколько ранее опубликована в номерах журнала «Онтогенез» (Рапопорт, 1993).

Наследственная изменчивость вызывается действием сильных химических мутагенов, открытых И.А. Рапопортом, – около 300, более слабых мутагенов им было найдено в несколько раз больше. С последними И.А. Рапопорт также много работал. Из сильных мутагенов в селекционных целях Иосиф Абрамович рекомендовал чаще использовать этиленимин (мутагенную активность которого он открыл одним из первых), нитрозоэтилмочевину, нитрозометилмочевину, нитрозодиметилмочевину, диметилсульфат, диэтилсульфат, нитрозометилбиурет, 1,4-бис-диазоацетилбутан и др. Эти и другие наиболее эффективно действующие химические мутагенные вещества Иосиф Абрамович назвал супермутагенами.

Ненаследственная изменчивость была также глубоко изучена И.А. Рапопортом. Им обнаружено большое число химических соединений, вызывающих модификации (морфозы), в частности фенкопии, имитирующие мутации. Среди модификаторов наибольший интерес представляет высокоэффективное физиологически активное вещество антиоксидант парааминобензойная кислота.

Оба метода – химический мутагенез и модификационная изменчивость – были широко внедрены с активным участием Рапопорта в разных областях фундаментальных и прикладных исследований: в теорию мутагенеза и изучение эволюционных процессов, генетику и медицину, сельское хозяйство и лесоводство, микробиологию и микробиологическую промышленность, животноводство и экологию. Из прикладных исследований Иосиф Абрамович наибольшее внимание уделял разработкам в области сельского хозяйства.

Каким образом Рапопорту удалось открыть и разграничить оба вида изменчивости, которые он исследовал, наследственную и ненаследственную, – открытия, которые подтвердились на классическом генетическом объекте мухе дрозофиле (*Drosophila melanogaster*), а позже и

на других объектах? И.А. Рапопорт нашел путь, следуя которым, он безошибочно обнаруживал интересующие его вещества и относил их к мутагенам или к модификаторам. Он определил, что механизмы их действия на живые организмы различны, но в основе их действия лежит один источник. Благодаря этим исследованиям Рапопорт мог предсказывать степень эффективности как мутагенов, так и модификаторов. В обнаружении этих соединений и их разграничении решающую роль играли величины их дипольных моментов (Рапопорт, 1965; Строева, 2012). У химических мутагенных веществ они составляют 2,4–2,7Д, 1Д – единица измерения дипольного момента. Эта единица названа по имени известного ученого Дебая, изучавшего диэлектрические характеристики молекул. У модификаторов дипольные моменты сильнее и составляют от 4Д и выше этого значения. В этом состоит «ключ», по выражению О.Г. Строевой, нахождения химических мутагенов и модификаторов: среди множества химических соединений – обнаружение химических мутагенов, в том числе супермутагенов органической природы и модификаторов как в основном неорганической, так и органической природы, а также разграничение их функций.

Оказалось, что дипольные моменты молекул химических мутагенных веществ соответствуют дипольным моментам определенных молекулярных структур клетки, куда входят триплеты, нуклеотиды, аминокислоты – предшественники синтеза ДНК и белков (Рапопорт, 1965; Строева, 2012). С этим связано родство химических мутагенов с определенными структурами генетического материала клетки и определенными участками – локусами хромосом (Эйгес, 1966; Строева, 2012; Эйгес и др., 2012). Это родство, видимо, определяет специфичность мутагенных воздействий на генетический материал клетки (Эйгес и др., 2012) и в связи с этим специфичность действия химических мутагенов на клеточном и организменном уровнях, что подтвердилось в последующих исследованиях (Эйгес, 1966, 1971; Эйгес и др., 1994, 2012).

Таким образом, очевидны три тесно связанных между собой события, определяющих основные принципы действия химических мутагенов органической природы: величина дипольного момента плюс родство химического мутагена

с определенными молекулярными структурами клетки (на основе соответствия друг другу их дипольных моментов), принимающими участие в синтезе ДНК и белков, плюс специфичность действия на молекулярном, клеточном и организменном уровнях. Следующее неосуществленное событие – направленный мутационный процесс, который для высших организмов не был достигнут. В связи с такими явлениями, как сродство и специфичность, в свое время ставился вопрос о возможности получения направленного действия химических мутагенов на высшие организмы. При этом специфичность рассматривалась как возможная промежуточная ступень (Эйгес, 1966; Эйгес и др., 2012).

Присутствие специфичности отличает действие химических мутагенов от действия ионизирующих излучений. Действие последних более случайно в связи с отсутствием сродства с молекулярными структурами клетки и наличием механизма только мишени для их действия, что определяет довольно грубое вмешательство в клетку и противоположно мягкому действию химических супермутагенов в оптимальных концентрациях (дозах) на генетические структуры клетки.

Было показано на примере супермутагена этиленimina (ЭИ), что в вариантах с наиболее эффективными концентрациями (дозами), самыми низкими из исследованных нами, 0,01–0,04 %, у пшеницы возникают исключительно генные мутации (Эйгес, 1972; Эйгес, Мартынюк, 1972), определяющие широкий спектр разнообразия признаков у мутантов, большая часть которых хозяйственно полезна, высокожизнеспособна и константна в поколениях (Эйгес, 1971, 1972, 1966; Эйгес, Мартынюк, 1972; Эйгес и др., 1994, 2012). Именно мутанты, несущие эти мутации, составили крупную коллекцию (Эйгес, Волченко, 2004). В нее вошли также константные гибриды разных поколений мутантов с иными сортами, часто немутантного происхождения, и гибриды мутантов между собой и с исходным сортом. Все это еще более разнообразит коллекцию. В какой-то своей части коллекция явилась результатом интеграции метода химического мутагенеза с традиционными подходами в селекции, с которыми он хорошо сочетается. Подобные рабочие коллекции создавались многими специалистами. В

настоящее время коллекции, сохраняющиеся у селекционеров, являются основой дальнейшей эффективной работы по мутационной селекции. Интеграция метода химического мутагенеза с традиционными методами селекции интенсифицирует селекцию и поднимает ее на более высокую ступень. Образцы коллекции представляют собой также уникальный исходный материал с новыми ценными признаками, отсутствующими у культурной мягкой гексаплоидной пшеницы. Этот материал – источник новых ценных сортов с разнообразными неродственными геномами. Это приумножает и поддерживает биоразнообразие, снижение которого продолжается по разным причинам в настоящее время. Повышение биоразнообразия стимулирует селекцию, предотвращает эпифитотии и отрицательное действие абиотических стрессов на культурные растения.

И.А. Рапопорт на совещаниях по химическому мутагенезу неоднократно говорил, что самое главное – это получать как можно более широкое разнообразие, которое служит увеличению возможности выбора форм, нужных селекционерам. Имея широкое разнообразие, мы прогнозируем (Эйгес, и др., 2012) нахождение в мутационном спектре коллекции мутантов тех или иных нужных наследственных изменений и пока ни разу не ошиблись в их наличии. Такой прогноз ускоряет селекционный процесс и создание новых сортов.

В формировании представлений о специфичности важно то, что при использовании наиболее эффективно действующих алкилирующих мутагенов И.А. Рапопорта в умеренных дозах они способны вступать в реакции алкилирования (метиляции) с основаниями ДНК. При этом может изменяться эухроматиново-гетерохроматиновое соотношение в сторону увеличения количества гетерохроматина (эпигенетические процессы) (Эйгес, и др., 2011), что, по-видимому, является одной из причин возникновения высокоадаптивных свойств. Около половины мутантов нашей коллекции обладает высокоадаптивными свойствами с признаками новизны в проявлении. ЭИ также действует на область гетерохроматина. Показателем этого в наших опытах является возникновение в высоких дозах анеуплоидов-моносомиков. При этом мутаген действует на гетерохроматин хромосо-

мы в области центромеры, что вызывает отставание унивалентной хромосомы в А-Т митоза и мейоза (Эйгес, 1972). В гетерохроматине могут возникать также и генные мутации при более низких дозах мутагена, но не исключено, что и при более высоких дозах.

Высокие дозы мутагена 0,09–0,12 % при экспозиции 24 ч (как было в наших исследованиях на примере ЭИ) действуют диаметрально противоположно низким дозам. В диапазоне высоких доз (самых высоких из испытанных) преобладают в наибольшей степени повреждения ядерного аппарата клетки в виде перестроек хромосом и анеуплоидии (Эйгес, 1971; Эйгес и др., 2012), что соответствует жесткому действию ионизирующих излучений и в данном случае – более жесткому по сравнению с гамма-лучами плотноионизирующему излучению – быстрым нейтронам. Мутационные спектры при действии быстрых нейтронов в оптимальных дозах и ЭИ в высоких дозах – узкие и одинаковые (Сюй Чень-мань, 1964; Эйгес, 1966, 1971). По-видимому, в высоких дозах сродство химического мутагена с генетическими структурами клетки отсутствует, и мутаген действует по принципу мишени случайно, что сродни с действием жесткой, плотноионизирующей радиации. В обоих случаях налицо повреждающий эффект генетических структур клетки и при этом отсутствует константность (Эйгес, Мартынюк, 1972). Поэтому данный феномен действия химического мутагена в высоких дозах – 0,09–0,12 % – мы определяем как радиомиметический эффект (Эйгес, 1966, 1971; Эйгес и др., 2012). Хозяйственно ценных признаков, пригодных для непосредственного использования в селекции, здесь почти нет.

12 доз ЭИ, с которыми мы работаем, 0,01–0,12 %, разделены нами на низкие (0,01–0,04 %), средние (0,05–0,08 %) и высокие (0,09–0,12 %). Экспозиция для всех доз при обработке воздушно-сухих семян была 24 часа. Градация доз исходила из поведения полученных мутантов в отношении особенностей мутационных спектров признаков, константности, данных цитогенетического анализа.

Итак, полученный феномен представляет собой специфический характер действия химического мутагена ЭИ в диапазоне низких, наиболее эффективных, доз – 0,01–0,04 % (Эйгес,

1966, 1971; Эйгес и др., 1994; 2012) (И.А. Рапопорт называл эти дозы умеренными), состоящий в наиболее широком разнообразии, константности, высокой жизнеспособности полученных мутантов, несущих исключительно генные мутации с высоким выходом хозяйственно ценных признаков. Это в корне отлично от действия высоких доз (концентраций) мутагена, при которых происходит совпадение с наиболее жесткой, плотно ионизирующей радиацией и, по-видимому, отсутствует сродство с определенными участками хромосом, а действие является более случайным, с повреждением генетического аппарата клетки и радиомиметическим эффектом. При этом разнообразие мутантов очень узко, характеризуется отсутствием селекционно-ценных признаков, пригодных для непосредственного использования в селекции. Жизнеспособность этих мутантов снижена, константность, как правило, отсутствует. Однако полученные в диапазоне высоких доз (концентраций) ЭИ с радиомиметическим действием мутанты обладают некоторыми полезными признаками, выявлению которых препятствуют перестройки хромосом, анеуплоидия, пониженная жизнеспособность. Перед нами стоит вопрос о нахождении путей выявления ценных признаков в вариантах с высокими дозами и использовании этих признаков в перспективе.

Специфичности действия мутагенных факторов мы придаем большое значение, так как на ее основе можно прогнозировать преимущественное получение тех или иных нужных признаков (Эйгес и др., 2012), что ускоряет селекционный процесс и, как надеялись Н.П. Дубинин и В.В. Хвостова, позволит находить возможности для получения направленных мутаций. Однако существуют препятствия для этого в отношении высших организмов, в частности в отношении культурных растений, где мутаген, прежде чем дойти до генетического материала клетки, может вступать в целую серию промежуточных реакций. Последнее зависит от физиологического и биохимического состояний клетки. Поэтому надо знать, в каком виде мутаген доходит до генетического аппарата. Например, известно, что ЭИ в живом организме довольно быстро превращается в этаноламин – немутагенное токсическое вещество. Тем не менее химический мутаген в

разных дозах (концентрациях) вызывает преимущественно тот или иной тип изменений. Например, при действии ЭИ в низких дозах, 0,01–0,04 %, преобладают крупноколосые урожайные мутанты, а также мутанты, комплексно устойчивые к фитопатогенам (Эйгес, 1966), высокоадаптивные (Эйгес и др., 2011), с высокими хлебопекарными свойствами (Эйгес и др., 2009) и другие, характеризующиеся комплексами ценных признаков, не требующих доработки. По сути, эти мутанты в большей части фактически представляют собой готовые сорта, которые надо размножить и передать на Госсортоиспытания. При более высоких дозах в диапазоне 0,05–0,08 % (в нашей градации это средний диапазон) возникают преимущественно мутанты с высоким содержанием белка в зерне (Эйгес, Иванов, 1975), низкостебельные, неполегающие (Эйгес, 1966). Однако у этих мутантов в отличие от мутантов, полученных при действии низких доз, ценные признаки сопровождаются нежелательными признаками, поэтому требуется дополнительная работа, чтобы избавиться от последних, но это не всегда удается. Во всяком случае, можно более или менее уверенно использовать определенные, заранее заданные, дозы мутагена для получения нужного наследственного изменения.

В развитии работ по химическому мутагенезу при дальнейшем изучении механизма действия химических мутагенов желательно находить мутагены более прямого действия на генетический материал клетки, с тем чтобы они доходили до него в неизменном виде, не подвергаясь промежуточным реакциям. При этом важно находить дозы, при которых мутаген вызывал бы преимущественно генные мутации, на что и направлена селекция. Известны некоторые химические мутагены более прямого и локального действия. Это, например, 8-этоксикофеин, не относящийся к группе мутагенов, открытых И.А. Рапопортом, жестко действующий, вызывающий главным образом разрывы хромосом и не применяющийся в мутационной селекции. Для определения продуктов промежуточного взаимодействия мутагена с компонентами клетки нужна интеграция генетиков с физиологами и биохимиками. Необходимо также для каждого химического мутагена, с которым ведутся работы, в том числе в области селекции, выбирать

нужную экспозицию в зависимости от времени сохранности мутагена в клетке и времени его действия. Нужно также иметь в виду, что химический мутаген может по-разному себя проявлять в зависимости от культуры и сорта. Очень важно находить в каждом конкретном случае наиболее эффективные сочетания: мутаген–доза–исходный сорт.

Как видно из вышеотмеченного, в области химического мутагенеза предстоят еще многие исследования, продолжающие дело И.А. Рапопорта, для дальнейшей интенсификации применения метода в разных областях фундаментальных и прикладных исследований, в том числе в селекции. Здесь открываются большие перспективы.

В наших исследованиях показано, что из нескольких сочетаний мутагена, его доз и исходного сорта озимой пшеницы было найдено наиболее благоприятное: мутаген ЭИ – дозы 0,01–0,04 % – исходный сорт пшенично-пырейный гибрид (ППГ) 186 (Эйгес и др., 1994). Однако это только начало, предстоят дальнейшие масштабные исследования по выявлению наиболее благоприятных сочетаний мутагена, его эффективных доз и высокомутабельного исходного сорта у разных культур. На данном этапе это наиболее нужные исследования в области химического мутагенеза. Конечно, здесь, кроме этого, необходимо знать, каковы должны быть рН раствора, температура во время обработки, состояние объекта обработки (семян). Перспективно исследование соединений, модифицирующих (повышающих) эффективность мутационного процесса, а также налаживание синтеза химических супермутагенов, которые в свое время рекомендовал И.А. Рапопорт.

Получение направленных мутаций на высших организмах пока не достигнуто, как упоминалось выше, хотя подходы к нему есть. В настоящее время его как бы заменяют некоторые биотехнологии, например получение генетически модифицированных организмов (ГМО). Использование последних проблематично. Актуально в настоящее время в теоретических и практических исследованиях применять и далее разрабатывать приемы получения специфичности мутагенных воздействий на высшие организмы, в том числе на сельскохозяйственные культуры при использовании метода хи-

мического мутагенеза. Молекулярной генетике придается при этом большое значение.

Открытия И.А. Рапопорта в области наследственной и фенотипической изменчивости в большой мере обязаны тому, что он сумел интегрировать основополагающие для этих целей науки: генетику, физику и химию. На данном этапе к этим трем наукам присоединяются еще физиология и биохимия. На стыке интегрированных наук открываются широкие горизонты для проникновения в глубину явлений, что привело И.А. Рапопорта к представленным здесь открытиям.

Иосиф Абрамович никогда не говорил о направленном получении мутаций. Очевидно, он понимал, что на данном этапе ставить этот вопрос преждевременно. Он говорил, что самое главное – это получить максимально широкое разнообразие, для того чтобы селекционеры могли выбирать нужные признаки. Здесь, конечно, играют большую роль специфичность мутагенных воздействий и возможность остановиться на тех воздействиях, которым принадлежит наибольшее генотипическое разнообразие и наиболее широкий спектр мутационных изменений.

Модификаторы с более высоким значением дипольного момента по сравнению с химическими мутагенами мутаций не вызывают. Очевидно, одной из причин этого является несоответствие их дипольного момента генетическим структурам клетки. Однако модификаторы обладают способностью вступать в комплексы с ферментами (без валентных связей), активируя их и реактивируя после воздействия ультрафиолетом и ионизирующей радиацией (Кожевникова и др., 1983). Поэтому Рапопорт обозначил этот феномен термином «фенотипическая активация». Особое значение среди модификаторов Иосиф Абрамович придавал пара-аминобензойной кислоте (ПАБК). Активируя фермент ДНК-полимеразу (Рапопорт и др., 1979), ПАБК вызывает репарации – восстановление хромосом, поврежденных ионизирующей радиацией или высокими дозами химических мутагенов (Григорова, 1983). Поэтому ПАБК является генетически значимым соединением, но не с мутагенным, а протекторным эффектом для окружающей среды от радиации. ПАБК – экологически чистое вещество, витамин, антиоксидант, участвующий в создании

экологически чистой продукции. Морфозы, в особенности вызванные действием ПАБК, часто отличаются положительными свойствами, что используется для повышения урожайности (Эйгес, 1989а, б), снижения поражения фитопатогенами и повышения адаптивных свойств (Эйгес, Вайсфельд, 1993), но уже на ненаследственном фенотипическом уровне.

ПАБК была внедрена в сельское хозяйство в 1980–1990-е годы на зерновых культурах после производственных испытаний в хозяйствах Московской и Тюменской областей. Во многих областях бывшего Советского Союза по инициативе Министерства сельского хозяйства после того как было установлено положительное влияние ПАБК на зерновые, овощные и кормовые культуры, картофель, свеклу (кормовую, столовую, сахарную), кукурузу и другие культуры, ПАБК уже широко использовали в сельском хозяйстве. ПАБК была внесена в соответствующий список Госхимкомиссией в 1993 г. ПАБК также применяется на овощных культурах и в индивидуальных хозяйствах. С помощью ПАБК лечатся глазные заболевания (Акберова и др., 1998). Она применяется и в геронтологии (Заключение ..., 1985). Положительное влияние ПАБК сказывается на домашних и сельскохозяйственных животных (Свечин, Михеев, 1990; Шангин-Березовский, Костин, 1992), у них повышаются иммунитет, выживаемость, увеличиваются вес и плодовитость. ПАБК также используется в лесоводстве, клеточной культуре, культуре ткани.

Такое широкое положительное влияние ПАБК на разные таксономические объекты основано главным образом на активации широкого круга жизненно важных ферментов, которые часто под влиянием неблагоприятных условий оказываются в угнетенном состоянии, и на восстановлении поврежденных хромосом. В связи с этим ПАБК особенно эффективна в тех случаях, когда внешние условия неблагоприятны.

ПАБК используется нами в семеноводстве для повышения кондиционных свойств семян. Перспективно использование ПАБК в селекции, особенно при отдаленной гибридизации для повышения завязываемости семян и жизнеспособности гибридных сеянцев; в мутагенезе – для повышения выхода мутаций и их разнообразия. Нас интересует совместная обработка

семян мутагеном в жесткой части его действия и ПАБК, с тем чтобы вызывать репарацию поврежденных хромосом и за счет этого расширить мутационный спектр при высоких дозах, изучить его на предмет возможного проявления генных мутаций, сокрытых перестройками хромосом и пониженной жизнеспособностью. Среди этих мутаций могут быть ценные и новые, которые могли не возникнуть при низких, наиболее часто употребляемых дозах, хотя при последних мутационный спектр широк.

Некоторые признаки, полученные под влиянием химического мутагена, совпадают с теми признаками, которые возникают при действии ПАБК. Например, в обоих случаях возникают устойчивость к фитопатогенам, выровненность посевов за счет снижения ярусности побегов более поздних порядков, высокая урожайность. Также на наследственном и ненаследственном уровнях происходят ослабления некоторых прочных корреляционных связей между признаками, эволюционно закрепленных, в частности нежелательных, препятствующих объединению в одной форме нужных ценных признаков, что лимитирует селекцию. Например, удалось объединить такие признаки, как «высокая урожайность» и «высокое качество», «высокая урожайность» и «высокие адаптивные свойства», «высокая урожайность» и «устойчивость к фитопатогенам». С помощью ПАБК на фенотипическом уровне можно ослабить нежелательные связи у ценных мутантов и мутантных сортов, у которых эти барьеры не были преодолены на наследственном уровне.

Сочетание ценных, обычно несочетаемых признаков наблюдается у полученных мутантов часто не только на экспериментальных полях, но и в условиях хозяйств Московской области. Например, хемомутантный сорт озимой пшеницы Имени Рапопорта при высоких урожаях, до 68 ц/га, одновременно стабильно по годам держит высокое продовольственное хлебопекарное качество. Содержание сырой клейковины составляет в конкурсном сортоиспытании до 36 %, в условиях хозяйств 24–27 % первой группы качества. Это наблюдалось нами в разных условиях, в частности в условиях хозяйств Дмитровского района Московской области. Стабильное повторение из года в год высоких хлебопекарных свойств на фоне высоких уро-

жаев и почвенно-климатических условий, не благоприятствующих в ряде случаев формированию качества, говорит о том, что этот признак более определяется генотипом и меньше зависит от внешних условий, что представляет собой новизну. Следовательно, в результате генных мутаций произошло объединение в одном сорте признаков высокой урожайности, высокого хлебопекарного качества, высоких адаптивных свойств, устойчивости к некоторым фитопатогенам, что явилось достоянием именно метода химического мутагенеза И.А. Рапопорта. Вне этого метода при использовании только традиционных методов селекции многокомпонентные селекционно значимые сочетания, как правило, отсутствуют. В подобных комплексах большую роль играют значения (величины) сочетаемых признаков. На фоне высокой урожайности адаптивные свойства настолько ярко проявляются, что хемомутантные сорта имеют очень большие преимущества перед сортами иной селекции (без применения метода химического мутагенеза). Например, перезимовка сорта Имени Рапопорта в крайне неблагоприятные годы (1994, 1995, 1998 гг. и др.) достигала 95 % перезимовавших растений в хозяйствах Ногинского, Дмитровского и других районов Московской области. Сорта, созданные только традиционными методами селекции (вне метода химического мутагенеза), в эти годы или погибали, или сильно изреживались. Что касается хлебопекарных свойств, то здесь также обнаруживаются большие преимущества полученных хемомутантных сортов перед сортами, в создании которых участвовали только традиционные методы селекции (вне метода химического мутагенеза). Например, хемомутантные сорта Имени Рапопорта, Солнечная и другие стабильно по годам сохраняют высокое хлебопекарное продовольственное качество с высокими значениями его параметров даже в условиях хозяйств, благодаря чему занимают первое место по занятым под ними площадям в Центральном регионе России. Сорта иной селекции в хозяйствах чаще всего ведут себя как фуражные с нестабильным проявлением качества по годам. Подобных примеров вклада метода химического мутагенеза в селекцию и сельское хозяйство много. В созданной нами коллекции хемомутантные сорта и образцы



характеризуются многими ценными признаками и их комплексами. Определенная часть коллекции представляет собой новые потенциальные сорта.

Химическими мутациями еще раньше занимались и другие исследователи. Так, одновременно с открытием И.А. Рапопорта явления химического мутагенеза в 1946 г. (Рапопорт, 1946) появилась публикация по иприту Ауэрбах и Робсона (Auerbach, Robson, 1946). Иприт – отравляющий горчичный газ, применявшийся во время первой мировой войны, не пригоден для получения ценных в хозяйственном отношении мутаций, так как этот мутаген отличается жестким действием и вызывает исключительно разрывы хромосом в большом количестве и их перестройки – в 24 % случаев, а генных мутаций, представляющих основной интерес с точки зрения возможностей практического использования, не вызывает. Генные мутации, представляющие интерес с точки зрения их практического использования, – это прерогатива сильных химических мутагенов – супермутагенов И.А. Рапопорта.

В 1930-е годы «химические» мутации были получены В.В. Сахаровым (1932) под воздействием йода и других неорганических веществ. Уровень мутаций был низок и только несколько превышал спонтанный уровень. М.Е. Лобашев пробовал использовать в качестве мутагена уксусную кислоту и аммиак (Лобашев, Смирнов, 1934а, б). Он получил результат, сходный с результатом В.В. Сахарова: в опыте с аммиаком частота мутаций была очень низкой. Уксусная кислота мутаций не вызывала.

В.В. Сахаров был первым, кто обнаружил химические мутации и специфичность действия химических веществ неорганической природы в сравнении с действием ионизирующей радиации и спонтанного мутагенеза (Сахаров, 1938).

Вышеизложенные результаты, при которых уровень мутирования был низок, получены на дрозофиле. На других объектах результатов в то время еще не было. Таким образом, ни иприт, ни йод, ни уксусная кислота и аммиак не могли быть использованы для практических целей. Специфичность характера действия химических мутагенов неорганической природы исследовалась В.В. Сахаровым при очень низкой мутагенной активности и узком мутационном спектре.

Химические мутагены органической природы, подобранные И.А. Рапопортом в соответствии с величиной дипольного момента, проявившие высокую эффективность после испытаний на дрозофиле, стали предметом широких теоретических и практических исследований и были применены в ряде областей биологии: в эволюционных и генетических исследованиях, сельском хозяйстве, медицине, микробиологии и микробиологической промышленности, экологии, животноводстве, лесоводстве.

И.А. Рапопорт является основоположником химического мутагенеза – одного из крупнейших открытий XX в. В связи с этим открытием И.А. Рапопорт был номинирован на Нобелевскую премию. Однако получить ее ему было не суждено. Иосиф Абрамович не поехал в Стокгольм по принципиальным соображениям, связанным с условием, поставленным перед ним ЦК КПСС о вступлении в партию заново (до 1948 г. он был членом КПСС, но после сессии ВАСХНИЛ исключен из партии).

Одним из достижений в области химического мутагенеза было создание разными сельскохозяйственными и биологическими учреждениями за относительно короткий промежуток времени (1960–1990-е гг.) около 400 мутантных сортов сельскохозяйственных культур, некоторые из них успешно прошли Государственные сортоиспытания. Многие селекционеры страны занимались созданием новых сортов с использованием метода химического мутагенеза.

Возникает вопрос, как объяснить столь широкое распространение метода химического мутагенеза, который еще при жизни И.А. Рапопорта стал массовым, составил эпоху в разных областях биологической науки и был внедрен не только в бывшем Советском Союзе, но и в ряде других стран: Венгрии, Китае, Вьетнаме, Индии, США. В Индии продолжает исследования ученик Иосифа Абрамовича Балрам Шарма.

Широкому распространению метода химического мутагенеза способствовали ежегодные совещания специалистов, использующих в своих исследованиях этот метод. Иосиф Абрамович проводил совещания в Институте химической физики АН ССР, где возглавлял отдел химической генетики, проявляя живой, можно сказать, трепетный интерес к обсуждаемым исследованиям. По сути, это была школа. Каждое

совещание Иосиф Абрамович предварял своим докладом по теории химического мутагенеза и модификационной изменчивости. Школа во многом помогала специалистам расширять и углублять знания в области генетики (особенно в 1950-е годы, вскоре после сессии ВАСХНИЛ 1948 г.) и творчески их использовать в своих работах. Совещания сыграли немалую роль в интенсификации генетических и селекционных исследований.

Большую роль в широком внедрении метода химического мутагенеза играли контакты Иосифа Абрамовича со специалистами и его помощь им в исследованиях. Иосиф Абрамович часто посещал сельскохозяйственные и биологические учреждения, наблюдая вместе со специалистами посевы разных культур, оценивая материал, советуя, как строить работу в дальнейшем. Таким образом он работал со специалистами в Краснодарском крае, Сибири, Средней Азии, Центральном регионе, Украине.

Большое значение в научных и практических достижениях имела сама личность Иосифа Абрамовича: его талант, преданность делу, отзывчивость, всегдашняя готовность помочь в постановке опытов, справедливость, бескорыстие, честность, доходящая до щепетильности. Под руководством Иосифа Абрамовича совещания проходили демократично. Каждый мог высказаться. Рапопорт не ограничивал докладчиков во времени, проявляя живой интерес к исследованиям, оценивая их, комментируя, глубоко в них вникая. Однако, если работы были слабыми, он был весьма резок в оценках, хотя это бывало не часто.

При создании новых сортов сельскохозяйственных культур методом химического мутагенеза многие селекционеры предлагали И.А. Рапопорту соавторство, однако он неизменно отказывался быть в числе авторов новых сортов. Это вызывало доверие и уважение специалистов и еще более привлекало к работе этим методом.

На конференции, проходившей в 2012 г., 15 марта, в Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова, посвященной 100-летию со дня рождения И.А. Рапопорта, академик РАН А.Ю. Розанов сделал предварительное выступление, которое очень понравилось участникам своей искренностью и открытостью. Розанов от-

метил, что И.А. Рапопорт был прав, отказываясь быть соавтором сортов и публикаций, и что эта его позиция была одной из причин массовости этого метода и быстрого его внедрения, а также быстрого достижения результатов, в частности, столь быстрого создания новых ценных сортов. И далее Розанов сказал: «Пока в Президиуме распределяли авторство и спорили по этому поводу, Рапопорт ушел далеко вперед».

Иосиф Абрамович отказывался быть в числе авторов при создании сортов озимой пшеницы и у своих сотрудников. Он говорил, что во всех случаях не может включаться в авторы сортов, так как их создавали специалисты, вкладывая интеллект, силы и время, хотя и работая методом химического мутагенеза: «Не становиться же мне автором такого количества сортов!». Однако он был рад, когда авторы сорта предложили назвать хемомутантный сорт озимой пшеницы его именем.

Иосиф Абрамович умел разглядеть творческие возможности специалистов, которые он особенно ценил и умел развивать. При этом он говорил: «Ведь Ваша работа козырная!» или «Работа образцовая». Это звучало в его устах как наивысшая оценка данного исследования. Химические супермутагены он бескорыстно раздавал селекционерам, всегда с ними беседовал, знакомил с методикой работы.

Свою Ленинскую премию Иосиф Абрамович раздал сотрудникам Отдела химической генетики, хотя нельзя сказать, чтобы он не нуждался в деньгах. Одни только неоднократные в течение дня ежедневные деловые поездки на такси отнимали немалую часть зарплаты. Ездить общественным транспортом он не мог, так как был болен острой формой астмы, которую приобрел, работая с мутагенами вне лаборатории, будучи отлученным от исследований в течение более 10 лет, с 1948 г. Тяжелые ранения во время Великой Отечественной войны также давали о себе знать. Один из однополчан попросил Иосифа Абрамовича не раздавать Ленинскую премию и сохранить ее для семьи, на что услышал ответ: «Уже раздал, но одному сотруднику не хватило и я добавил деньги из зарплаты». Семье Иосифа Абрамовича было тяжело также и материально. На работу, даже не по специальности, устроиться было почти невозможно. Временная работа длилась недолго, так как

поступало очередное распоряжение об увольнении. Только после 1957 г. И.А. Рапопорт смог продолжить исследования, будучи принятым на постоянную работу в Институт химической физики АН СССР по приглашению Н.Н. Семенова. Интеллектуальные и душевные силы Иосифа Абрамовича были настолько велики, что крупные теоретические и практические результаты были достигнуты быстро, как бы наверстаны после длительного перерыва.

Основной причиной широкого и быстрого распространения метода химического мутагенеза является его высокая эффективность, во много раз превышающая эффективность дотеле известных неорганических веществ, вызывающих мутации (Сахаров, 1932, 1938; Лобашев, 1934а, б; Auerbach, Robson, 1946) в отношении как их общей частоты, так и широты мутационных спектров. Преимущества химического мутагенеза относятся и к радиационному мутагенезу. На примере озимой пшеницы мы видим, что при правильном подборе трех составляющих, супермутагена, его оптимальных доз и высокомутабильного исходного сорта (Эйгес, Вайсфельд, 1994), общая частота мутаций на порядок величины выше по сравнению с частотами мутирования, полученными при действии оптимальных доз редко ионизирующего излучения – гамма-лучей (Эйгес, Валева, 1961; Эйгес, 1964), и на порядок величины превышает разнообразие типов наследственных изменений, полученных при использовании оптимальных доз плотно ионизирующей радиации – быстрых нейтронов (Сюй Чень-мань, 1964; Khvostova *et al.*, 1965).

В процессе дальнейшего многолетнего изучения метода химического мутагенеза открываются новые его закономерности и особенности.

Сотрудники И.А. Рапопорта и другие специалисты в области химического мутагенеза по возможности продолжают и развивают эти исследования.

Интересы Иосифа Абрамовича принадлежали не только науке. Будучи широко образованным высококультурным человеком, он увлекался литературой, театром, живописью, часто бывал на выставках и говорил, что это вдохновляет его на научные исследования.

Все сказанное об Иосифе Абрамовиче Рапопорте, а также его военные подвиги и стойкая

принципиальная гражданская позиция защитника науки генетика в борьбе с лысенковщиной снискали ему исключительно высокий авторитет не только среди специалистов, но и в народе, среди тех, кто его знал, слышал или читал о нем. Можно еще многое сказать об этом необыкновенном, уникальном человеке, его добропорядочности, воинской доблести, принципиальности, чутком отношении к людям, высокой интеллигентности, а также о крупных открытиях в науке, и не только в области наследственной, но и модификационной (ненаследственной) изменчивости. Обо всем этом можно писать особо. В этом плане много сделала О.Г. Строева, опубликовав книги об Иосифе Абрамовиче и его методах (Рапопорт, 1965; Иосиф Абрамович Рапопорт, 1993; И.А. Рапопорт, 1993, 1995; И.А. Рапопорт ..., 2003; Строева, 2009).

## ЛИТЕРАТУРА

- Акберова С.И., Мусаев П., Магомедов Н.М. и др. Парааминобензойная кислота как антиоксидант // Биоантиоксидант: Тез. докл. М., 1998. С. 103–104.
- Григорова Н.В. Антимитотический и защитный эффект пара-аминобензойной кислоты в опытах с химическими мутагенами на *Crepis capillaries* // Химический мутагенез и качество сельскохозяйственной продукции. М.: Наука, 1983. С. 262–267.
- Заключение Всесоюзного научно-исследовательского института гигиены и токсикологии пестицидов, полимерных материалов и пластических масс. Киев, 1985.
- И.А. Рапопорт – ученый, воин, гражданин: Очерки, воспоминания: Материалы. М.: Наука, 2001. 2-е изд. 2003. 335 с.
- И.А. Рапопорт. Избр. труды: Гены. Эволюция. Селекция. М.: Наука, 1995. 249 с.
- И.А. Рапопорт. Избр. труды: Открытие химического мутагенеза. М.: Наука, 1993. 304 с.
- Иосиф Абрамович Рапопорт // Биобиблиография ученых. Сер. биол. Генетика. М.: Наука, 1993. Вып. 6. 91 с.
- Кожевникова Н.А., Рапопорт И.А., Иваницкая Е.А., Пудрина И.Д. Влияние пара-аминобензойной кислоты на активность дезоксирибонуклеазы интактного и облученного препарата // Докл. АН СССР. 1983. Т. 273. № 2. С. 476–479.
- Лобашев М.Е., Смирнов Ф.А. К природе действия химических агентов на мутационный процесс. Сообщение 1. Действие уксусной кислоты на non-disjunction и трансгенации у *Drosophila melanogaster* // Докл. АН СССР. 1934а. Т. 2(3). Вып. 5. С. 307–311.
- Лобашев М.Е., Смирнов Ф.А. К природе действия химических агентов на мутационный процесс. Сообщение 2. Действие аммиака на возникновение летальных трансгенаций // Докл. АН СССР. 1934б. Т. 3(4). Вып. 3. С. 174–178.

- Рапопорт И.А. Карбонильные соединения и химический механизм мутаций // Докл. АН СССР. 1946. Т. 54. № 1. С. 65–68.
- Рапопорт И.А. Микрогенетика. М.: Наука, 1965.
- Рапопорт И.А. Микрогенетика. М., 2010. 530 с.
- Рапопорт И.А. Молекулярный дипольный момент в химическом мутагенезе // Микрогенетика. М.: Наука, 1965. С. 67–94.
- Рапопорт И.А. Феногенетический анализ независимой и зависимой дифференцировки // Тр. Ин-та цитологии, гистологии и эмбриологии. 1948. Т. 2. Вып. 1. 135 с. // Онтогенез. 1992. Т. 23. № 3/6. Онтогенез. 1993. Т. 24. № 1/2.
- Рапопорт И.А., Васильева С.В., Давниченко Л.С. Роль пара-аминобензойной кислоты в репарации повреждений, индуцированных УФ и гамма-излучениями // Докл. АН СССР. 1979. Т. 247. № 1. С. 231–234.
- Сахаров В.В. Йод как химический фактор, действующий на мутационный процесс у *Drosophila melanogaster* // Биол. журнал. 1932. Т. 1(8). Вып. 3/4. С. 1–8.
- Сахаров В.В. Специфичность действия мутационных факторов // Биол. журнал. 1938. 7. № 3.
- Свечин Ю.К., Михеева Н.Н. Влияние пара-аминобензойной кислоты на рост и мясные качества свиней // Зоотехния. 1990. № 1. С. 53–56.
- Строева О.Г. Иосиф Абрамович Рапопорт 1912–1990. М.: Наука, 2009. 213 с.
- Строева О.Г. Механизм химического мутагенеза в свете микрогенетической концепции И.А. Рапопорта // Индуцированный мутагенез в селекции растений. Біла Церква, 2012. С. 6–12.
- Сюй Чень-мань. Получение мутантов у озимой пшеницы под действием быстрых нейтронов // Радиобиология. 1964. № 3.
- Шангин-Березовский Г.Н., Костин А.В. Развитие и резистентность крупного рогатого скота в зависимости от способа введения биологически активного соединения пара-аминобензойной кислоты // С.-х. биология. Сер. Биология животных. 1992. Т. 6. С. 128–131.
- Эйгес Н.С. Влияние ПАБК на сорта озимой пшеницы в условиях производственного опыта // Химические мутагены и пара-аминобензойная кислота в повышении урожайности сельскохозяйственных растений. М.: Наука, 1989а. С. 38–64.
- Эйгес Н.С. Изучение мейоза у мутантов озимой пшеницы, полученных при действии этиленimina // Химический мутагенез и создание селекционного материала. М.: Наука, 1972. С. 230–243.
- Эйгес Н.С. Изучение разных способов обработки ПАБК ярового ячменя в хозяйствах Ногинского района Московской области // Химические мутагены и пара-аминобензойная кислота в повышении урожайности сельскохозяйственных растений. М.: Наука, 1989б. С. 99–123.
- Эйгес Н.С. Мутагенный эффект разных концентраций этиленimina на озимой пшенице // Тр. Моск. об-ва испытателей природы. 1966. Т. 23. С. 66–78.
- Эйгес Н.С. Мутагенный эффект этиленimina и гамма-лучей при действии на воздушно-сухие семена озимой пшеницы // Радиобиология. 1964. Т. 4. Вып. 1. С. 20–28.
- Эйгес Н.С. Цитогенетический анализ мутантов озимой пшеницы, полученных при действии этиленimina в разных концентрациях // Генетика. 1971. Т. 7. № 6. С. 11–24.
- Эйгес Н.С., Вайсфельд Л.И. Закономерности действия пара-аминобензойной кислоты на зерновые культуры // Химический мутагенез и задачи сельскохозяйственного производства. М.: Наука, 1993. С. 191–198.
- Эйгес Н.С., Вайсфельд Л.И., Волченко Г.А. Специфичность химического мутагенеза на озимой пшенице и создание мутантов с множественными мутациями, определяющими наиболее важные признаки // Тез. докл. I съезда Вавилов. об-ва генетиков и селекционеров (ВОГиС). Генетика. 1994. Т. 30. Прил. С. 187.
- Эйгес Н.С., Валева С.А. Сравнительное изучение действия гамма-лучей и этиленimina // Радиобиология. 1961. Т. 1. № 2. С. 304–309.
- Эйгес Н.С., Волченко Г.А. Коллекция мутантов озимой пшеницы, полученных методом химического мутагенеза И.А. Рапопорта // Матер. Междунар. конф. «Сохранение генетических ресурсов». Цитология. 2004. Т. 46. № 9. С. 891–892.
- Эйгес Н.С., Волченко Г.А., Вайсфельд Л.И., Волченко С.Г. Адаптивные свойства озимой пшеницы, полученные методами наследственной и ненаследственной изменчивости // Современный мир, природа и человек. Томский ун-т. 2011. Т. 2. № 1. С. 55–58.
- Эйгес Н.С., Волченко Г.А., Волченко С.Г. и др. Коллекция хемомутантов озимой пшеницы и возможности интенсификации селекционного процесса // Идеи Н.И. Вавилова в современном мире: Тез. III Вавилов. междунар. конф. Санкт-Петербург. 2012. С. 368.
- Эйгес Н.С., Волченко Г.А., Волченко С.Г. Некоторые аспекты биофизико-биохимических взаимодействий химических мутагенов и модификаторов с биологическими системами. Внедрение в практику // IV Съезд биофизиков России. Симпозиум 3. «Физика – медицине и экологии»: Матер. докл. Нижний Новгород, 2012. С. 251.
- Эйгес Н.С., Иванов Ю.А. Изучение содержания белка в зерне у мутантов озимой пшеницы, полученных при действии этиленimina // Химические супермутагены в селекции. М.: Наука, 1975. С. 164–169.
- Эйгес Н.С., Кузнецова Н.Л., Волченко Г.А. и др. Множественные мутации на озимой пшенице, определяющие хозяйственно ценные признаки // Вестн. Украинского об-ва генетиков и селекционеров (Вісник УТГС). 2009. Т. 7. № 2. С. 269–275.
- Эйгес Н.С., Мартынюк В.В. Жизнеспособность, константность и фертильность мутантов озимой пшеницы, полученных при действии этиленimina // Химический мутагенез и создание селекционного материала. М.: Наука, 1972. С. 220–230.
- Auerbach Ch., Robson I.M. Chemical production of mutations // Letters to Editor. Nature. 1946. V. 157. P. 302.
- Khvostova V.V., Mozhaeva V.S., Aigaes N.S., Valeva S.A. Mutants, induced by ionising radiations and ethyleneimine in winter wheat // Mutat. Res. 1965. V. 2. P. 339–343.

УДК 57(092)

**ГЕНЕТИК НИКОЛАЙ ВАСИЛЬЕВИЧ ТУРБИН И ЕГО ВРЕМЯ**© 2013 г. **И.М. Суриков**

Поступила в редакцию 4 июля 2012 г. Принята к публикации 20 июля 2012 г.

Николай Васильевич Турбин, известный генетик нашей страны, прожил долгую жизнь и всецело принадлежал своему трагическому двадцатому веку с его многочисленными противоречиями, неразрешенными проблемами и страшными событиями, особенно в России. В этот век произошли две мировые войны, революция 1917 г. и гражданская война в России, создание и первое применение ядерного оружия, распад СССР. Но этот век отмечен также началом освоения космоса Россией, объединением всех народов Земли в единую семью под флагом ООН, открытием ДНК и генетического кода. Именно в XX веке появились и стали обычными, наиболее употребляемыми устройствами как в производстве, так и в быту, телефон, телевизор, мобильные телефоны и компьютеры, возник Интернет, сделавшие доступной постоянную связь между всеми людьми, не говоря уже о возможности безграничного и мгновенного распространения новых идей и открытий.

Н.В. Турбин был энергичным, предприимчивым, несомненно, одаренным человеком, жившим всеми достижениями и противоречиями своего времени. Повороты его судьбы зависели от обстановки, в которой он жил и работал. Начав свою научную деятельность во время общеизвестных дискуссий в генетике 1940–1950-х годов, он, будучи человеком активным и талантливым, не мог избежать участия в этих событиях в соответствии с теми возможностями, которые предоставили ему его образование и умонастроения среды.

3 декабря 2012 г. исполняется 100 лет со дня его рождения. Будет полезным проследить весь сложный путь Н.В. Турбина: от заблуждений молодых лет его жизни к принятию истинных представлений науки о наследственности. За-

малчивание теневых сторон его деятельности не способствует пониманию определенной трагичности судьбы этого ученого. Вообще говоря, биография Н.В. Турбина заслуживает не журнальной статьи, а отображения в художественной прозе или пьесе. Драматизм его жизни весьма поучителен для тех, кто интересуется историей нашей Родины в двадцатом веке.

Н.В. Турбин родился накануне первой мировой войны 3 декабря (20 ноября по старому стилю) 1912 г. в семье служащего, жившей в селе Тума Касимовского уезда Рязанской губернии Российской Империи (ныне рабочий поселок Тума Клепиковского района Рязанской области). В 1929 г. Николай окончил Тумскую школу-девятилетку и в 1930 г. поступил на агрономический факультет Воронежского сельскохозяйственного института. После его окончания в 1935 г. был оставлен в аспирантуре при кафедре генетики и селекции. Одновременно работал областным агрономом Комиссии по определению урожайности при Совете Народных Комиссаров СССР в Воронеже (1938 г.). Будучи еще аспирантом, в 1938 г. Турбин прошел годичную стажировку для подготовки к чтению лекций по дарвинизму в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова. Здесь он прослушал лекции выдающихся ученых-биологов: И.И. Шмальгаузена, Н.К. Кольцова, А.С. Серебровского, М.М. Завадовского и др. В 1938 г. Турбин успешно защитил диссертацию на степень кандидата сельскохозяйственных наук по теме «Структура урожая сортов яровой пшеницы», посвященную разработке методики селекции этой культуры. После защиты диссертации его пригласили на должность доцента кафедры генетики и селекции Воронежского сельскохозяйственного ин-

ститута. Здесь Турбин начинает читать лекции по курсам дарвинизма и селекции.

В ноябре 1939 г. Н.В. Турбин зачисляется в докторантуру Академии наук СССР, которую проходит в лаборатории эволюционной экологии растений, руководимой академиком Б.А. Келлером, крупным ученым в области геоботаники и экологии растений, убежденным сторонником Т.Д. Лысенко. Работая в лаборатории Келлера, Николай Васильевич сосредоточил свое внимание на изучении явления вегетативной изменчивости растительных гибридов. На основании обширного материала, полученного путем экспериментального исследования большого числа межвидовых и межразновидностных гибридов рода *Solanum*, а также путем привлечения многочисленных литературных источников Турбину удалось обнаружить интересные особенности вегетативного поведения гибридов и дать свое объяснение найденным явлениям. В дальнейшем материалы этой работы легли в основу его докторской диссертации.

После окончания докторантуры в 1942 г. в возрасте 30 лет Н.В. Турбин защищает диссертацию «Вегетативное расщепление растительных гибридов» на соискание ученой степени доктора биологических наук. Защита проходила в г. Ашхабаде, где в это время Николай Васильевич находился в рядах Советской Армии, будучи курсантом военно-медицинского училища (это были годы Великой Отечественной войны). После защиты докторской диссертации Николай Васильевич в течение двух лет (1943–1944 гг.) заведует отделом Московского ботанического сада Академии наук СССР и одновременно работает профессором в Московском областном педагогическом институте. В 1945 г. он становится руководителем кафедры генетики растений Ленинградского университета. В 1948 г. его утвердили в ученном звании профессора. С 1948 г. по 1954 г. Турбин возглавлял объединенную кафедру генетики и селекции ЛГУ. Он также был деканом биолого-почвенного факультета университета; в 1948–1952 гг. – директором Биологического института ЛГУ в Петергофе под Ленинградом. В 1950 г. Турбин становится членом КПСС.

Первой печатной работой Н.В. Турбина стала небольшая заметка «К вопросу о методике

определения урожая», появившаяся в 1935 г. в № 5/6 воронежского журнала «Социалистическое строительство». В 1938 г. он опубликовал свою вторую большую работу «Опыт борьбы передовых колхозов Воронежской области за высокий урожай зерновых культур в условиях засухи 1936 года». Позднее, в 1941 г., в журнале «Яровизация» – рупоре Лысенко – публикуется работа Турбина по изучению наследования и соматического поведения гибридных растений. А затем была серия работ в духе мичуринско-лысенковского направления. Н.В. Турбин был человеком активным и энергичным и не мог оставаться сторонним наблюдателем событий, разворачивавшихся в генетике в эти годы. Он сразу начинает участвовать во всем, что обсуждалось в это время биологами страны.

1930-е годы прошлого века явились началом серьезных испытаний для генетики в СССР. В эти годы образовались две группировки среди работников научных учреждений: группировка, полностью принимающая положения классической генетики Менделя–Моргана, и группа лиц, отрицающих ценность классической генетики. К первой принадлежали: Н.И. Вавилов, Г.Д. Карпеченко, Г.А. Левитский, А.С. Серебровский, Н.К. Кольцов, А.Р. Жебрак, работающий в СССР американский генетик, член-корреспондент АН СССР Герман Джозеф Мёллер и др. Вторая группа возглавлялась академиком АН СССР, АН УССР и ВАСХНИЛ Т.Д. Лысенко и до этого малоизвестным юристом по образованию, полуфилософом-полубиологом И.И. Презентом. В августе 1936 г. на выездной сессии зерновой секции ВАСХНИЛ в г. Омске, Т.Д. Лысенко сделал доклад «О внутрисортном скрещивании растений-самоопылителей», в котором вступил в дискуссию с Н.И. Вавиловым и другими генетиками. В данной дискуссии Лысенко отрицал как общетеоретические воззрения своих оппонентов, так и их практическое воплощение в селекционной работе. В частности, Лысенко отрицал пользу метода инцухта полевых культур. Дискуссия была продолжена 23 декабря 1936 г., когда была созвана IV сессия ВАСХНИЛ, посвященная борьбе с «буржуазной генетикой». На ней Лысенко сделал доклад «О двух направлениях в генетике» (опубликован в сборнике Т.Д. Лысенко «Агробиология»). Лысенко совместно с Презентом

ссылались на мнение Ч. Дарвина и К.А. Тимирязева по вопросу вырождения растений-самоопылителей и полезности внутрисортного перекрестного опыления растений. К Лысенко и Презенту присоединился Н.В. Цицин.

Но особенно острый характер начала приобретать дискуссия в биологии в 1939 г. на совещании по генетике и селекции в редакции журнала «Под знаменем марксизма», проходившем с 7 по 14 октября в Москве под руководством главного редактора академика М.Б. Митина. Это совещание явилось как бы предшественником знаменитой августовской сессии ВАСХНИЛ 1948 г., состоявшейся спустя 9 лет, через три года после окончания Великой Отечественной войны. На совещании 1939 г. выступили Н.И. Вавилов (видимо, это было его последнее значительное публичное выступление, так как в следующем, 1940 г., он был арестован), Н.П. Дубинин, А.Р. Жебрак и другие действующие лица генетической драмы, не говоря уже о Лысенко! С заключительным словом выступил М.Б. Митин. Его выступление «За передовую советскую генетическую науку» было опубликовано в 10-м номере журнала «Под знаменем марксизма» за 1939 г.

Конец 1930-х и начало 1940-х годов прошлого века были годами не только генетических и негенетических дискуссий, не только подготовки и начала Великой Отечественной войны, но и годами свирепых репрессий, большого сталинского террора, годами массовых расстрелов неповинных людей. Классические генетики в эти годы понесли крупные и ничем невозполнимые потери. Были расстреляны: профессор, заведующий кафедрой генетики Ленинградского университета, заведующий отделом генетики Всесоюзного института растениеводства Г.Д. Карпеченко; академик, директор Института микробиологии АН СССР Г.А. Надсон, академик АН УССР, заведующий отделом генетики Института зоологии и биологии АН УССР И.И. Агол; руководитель Отдела генетики и селекции Закавказского института шелководства Н.К. Беляев; директор Медико-генетического института С.Г. Левит; и. о. президента ВАСХНИЛ доктор биологических наук, профессор, академик ВАСХНИЛ Г.К. Мейстер и другие талантливые ученые. Умер в тюрьме в 1942 г. арестованный по сфабрикованному обвинению член-корреспондент АН СССР, заведу-

ющий лабораторией цитологии ВИР, крупный цитолог и генетик Г.А. Левитский. Николай Иванович Вавилов, глава российских генетиков, ботаник, селекционер, географ, академик АН СССР, АН УССР и ВАСХНИЛ, президент ВАСХНИЛ (1929–1935), президент Всесоюзного географического общества (1931–1940), организатор и бессменный до момента ареста директор Всесоюзного института растениеводства (1930–1940), директор Института генетики АН СССР (1930–1940) на основании сфабрикованных обвинений был арестован в 1940 г. В 1941 г. он был осужден и приговорен к расстрелу, который впоследствии заменили 20-летним сроком заключения. В 1943 г. Н.И. Вавилов умер в тюрьме от голода. И это далеко не полный список репрессированных в той или иной форме знаменитых генетиков России.

Н.В. Турбин в совещаниях 1930-х годов не участвовал. В 1936 г. он еще учился в аспирантуре Воронежского сельскохозяйственного института, а в ноябре 1939 г. поступил в докторантуру Академии наук СССР. Но после защиты докторской диссертации в 1942 г. он включается в ведущие дискуссии по генетике. В 1947 г. Турбин активно участвует в работе так называемого суда чести над А.Р. Жебраком в ТСХА, где в заключительном выступлении осудил заслуженного ученого за низкопоклонство перед Западом. Но особенно ярко полемическая активность Турбина проявилась на знаменитой августовской сессии ВАСХНИЛ 31 июля–7 августа 1948 г. в Москве. Известно, что эту сессию благословил сам Сталин. Выступления на сессии освещались в главной партийной газете СССР «Правде», а затем были изданы уже в августе 1948 г. в виде стенографического отчета издательством «Сельхозгиз» тиражом 200 тыс. экземпляров (в настоящее время Стенографический отчет полностью опубликован в Интернете. – *И.С.*). Н.В. Турбин уже в качестве заведующего кафедрой генетики растений ЛГУ и профессора выступил на восьмом заседании 5 августа 1948 г. Это выступление было выдержано полностью в духе антименделевской риторики.

После разгрома генетики на августовской сессии ВАСХНИЛ 24 сентября 1948 г. преследования менделистов-морганистов продолжались. Многие были уволены со своих должностей в вузах и институтах. Впрочем, для некоторых

из них эти перемены начались еще в 1947 г., до сессии ВАСХНИЛ 1948 г. Так, А.Р. Жебрак был отстранен в 1947 г. от должности Президента АН БССР, пробыв на ней всего около 5 месяцев. В 1948 г. его освободили от должности заведующего кафедрой генетики и селекции ТСХА. А всего в результате «чистки» научных кадров после августовской сессии ВАСХНИЛ только в РСФСР и только от преподавательской работы были освобождены около 40 человек, из них деканов – 7, заведующих кафедрами – 12, профессоров – 9, доцентов – 8. Среди освобожденных от должности были декан биологического факультета ЛГУ М.Е. Лобашев (замененный на этом посту именно Н.В. Турбиным), профессор кафедры генетики Воронежского университета Н.П. Дубинин и другие ученые. Беды А.Р. Жебрака в 1948 г. не закончились. Позднее его лишили возможности занять кафедру генетики МГУ, которую фактически присвоил себе министр высшего образования СССР В.Н. Столетов, хотя Ученый совет МГУ высказался за Жебрака. В знак протеста против преследования генетики в СССР лауреат Нобелевской премии генетик Герман Джозеф Меллер направил в адрес Академии наук СССР письмо, в котором отказался от звания члена-корреспондента академии.

После того как Н.В. Турбин становится руководителем кафедры генетики и деканом биофака Ленинградского университета, он пишет и в 1950 г. издает учебное руководство «Генетика с основами селекции» тиражом 50 тыс. экземпляров, допущенное Министерством высшего образования СССР в качестве учебника для государственных университетов. Его появлению предшествует публикация в 1949 г. в издательстве «Советская наука» тома «Хрестоматии по генетике» (676 стр.), составленной под руководством и редакцией Н.В. Турбина сотрудниками кафедры генетики ЛГУ М.М. Лебедевым, А.И. Палиловым, В.С. Федоровым и Н.А. Шеломовой. Хрестоматия была целиком наполнена обширными выдержками из работ Т.Д. Лысенко, И.В. Мичурина, а также Ч. Дарвина и К.А. Тимирязева. Вышедший через год учебник был полностью основан на мичуринско-лысенковских представлениях о наследственности и изменчивости. В числе прочего во второй главе рассмотрены вопросы роста и развития растений, концепция стадийности

развития, обоснованная Т.Д. Лысенко. В главе третьей изложены представления о вегетативной гибридизации, вызвавшие наибольшие споры в научном мире. Четвертая глава посвящена половому процессу, обосновывается общая физиологическая концепция половой и вегетативной гибридизации растений. Упоминаются такие введенные Лысенко понятия, как жизненность и избирательность оплодотворения растений. В главе пятой рассмотрены вопросы доминирования и расщепления гибридов, а также работы по отдаленной гибридизации. Глава шестая посвящена одному из самых больших вопросов биологии – возможности наследования благоприобретенных признаков. Автор учебника безоговорочно высказывается в пользу существования такого наследования. Наконец, в главе седьмой бегло освещены задачи и методы селекции. Подробное рассмотрение содержания этого учебника здесь оправдано тем, что оно отражает совокупность генетических представлений, сложившихся у Н.В. Турбина на первом этапе его профессиональной карьеры.

Нельзя не сказать, что лекции для студентов университета Н.В. Турбин читал ярко, с воодушевлением, чем запомнился своим слушателям. К тому же Турбин не замыкался в рамках вузовского преподавания. Он любил читать научно-популярные лекции в разнообразных аудиториях как в молодые, так и в более зрелые годы. Стенограммы этих лекций сохранились в библиотеках. Годы пребывания Н.В. Турбина в Ленинградском университете были наполнены также знакомством с серьезной генетической литературой и постепенным освоением всего богатства генетических знаний, тех знаний, которые не удалось получить в студенческие годы и во время учебы и аспирантуре в Воронежском сельхозинституте. Надо отдать ему должное, он постоянно учился, изучал не только генетику, но также английский язык, позднее в Минске брал уроки вариационной статистики у П.Ф. Рокицкого.

Ниже будут использованы материалы, изложенные академиком АН Беларуси Л.В. Хотылевой в биографическом очерке, посвященном 95-летию со дня рождения Н.В. Турбина. Положительная сторона деятельности Турбина как классического генетика была освещена в нем Л.В. Хотылевой достаточно полно.



Возглавив кафедру генетики Ленинградского университета, Н.В. Турбин с присущей ему энергией развернул широкие исследования биологии цветения растений и оплодотворения животных. Всего через два года после появления учебника, в 1952 г., Турбин опубликовал в «Ботаническом журнале», членом редколлегии которого он был, статью с критикой взглядов академика Лысенко по вопросам видообразования. Чтобы опубликовать эту статью, Турбину пришлось обращаться к самому И.В. Сталину. В этот период в биологической литературе появились бредовые заявления Т.Д. Лысенко и его сторонников относительно возможности превращения пшеницы в рожь, ячмень, овес; овса – в овсюг; сосны – в ель и т.п. Т.Д. Лысенко говорил даже о возможности появления кукушки из яиц пеночки. Статья Турбина стала событием в научной жизни страны. Она положила начало длительному процессу разоблачения псевдонаучных взглядов Лысенко. Вместе с тем она явилась первым важным шагом Н.В. Турбина на пути к принятию серьезных генетических концепций. 1952–1956 гг. были переломными в научной жизни Турбина. Я помню, что еще в 1953 г., в год моего поступления в аспирантуру при кафедре генетики и селекции ЛГУ, Н.В. Турбин дал мне тему с мичуринским уклоном, предложив разобраться в возможности влияния условий выращивания ржи на ее самофертильность. Когда я получил данные, которые не смогли убедить меня в серьезной роли среды в определении признака самофертильности, а наоборот выявили решающую роль наследственных различий в контроле самофертильности популяции ржи, Турбин поддержал эти выводы и не мешал мне в стремлении интерпретировать экспериментальные результаты в терминах классической генетики.

В 1953 г. Н.В. Турбина избрали академиком АН БССР. В 1953–1965 гг. он директор Института биологии АН БССР. В этот институт я был принят после окончания аспирантуры на должность младшего научного сотрудника. Одновременно в 1953–1967 гг. Н.В. Турбин заведует кафедрой генетики и дарвинизма Белорусского государственного университета. В 1957 г. я защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук, руководителем которой был Н.В. Тур-

бин. В качестве основного оппонента по моей диссертации выступил академик АН БССР А.Р. Жебрак. К этому времени бывшие противники стали соратниками в борьбе против обскурантизма Лысенко. В 1965–1971 гг. Н.В. Турбин становится директором-организатором Института генетики и цитологии АН БССР. В 1967 г. его избирают академиком ВАСХНИЛ и в том же году командируют для чтения лекций в университетах Великобритании, а в 1970 г. – в университетах Канады. В 1972–1976 гг. Турбин становится Президентом и почетным членом (с 1974 г.) Всесоюзного общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова.

Таковы основные должностные вехи в жизни Турбина после его отказа от лысенкоизма и принятия взглядов классической генетики. В 1968 г. Николай Васильевич был избран академиком-секретарем Отделения растениеводства и селекции Всесоюзной академии сельскохозяйственных наук (в связи с этим он переехал в Москву) и занимал этот пост более 10 лет.

В 1974 г. Турбин становится директором-организатором Всесоюзного института прикладной молекулярной биологии и генетики (ныне Всероссийский институт сельскохозяйственной биотехнологии). Он руководит им до 1980 г. Для исследования физико-биохимических основ продуктивности сельскохозяйственных растений академик Н.В. Турбин организовал лабораторию генетики и физиологии продуктивности растений. При нем к 1975 г. в институте было создано 11 научных коллективов, возглавляемых видными учеными страны. Тематика института контролировалась Межведомственным техническим советом по проблемам молекулярной биологии и молекулярной генетики. Комиссия Совета ознакомилась с работой лабораторий института и отметила слабое развитие научно-исследовательских работ по молекулярной биологии, преобладание исследований по традиционной тематике. Это привело в конечном счете к отстранению Н.В. Турбина от должности директора и замене его на этом посту академиком ВАСХНИЛ Г.С. Муромцевым. Турбин перешел со своей тематикой и лабораторией в Московское отделение ВИР и работал там вплоть до своей смерти в 1998 г.

Н.В. Турбин известен как заслуженный ученый в области прикладной генетики и селекции

растений. Он внес большой вклад в разработку многих проблем науки, – это биология оплодотворения растений, теория гетерозиса, генетика алкалоидности люпина, экспериментальная полиплоидия, генетико-физиологическая теория продуктивности растений и др. Широкий резонанс в мировой генетической литературе имели его работы по использованию гетерозиса у полиплоидных гибридов сахарной свеклы, а также по изучению цитоплазматической мужской стерильности у растений. Он инициировал изучение механизмов взаимодействия хромосомных генов и плазмогенов при наследовании цитоплазматической мужской стерильности.

Его основные труды посвящены генетическим основам селекции растений, главным образом проблеме гетерозиса. Теоретические результаты исследований Николая Васильевича и руководимого им коллектива были обобщены в книге «Гетерозис», вышедшей в 1961 г. и ставшей сразу же библиографической редкостью. Кроме сотрудников отдела генетики Института биологии АН БССР в качестве соавторов для работы над книгой были приглашены известные иностранные ученые А. Мюнтцинг (Швеция) и Х. Даскалов (Болгария). В книге получили освещение теоретические проблемы гетерозиса. Н.В. Турбин разработал концепцию гетерозиса, основанную на теории генетического баланса. Он также является автором новой методики оценки селективируемого материала на общую комбинационную способность и методики реципрокной селекции межлинейных гибридов кукурузы с применением предварительных межсортовых скрещиваний для оценки исходных популяций. Турбин – автор концепции конструирования морфофизиологического типа растений как системного подхода в селекции растений. В 1968 г. он доказал возможность аутомиксиса у пшеницы при межвидовых скрещиваниях. Всего им опубликовано и отредактировано около 400 научных и научно-популярных трудов в отечественных и зарубежных изданиях, в том числе 27 книг и брошюр, включая вышеупомянутый вузовский учебник «Курс генетики».

В течение ряда лет Н.В. Турбин состоял членом Комитета по Ленинским и Государственным премиям при Совете Министров СССР. Был членом Высшей аттестационной комиссии

СССР. Удостоен почетных званий «Заслуженный деятель науки БССР» (1972) и «Лауреат Государственной премии БССР» (1984). Н.В. Турбин награжден правительственными наградами СССР и БССР, в том числе орденом «Знак почета», полученным в 1966 г., и орденом «Трудового Красного Знамени», полученным в 1971 г. Ему присуждена государственная премия БССР за цикл работ «Генетика гетерозиса и пути его использования в селекции растений». Н.В. Турбин был избран иностранным членом Шведского общества селекционеров и семеноводов. Был членом редколлегии международного журнала по селекции растений «Zeitschrift für Pflanzenzüchtung» (ФРГ). В 1973 г. избирался членом исполнительного бюро Международной генетической федерации.

Н.В. Турбин основал большую школу учеников, среди которых 18 докторов наук и более 40 кандидатов наук. Турбин был добрым, отзывчивым человеком. Аспиранты его любили и больше всего за то, что он не командовал ими, а позволял работать самостоятельно и делать выводы самим, опираясь на полученные факты. Эти его качества я познал на собственном опыте при написании кандидатской диссертации. Его доброта и отходчивость были также испытаны мною в эпизоде с моим уходом в 1959 г. из Института биологии АН БССР в лабораторию цитологических основ злокачественного роста Института цитологии АН СССР в Ленинград к генетику классической школы Ю.М. Оленову. Мое обращение к Н.В. Турбину с сообщением об этом намерении было встречено, разумеется, со скандалом. Н.В. Турбин, видимо, рассчитывал на мою дальнейшую работу под его руководством. К тому же я переезжал в Ленинград, «прихватив с собой» только что предоставленную мне АН БССР комнату, которую мы с женой обменяли на комнату в родном городе. Однако позднее добрые отношения с Н.В. Турбиным были восстановлены. От Ю.М. Оленова я тоже ушел (без скандала) и вернулся к тематике, продолжившей тему, начатую по инициативе Н.В. Турбина, по которой я и защитил докторскую диссертацию. В последующие годы Н.В. Турбин ни разу не упрекнул меня за этот шаг. В наших беседах он говорил со мной очень тепло и с пониманием моих проблем. Я думаю, что среди упомянутых выше 18 докторов наук, ко-

торых Н.В. Турбин считал своими учениками, значится и мое имя.

Турбины воспитали одного сына и двух дочерей, одна из которых, Л.Н. Турбина, стала известной русской поэтессой и генетиком.

Умер Н.В. Турбин в возрасте 85 лет 22 июля 1998 г.

### ЛИТЕРАТУРА

Митин М.Б. За передовую советскую генетическую науку // Под знаменем марксизма. 1939. № 10.

#### Лекции и избранные публикации Н.В. Турбина

Турбин Н.В. Творцы культурных растений. Л.: Лениздат, 1945. 59 с.

Турбин Н.В. Стенограмма выступления на августовской сессии ВАСХНИЛ 1948 года // О положении в биологической науке: Стенограф. отчет сессии ВАСХНИЛ 31 июля–7 августа 1948 г. М.: Сельхозгиз, 1948. С. 401–411.

Турбин Н.В. Генетика с основами селекции. М.: Сов. наука, 1950. 391 с.

Турбин Н.В. Процесс оплодотворения у растений в свете мичуринского учения: Стенограмма публичной лекции, прочитанной в Центральном лектории об-ва «Знание» в Москве. М.: Правда, 1950. 23 с.

Турбин Н.В. Управление наследственностью при половой гибридизации: Стенограмма лекции, прочитанной в

Ленинграде в 1950 г. Л., 1950. 30 с.

Турбин Н.В. Наследственность и жизненность в свете мичуринской генетики. Л., 1952. 27 с.

Турбин Н.В. Новые данные мичуринской биологии о процессе оплодотворения. М.: Знание, 1952. 31 с.

Турбин Н.В. Гетерозис и генетический баланс // Гетерозис: Теория и методы практического использования. Минск: Изд-во АН БССР, 1961. С. 3–34.

Турбин Н. В., Хотылева Л.В. Использование гетерозиса в растениеводстве. М., 1966. 84 с.

Турбин Н.В., Бормотов В.Е. Экспериментальная полиплоидия и гетерозис у сахарной свеклы. Минск: Наука и техника, 1972. 231 с.

Турбин Н.В., Хотылева Л.В., Тарутин Л.А. Диаллельный анализ в селекции растений. Минск: Наука и техника, 1974. 181 с.

Турбин Н.В., Палилова А.Н. Генетические основы цитоплазматической стерильности у растений. Минск: Наука и техника, 1975. 183 с.

Турбин Н.В., Хотылева Л.В., Каминская Л.Н. Периодический отбор в селекции растений. Минск: Наука и техника, 1976. 142 с.

Турбин Н.В., Володин В.Г., Гордей И.А. Гетерозис и радиоустойчивость растений. Минск: Наука и техника, 1977. 150 с.

Турбин Н.В. Биология и сельское хозяйство: Генетико-физиологические основы селекции растений. М.: Знание, 1978. 64 с.

Турбин Н.В. «Смутное время» отечественной биологии. Минск: Неман, 1993. № 4. С. 130–145.

Чайка М.Т., Решетников В.Н., Романова А.К. и др. Фотосинтетический аппарат и селекция тритикале / Под ред. Н.В. Турбина, Л.В. Хотылевой. Минск: Наука и техника, 1991. 240 с.

УДК 575.8

## СТРАСТИ ПО ФЕОДОСИЮ, ИЛИ КАК И ПОЧЕМУ Ф.Г. ДОБРЖАНСКИЙ СТАЛ «НЕВОЗВРАЩЕНЦЕМ»

© 2013 г. М.Б. Конашев

Санкт-Петербургский филиал учреждения Институт истории естествознания и техники им. С.И. Вавилова Российской академии наук (СПбФ ИИЕТ РАН), Санкт-Петербург, Россия, e-mail: mbkonashev@mail.ru

Поступила в редакцию 13 июня 2012 г. Принята к публикации 12 июля 2012 г.

В течение года, с мая 1930 по июнь 1931, Ф.Г. Добржанский, находившийся на стажировке в США в качестве стипендиата Международного образовательного совета (Рокфеллеровского фонда), готовился к возвращению в СССР. Подготовка включала все необходимые действия для устройства на новую работу и продления его паспорта и паспорта его жены. После получения трех писем Н.И. Вавилова от 9, 11 и 12 июня 1931 г. Ф.Г. Добржанский принял решение остаться в США и стал «невозвращенцем». В 1932 г. при встрече на VI Международном генетическом конгрессе в Итаке, США, Н.И. Вавилов назвал это решение правильным.

**Ключевые слова:** Ф.Г. Добржанский, генетика, «невозвращенец», сталинизм.

В последние годы история отечественной генетики и ее связи с «синтетической теорией эволюции» (СТЭ) вновь стала актуальна. В том числе потому, что оказалась неразрывно сцепленной с советским периодом в истории страны, а также с современными спорами о советском прошлом, прежде всего о сталинизме и лысенкоизме. Появились публикации, авторы которых пытаются осуществить ревизию того, что 20 лет назад с искренним пафосом называли восстановлением исторической правды, в том числе правды об отдельных ученых (см. напр.: Анохин, 2009а, б; Трофим Денисович Лысенко ..., 2008; Кононков, 2010; Овчинников, 2010). Вот почему приходится возвращаться к вопросам, на которые историками, в том числе историками науки, уже были даны, казалось бы, убедительные ответы.

Одним из создателей СТЭ, ее «генеральным конструктором», был наш соотечественник, один из основателей ленинградской школы генетики и отечественной генетики в целом, а также международной школы эволюционной генетики, мыслитель и гуманист Феодосий Григорьевич Добржанский (Конашев, 2008, 2010а). В судьбе Ф.Г. Добржанского по своему

отразились многие противоречия XX в., в частности между наукой и религией, эволюционной теорией и традиционным представлением о природе и человеке, и он не раз оказывался перед непростым выбором (Конашев, 2010б).

В 1927 г., являясь ассистентом кафедры генетики ЛГУ, а в 1925–1927 гг. к тому же еще и ученым специалистом Бюро евгеники и генетики (с 1927 г. Отдел генетики) Комиссии по изучению естественных производительных сил (КЕПС АН СССР), Ф.Г. Добржанский благодаря хлопотам Ю.А. Филипченко, был командирован в США, где с 1928 г. по 1929 г. стажировался в Нью-Йорке в Колумбийском университете в лаборатории Т.Х. Моргана в качестве стипендиата фонда Рокфеллера. По возвращении Добржанского планировали развернуть масштабные исследования по генетике дрозофилы на кафедре и в Отделе генетики КЕПС и создать для этого специальную дрозофильную группу, в которую, помимо самого Добржанского, должны были войти молодые генетики (тогда еще студенты) Ю.Я. Керкис, Н.Н. Медведев, Ю.Л. Горощенко, Р.А. Мазинг, М.Л. Бельговский и, возможно, некоторые другие (Конашев, 1994а. С. 33). Однако в декабре 1929 г., получив требование досроч-

но вернуться и взвесив все «за» и «против», Ф.Г. Добржанский принимает мучительное, как он сам пишет, решение временно остаться в США (У истоков ..., 2002. С. 260–261; см. подр.: Конашев, 1991). При этом он сразу настойчиво пытается найти работу на родине через Н.И. Вавилова и своих коллег на кафедре генетики Ленинградского университета (ЛГУ) и в Лаборатории генетики (ЛАГ) АН СССР.

### ПОПЫТКА НЕ ПЫТКА

Обращение к Н.И. Вавилову представлялось Ф.Г. Добржанскому единственно возможным прежде всего потому, что ранее в официальном письме от 15 марта 1928 г. сам Николай Иванович предлагал ему другое место работы в Ленинграде: взять на себя организацию и заведование Отделом зоотехнии Государственного института опытной агрономии (ГИОА) (У истоков ..., 2002. С. 412). Тогда Ф.Г. Добржанский ответил отказом, объяснив в письме от 27 апреля 1928 г., что занят исследованиями в другом направлении – генетике дрозофилы и намерен посвятить себя этой, как ему кажется, весьма многообещающей области (У истоков ..., 2002. С. 413). Теперь же в письме от 29 декабря 1929 г. Добржанский писал, что он узнал о предполагаемой организации Н.И. Вавиловым лаборатории по изучению географической изменчивости и генетики географических рас, и поскольку вопросы географической изменчивости остаются близкими его интересам, то у него «является смелость предложить свои услуги по части работы в указанном выше направлении» (У истоков ..., 2002. С. 415). Однако Н.И. Вавилов в письме от 2 февраля 1930 г. сообщал, что у него нет «никакой генетической и географ.[ической] секции» и настойчиво советовал Ф.Г. Добржанскому вернуться к установленному ему сроку (У истоков ..., 2002. С. 416–417).

Полученному от Н.И. Вавилова совету Ф.Г. Добржанский не последовал. Причины, побудившие его принять такое решение, не устранились: он не успевал к апрелю завершить свои эксперименты. К тому же его собственный паспорт и паспорт его жены в результате продления его командировки в США оказались просрочены. Но после внезапной смерти Ю.А. Филипченко

в мае 1930 г. он предпринимает новые усилия вернуться на родину и найти там подходящую работу, поскольку должностей, которые он занимал на кафедре генетики ЛГУ и в отделе генетики, ставшем лабораторией генетики АН СССР, больше не существовало. Получив от Н.И. Вавилова телеграмму, посланную 21 мая 1930 г., о том, что Филипченко умер от менингита и его приезд желателен (Там же. С. 416), Ф.Г. Добржанский в ответном письме от 29 мая 1930 г. из Пасадины выражал готовность вернуться, подчеркивая: «готов прислать по Вашему указанию официальное заявление о предоставлении мне этой или другой должности в университете, в Академии Наук или в ином учреждении, в котором моя работа может быть желательна или полезна» (У истоков ..., 2002. С. 418).

В то же время Ф.Г. Добржанский подчеркивал необходимость продления действия паспортов: «Будучи официально зачислен, я хотел бы получить от соответствующих учреждений продление моей командировки; это последнее совершенно необходимо мне для продления заграничных паспортов, которые уже просрочены. Без такого продления я не смогу получить виз для проезда, ни въехать в СССР. Имея все это, я мог бы в начале осени двинуться в обратный путь. К этому времени я рассчитываю закончить ведущиеся теперь работы, и в это время истекает первоначально предполагавшийся срок моего здесь пребывания» (У истоков ..., 2002. С. 418).

Аналогичное письмо от 10 июня 1930 г. было послано Ф.Г. Добржанским из Пасадины Т.К. Лепину как и.о. руководителя ЛАГ. В этом письме он недвусмысленно отвечал на полуофициальный запрос Т.К. Лепина: «Итак, поскольку вопрос ставится <принудительно>, не может быть двух мнений. Я хочу вернуться в Ленинград, и сделаю это как только это станет возможно» (РО РНБ. Л. 33).

В начале декабря 1930 г. уже в ответ на официальный запрос из АН СССР от 29 октября 1930 г. № 3541 (APSL. В:D65 Th. Dobzhansky Papers. Unknown (Russian)) Ф.Г. Добржанский послал в Секретариат АН СССР официальное заявление, датированное 2 декабря 1930 г., в котором сообщал, что предполагает закончить ведущуюся им в США работу к лету 1931 г. и вернуться в Ленинград. Заявление заканчива-

лось просьбой продлить его командировку (У истоков ..., 2002. С. 419). В заявлении от 15 января 1931 г. в Президиум Отдела животноводства Всесоюзной сельскохозяйственной академии им. В.И. Ленина (ВАСХНИЛ) Ф.Г. Добржанский просил предоставить ему должность ученого специалиста данного отдела (У истоков ..., 2002. С. 419).

Находясь в это время в США, Н.И. Вавилов отправляет предположительно 1 января 1931 г. из Кливленда письмо Ф.Г. Добржанскому, в котором подчеркивает, что проблем из-за его задержки не будет, и что надо обязательно возвращаться «поднимать страну»: «Надо поспешить оформляться. Я, как говорил, думаю что ни черта серьезного за Вами нет. ... Помогайте страну поднимать. Это миссия всечеловеческая» (У истоков ..., 2002. С. 414–415).

Вернувшись в СССР, Н.И. Вавилов 29 января 1931 г. посылает еще одно письмо Ф.Г. Добржанскому, в котором по итогам своей беседы с академиком В.П. Волгиным, Непременным секретарем АН СССР, настойчиво рекомендует Ф.Г. Добржанскому предпринять ряд шагов. По мнению Н.И. Вавилова, прежде всего Ф.Г. Добржанскому было необходимо подать заявление в какое-нибудь из советских полпредств или генеральных консульств либо в Канаде, либо во Франции или Германии с ходатайством о восстановлении действительности паспорта. Копию этого заявления Н.И. Вавилов советовал прислать в Секретариат АН СССР, чтобы тот через Наркоминдел ходатайствовал об устранении затруднений с выездом Ф.Г. Добржанского из США. Одновременно Ф.Г. Добржанский должен был незамедлительно подать заявление о предоставлении ему должности ученого специалиста в ЛАГ АН СССР. В заключение Н.И. Вавилов писал, что все это, «конечно, займет несколько месяцев, но нужно действовать незамедлительно и волынки тянуть не стоит, ибо в связи с этим в Академии получается впечатление неблагоприятное» (У истоков ..., 2002. С. 420).

В ответ Ф.Г. Добржанский в письме от 28 февраля 1931 г. сообщил, что заявление о предоставлении ему должности ученого секретаря Генетической лаборатории АН СССР, а также заявление в ВАСХНИЛ были посланы им свыше месяца тому назад (У истоков ..., 2002.

С. 422). Получение этих заявлений подтверждал Ю.Я. Керкис в письме Ф.Г. Добржанскому от 1 марта 1931 г., подчеркивая: «Совершенно несомненно одно, это что Вавилов сделает все от себя зависящее, чтобы Вы могли приехать» (APSL. B:D65 Th. Dobzhansky Papers. Kerkis). Извещая об отсылке требуемых заявлений, Ф.Г. Добржанский написал, что план действий, предложенный В.П. Волгиным, кажется ему «не совсем правильным» (У истоков ..., 2002. С. 422), обосновывая это следующим образом: «Боюсь, что он не знает консульских правил. Дело в том, что консульство, вероятно, вообще откажется продлить наши паспорта за отсутствием документов. Если же этого и не произойдет, то за продление консульство пожелает, вероятно, получить по тарифу для некомандированных. На два паспорта за 2½ года это может выйти заметно больше 1000 рублей. Таких денег у меня, конечно, не найдется» (У истоков ..., 2002. С. 422).

Данное рассуждение Ф.Г. Добржанского может показаться уловкой, поскольку он высказывает лишь предположение о том, что консульство ему откажет. Но Ф.Г. Добржанский послал соответствующие ходатайства, о чем в том же письме от 28 февраля 1931 г. и сообщил Н.И. Вавилову (У истоков ..., 2002. С. 423).

Из последующей переписки между ним и Н.И. Вавиловым следует, что сначала дело как будто стало развиваться в нужном направлении. Почти ровно через месяц после своего предыдущего письма Н.И. Вавилов сообщал Ф.Г. Добржанскому в письме от 21 февраля 1931 г., что получил его заявления и передаст их Непременному секретарю АН СССР, поддержав их. Однако при этом Н.И. Вавилов настаивал на прежнем: «...самое существенное Вам связаться с Полпредством и подать заявление об оформлении Вашего выезда; Академия, когда получит копию Вашего ходатайства в Полпредство, пошлет со своей стороны в Полпредство ходатайство о содействии Вам» (У истоков ..., 2002. С. 421). Настаивал, хотя из ответного письма Ф.Г. Добржанского от 29 марта 1931 г. из Пасадины следует, что первоначальная договоренность между ним и Ф.Г. Добржанским была другая: «Меня сильно беспокоит то обстоятельство, что и в этом письме отсутствует упоминание о продлении моей командировки, о

чем мы ведь совершенно определенно сговорились в Пасадине, и без чего я не могу выехать» (У истоков ..., 2002. С. 423–424).

Одновременно Ф.Г. Добржанский еще раз подтверждал, что уже послал заявление о продлении паспортов (своего и жены) в консульство в Берлин и ждет ответа из консульства «в течение ближайших двух недель». К этому письму Ф.Г. Добржанский прилагал свой Curriculum vitae и Список печатных работ (У истоков ..., 2002. С. 423–429).

Через два месяца в письме от 12 мая 1931 г. из Пасадины Ф.Г. Добржанский извещал Н.И. Вавилова, что получил из Берлинского консульства письмо, в котором ему обещают продлить оба паспорта «за сравнительно умеренную сумму», и что паспорта посланы вместе с официальным заявлением, копию которого, согласно указанию Н.И. Вавилова, он посылает вместе со своим письмом. В заключение Ф.Г. Добржанский выражал надежду, что через месяц–полтора получит паспорта, «если только Консульство сделает это не еще более медленно, чем они ответили на мой запрос (2 месяца)» (У истоков ..., 2002. С. 429).

Таким образом, как сказали бы прагматичные американцы, Ф.Г. Добржанский полностью выполнил свою часть сделки и поэтому ожидал, что Н.И. Вавилов и В.П. Волгин выполнят свою, о чем и писал без всяких обиняков: «Теперь, Николай Иванович, следует, мне кажется, уже возбудить вопрос о продлении командировки. Вам, конечно, виднее когда это лучше сделать. ... Можно ли рассчитывать, что это будет сделано до конца лета и я, таким образом, в августе смогу получить уже все нужные документы?» (У истоков ..., 2002. С. 429).

Из всех этих действий с очевидностью следует тот вывод, что Ф.Г. Добржанский на самом деле стремился как можно скорее вернуться на родину. В пользу такого заключения говорит и ряд других фактов. Мать Н.П. Добржанской в письме от 2 июля 1930 г. писала ей, что накануне, т. е. 1 июля 1930 г., получила от нее письмо, в котором та сообщала о возвращении в связи со смертью Ю.А. Филипченко (APSL. B:D65 Th. Dobzhansky Papers. Unknown (Russian)). Уверенность в том, что Добржанские скоро вернуться, выражала и жена брата Н.П. Добржанской еще в письме от 18 февраля 1930 г.:

«Мы очень твердо надеемся, что скоро увидим Вас обоих поближе, чем на фотографии». Это означает, что в письмах ближайшим родственникам Н.П. Добржанская (Сиверцева) писала им о том, что она с мужем собирается домой. Сам Ф.Г. Добржанский в письме Н.Н. Медведеву от 4 декабря 1967 г. писал: «Хотелось мне написать Вам, потому что сегодня, так сказать, «юбилейная дата». 40 лет тому назад мы виделись в последний раз в туманное ленинградское утро на перроне вокзала! Тогда никому из нас и в голову не приходила мысль, что это может оказаться последний раз в жизни» (APSL. B: D65 Th. Dobzhansky Papers. Medvedev, N.). Кроме того, и это, наверное, наиболее важное, Ф.Г. Добржанский настойчиво интересовался у Н.И. Вавилова и у своих коллег по ЛАГ условиями работы на родине (см. напр.: У истоков ..., 2002. С. 429–430). Значит, всерьез готовился к этой работе.

Но противоположная сторона, по крайней мере в лице Н.И. Вавилова, упорно повторяла одно: сначала надо вернуться, а все остальное потом устроится. Наконец, в письме от 12 июня 1931 г. Н.И. Вавилов сообщал, что договорился с академиком В.П. Волгиным о том, что АН СССР в лице своего Непременного секретаря и его как директора Генетической лаборатории Академии наук приглашает Ф.Г. Добржанского занять должность ученого специалиста в составе Генетической лаборатории Академии наук. Завершал свое письмо Н.И. Вавилов одновременно и официально, и дружески: «Мы очень хотим, чтобы Вы возможно скорее приезжали и развернули бы свою работу, и со стороны Академии Наук будут приняты меры к тому, чтобы всячески содействовать Вам в Вашей работе» (У истоков ..., 2002. С. 435). О том же сообщал Ф.Г. Добржанскому и его друг Ю.Я. Керкис в письме от 16 июля 1931 г. (APSL. B:D65 Th. Dobzhansky Papers. Kerkis).

Вопрос, казалось бы, был решен положительно и окончательно. Однако вместо того чтобы с радостью согласиться и, собрав чемоданы, тут же тронуться в путь, Ф.Г. Добржанский в письме Н.И. Вавилову от 10 августа 1931 г. вдруг отвергает это, вроде бы официальное, предложение (У истоков ..., 2002. С. 436). Но почему вдруг? Действительно ли, как написал Ф.Г. Добржанский, «опять не вышло», или всего лишь настал

момент, когда можно сообщить, что не вернется? Некоторые современные моралисты скажут, что, безусловно, все ясно как божий день. Само собой, тянул время, возвращаться и не собирался, и все письма и прочее – лишь для создания видимости, что собирается на родину, отвлекающий маневр. Но какой смысл? Мог бы сразу совсем отказаться или вовсе ничего не отвечать. Зачем тратить нервы, время, бумагу и деньги?

Проще всего было бы прояснить ситуацию, приведя запись из дневника Ф.Г. Добржанского, который он вел практически всю жизнь, в том числе большую часть своей жизни за рубежом. Но как раз тетради, в которых делались записи в конце 1920-х–начале 1930-х гг., пропали. Позднее в своем дневнике Ф.Г. Добржанский если и касался этой темы, то только в самом общем виде, когда писал, как, например, 25 января 1972 г., что ему повезло, что попал в Америку, а не в сталинские лагеря (APSL. B:D65 Th. Dobzhansky Papers. [Notebooks]). Не касается практически этой темы он и в своих воспоминаниях (The Reminiscences ..., 1962), которые легли в основу книги о нем (Land, 1973). Однако мотивы такого неожиданного поступка Ф.Г. Добржанского, по крайней мере некоторые из них, становятся понятны из последних двух писем к нему Н.И. Вавилова.

Приглашая Ф.Г. Добржанского на работу, одновременно в том же самом письме от 11 июня 1931 г. Н.И. Вавилов давал ему понять, что возвращаться не следует, что на родине уже царит атмосфера, в которой Ф.Г. Добржанский не сможет дышать. Но делал он это понятным Ф.Г. Добржанскому своеобразным эзоповым языком сталинской эпохи: «Дела разворачиваются невзирая ни на какие трудности, наука нужна, но наука, обращенная к практическим запросам; .... Замкнуться в науку нельзя. Идет аспирант, которого надо учить; нужно быть чутким к тому, что делается в стране. ... Диалектическая методология – это только плюс, который позволяет не быть оторванным от запросов жизни. .... Единственное, что нужно – учесть критическое отношение к каждой книжке, усиленную борьбу с витализмом, баталию с механистами. ... Придется позаниматься может быть первое время популярной литературой» (У истоков ..., 2002. С. 433–435).

В ответ Ф.Г. Добржанский посылает письмо, в котором, по его собственному выражению,

ставит точки над «i»: «К грусти вижу, что и на этот раз дело не вышло. ... Хуже всего то, что судя по Вашему письму, от меня потребовалось бы то, чего я не могу делать. В самом деле, для того чтобы жить, мне потребовалось бы подрабатывать писанием. Это еще бы ничего, в конце концов, многие так живут. Но вот те требования о стиле и характере писания, о которых Вы говорите, делают для меня положение *невозможным* (курсив мой – М.К.). С этим стилем я не знаком, а поскольку знаком – чувствую себя не в силах ни его принять, ни даже под него подделываться. А к тому же, ясное дело, и лабораторию надо вести в том же духе. Значит, с первых же шагов – неприятности, унижения и прочее. Простите, Николай Иванович, если этим доставляю Вам неприятность. ... При всем моем уважении к Вам лично, при всем моем искреннем желании работать в Академии Наук, а не здесь (знаю, что в искренности этого желания многие сомневаются, но это их дело – я говорю, что думаю), вижу, что из этого ничего не выйдет. Если же чемнибудь могу быть полезен здесь, то постараюсь быть. Как бы то ни было, никогда не забуду ни страны, ни того, чем ей обязан» (У истоков ..., 2002. С. 436).

Остается добавить, что когда Н.И. Вавилов встретился с Ф.Г. Добржанским на VI Международном генетическом конгрессе, проходившем в 1932 г. в США, в Итаке, и им удалось на несколько минут освободиться от двух «ассистентов», сопровождавших Н.И. Вавилова повсюду, он прямо сказал Ф.Г. Добржанскому, чтобы тот оставался в США (Land, 1973. P. 184).

### НЕ ПО СЕНЬКЕ ШАПКА?

Переговоры о той работе и должности, которые бы ему могли предоставить после его возвращения, Ф.Г. Добржанский вел фактически через своих друзей и коллег в Ленинграде, Ю.Я. Керкиса, Н.Н. Медведева и Т.К. Лепина. В первом же письме к Лепину от 10 июня 1930 г. Ф.Г. Добржанский, поблагодарив его за предложение занять место Ю.А. Филипченко, т. е. стать заведующим ЛАГ, дал на это свое согласие. Но выразил свое мнение о том, что «на одну службу не проживешь у нас» (РО РНБ. Л. 33 об). Поэтому, имея место в Университете «и комбинируя его с АН, чувствовал бы себя прочно.



Если бы такая комбинация была бы возможна, я выехал бы в Ленинград так скоро, как только мог бы ликвидировать свои дела тут. Но, судя по всему, эта возможность не существует» (РО РНБ. Л. 34).

Почему Ф.Г. Добржанский так решил? По его мнению, другими претендентами на заведение кафедрой генетики в ЛГУ могли бы быть А.П. Владимирский и М.М. Навашин. Последний, с точки зрения Ф.Г. Добржанского, был бы более желателен. Относительно А.П. Владимирского Ф.Г. Добржанский писал: «от Медведева же знаю, что кандидатура Владимирского вопрос уже почти решенный. А при всем моем уважении к Владимирскому и лично, и как к ученому работать под его началом я не могу» (Там же. Л. 34).

В следующем письме Т.К. Лепину от 15 июня 1930 г. Ф.Г. Добржанский, имея в виду предполагаемую реорганизацию ЛАГ в Институт генетики АН СССР (ИГЕН), писал о том, что ИГЕН, как полагал Ю.А. Филипченко, обязательно должен возглавлять академик. Поэтому Ф.Г. Добржанский спрашивал: «Нельзя ли было бы, чтобы директором института генетики стал Н.И. Вавилов, а меня бы назначили зам – пом – или чем-либо в таком роде?» (Там же. Л. 36–36 об).

Коллеги Ф.Г. Добржанского в Ленинграде последовали его рекомендациям и Н.И. Вавилов стал директором ИГЕН. А вот его фактическим заместителем, т. е. первоначально ученым секретарем ЛАГ назначили вовсе не Ф.Г. Добржанского, как он просил, а Т.К. Лепина. В связи с этим Т.К. Лепин более чем пространно объяснялся по этому поводу в письме от 12 июня 1931 г. (APSL. В:D65 Th. Dobzhansky Papers. Lepin, Т.К.), но, судя по тому, что предлагал Ф.Г. Добржанскому в своих письмах Н.И. Вавилов, Ф.Г. Добржанскому было намечено предоставить всего лишь должность ученого специалиста (см. напр.: У истоков ..., 2002. С. 420).

Но становиться рядовым научным сотрудником без ясных перспектив, прежде всего исследовательских, а также материальных, Ф.Г. Добржанский не считал возможным, хотя и предпочел бы отчизну: «Мне, как я уже писал, до зарезу хочется вернуться на родину, надоело тут страшно...» (РО РНБ. Л. 38об). Ему же, как и его ученику Ю.Я. Керкису, пришлось бы, имея 150 рублей зарплаты, «сводить концы с

концами». Начинать опять все с нуля, как ему предлагалось, он не хотел.

## ОБВИНЕНИЕ И ОПРАВДАНИЕ

Моралисты, вероятно, радостно воскликнут: «Вот видите! Он же еще и торгуется. Ставит *Родине* условия!». Действительно, можно сказать, что если уж *до зарезу* хочется вернуться на родину, то возвращаются, а не пишут, что и в чужой стране, где «надоело страшно», все же пристроен. Значит, наверное, все же *не до зарезу*. Но не странна ли, тем не менее, сама постановка вопроса и логика, за такой постановкой вопроса скрывающаяся: человек в любом случае обязан вернуться в страну (как холоп в поместье, как раб на фазенду, как заключенный в тюрьму или лагерь), а *Родина* посмотрит, куда и кем назначить, дать работу или не дать, облагодетельствовать или наказать. Но тогда естественен и правомерен другой вопрос: А в чем преступление-то? И по отношению к кому оно совершено? Кто конкретно эта «*Родина*»? Тут-то и выясняется, что Родиной уже был не Ю.А. Филипченко, не милейший и самоотверженный Н.И. Вавилов, не старые большевики, не та самая «ленинская гвардия», которая была авангардом свершившего революцию 1917 г. народа, а совсем, совсем другие люди. Те, кто уже готовил так называемый Большой Террор и потом его осуществил, арестовав и сгноив в тюрьме или расстреляв многих и многих милейших, самоотверженнейших, действительно преданных новой, социалистической, лучшей, как они верили, в мире Родине – стране трудящихся. Есть ли хоть какие-либо основания сомневаться в том, что, вернись Ф.Г. Добржанский на *эту* Родину, его ждала бы та же судьба, что и Н.И. Вавилова – арест, ночные допросы и смерть?

Один из современных критиков решения Ф.Г. Добржанского остаться в США сначала охотно констатирует: «Вообще-то говоря, в этой истории нет абсолютно ничего примечательного – откушав сытного американского пирога, товарищ предпочел его отечественному черному хлебу... (А «демократию» – «тоталитаризму» и далее по списку...)» (Тарсков, <http://lysenkoism.narod.ru/dob.htm>). Затем разъясняет свою констатацию: «Реальность состоит в том, что Добржанский стал просто еще одним эмигрантом, «невозвраща-

щенцем», оставшимся для того, чтобы более комфортно и успешно устроить свою жизнь за границей» (Там же). Но этого ему кажется недостаточно и он добавляет: «Его очаровала Америка – ее климат, ее экономика, ее возможности; он получил сразу все, о чем мог только мечтать: интересную работу, стабильность, уважение, комфорт... И он сделал свой выбор. Между теплой, сытой и стабильной Америкой и холодной, голодной и нестабильной Россией он выбрал первое. Надо ли его за это осуждать? Это личное дело каждого. Вот только делать из Добржанского несчастного патриота и жертву лысенковщины уж точно не надо...» (Там же).

Мораль сей современной басни, выложенной в Интернете на сайте, специально посвященном оправданию Т.Д. Лысенко и лысенкоизма, а заодно, само собой, и его покровителей, в первую очередь, конечно же, И.В. Сталина и сталинизма в целом, однако, несколько иная, чем та, что выражена в последней фразе. И дается она не в самом тексте, а в постскрипуме: «А кем вообще были инициированы эти изменения в атмосфере научного творчества? Лысенко-то тогда еще рядом не было! 1930–1931 год... Кто там у нас задает тон?...» (Там же). Ответа на эти вопросы их автор не дает, и совсем не случайно. Явно знакомый с перепиской Ф.Г. Добржанского с Ю.А. Филипченко, он умалчивает о ряде важных фактов, в частности о том, что Ю.А. Филипченко *вынужден* был уйти из университета, о чем и писал Ф.Г. Добржанскому (У истоков ..., 2002. С. 407) как и об общем изменении атмосферы в университете и в науке в целом (У истоков ..., 2002. С. 401, 404) в этот действительно переломный для страны период. Тогда Ф.Г. Добржанский и заявил, что при таких обстоятельствах не может вернуться к установленному ему сроку (У истоков ..., 2002. С. 260–261).

Да, Ф.Г. Добржанский не был прямой жертвой лысенкоизма, хотя из-за критики лысенкоизма (Коначев, 1994б) ему не разрешили побывать на родине в 1960-е гг. Но его невозвращение – одно из последствий установления сталинизма как специфически трансформировавшегося многовекового российского авторитаризма.

Сам ярлык «невозвращенец» и то, как он использовался, – прямое порождение становления сталинизма. В числе тех, кто не вернулся в сталинизирующийся СССР, были члены семьи

и ближайшего окружения наркома внешней торговли Л.Б. Красина, руководители первых дипломатических миссий Н.З. Бравин и И.Л. Дзевялковский, деятели Коминтерна А.И. Балабанова, Я.С. Рейх, А.Ю. Руднянский, председатель Госбанка А.Л. Шейнман, экономист Н.А. Орлов, инженер Ю.В. Ломоносов, поэт А.Б. Ярославский, лингвист Р.О. Якобсон и многие другие (см. Генис, 2000, 2009). Первый диагноз сталинизму поставили, таким образом, не Т.В. Сапронов, не М.Н. Рютин и не Л.Д. Троцкий, а первые «невозвращенцы», являвшиеся до того «верными слугами режима». И их невозвращение было не только и не столько «бегством», сколько вызовом сталинской системе. Потому-то они и представляли для нее опасность, потому-то и были объявлены в 1929 г. «вне закона».

Ф.Г. Добржанский мог выбрать возвращение в такой СССР, но не выбрал, это правда. Осуждать ли его за это? И кто на самом деле имеет или имел бы моральное право это сделать? Те коллеги, которые в отличие от него вернулись? В.В. Алпатов, Г.Д. Карпеченко, Н.И. Вавилов? Те его коллеги и друзья, с кем он переписывался, пока переписка не оборвалась? Ю.А. Филипченко, Ю.Я. Керкис, Н.Н. Медведев, Т.К. Лепин, М.Н. Римский-Корсаков? Почему-то никто из них, ни один человек его не осудил. К тому же на классический вопрос «А судьи кто?» ответ тоже уже дан (Захаров-Гезехус, 2011).

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 10-06-00124-а.

## ЛИТЕРАТУРА

- Анохин М. Академик Лысенко и бедная овечка Долли // Литературная газета. 2009а. № 11 (13 марта).  
 Анохин М. Про бедную овечку забыли // Литературная газета. 2009б. № 23 (3 июня).  
 Генис В.Л. Невозвращенцы 1920-х–начала 1930-х годов // Вопросы истории. 2000. № 1. С. 46–63.  
 Генис В.Л. Неверные слуги режима: Первые советские невозвращенцы (1920–1933): Опыт документального исследования в 2 кн. Кн. 1: «Бежал и перешел в лагерь буржуазии...» (1920–1929). М., 2009. 704 с.  
 Захаров-Гезехус И.А. Эксгумация лысенковщины (о публикациях П.Ф. Кононкова, Н.В. Овчинникова, В.И. Пыженкова) // Историко-биологические исследования. 2011. № 2. С. 124–129.  
 Коначев М.Б. Феодосий Григорьевич Добржанский и становление генетики в Ленинградском университете //

- Исследования по генетике. 1994а. Вып. 11. С. 29–36.
- Конашев М.Б. На поприще клеветы против советских биологов (критика Ф.Г. Добржанским лысенкоизма) // Эволюционная биология (Труды Санкт-Петербургского общества естествоиспытателей. Т. 90, вып. 1). СПб., 1994б. С. 60–74.
- Конашев М.Б. Об одной научной командировке, оказавшейся бессрочной // Репрессированная наука. Л.: Наука, 1991. С. 240–263.
- Конашев М.Б. Ровесник генетики, ровесник века: Ф.Г. Добржанский (1900–1975 гг.) // Деятели русской науки XIX–XX веков. Вып. 4. СПб.: Нестор-История, 2008. С. 193–228.
- Конашев М.Б. Ф.Г. Добржанский – эволюционный генетик и мыслитель. СПб.: Изд-во СПбСУ, 2010а. 50 с.
- Конашев М.Б. Добржанский и религия // Человек. 2010б. № 1. С. 30–48.
- Кононков П.Ф. Вклад Т.Д. Лысенко в победу в Великой Отечественной войне. М.: Самообразование, 2010. 16 с.
- Овчинников Н.В. Академик Трофим Денисович Лысенко / Под ред. П. Кононкова. М.: Луч, 2010. 232 с. РО РНБ. Ф. 813. Оп. 1. Д. 1286.
- Тарсков А. Почему Добржанский остался в Америке // <http://lysenkoism.narod.ru/dob.htm>
- Трофим Денисович Лысенко – советский агроном, биолог, селекционер: Сб. статей. М.: Самообразование, 2008. 192 с.
- У истоков академической генетики в Санкт-Петербурге. СПб.: Наука, 2002. 558 с.
- APSL. B:D65 Th. Dobzhansky Papers. [Notebooks\*].
- APSL. B:D65 Th. Dobzhansky Papers. Kerkis.
- APSL. B:D65 Th. Dobzhansky Papers. Lepin, T. K.
- APSL. B:D65 Th. Dobzhansky Papers. Medvedev, N.
- APSL. B:D65 Th. Dobzhansky Papers. Unknown (Russian).
- Land B. Evolution of a Scientist: The Two Worlds of Th. Dobzhansky. N.Y., 1973. 203 p.
- The Reminiscences of Theodosius Dobzhansky. Part I. Columbia University, Oral History Research Office. N.Y., 1962. 639 p.

## ST. THEODOSIUS PASSION. HOW AND WHY TH.G. DOBZHANSKY BECAME A NON-RETURNER

**M.B. Konashev**

St. Petersburg Branch, Institute of the History of Science and Technology,  
Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, e-mail: [mbkonashev@mail.ru](mailto:mbkonashev@mail.ru)

### Summary

Within one year since May 1930 till August 1931 Th. Dobzhansky undertook an intership in the USA on a scholarship from the International Education Board (The Rockefeller Foundation). His preparation for returning to the USSR included all necessary actions for getting a new job and prolongation of his and his wife's passports. After receiving three letters from N.I. Vavilov, of June, 9, 11 and 12, 1931, Th. Dobzhansky decided to stay in the USA and became an asylee (the Russian term "nevozvrashchenets" literally means non-returner). In 1932, at the 6th International Genetic Congress in Ithaca, USA, N.I. Vavilov said that Dobzhansky's decision was sound.

**Key words:** Th. Dobzhansky, genetics, non-returner (nevozvrashchenets), Stalinism.

УДК 575.1/2

## ЭВОЛЮЦИОННЫЙ СИНТЕЗ ЛЕДЬЯРДА СТЕББИНСА

© 2013 г. В.А. Соколов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения РАН,  
Новосибирск, Россия, e-mail: sokolov@mcb.nsc.ru;

<sup>2</sup> Государственное научное учреждение, Всероссийский научно-исследовательский институт  
растениеводства им. Н.И. Вавилова Российской академии сельскохозяйственных наук,  
Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 19 апреля 2012 г. Принята к публикации 29 мая 2012 г.

В статье изложена история формирования идеи эволюционного синтеза на растительных объектах и его экспериментальное обоснование. Показана роль Сергея Михайловича Навашина, Эдварда Бэбкока и Ледьярда Стеббинса в построении экспериментальных оснований эволюционного синтеза на ботаническом материале. Изложена история формирования взглядов Л. Стеббинса на роль гибридизации и полиплоидии в эволюционном процессе у растений. Рассмотрены гениальные предвидения Л. Стеббинса о роли полного удвоения геномов в расширении изменчивости, получить доказательства которых стало возможным только с началом использования методов геномики.

**Ключевые слова:** полиплоиды, межвидовые гибриды, полиплоидные комплексы, агамные комплексы, апомиксис, эволюция у растений, Джордж Ледьярд Стеббинс, Эрнест Бэбкок, Сергей Михайлович Навашин.

Джордж Ледьярд Стеббинс (младший), родился 6 января 1906 г. и был назван в честь отца. Позже, после его смерти, он предпочитал имя Ледьярд и опускал слово «младший». О своем социальном происхождении он писал: «Моя семья принадлежала к верхнему слою среднего класса, белых протестантов в Нью-Йорке и Новой Англии. Отец был преуспевающим торговцем недвижимостью. Он владел риелторской конторой в штате Мэн и много сделал для развития располагавшегося там горного курортного района «Пустынный остров». Кроме того, он приложил много сил в дело организации Национального парка «Акадия».

В первые восемь лет жизни Л. Стеббинса семья проводила полгода на побережье залива Моржей (штат Мэн) и полгода – в Вудмере на Лонгайленде в Нью-Йорке. Позже по причине болезни матери на зиму они перебирались в Калифорнию или Колорадо. С 1922 г. по 1929 г. Л. Стеббинс на все лето поселялся в заливе Моржей. С раннего детства Л. Стеббинс проявлял стремление проводить время вне дома и

обнаружил увлеченность растениями. Никто из его родителей не был натуралистом-биологом или как-либо связан с наукой, но оба интересовались естественной историей. Они поддерживали интерес сына к природе. Немалую роль в этом сыграл и их сосед, профессор геологии из Йельского университета Эдвард Дана. Родители отметили у ребенка тягу к знаниям с трех лет и стремились дать хорошее образование. Поэтому он обучался только в частных школах. Из-за болезни матери Ледьярд с 8 лет воспитывался в основном гувернерами или наставниками школ и проводил много времени в походах, горных путешествиях и изучении растительного мира. Кроме того, он усердно занимался музыкой и брал уроки игры на фортепьяно в течение 7 лет. Но в связи с врожденной спецификой моторики мышц он не мог исполнять серьезные произведения. Однако Л. Стеббинс через всю жизнь пронес любовь к классической музыке. В студенческие годы он был активным участником мужского хора Гарвардского университета.

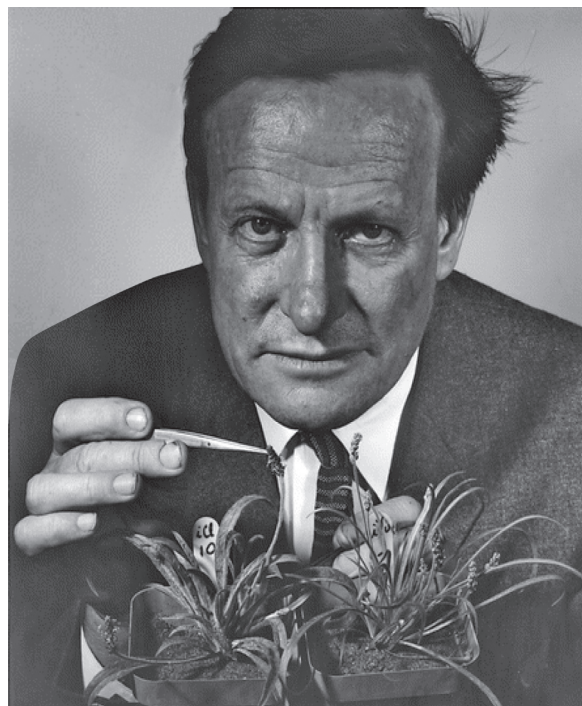
Наиболее значительный школьный период взросления, социализации и интеллектуального роста был у него в течение 4 лет в Санта-Барбаре. Здесь он освоил верховую езду на лошади, исследовал горы Санта Инец и попал под влияние ботаника Ральфа Хофмана, который заинтересовал его растениями и естественной историей этого замечательного региона.

В 1924 г. Л. Стеббинс поступил в Гарвард. Это было продиктовано традициями семьи, а также тем, что в это время там учился его старший брат Генри. Поначалу Ледьярд был в затруднении в связи с выбором будущей профессии. Лето после первого курса он провел в изучении растений на берегу залива Бар в штате Мэн. Здесь он встретился с профессором ботаники Университета Пенсильвании, специалистом по мхам Эдгаром Уэрри. Эта встреча, видимо, и определила окончательное решение Л. Стеббинса посвятить свою жизнь исследованию растений.

К выполнению дипломной работы он приступил в 1928 г. в отделе ботаники Университета Гарварда. Полученный в этой работе опыт сформировал его будущий научный стиль. Он на всю жизнь сохранил тенденцию переходить от одного направления исследований к другому, если этого требовала логика развития проводимых экспериментов, невзирая на неминуемые сложности в отношениях с руководителями. Первые флористические исследования Л. Стеббинс выполнил в гербарии Грэя под руководством известного систематика М.Л. Фернолда (M.L. Fernald). Следует отметить, что он быстро потерял интерес к устаревшим таксономическим методам, предложенным руководителем, и был расстроен его жесткостью в отношениях с подчиненными. Он с горечью иронизировал, что самый сухой экспонат в гербарии – профессор М. Фернолд. Его симпатии склонялись к методам таксономии, развиваемым Карлом Саксом (K. Sax), который использовал цитогенетические принципы для углубленного понимания систематических взаимосвязей растений. Докторская работа Л. Стеббинса была посвящена анатомическим и цитологическим исследованиям микроспорогенеза у антеннарии (кошачьей лапки).

Его руководителем стал известный морфолог и цитолог Э.К. Джеффри (E.C. Jeffrey).

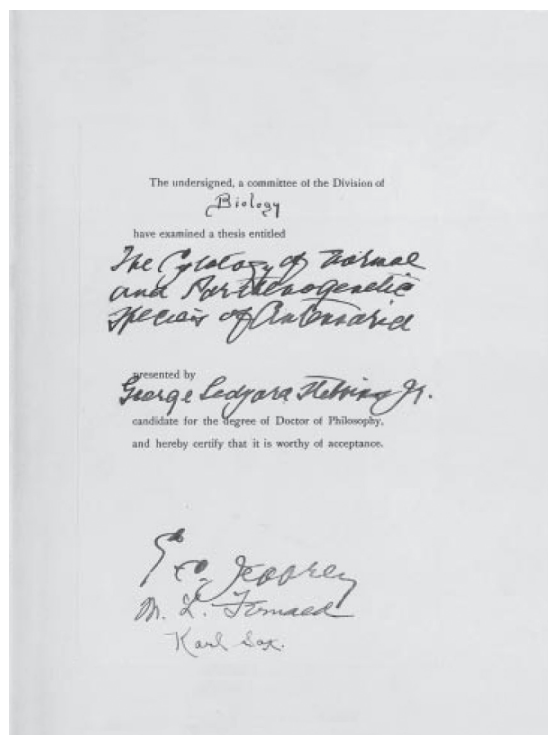
Л. Стеббинс легко находил объекты для своих исследований на близлежащих холмах и одновременно изучал географическую изменчивость среди видов этого рода. Работа захватила его, но возникли и все более углублялись разногласия с руководителем. Дело в том, что Э. Джеффри был ортодоксальным ботаником и нетерпимо относился к выходцам из «генетического гнезда» Т.Г. Моргана, к которым принадлежал известный цитогенетик растений К. Сакс. Он был сторонником идиосинкратической теории происхождения видов за счет гибридизации, ранее предложенной Дж. Лотси (Lotsy, 1916). Кроме того, Э. Джеффри вел активную кампанию против моргановской генетики и настаивал на константности генов и отсутствии эволюции у растений за счет наследственной изменчивости. Л. Стеббинс в силу своего образования был готов оценить значение генетических методов в ботанической систематике. Дело в том, что обучаясь в Гарварде, он был частым гостем в библиотеке Института Басси (Bussey Institution) и знакомился с генетическими журналами, такими, как *Hereditas* и *Genetica*, где публиковались А. Мюнтцинг и К. Хаскинс (A. Muntzing, C.L. Huskins). Кроме того, он общался с Э. Истом (E.M. East), а также други-



**Фото 1.** Л. Стеббинс проводит гибридизацию.

ми выдающимися специалистами по генетике кукурузы из Института Басси и прослушал курс генетики У. Кастла (W.E. Castle). Интерес Л. Стеббинса к генетической литературе стал еще глубже после того, как он стал работать с Карлом Саксом. Однако их взаимодействие и дружба вызывали не лучшие чувства у непосредственного руководителя, Э. Джеффри, при обсуждении диссертации Л. Стеббинса. К. Сакс критически высказался относительно ошибок в цитогенетической части работы, после чего возмущенный Э. Джеффри демонстративно покинул зал заседания. В результате Л. Стеббинс оказался под перекрестным огнем со стороны духовного и формального руководителей. Благодаря вмешательству Ральфа Ветмора и других коллег диссертация в итоге была принята к защите. Однако внесение поправок и согласования отняли значительное время как у автора, так и у комитета по рассмотрению споров. До сих пор эта работа хранится в архиве Гарвардского университета как напоминание о противостоянии личностей в отделе ботаники тех времен (рис. 1).

Диссертация была закончена в 1931 г. и опубликована в составе двух работ в 1932 г. (Stebbins, 1932a, b). К этому моменту он уже имел несколько флористических публикаций совместно с М. Фернолдом. Одним из знаковых событий в ранней карьере Л. Стеббинса было участие в Международном ботаническом конгрессе в Кембридже в 1930 г. Там он встретил Эдгара Андерсона (Edgar Anderson), который стал его другом и коллегой на всю жизнь, Ирен Мантон (I. Manton) и Кирила Дарлингтона (C. Darlington). Эти контакты, наряду с другими, еще более укрепили его интерес к занятиям ботаникой и сохранились на всю дальнейшую жизнь. После защиты диссертации Л. Стеббинс 4 года работал в Университете Колгейта (1931–1935 гг.). Позже он вспоминал эти годы как потерянные, по причине того, что подавляющую часть времени забирала учебная нагрузка. Несмотря на все препятствия, он находил время для исследований, сконцентрировавшись на работе по цитогенетике пионов. Эти исследования были проведены совместно с П. Саундерсом (P. Saunders). Они осуществили сравнительные цитогенетические исследования гибридных форм пионов Старого и Нового Света. Эта работа была первой из серии



**Рис. 1.** Обложка диссертации Л. Стеббинса с подписями участников дискуссии Э. Джеффри, М. Фернолда и К. Сакса.

биосистематических исследований обширной группы растений, которые в дальнейшем преобладали в его научной карьере. Примечательно, что эксперименты проводились в цоколе дома П. Саундерса, где они оборудовали лабораторию. У западных североамериканских видов пионов этого рода они обнаружили комплексы структурных гетерозигот. В дальнейшем это открытие поддерживало творческий энтузиазм Л. Стеббинса в цитогенетических исследованиях.

Совместно с П. Саундерсом он участвовал в Генетическом конгрессе в Итаке (1932 г.). Несомненно, что Генетический конгресс имел решающее значение в определении научной судьбы Л. Стеббинса. Очень многие доклады на сессиях и пленарных заседаниях определили развитие генетических исследований на многие годы вперед. Так, сильное впечатление на Л. Стеббинса произвело сообщение Барбары Мак-Клинтон о результатах цитогенетических исследований на кукурузе. Она показала линейное спаривание родительских хромосом в середине профазы или пахитене мейоза и кроссинговер между

ними, а также продемонстрировала присутствие инверсий и транслокаций. Несколькими годами позднее Л. Стеббинс подтвердил некоторые из этих фактов на пионах и был первым, кто показал образование кольцевых хромосом у этого рода. Эта работа не была прорывной, но она подтвердила результаты Б. Мак-Клинтон и других исследователей (Stebbins, Ellerton, 1939). Незабываемыми моментами конгресса для него стали знаменитое послание Т.Г. Моргана и дискуссия К. Сакса и К. Дарлингтона по теории хиазм, равно как и постер Д. Беллинга (John Belling) с демонстрацией хромомер, которые ошибочно идентифицировались как гены.

В 1935 г. профессор Эрнест Бэбкок пригласил Л. Стеббинса в Калифорнийский университет на должность исследователя. В Беркли Л. Стеббинс принял активное участие в выборной компании Ф. Рузвельта, с чего началась его связь с демократической партией, продолжавшаяся до конца жизни.

Здесь необходимо вернуться в начало 20-го века и проследить формирование идеологии, которая привела к выдающимся результатам по эволюционному синтезу на основе ботанического материала. Организатором и вдохновителем проекта по изучению факторов эволюции растений являлся Эрнест Бэбкок. По университетскому образованию он был агрономом и занимался селекцией плодовых деревьев (цитрусовые, персики и грецкий орех). В 1901 г. еще студентом Э. Бэбкок познакомился с выдающимся селекционером Л. Бербанком и получил от него первые наставления по подбору исходного материала. В 1903 г. ему посчастливилось прослушать лекции Гуго де Фриза по мутационной теории и он проникся значимостью наследования и варибельности признаков с точки зрения селекции. В 1912 г. декан Агрономического колледжа Калифорнийского университета в Беркли принял решение о создании четырех новых отделов: 1 – агрохимии; 2 – почвоведения; 3 – семеноводства; 4 – основ селекции растений и животных. Последний отдел поручили возглавить Э. Бэбкоку, учитывая его достижения по созданию сортов персика и грецкого ореха. В процессе организационных мероприятий Э. Бэбкок переименовал новое подразделение в «Отдел генетики», создав первое академическое учреждение с таким названием на территории

США. Основной задачей нового подразделения должно было стать теоретическое обоснование селекции на основе знаний о наследовании признаков. Продолжая селекционную работу и преподавание Э. Бэбкок в соавторстве с Р. Клаусеном написал учебник «Genetics in Relation to Agriculture». Эту книгу высоко оценил Ж. Шелл, генетик из Принстона, назвав лучшим из существующих учебных пособий. Ее переработанное издание вышло в 1927 г. Этим учебником долго пользовались в различных университетах США и он выдержал 17 переизданий. Кроме того, Э. Бэбкок совместно с Л. Коллинсом издал практикум по генетике (Babcock, Collins, 1918). Э. Бэбкок считал, что миссия Университета Беркли – это проведение фундаментальных исследований, необходимых для обеспечения селекционного процесса.

Продолжая преподавать морганистскую генетику, Э. Бэбкок постоянно размышлял о том, что с точки зрения агрономии и практической селекции необходимо работать с генетической моделью из царства растений. Такой объект должен удовлетворять целому ряду требований, что позднее было изложено в статье, опубликованной в «American Naturalist» (Babcock, 1920). По мнению Э. Бэбкока, модельные растения должны иметь короткий жизненный цикл, быть удобными в выращивании и гибридизации и давать большое по численности потомство. Э. Бэбкок понимал, что у любого растительного объекта цикл размножения продолжительнее, чем у дрозофилы, но зато растения могут размножаться вегетативно, т. е. клонироваться. Искомая модель должна была иметь малое число хромосом и много морфологических признаков для создания плотной генетической карты. Поначалу он склонялся к тому, чтобы взять *Hemizonia congesta* (амброзию полыннолистную). Но, прочитав работу Э. Иста и узнав, что у скерды диплоидный набор состоит всего из 6 хромосом, он отдал предпочтение этому виду. О своем решении Э. Бэбкок сообщил Ж. Шеллу с просьбой оценить правильность выбора модели и сообщить имена исследователей, работающих с этим растением. Шелл ответил, что малое число хромосом, несомненно, делает его удобным, но необходимо знать, нет ли у него партеногенеза, чтобы не повторить ошибку Менделя с ястребинкой. В Европе с *Crepis* работали

всего 4 исследователя: Н.О. Juel, О. Rosenberg, L. Digby и Михаил Сергеевич Навашин, который опубликовал статью о числах хромосом и их варьировании у видов рода *Crepis* (Навашин, 1915). Последняя работа Э. Бэбкоку была не известна, и только позднее он узнал о молодом российском исследователе из публикации в «Genetics» и смог пригласить его в США (Navashin, 1925a). Кроме малого числа хромосом, *Crepis* имел и другие удобные, с точки зрения экспериментатора, качества: широкую гамму морфологических форм и обширное географическое распространение в Старом и Новом Свете – от пустынь до болот и от морских побережий до альпийских лугов. Род достаточно богат видами – всего более 225. Многие из них дают плодовые гибриды и могут выращиваться в условиях теплиц. Взвесив все обстоятельства, Э. Бэбкок заключил, что *Crepis* вполне подходит на роль модельного объекта и может быть использован в генетических экспериментах (Babcock, 1920). В то время, когда Э. Бэбкок выбирал ботаническую альтернативу дрозофиле, наследование и сцепление признаков уже исследовалось на горохе, ячмене, кукурузе и других растениях. Наиболее удобным был горох с  $2n = 14$  и необычайно богатой морфологией, что позволяло создавать генетические карты высокой плотности. Но обнаруженное число групп сцепления у этих видов не соответствовало числу хромосом. Это, видимо, и послужило основным аргументом Э. Бэбкока в окончательном выборе *Crepis capillaris* с  $2n = 6$  (Babcock, 1920).

Работа с *Crepis* была начата в 1915 г. и результаты по генетике, полученные к 1922 г., были более чем скромные – две публикации в «Science» в сумме размером менее одной страницы (Babcock, Collins, 1922a, b). Это свидетельствовало о том, что с генетической точки зрения выбор оказался неудачным. Однако анализ данных гибридизации позволил сделать ряд принципиальных выводов относительно механизмов видообразования в роде *Crepis* (Babcock, 1924b). В то время возникновение новых таксонов объясняли, исходя из двух гипотез: 1) в результате мутационного процесса (Т. Морган и Г. де Фриз); 2) продуктом гибридизации существующих видов (Дж. Лотси). Исследования Э. Бэбкока позволили заключить, что оба эти процесса вносят вклад в эволюционные события, но, кроме

того, возможны и ламарковские феномены, т. е. наследование приобретенных признаков (Babcock, 1924a).

Далее, несмотря на первоначальную задачу по генетическому обеспечению селекционного процесса, Э. Бэбкок изменил направление исследований в сторону изучения эволюционных преобразований в этом таксоне. Он верно оценил сложность обнаруженных проблем, препятствовавших использованию скерды в качестве генетической модели. Главная из них – невозможность быстрого создания генетических карт достаточной плотности. Кроме того, обнаружились сложности таксономических связей среди видов *Crepis*. Поэтому, прежде чем проводить генетические исследования, требовалось прояснить эволюционные взаимосвязи среди образцов.

Именно в этом направлении Э. Бэбкок и начал переориентацию своих исследований, используя новые принципы систематики, базирующиеся на генетических и цитогенетических знаниях. Методической основой этих подходов послужили работы его коллег (Hall, Clements, 1923). В итоге направление по систематике и эволюционным взаимоотношениям видов в роде *Crepis* стало ведущим в проекте (Babcock, 1924a, b). В 1927 г. в коллектив отдела генетики вошел советский цитогенетик М.С. Навашин, привезший с собой серию необычных мутантов, часть из которых были получены с использованием X-лучей. Он проработал с Э. Бэбкоком около 3 лет, и в 1930 г. они опубликовали первую в мире монографию по роду *Crepis*, где рассматривались вопросы таксономии, цитологии и генетики. Заключительная глава монографии была посвящена эволюционным факторам, оперирующим в этом роде (Babcock, Navashin, 1930). После детального изложения доказательств Э. Бэбкок и М.С. Навашин сделали выводы о том, что эволюция видов в роде *Crepis* обеспечивается тремя процессами: 1) точечными мутациями; 2) изменением числа и морфологии хромосом; 3) межвидовой гибридизацией. Они не могли расставить акценты в этом списке, т. е. отдать ведущую роль какому-либо из процессов.

По окончании гранта Э. Бэбкок приложил немало усилий, чтобы устроить М.С. Навашина на новую позицию, но ему это не удалось.



Таким образом, работа по цитогенетике эволюционного процесса в роде *Crepis* во время пребывания Михаила Сергеевича в Беркли получила мощный импульс. Ее результатом стали не только выход монографии, но и защита им докторской диссертации и несколько публикаций. На основе этих материалов М.С. Навашин сделал вывод, что эволюция видов *Crepis* определяется редукцией числа хромосом. Это происходит за счет их реконструкции в результате транслокаций (Babcock, 1934). Здесь необходимо отметить, что ранее эту идею высказывал М.С. Навашин (Nawashin, 1925b, 1926). В своих выводах Бэбкок опирался, в том числе, и на работу М.С. Навашина по дислокации (Navashin, 1932). Скорее всего, более ранняя работа Михаила Сергеевича была незнакома Э. Бэбкоку, потому что была опубликована на русском языке (Навашин, 1927). Этот результат расходился с теорией естественного отбора, разрабатываемой С. Райтом, Р. Фишером и Дж. Холдейном.

В 1934 г. Э. Бэбкок расширил исследовательскую программу по *Crepis*, включив в нее подробное изучение географического распространения этого рода и других систематически близких ему таксонов. К 1935 г. результаты изучения *Crepis* представляли сложную картину. Стало совершенно очевидно, что североамериканские виды имеют иной характер генетических взаимосвязей в сравнении с европейскими диплоидными формами ( $2n = 6, 8, 10$  и  $12$ ). Гибриды между ними были в высокой степени стерильны, с аномальным поведением хромосом в мейозе. В противоположность этому американские формы имели гаплоидное число хромосом от 11 и выше и достаточно легко давали плодовые гибриды. Э. Бэбкок постулировал, что американские виды в основном являются аллополиплоидами (Babcock, 1931, 1934; Babcock, Cameron, 1934). На основе их географического распространения можно было сказать, что они состоят из двух основных групп. Одна обитает на равнинах среднего запада или увлажненных почвах западнее реки Миссури и до восточных склонов Сьерра-Невады. Геномы растений в ней всегда состоят из диплоидного числа хромосом, равного 22.

Другая, более интересная, группа встречается преимущественно в горах от Колорадо на запад вплоть до Калифорнии и характеризуется

хромосомными наборами от  $2n = 2x = 22$  до  $2n = 4x = 44$ . Морфологические характеристики второй группы представляют собой смесь имеющихся у 22- и 44-хромосомных цитотипов. Поскольку многие из этих, по-видимому, гибридных форм имели abortивные пыльники и пыльцу аномальной формы, то Э. Бэбкок предположил, что они апомикты и размножаются бесполосеменным путем (Babcock, 1934).

Когда в 1935 г. Л. Стеббинс присоединился к проекту по *Crepis*, в его обязанности входило изучение хромосомных чисел ближайших родственников этого рода в трибе Cichorieae. Но он не только вел рутинную цитогенетическую работу, но и заинтересовался результатами Э. Бэбкока, полученными при изучении североамериканских видов рода *Crepis*. Они напомнили ему его собственные данные по соотношению некоторых признаков у видов *Antennaria* (кошачья лапка) и у *Paeonia* (пионов). Его достижения по проекту с *Antennaria*, который он выполнял в Гарварде, пролили лишь незначительный свет на эволюцию растений этого рода. Л. Стеббинс нашел гибриды между двумя 28-хромосомными формами *Antennaria*, *A. plantaginifolia* и *A. neglecta*, но они не проявляли апомиксиса и были обычными частично стерильными межвидовыми гибридами. Даже гексаплоидный вид *A. parlinii* из северной Вирджинии не выявлял признаков бесполосеменного размножения. Он был высокостерилен и, следовательно, обладал слабым адаптивным потенциалом. Таким образом, Л. Стеббинсу не удалось выявить каких-либо примеров, свидетельствующих о связи гибридизации и апомиксиса у *Antennaria*. Его работа в университете Колгейта с пионами была более ценна для понимания процессов, наблюдающихся у *Crepis*. В совместной работе с П. Саундерсом они показали, что диплоидные формы пионов являются стабильными и барьер нескрещиваемости между ними обеспечивается разницей в наборах хромосом. Однако некоторые образцы были тетраплоидами и представляли, по всей видимости, смесь разных видов. Когда Л. Стеббинс и П. Саундерс начали изучать их географическое распространение, то обнаружили, что средиземноморские формы очень близки к диплоидам этого ареала из группы *P. coral-line*. Они, в свою очередь, имели непрерывную

цепь переходных форм с диплоидом из группы *P. officinalis*. Некоторые из тетраплоидов *P. officinalis* походили на *P. anomala* из восточной Азии. Л. Стеббинс пришел к заключению, что распространенность цитотипов *Crepis* имеет географические закономерности и напоминает картину, наблюдаемую им у пионов. Это обстоятельство его весьма воодушевило, и он попросил Э. Бэбкока поработать совместно с ним по североамериканским видам. Предложение было принято, и с весны 1936 г. Ледъярд стал соисполнителем двух проектов. Он участвовал в экспедициях по сбору *Crepis*. У собранных образцов определили хромосомные числа, материал был классифицирован по плоидности методами измерения устьиц и оценки качества пыльцы. После этого было проведено сравнение с ранее собранными гербарными образцами. Используя статистический аппарат, созданный Э. Андерсоном, Л. Стеббинс сравнил варибельность диплоидных и тетраплоидных популяций *Crepis*. По окончании этой работы картина взаимоотношений между полиплоидией, гибридизацией и апомиксисом прояснилась.

Результаты этого обширного исследования были опубликованы в 1938 г. (Babcock, Stebbins, 1938; Babcock *et al.*, 1942). Для обоих ученых выход монографии послужил основанием к самоутверждению и сделал их известными.

Линия доказательств и форма обоснований, использованных для понимания эволюции

американских видов, давшие начало концепции полиплоидных комплексов, были сложными, и не всегда очевидными. На основе имевшей место эволюции Л. Стеббинс и Э. Бэбкок классифицировали американские виды *Crepis* на две группы.

Первая из них состояла из вида *C. runcinata*, размножающегося половым путем, который не претерпел хромосомных изменений со времени своего возникновения от гибридизации между 8- и 14-хромосомными видами. Эволюция в этой группе протекала обычным путем – мутации генов и естественный отбор в конкретных условиях обитания. Такие формы немецкий эволюционист Р. Ренч назвал политипическими видами (Rassenkreis), т. е. имеющими множественные фенотипические варианты.

Вторая группа состояла из 9 видов, являвшихся продуктом различных эволюционных процессов, включая полиплоидию, апомиксис и гибридизацию. Половые формы этих видов отличались друг от друга морфологически и имели разные географические зоны распространения, т. е. генетически были изолированы друг от друга. Между ними не были обнаружены диплоидные гибриды, но полиплоиды встречались в изобилии (рис. 2).

Э. Бэбкок и Л. Стеббинс писали, что они были либо идентичны с некоторыми из диплоидов, отличаясь лишь по физическим размерам, либо несли признаки нескольких форм (Babcock, Stebbins, 1938). По всей видимости, такие полиплоиды эволюционировали от диплоидов. Отсюда Э. Бэбкок и Л. Стеббинс заключили, что у них имела место дивергентная эволюция, а приобретенное разнообразие есть результат увеличения числа геномов, апомиксиса и гибридизации (Babcock, Stebbins, 1938; Stebbins, Babcock, 1939). Морфологические изменения, наблюдаемые во второй группе, хорошо укладывались в три основные категории: увеличение размеров (гигантизм – благодаря полиплоидии); рекомбинация признаков диплоидов (результат гибридизации); формирование апомиктических микровидов (или видов, резко отличающихся от других благодаря единичным изменениям). Такие апомикты выявляли совершенно отличающиеся по варибельности образцы и располагались в центре ареала рядом с аналогичными диплоидными формами.

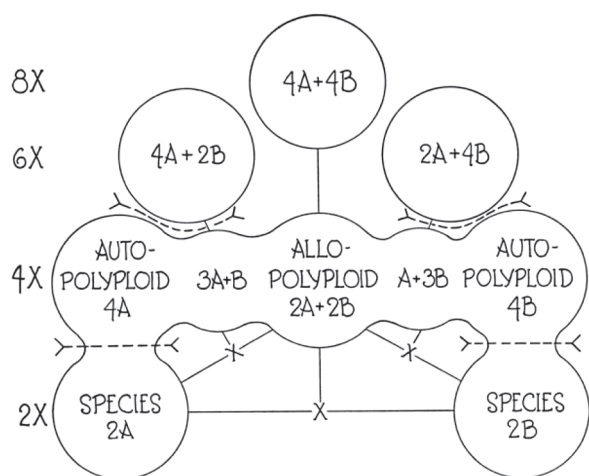


Рис. 2. Гипотетическая диаграмма, иллюстрирующая половой полиплоидный комплекс (Babcock, Stebbins, 1938).

Такое совместное произрастание диплоидов в окружении бесполосеменных полиплоидов Стеббинс и Бэбкок назвали агамными комплексами (рис. 3).

Агамные комплексы демонстрируют высокую вариабельность в центре распределения диплоидных половых форм, прогрессивное уменьшение числа биотипов с удалением от него и все большую разницу между индивидами. Формирование агамных комплексов есть результат скрещивания половых форм, их гибриды дают полиплоиды, которые, в свою очередь, могут быть апомиктичными. По всей видимости, полиплоидия сама по себе дает новые формы со значительно большей скоростью, чем обычные генетические процессы (Babcock, Stebbins, 1938). Отсюда Э. Бэбкок и Л. Стеббинс пришли к заключению о том, что полиплоиды имеют селективные преимущества в быстро меняющихся условиях среды, где скорость репродукции и адаптивность являются предметом отбора. Это объяснение можно было распространить и на быстрое возникновение и распространение некоторых групп покрытосеменных растений после последнего оледенения. Полиплоидия рассматривалась как кратчайший путь, посредством которого виды или роды могут адаптироваться к быстро меняющимся условиям. Роль апомиксиса, который сопровождает гибридизацию и полиплоидию, состоит в быстром производстве и фиксации новых вариантов признаков и в то же время в ограничении изменчивости других. Агамные комплексы в местах, близких к центрам их распространения, лучше адаптированы к меняющимся условиям в сравнении с половыми гетероплоидными комплексами.

Естественно, что монография «The American Species of *Crepis*: Their Interrelationships and Distribution as Affected by Polyploidy and Apomixis» явилась значительным вкладом в систематику растений, но, возможно, еще большее ее значение связано с демонстрацией отличий эволюционных событий у растений в сравнении с таковыми у животных – млекопитающих, птиц и насекомых. Это явилось притягательным моментом для биологов, размышлявших об общей теории эволюции. По этим причинам зоологи «повернулись лицом» к генетике, систематике и биогеографии растений. С конца 1930-х годов Ф. Добржанский

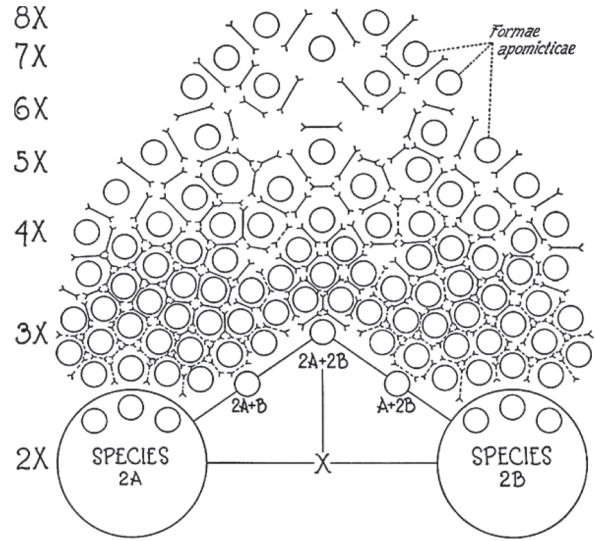


Рис. 3. Гипотетическая диаграмма, иллюстрирующая агамный комплекс (Babcock, Stebbins, 1938).

детально изучал эволюционную генетику *Drosophila pseudoobscura* и одновременно проводил много времени в кругу калифорнийских эволюционистов растений Л. Стеббинса, Р. Клаусена и др. В итоге достижения ботаников на *Crepis* были включены во второе дополненное издание «Генетики и происхождения видов» (Dobzhansky, 1941). Эти подходы Л. Стеббинс развил в последующих статьях (Stebbins, 1940, 1941, 1947). В его классической работе «Types of Polyploids: Their Classification and Significance» были объединены и систематизированы знания о полиплоидах растений, накопленные к этому времени. Предложенная в этой статье номенклатура принята биологическим сообществом и широко используется в научной литературе (Stebbins, 1947).

В 1939 г. Л. Стеббинс был приглашен в качестве ассистента профессора в отдел генетики Сельскохозяйственного колледжа в Беркли. Этот карьерный шаг был осуществлен при поддержке Э. Бэбкока, который находился под сильнейшим впечатлением от энергичной и целеустремленной работы своего ученика. До этого его попытка получить позицию в отделе ботаники не имела успеха, и он был чрезвычайно расстроен этим обстоятельством. Хотя Л. Стеббинс и считал себя ботаником, его коллеги полагали, что он недостаточно сосредоточен на кураторской части работы, которой требовала эта вакансия. Должность в отделе генетики

предполагала чтение общих курсов по эволюции и была более близка Л. Стеббинсу, поскольку его интересы склонялись к зарождавшейся в тот момент эволюционной генетике. Кроме того, увлечение эволюцией подогревалось двумя дополнительными обстоятельствами. Первое – общение с уникальной группой биологов, сосредоточившихся на изучении эволюции и систематики, называвших себя «биосистематиками». Кроме того, он активно общался с выдающимся эволюционистом Ф. Добржанским, что подпитывало его растущий интерес к этому разделу биологической науки. Начиная с середины 1930-х годов район залива Сан-Франциско был «парником» для эволюционистов. Новое поколение систематиков, пришедших из генетики и экологии, пустило корни в нескольких местах: в Университете Стэнфорда, Институте Карнеги, Калифорнской академии наук и в Университете Беркли. «Систематики» ежемесячно проводили встречи для обсуждения результатов исследований и обмена методами (Hagen, 1984). Практически с самого начала работы этого неформального объединения Л. Стеббинс был его заметным функционером. Он активно приглашал докладчиков, некоторые из них приезжали из других регионов. Главным «идеологом» в команде биосистематиков была междисциплинарная группа из Института Карнеги. В нее входили датский специалист по экологической генетике Йенс Клаусен (J. Clausen), систематик Дэвид Кек (D. Keck) и физиолог Вильям Хиси (W. Khisey). Эта группа длительное время систематически исследовала изменчивость растений и ее роль в адаптации к степным районам Калифорнии. Л. Стеббинс пристально следил за работой коллег непосредственно в полевых условиях недалеко от Йосиметского национального парка.

Знакомство и дружба с Ф. Добржанским начались во время визита Л. Стеббинса в Калифорнийский технологический институт в 1936 г., где тот уже занимался генетикой природных популяций *Drosophila pseudoobscura*. Позднее они постоянно общались в Беркли, куда Ф. Добржанский часто заезжал для встреч со своим коллегой Михаилом Лернером. В свою очередь, Л. Стеббинс контактировал с М. Лернером два раза в месяц в генетической ассоциации, где докладывались рефераты пуб-

ликаций. Л. Стеббинс с удовольствием слушал дискуссии этих ученых, несмотря на то что в пылу спора они часто переходили на русский язык (Smokovitis, 1994).

Дружба с Ф. Добржанским стала поворотным моментом в научной судьбе Л. Стеббинса, так как его собственные интересы все более склонялись к эволюционной генетике, кроме того, это подкреплялось необходимостью чтения курса эволюции. Ф. Добржанский, опубликовавший неординарную монографию «Генетика и происхождение видов» в 1937 г. (Dobzhansky, 1937), пробудил у Л. Стеббинса интерес к генетическим проблемам эволюционного учения. В 1940-е годы они контактировали особенно тесно, так как встречались во время полевых работ в районе Мазера. Кроме того, оба любили верховые прогулки на лошадях и часто совершали их вместе. Переехав из Калифорнии в Нью-Йорк (Колумбийский университет), Ф. Добржанский пригласил Л. Стеббинса в 1946 г. прочесть там очень престижные Джесаповские лекции (Jesup Lectures). Выбор Л. Стеббинса в качестве лектора был не случаен, так как он лучше кого-либо мог осуществить синтез генетики и эволюции у растений. В 1941 г. такая же задача была поставлена Эдгару Андерсону и он прочел лекции совместно с Эрнстом Майром, позднее выпустившим книгу «Систематика и происхождение видов» (Mayr, 1942). К сожалению, Э. Андерсон так и не издал свои лекции (Kleinman, 1999). Лекции Л. Стеббинса были изданы в виде монографии «Variation and Evolution in Plants» (Stebbins, 1950). Эта книга завершила серию из четырех классических трудов по синтетической теории эволюции и стала наиболее значительной публикацией по этому разделу биологии растений в XX столетии. Первой в этом ряду была работа Ф. Добржанского (Dobzhansky, 1937), за ней следовали «Systematics and the Origin of Species» Эрнста Майра (Mayr, 1942) и «Tempo and Mode in Evolution» Джоржа Симпсона (Simpson, 1944; Симпсон, 1948). Основное достижение этих книг – объединение дарвиновской идеи естественного отбора с последними на тот момент достижениями генетики и создание научного направления, получившего название «синтетическая теория эволюции» (фото 2).

Ф. Добржанский осветил взгляд с позиции генетики, Э. Майр – как зоолог и систематик,



**Фото 2.** Творцы синтетической теории эволюции, Л. Стеббинс, Дж. Симпсон и Ф. Добржанский (слева направо).

а Дж. Симпсон – как палеонтолог. Растения с их уникальной генетикой, физиологией и эволюционными преобразованиями оказались вне синтеза этих дисциплин с дарвинизмом. Поэтому монография Л. Стеббинса стала заметным вкладом в представления о генетических основах эволюционного процесса у растений. Он подчеркнул центральную роль естественного отбора, но уделил весьма скромное внимание случайному дрейфу и неадаптивной эволюции, которые были важной частью второго дополненного издания книги Ф. Добржанского (Dobzhansky, 1941). Труд Л. Стеббинса изложен на 643 страницах с более чем 1250 ссылками и является самой большой из четырех книг, изданных Колумбийским университетом по материалам Джесаповских лекций, посвященных факторам и генетическим основам эволюции. Здесь следует подчеркнуть, что Л. Стеббинс в большом объеме процитировал советских исследователей, в том числе источники на русском языке. По всей видимости, он не только воспользовался помощью Ф. Добржанского и М. Лернера при знакомстве с этими работами, но и мог читать на русском, во всяком случае при необходимости он мог прочесть резюме или выводы. Я пришел к такому заключению на основе того, что на прогулке в окрестностях новосибирского Академгородка он прочел слово «шлагбаум» и с улыбкой сказал, что в русском языке много заимствований из немецкого.

Монография Л. Стеббинса была сразу широко признана во всем мире благодаря ее неожиданному и смелому синтезу научных направлений. Она открыла новые горизонты исследований для молодых ученых, посвятивших себя эволюционной биологии (Smokovitis, 1994). Выдающееся значение «Разнообразия и эволюции растений» состоит в том, что монография уничтожила сколько-нибудь серьезные альтернативы генетической трактовке эволюции растений, такие, как ламаркизм или мягкое наследование, которые еще поддерживали некоторые ботаники. Л. Стеббинс принял биологическую концепцию вида, предложенную ранее Ф. Добржанским и Э. Майром. Большинство специалистов квалифицировали этот труд по систематике и эволюции как наиболее влиятельный в XX столетии (Raven, 1974). К сожалению, в СССР она не была переведена в отличие от книг Э. Майра и Дж. Симпсона (Майр, 1947; Симпсон, 1948), равно как и монография Ф. Добржанского. Перевод последней на русский язык был осуществлен только в 2010 г. и почему-то с первого издания (!?), которое позднее было дополнено и переработано автором (Добржанский, 2010).

Здесь хотелось бы подчеркнуть, что Л. Стеббинс прозорливо предсказал важное значение полиплоидии в эволюции растений. Этому феномену в его монографии уделено две главы, в которых рассмотрены частота возникновения, таксономическое распределение и географическое

распространение полиплоидов (Polyploidy I: Occurrence and nature of polyploid types. P. 289–341; Polyploidy II: Geographic distribution and significance of polyploidy. P. 342–379). В них подробно рассмотрены причины образования полиплоидов и факторы, способствующие их закреплению в экологических нишах. Значительное внимание уделено прямым эффектам кратного увеличения числа геномов, полиплоидным комплексам, успешной адаптации к экстремальным местам обитания и их роли в эволюции и селекции. Кроме того, закономерно, что следующий за ними раздел рассматривает специфическое проявление эффекта полиплоидии в феномене апомиксиса, поскольку все известные бесполо-семенные формы несут более двух геномов. В этой главе впервые сформулирована гипотеза о двух элементах апомиксиса – апомейозе и партеногенезе – как независимо контролируемых компонентах апомиктического размножения (Apomixis in relation to variation and evolution. P. 380–419). Примечательно, что современные методы геномного анализа подтвердили предположения Стеббинса, позволив выявить множественные полные удвоения геномов у травянистых растений в ходе эволюции и их структурные преобразования.

Вторая значительная книга Л. Стеббинса – «Эволюция на уровне выше видового» – вышла в 1974 г. и была издана на основе Пратнеровских лекций, прочитанных им в Гарварде (Stebbins, 1974). Ее можно рассматривать как современное изложение монографии, изданной в 1950 г. В 1965 г. он совместно с Гербертом Бейкером стал редактором книги «Генетика колонизирующих видов», обобщавшей труды конференции в Асиломаре (The Genetic ..., 1965). Позже вышли книги: «The Basis of Progressive Evolution» (Stebbins, 1969); учебник «Chromosomal Evolution in Higher Plants» (Stebbins, 1971) и популярная книга с двойным названием «Darwin to DNA – Molecules to Humanity» (Stebbins, 1982). Л. Стеббинс был вдумчивым и энциклопедически образованным ученым, умевшим как никто другой объединять биологические знания. Его научное наследие обширно и включает работы по ботанике, генетике и эволюции. В течение 7 десятилетий своей научной деятельности он написал множество обзоров и стал признан-

ым мастером жанра научных публикаций. Всего им опубликовано более 250 научных работ.

В 1950 г. Л. Стеббинс принял приглашение организовать отдел генетики в Калифорнийском университете в Дэвисе, который оставался его домом вплоть до последних дней. Он очень любил Дэвис и оставался руководителем отдела до 1963 г. Л. Стеббинс был особенно горд тем, что привлек для работы в Дэвисе своего ближайшего друга Ф. Добржанского вместе с его ассистентом Ф. Айялой.

Л. Стеббинс был главным руководителем у 33 аспирантов. Ежегодно он с удовольствием читал популярный курс эволюции нескольким сотням студентов. Окончание последней лекции Л. Стеббинса в связи с его уходом на пенсию в 1973 г. сопровождалось продолжительными аплодисментами. Он очень заботился о преподавании эволюции и тесно сотрудничал с другими биологами, привлеченными к написанию школьных учебников.

С 1960 г. по 1964 г. он исполнял обязанности генерального секретаря Международного союза биологических наук. Л. Стеббинс известен также как борец за охрану дикой природы; так, в 1967 г. он был избран президентом Калифорнийского общества диких растений. Он прилагал много усилий по охране природных ландшафтов и защите диких растений, организовывал недельные полевые путешествия по охраняемым территориям под лозунгом: «не делай ничего, кроме фотографий и не оставляй ничего, кроме следов обуви». В 1967 г. Л. Стеббинс предотвратил разрушение естественного ландшафта на полуострове Монтерей, который теперь называется Ботанический регион Морзе, и где, по его словам, можно наблюдать все проблемы и принципы эволюции растительных видов. Он обладал энциклопедическими знаниями в таксономии растений, и детально знал флору Калифорнии и охотно делился своими обширными познаниями со студентами, коллегами и друзьями. В течение многих лет я получал его рождественские открытки с рисунками новых видов растений, открытых или найденных им в Калифорнии.

Уйдя на пенсию в 1973 г., на протяжении следующих 20 лет он вел активную научную работу, продолжая исследования и публикуя



**Фото 3.** Слева направо: автор статьи В.А. Соколов, академик В.К. Шумный, Л. Стеббинс, академик Д.К. Беляев, В.В. Хвостова в парке у коттеджа академика М.А. Лаврентьева. 1975 г. Фото Барбары Стеббинс.

статьи и книги. В качестве приглашенного профессора Л. Стеббинс побывал в Чили, Австралии, Франции, Карлтон Колледже (Миннесота), Университете Сан-Франциско, Огайо, Колледже Святого Олафа (Миннесота) и Университете Леона (Испания).

В 1975 г. по программе обмена учеными с США он более месяца провел в СССР. Одну неделю он находился в Академгородке под Новосибирском, знакомясь с работами Института цитологии и генетики СО АН СССР (фото 3).

Еще при его жизни научные достижения Л. Стеббинса стали предметом науковедческих исследований. Ему были посвящены многочисленные конференции, публикации и диссертации (Smocovitis, 1994, 1997).

Скончался Л. Стеббинс 19 января 2000 г. в Дэвисе, через две недели после своего 94-го дня рождения. По воле покойного тело был кремировано, а прах развеян в заповеднике его имени недалеко от любимого им Дэвиса в Калифорнии.

В заключение хочу выразить глубокую благодарность Бетти Смоковитис за обсу-

ждение материалов статьи и помощь в получении биографических данных Э. Бэбкока и Л. Стеббинса.

Работа выполнена при поддержке интеграционного гранта СО РАН № 140.

## ЛИТЕРАТУРА

- Добржанский Ф. Генетика и происхождение видов. М.-Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2010. 383 с.
- Майр Э. Систематика и происхождение видов. М.: Инстр. лит-ра, 1947. 504 с.
- Навашин М.С. Гаплоидные диплоидные и триплоидные ядра у *Crepis virens* Vill. // Зап. Киев. об-ва естествоиспытателей. 1915. 25. С. 139–152.
- Навашин М.С. Морфология клеточного ядра у видов *Crepis* L. в связи с вопросом о видообразовании: Сб. им. С.Г. Навашина. М.: ГосНИИ им. К.А. Тимирязева, 1927. С. 171–186.
- Симпсон Д.Г. Темпы и формы эволюции. М.: Инстр. лит-ра, 1948. 358 с.
- Babcock E.B., Collins L. Genetics Laboratory Manual. McGraw Hill, 1918. 56 p.
- Babcock E.B. *Crepis* – A promising genus for genetic investigation // Am. Nat. 1920. V. 54. P. 270–276.
- Babcock E.B., Collins L. Special articles a case of duplicate genes in *Crepis capillaries* (L.) WALIR // Science. 1922a. V. 56. No. 1449. P. 392.

- Babcock E.B., Collins L. Inheritance of glandular in *Crepis capillaries* (L.) WALIR // Science. 1922b. V. 56. No. 1449. P. 392.
- Babcock E. Genetics and plant taxonomy // Science. 1924a. V. 59. No. 1528. P. 1327–1328.
- Babcock E. Species hybrids in *Crepis* and their bearing on evolution // Am. Nat. 1924b. V. 58. P. 296–310.
- Babcock E.B., Navashin M.S. The genus *Crepis*. Bibliographia // Genetica. 1930. V. 6. P. 1–90.
- Babcock E.B. Cyto-genetics and the species-concept // Amer. Nat. 1931. V. 65. P. 4–17.
- Babcock E.B., Cameron D.R. Chromosomes and phylogeny in *Crepis*, II. The relationships of one hundred eight species // Univ. Calif. Publ. Agr. Sci. 1934. V. 6. No. 11. P. 287–324.
- Babcock E.B. Genetic evolutionary processes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1934. V. 20. P. 510–515.
- Babcock E.B., Stebbins G.L. The American Species of *Crepis*: Their Interrelationships and Distribution as Affected by Polyploidy and Apomixis. Washington, DC: Carnegie Inst. of Washington, 1938. Publ. No. 504. 200 p.
- Babcock E.B., Stebbins G.L., Jenkins J.A. Genetic evolutionary processes in *Crepis* // Am. Nat. 1942. V. 76. P. 337–363.
- Dobzhansky Th. Genetics and the Origin of Species. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1937. 364 p.
- Dobzhansky Th. Genetics and the Origin of Species. 2nd. ed. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1941. 446 p.
- Hall H.M., Clements F.E. The Phylogenetic Method in Taxonomy. Washington, DC: Carnegie Institution of Washington, 1923. No. 326.
- Hagen J.B. Experimentalists and naturalists in twentieth century botany, 1920–1950 // J. Hist. Biol. 1984. V. 17. P. 249–270.
- Kleinman K. His own synthesis: Edgar Anderson and evolutionary theory in the 1940s // J. Hist. Biol. 1999. V. 32. P. 293–320.
- Lotsy J.P. Evolution by Means of Hybridization. The Hague, M. Nijhoff, 1916. 166 p.
- Mayr E. Systematics and the Origin of Species. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1942. 334 p.
- Navashin M.S. Poliploid mutation in *Crepis*. Triploid and pentaploid mutation of *Crepis capillaries* // Genetics. 1925a. V. 10. P. 583–592.
- Nawashin M.S. Morphologische Kernstudien der *Crepis*-Arten in Bezug auf die Artbildung // Ztschr. Zellforsch. 1925b. Bd. 2. No. 1. S. 98–111.
- Nawashin M.S. Variabilität des Zellkerns bei *Crepis*-Arten in Bezug auf die Artbildung // Ztschr. Zellforsch. 1926. Bd. 4. No. 2. S. 171–215.
- Nawashin M.S. The dislocation hypothesis of evolution of chromosome numbers // Ztschr. Ind. Abst und Vererbungslehre. 1932. Bd. 63. No. 3. S. 224–231.
- Raven P. Plant systematics 1947–1972 // Ann. Missouri. Bot. Gard. 1974. V. 61. P. 166–178.
- Simpson G.G. Tempo and Mode in Evolution. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1944. 237 p.
- Smocovitis V.B. Organizing evolution: founding the society for the study of evolution (1939–1950) // J. Hist. Biol. 1994. V. 27. P. 241–309.
- Smocovitis V.B. Ledyard Stebbins, Jr. and the evolutionary synthesis (1924–1950) // Am. J. Bot. 1997. V. 84. P. 1625–1637.
- Stebbins G.L.Jr. Cytology of *Antennaria*. I. Normal species // Bot. Gaz. 1932a. V. 94. P. 134–151.
- Stebbins G.L.Jr. Cytology of *Antennaria*. II. Parthenogenetic species // Bot. Gaz. 1932b. V. 94. P. 332–345.
- Stebbins G.L., Babcock E.B. The effect of polyploidy and apomixis on the evolution of species in *Crepis* // J. Hered. 1939. V. 30. P. 519–530.
- Stebbins G.L., Ellerton S. Structural hybridity in *Paeonia Californica* and *P. brownii* // J. Genet. 1939. V. 38. P. 1–36.
- Stebbins G.L.Jr. The significance of polyploidy in plant evolution // Am. Nat. 1940. V. 74. P. 54–66.
- Stebbins G.L. Apomixis in the angiosperms // Bot. Rev. 1941. V. 7. P. 507–542.
- Stebbins G.L. Types of polyploids: Their classification and significance // Adv. Genet. 1947. V. 1. P. 403–429.
- Stebbins G.L. Variation and Evolution in Plants. N.Y.: Columbia University Press, 1950. 643 p.
- Stebbins G.L. Chromosomal Evolution in Higher Plants. London: Arnold, 1971. 216 p.
- Stebbins G.L. Flowering Plants: Evolution above the Species Level. Cambridge: Mass. Harvard Univ. Press, 1974. 480 p.
- Stebbins G.L. Darwin to DNA: Molecules to Humanity. San Francisco: W.H. Freeman, 1982. 491 p.
- Stebbins G.L. The Basis of Progressive Evolution. Chapel Hill: Univ. of North Carolina Press, 1969. 150 p.
- The Genetics of Colonizing Species / Eds G.L. Stebbins, H. Baker. N.Y.: Academic Press, 1965. 173 p.



---

**EVOLUTIONARY SYNTHESIS BY LEDYARD STEBBINS****V.A. Sokolov<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,  
Novosibirsk, Russia, e-mail: sokolov@mcb.nsc.ru;

<sup>2</sup> Vavilov Institute of Plant Industry, Russian Academy of Agricultural Sciences,  
St. Petersburg, Russia

**Summary**

The paper concisely reviews the history of establishment of the idea on evolutionary synthesis involving plant objects and its experimental justification. The roles of S. Navashin, E. Babcock, and G.L. Stebbins in the construction of experimental background for evolutionary synthesis involving botanical material are described. The history of the development of Stebbins' views of the role of hybridization and polyploidy in plant evolution is considered, as well as his brilliant insight into the role of whole genome duplication in the expansion of variation, which were proven only after the advent of the genomics approach.

**Key words:** polyploids, interspecific hybrids, polyploid complexes, agamic complexes, apomixis, plant evolution, George Ledyard Stebbins, Ernest Babcock, Sergei M. Navashin.

**ПАМЯТИ ЗАСЛУЖЕННОГО ПРОФЕССОРА  
МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА,  
ДОКТОРА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК  
СЕРГЕЯ АЛЕКСАНДРОВИЧА ГОСТИМСКОГО**



6 ноября 2012 г. после тяжелой продолжительной болезни скончался заслуженный профессор Московского государственного университета, доктор биологических наук, профессор кафедры генетики Сергей Александрович Гостимский. Ушел из жизни замечательный преподаватель, великолепный экспериментатор, всю свою жизнь посвятивший Московскому университету.

Сергей Александрович закончил биологический факультет МГУ в 1962 г. В 1981 г. защитил докторскую диссертацию на тему «Генетический контроль фотосинтеза у высших растений». Вся его трудовая жизнь связана с кафедрой генетики МГУ. Он был высококвалифицированным специалистом в области генетики растений, пользовался заслуженно высоким авторитетом в кругах генетической общественности в России и за рубежом. Научные исследования Сергея Александровича свя-

заны с идентификацией генов, определяющих основные процессы фотосинтеза; разработкой генетики соматических клеток растений; изучением генетической изменчивости клеток растений в культуре тканей. Им опубликовано более 150 научных работ, в том числе 3 учебных пособия. Сергей Александрович – лауреат премии им. Д.А. Сабина за цикл работ по изучению молекулярной изменчивости генома растений. Он награжден медалью к столетию со дня рождения академика Н.И. Вавилова (1988) и медалью «Ветеран труда».

Сергей Александрович был эрудированным биологом и прекрасным, талантливым преподавателем. Под его руководством защищены десятки кандидатских диссертаций. Он читал курсы лекций: «Общая генетика», «Цитогенетика» и др. Огромной заслугой Сергея Александровича является создание генетической

коллекции гороха. Эта коллекция послужила основой для организации летней генетической практики на Звенигородской биологической станции Московского университета, руководителем которой он был многие годы. Растения из этой коллекции широко использовались в различных научных исследованиях, включая изучение влияния факторов космического

полета на геном растений на Международной космической станции. На протяжении многих лет Сергей Александрович возглавлял секцию биологии Международной молодежной научной конференции «Ломоносов».

Память о Сергее Александровиче Гостимском, прекрасном преподавателе, ученом и человеке останется в наших сердцах.

**Друзья и коллеги по кафедре генетики МГУ**

## ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСЕЙ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В «ВАВИЛОВСКОМ ЖУРНАЛЕ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ»

### ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

«Вавиловский журнал генетики и селекции» публикует на русском (или английском) языке работы по всем разделам генетики, селекции, а также смежных наук. К публикации принимаются результаты оригинальных экспериментальных исследований; теоретические и обзорные статьи, представляющие интерес для научного сообщества; краткие сообщения; рецензии; письма редактору; персоналии; хроника; информация; сообщения из отделений ВОГиС; материалы и документы по истории генетики и селекции. Печатаются также материалы, касающиеся образовательных программ и методики преподавания генетики и селекции в средней и высшей школах. Журнал печатает заказные обзоры и проблемные статьи. Отдельные тематические выпуски посвящаются актуальным проблемам и направлениям генетики и селекции.

Хотя журнал и является официальным изданием Вавиловского общества генетиков и селекционеров, членство авторов в обществе необязательно – журнал одинаково открыт для всех.

Сайт журнала в Интернете:

[http://www.bionet.nsc.ru/vogis/vavilov\\_journal](http://www.bionet.nsc.ru/vogis/vavilov_journal)

В редакцию статьи представляются в электронном виде в формате MS WinWord 6.0 (и выше) на дискетах размером 3,5", на CD, через FTP или по электронной почте в форме присоединенных файлов. Текст статьи, включая аннотации на русском и английском языках, таблицы, иллюстрации и подписи к ним, а также список литературы оформляются одним файлом. Иллюстрации дополнительно присылаются отдельными файлами. Если пересылаемый материал велик по объему, следует архивировать файлы в формат \*.zip или \*.rar.

Текст статьи на бумаге обязателен.

Наш адрес: 630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10, Институт цитологии и генетики СО РАН. Редакция «Вавиловского

журнала генетики и селекции». Электронный адрес: [vavilov\\_journal@bionet.nsc.ru](mailto:vavilov_journal@bionet.nsc.ru)

К публикации в «Вавиловском журнале генетики и селекции» принимаются статьи, прошедшие рецензирование. Решение о публикации принимается редакционной коллегией журнала на основании экспертных оценок рецензентов с учетом соответствия представленных материалов тематической направленности журнала, их научной значимости и актуальности.

Поступившая в редакцию рукопись направляется на рецензию специалистам в данной области исследований. Авторы статьи могут назвать двух–трех потенциальных рецензентов. Наряду с фамилией каждого рецензента обязательно указание его полного имени и отчества, места работы, телефона, адреса электронной почты. Окончательный выбор рецензентов остается за редколлегией журнала. Рукопись, получившая отрицательные отзывы двух независимых рецензентов, решением редколлегии отклоняется.

Статья, нуждающаяся в доработке, направляется авторам с замечаниями рецензента и научного редактора. Авторы должны учесть все замечания, сделанные в процессе рецензирования и редактирования статьи, ответить на каждое из замечаний и указать место в рукописи, где сделаны изменения. В случае несогласия с рецензентом или редактором автор должен кратко и четко обосновать свою позицию. Сделанные автором изменения в рукописи необходимо внести в электронный вариант текста и вернуть в редакцию.

Статья, отправленная редакцией на доработку после рецензии и исправленная в соответствии с замечаниями рецензента, должна быть возвращена в редакцию в течение 15 дней с момента ее получения авторами. Статья, возвращенная в редакцию по прошествии месяца, будет иметь новую дату поступления. После принятия рукописи к печати с автором заключается Договор о временной передаче авторских прав.

Редакция не предоставляет авторам копии корректуры статьи на бумаге. Статья высылается автору в виде pdf-файла. На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если в корректуру вносятся исправления, при возвращении ее в редакцию необходимо приложить в виде отдельного файла подробный список сделанных исправлений.

Редакция оставляет за собой право отклонять без рецензии статьи, не соответствующие профилю журнала или оформленные с нарушением правил.

На всех стадиях работы с рукописями и для общения с авторами редакторами и рецензентами используется электронная почта, поэтому авторы должны быть внимательны при указании своего электронного адреса.

## ТРЕБОВАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ РУКОПИСЕЙ

Статьи должны быть написаны на русском (или английском) языке, отредактированы и оформлены в соответствии с нижеследующими требованиями.

Объем статьи – до 20 страниц формата А4, нумерация страниц сквозная. В этот объем входят текст, аннотация, список литературы, таблицы, иллюстрации и подписи к ним. Основной текст набирается шрифтом Times New Roman через 1,5 интервала с выравниванием по ширине и без переносов, размер шрифта 12 pt. Поля – 3 см со всех сторон страницы.

Статьи большего объема принимаются только после предварительного согласования с редакцией.

**Латинские названия** объектов исследований в названии статьи и в тексте пишутся с соблюдением общепринятых правил таксономической номенклатуры: бинарные видовые – курсивом (*Drosophila melanogaster*), таксонов более высокого ранга – прямым шрифтом (*Drosophila* или *Drosophilidae*). При первом упоминании в тексте родовые и видовые названия приводятся без сокращений, далее по тексту родовое название обозначается одной прописной (первой) буквой, а видовое указывается полностью (*D. melanogaster*).

**Названия и символы** генов набираются курсивом, а названия их продуктов – с прописной

буквы прямым шрифтом. Например: гены *fos*, *c-myc*, *ATM*; белки Fos, с-Мус, ATM. Курсивом выделяются обозначения мобильных элементов, например, *hobo*-элемент, а также три первых буквы названий сайтов рестрикции, например, *Hind*III. Названия фагов и вирусов пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.

Следует использовать общепринятые сокращения и аббревиатуры или приводить их дополнительно в тексте. Все физические размерности рекомендуется приводить в международной системе СИ.

**Математические формулы и уравнения** набираются в редакторах MS WinWord (версия 6.0 и выше) или MathType. Уравнения располагаются по центру строки и нумеруются арабскими цифрами в круглых скобках в порядке их упоминания в тексте. Номера уравнений выравниваются по правому краю строки. Уравнения отделяются от текста сверху и снизу одной пустой строкой. При написании нескольких уравнений они также разделяются пустой строкой.

**Таблицы и иллюстрации** (графики, схемы, фотографии, штриховые рисунки) представляются в черно-белом варианте.

**Таблицы, иллюстрации** и подписи к ним размещаются в тексте статьи при первом их упоминании. При этом не следует использовать опцию «обтекание текста».

Таблицы снабжаются тематическими заголовками и нумеруются арабскими цифрами в порядке их упоминания в тексте. Все графы в таблицах должны иметь заголовки. Сокращение слов в таблицах не допускается. Все аббревиатуры должны быть расшифрованы в сносках к таблице.

Число иллюстраций в статье не должно быть больше 6 (исключения согласовываются с редакцией). Максимальный размер иллюстраций или таблиц не должен превышать размера рабочего поля 15,7 × 23 см. Весь иллюстративный материал должен иметь минимум надписей.

На графиках необходимо указывать величины, значения которых даются на осях, и обозначение их размерностей.

Имеющиеся в схемах детали обозначаются арабскими цифрами или буквами русского алфавита и расшифровываются в подписях.

Иллюстрации нумеруются в порядке их упоминания в тексте. При ссылке в тексте на ил

люстрацию указывается ее номер и буквенные и цифровые обозначения ее деталей, например: рис. 1, а, кривая 2.

Графики и схемы должны выполняться с помощью векторных программ (Microsoft Excel, CorelDraw 9, Microsoft PowerPoint), их следует присылать в виде отдельных файлов с сохранением форматов, использованных для их создания. Если они выполнялись в других векторных программах, то необходимо использовать формат EPS.

Фотографии представляются в виде отдельных файлов в форматах JPEG, TIFF, BMP, PNG с разрешением 300–600 dpi.

Штриховые рисунки, выполненные от руки, должны быть отсканированы в режиме bitmap с разрешением 800 dpi и сохранены в формате TIFF.

## СТРУКТУРА РУКОПИСИ

Материалы должны быть размещены следующим образом:

1. УДК.

2. Название статьи. Должно быть кратким и отражать содержание работы. Печатается прописными буквами прямым полужирным шрифтом без подчеркивания и разрядки. Латинские названия объектов исследований в названии статьи пишутся без сокращений, с соблюдением общепринятых правил таксономической номенклатуры.

3. Инициалы и фамилия (фамилии) автора(ов) (А.А. Иванов, Б.В. Петров...). Печатаются прямым строчным шрифтом и отделяются от названия статьи пустой строкой.

4. Полное название и адрес учреждения, где работает автор(ы) – шрифт прямой строчной; адрес(а) электронной почты автора(ов) – шрифт прямой строчной.

Отметить арабскими цифрами соответствие фамилий авторов учреждениям, в которых они работают; звездочкой пометить фамилию автора, с которым будет вестись переписка.

5. Аннотация (резюме) статьи на русском и английском языках с кратким изложением основной цели работы и ее результатов (не более 20 строк). На английском языке – название статьи, общепринятую версию названия учреждения, где выполнена работа, и транслитерацию фамилий

авторов, текст аннотации, ключевые слова. Для англоязычных статей аннотация оформляется на русском языке. Шрифт – прямой строчной.

6. Ключевые слова (не более 10). Шрифт – прямой строчной. В ключевых словах должны быть отражены: (1) объект; (2) метод; (3) область исследования; (4) специфика данной работы.

7. Текст статьи, оформленный в соответствии с правилами.

8. Благодарности и ссылки на источники финансирования работы.

9. Литература.

Для экспериментальных статей рекомендуются следующие разделы: **Введение; Материалы и Методы; Результаты; Обсуждение; Литература.**

Теоретические, обзорные и проблемные статьи могут иметь произвольную структуру, но обязательно должны содержать резюме. Названия разделов в таких статьях определяются автором.

Названия разделов печатаются строчными буквами на отдельной строке без подчеркивания и отделяются от текста одной пустой строкой. Шрифт – прямой полужирный. Подзаголовки внутри разделов печатаются на отдельной строке строчными буквами. Шрифт – прямой полужирный. Заголовки и подзаголовки выравниваются по центру.

Раздел «Литература» отделяется от текста статьи пустой строкой и содержит перечень цитированных источников с обязательным указанием заглавия (см. ниже образец). Библиографические ссылки внутри текста приводятся в круглых скобках. При этом указывается фамилия автора публикации без инициалов и год публикации, например: (Иванов, 1999). Если у публикации два автора, то указываются обе фамилии и год издания, например: (Gihl, Smith, 2001). Работы трех и более авторов цитируются следующим образом: (Gatsby *et al.*, 1998; Добров и др., 2000).

При ссылках на несколько публикаций ссылки в скобках располагаются в хронологическом порядке, например: «В ряде работ (Смирнов, 1978; Smith, Gatsby, 1998; Павлова и др., 2001)...». При этом если цитируются работы одного и того же года, ссылки располагаются в алфавитном порядке (сначала русские, потом

иностранные фамилии). Если цитируются несколько работ одного и того же автора (или одной и той же группы авторов), опубликованных в одном и том же году, то к году добавляются русские или латинские строчные буквы в алфавитном порядке.

Например: Смирнов и др., 1995а, б; Smith 1997а, d; Ulrich *et al.*, 1998b. Порядок расстановки букв определяется положением статьи в разделе «Литература».

Список литературы должен содержать библиографическое описание всех литературных источников, ссылки на которые фигурируют в тексте статьи. Цитированная литература сводится в алфавитные списки сначала на русском языке, потом на иностранных языках с указанием фамилий и инициалов всех авторов каждой публикации. Работы одного и того же автора располагаются в хронологической последовательности. В случае если в списке приводятся несколько работ одного автора, опубликованных в одном и том же году, им дают буквенные обозначения: 1999а, б, в и т. д.; для иностранных авторов – 1999а, b, c и т. д.

При количестве авторов более 4 приводятся только 3 автора, далее используется обозначение (и др.) *et al.*

Оформляйте список по следующему образцу, обращая внимание на знаки препинания и пробелы.

## ЛИТЕРАТУРА

### ДЛЯ КНИГ:

Завадский К.М. Развитие эволюционной теории после Дарвина (1859–1920-е годы). Л.: Наука, 1973. 423 с. (или конкретные страницы, например С. 22–32).

Searle A.G. Comparative Genetics of Coat Color in Mammals. L.; N.Y.: Logos Press, Acad. Press, 1968. 303 p.

### ДЛЯ ЖУРНАЛОВ:

Кольцов Н.К. Проблема прогрессивной эволюции // Биол. журнал. 1933. Т. 2. Вып. 4/5. С. 475–500.

Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer // Cell. 2000. V. 100. No. 2. P. 57–70.

Zhao S.H., Recknor J., Lunney J.K. *et al.* Validation of a first-generation long-oligonucleotide microarray for transcriptional profiling in the pig // Genomics. 2005. V. 86. No. 5. P. 618–625.

### ДЛЯ СБОРНИКОВ:

Розова М.А., Янченко В.И., Мельник В.М. Зависимость урожайности яровой твердой пшеницы от метеорологических факторов в Приобской лесостепи Алтайского края // Современные проблемы и достижения аграрной науки в животноводстве и растениеводстве: Сб. статей Междунар. науч.-практ. конференции. Барнаул, 2003. Ч. 1. С. 71–74.

Golygina V.V., Istomina A.G., Kiknadze I.I. Chromosomal polymorphism in natural populations of *Chironomus balatonicus* Dévai, Wülker et Scholl // Late 20th century research on Chironomidae / Ed. O. Hof-frichter. Aachen: Shaker-Verlag, 2000. P. 89–92.

### ДЛЯ ТЕЗИСОВ ДОКЛАДОВ:

Peshkov I.M., Likhoshvai V.A., Matushkin Yu.G., Fadeev S.I. On research into hypothetical networks on ecological nature // Proc. of the 4th Intern. Conf. on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (BGRS'2004). Novosibirsk, 25–30 July 2004. Novosibirsk: Inst. Cytol. Genet., 2004. V. 2. P. 128–130.

### ДЛЯ ИНТЕРНЕТ-ПУБЛИКАЦИЙ:

Smith A., Green P. RepeatMasker. 1999. available at <http://ftp.genome.washington.edu/RM/RepeatMasker.html>.

Schwenger G.T.F., Mordvinov V.A., Fournier R. *et al.* (2000). Interleikin-5. In: Academic Press Cytokine Reference Database. DOI:10.1006/rwcy.2000.0902.

На отдельной странице следует привести:

– оригинальное написание иностранных фамилий, встречающихся в тексте статьи, подписях к иллюстрациям и таблицам.

– на русском языке – сведения об авторах (фамилии, имена, отчества полностью, ученые степени, звания, должности, место работы, полные почтовые адреса с индексами, домашние и служебные телефоны, факсы, адреса электронной почты и адреса личных страниц в Интернете).