

---

# БАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

ОСНОВАН В 1997 г.

Том 17

# 2

Июнь 2013

---

# VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

FOUNDED IN 1997

Vol. 17

# 2

June 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>Г.М. Дымищ, И.К. Захаров</i> МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА В ИНСТИТУТЕ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СО АН СССР (с 1957 по 1970-е годы).....	214
<i>Л.Н. Трут, Ю.Э. Гербек, А.В. Харламова, Р.Г. Гулевич, А.В. Кукекова</i> ДОМСТИЦИРУЕМЫЕ ЛИСИЦЫ: МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ, ВОВЛЕКАЕМЫЕ В ОТБОР ПО ПОВЕДЕНИЮ.....	226
<i>А.Г. Мензоров</i> ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА.....	234
<i>Е.В. Долгова, А.В. Прокопенко, В.П. Николин, Н.А. Попова, А.С. Проскурина, К.Е. Орищенко, Е.А. Алямкина, Я.Р. Ефремов, 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> ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА УМЕРЕННЫХ ПОВТОРОВ В ГЕНОМЕ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МЫШЕЙ НА ФОНЕ ИНЪЕКЦИИ ЦИКЛОФОСФАНА И ЭКЗОГЕННОЙ ДНК ЧЕЛОВЕКА.....	246
<i>А.А. Струнов, Ю.Ю. Илинский, И.К. Захаров, Е.В. Киселева</i> ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> , ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАТОГЕННЫМ ШТАММОМ БАКТЕРИЙ <i>WOLBACHIA</i> .....	265
<i>А.Б. Щербань</i> РЕОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА РАСТЕНИЙ В ХОДЕ АЛЛОПОЛИПЛОИДИЗАЦИИ .....	277
<i>А.В. Железнов, Т.В. Кукуева, Н.Б. Железнова</i> ЯЧМЕНЬ ГОЛОЗЕРНЫЙ: ПРОИСХОЖДЕНИЕ, РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ.....	286
<i>И.И. Супрун, С.В. Токмаков</i> ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО РАЗНООБРАЗИЯ ГЕНОВ СИНТЕЗА ЭТИЛЕНА <i>Md-ACS1</i> И <i>Md-ACO1</i> В ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ГЕНПЛАЗМЕ ЯБЛОНИ.....	298

<i>А.А. Коновалов, И.К. Шундрина, Е.В. Карпова, В.И. Маматюк</i> ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СТЕБЛЯ У РЖИ ( <i>SECALE CEREALE</i> L.) СО СТЕКЛОВИДНОЙ СОЛОМИНОЙ .....	303
<i>И.Н. Леонова</i> МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ, ИНТРОГРЕССИИ И ПИРАМИДИРОВАНИЯ ГЕНОВ .....	314
<i>Е.А. Филипенко, А.В. Кочетов, У. Капаята, В.И. Малиновский, В.К. Шумный</i> PR-БЕЛКИ С РИБОНУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ И УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К ПАТОГЕННЫМ ГРИБАМ .....	326
<i>Т.М. Гришаева, Ю.Ф. Богданов</i> О ПРОИСХОЖДЕНИИ БЕЛКОВ СИНАПТОНЕМНОГО КОМПЛЕКСА. ПОИСК РОДСТВЕННЫХ БЕЛКОВ В ПРОТЕОМАХ ВОДОРΟΣЛЕЙ, НИЗШИХ ГРИБОВ, МХОВ И ПРОСТЕЙШИХ ЖИВОТНЫХ .....	335
<i>А.И. Сорока, В.А. Лях</i> ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОИСХОЖДЕНИЯ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ ЛЬНА .....	343
<i>Л.Н. Миронова, А.А. Реут</i> ПИОНЫ. ДОСТИЖЕНИЯ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ СЕЛЕКЦИОНЕРОВ .....	349
<i>А.В. Пилигаев, К.Н. Сорокина, А.В. Брянская, Е.А. Демидов, Р.Г. Кукушкин, Н.А. Колчанов, В.Н. Пармон, С.Е. Пельтек</i> ИССЛЕДОВАНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ПРОЦЕССАХ ПОЛУЧЕНИЯ БИОТОПЛИВА ТРЕТЬЕГО ПОКОЛЕНИЯ .....	359
<i>Р.Г. Сайфуллин, А.И. Прянишников, Ю.С. Свистунов</i> МЕЙСТЕР ГЕОРГИЙ КАРЛОВИЧ (1873–1938) .....	368

## Content

<i>G.M. Dimshits, I.K. Zakharov</i> MOLECULAR GENETICS AT THE INSTITUTE OF CYTOLOGY AND GENETICS OF THE USSR ACADEMY OF SCIENCES (THE 1957–1970IES).....	214
<i>L.N. Trut, Yu.E. Herbeck, A.V. Kharlamova, R.G. Gulevich, A.V. Kukekova</i> FOX DOMESTICATION: MOLECULAR MECHANISMS INVOLVED IN SELECTION FOR BEHAVIOR.....	226
<i>A.G. Menzorov</i> MOUSE AND HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS .....	234
<i>E.V. Dolgova, A.V. Prokopenko, V.P. Nikolin, N.A. Popova, A.S. Proskurina, K.E. Orishchenko, E.A. Alyamkina, Ya.R. Efremov, E.R. Chernykh, A.A. Ostanin, S.S. Bogachev, T.S. Gvozdeva, E.M. Malkova, O.S. Taranov, V.A. Rogachev, A.V. Panov, S.N. Zagrebelnyi, M.A. Shurdov</i> CHARACTERISTIC CHANGES IN THE COPY NUMBER OF INTERSPERSED REPEATS IN BONE MARROW CELLS OF MICE TREATED WITH CYCLOPHOSPHAMIDE AND EXOGENOUS HUMAN DNA .....	246
<i>A. Strunov, Yu. Yu. Ilinskii, I.K. Zakharov, E.V. Kiseleva</i> EFFECT OF ELEVATED TEMPERATURE ON THE SURVIVAL OF <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> INFECTED WITH A PATHOGENIC <i>WOLBACHIA</i> STRAIN .....	265
<i>A.B. Shcherban</i> THE REORGANIZATION OF PLANT GENOMES DURING ALLOPOLYPLOIDISATION.....	277
<i>A.V. Zhelesnov, T.V. Kukoeva, N.B. Zheleznova</i> NAKED BARLEY: ORIGIN, DISTRIBUTION, AND PROSPECTS OF UTILISATION.....	286
<i>I.I. Suprun, S.V. Tokmakov</i> ALLELIC DIVERSITY OF ETHYLENE BIOSYNTHESIS-RELATED <i>Md-ACS1</i> AND <i>Md-ACO1</i> GENES IN RUSSIAN APPLE GERMPLASM .....	298
<i>A.A. Kononov, I.K. Shundrina, E.V. Karpova, V.I. Mamatyuk</i> PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF CULMS IN RYE ( <i>SECALE CEREALE</i> L.) WITH A BRITTLE STEM.....	303



<i>I.N. Leonova</i>	
MOLECULAR MARKERS: IMPLEMENTATION IN CROP PLANT BREEDING FOR IDENTIFICATION, INTROGRESSION, AND GENE PYRAMIDING.....	314
<i>E.A. Filipenko, A.V. Kochetov, Y.Kanayama, V.I. Malinovsky, V.K. Shumny</i>	
ASSOCIATION BETWEEN PR PROTEINS WITH RIBONUCLEASE ACTIVITY AND PLANT RESISTANCE AGAINST PATHOGENIC FUNGI .....	326
<i>T.M. Grishaeva, Yu.F. Bogdanov</i>	
THE ORIGIN OF SYNAPTONEMAL COMPLEX PROTEINS. SEARCH FOR RELATED PROTEINS IN PROTEOMES OF ALGAE, LOWER FUNGI, MOSSES, AND PROTOZOANS .....	335
<i>A.I. Soroka, V.A. Lyakh</i>	
DETERMINATION OF THE ORIGIN OF REGENERATED FLAX PLANTS IN ANOTHER CULTURE .....	343
<i>L.N. Mironova, A.A. Reut</i>	
PEONIES: ACHIEVEMENTS OF RUSSIAN BREEDERS .....	349
<i>A.V. Piligaev, K.N. Sorokina, A.V. Bryanskaya, E.A. Demidov, R.G. Kukushkin, N.A. Kolchanov, V.N. Parmon, S.E. Peltek</i>	
STUDY OF MICROSCOPIC ALGA DIVERSITY IN WEST SIBERIA IN THE CONTEXT OF THIRD GENERATION BIOFUEL PRODUCTION.....	359
<i>R.G. Saifullin, A.I. Pryanishnikov, Yu.S. Svistunov</i>	
MEISTER GEORGIY KARLOVICH (1873–1938) .....	368

УДК 577.21 (092)

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА В ИНСТИТУТЕ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СО АН СССР (с 1957 по 1970-е годы)

© 2013 г. Г.М. Дымшиц<sup>1,2</sup>, И.К. Захаров<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Специализированный учебно-научный центр Новосибирского государственного национального исследовательского университета, Новосибирск, Россия;

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия, e-mail: zakharov@bionet.nsc.ru;

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 12 апреля 2013 г. Принята к публикации 20 мая 2013 г.

К 90-летию со дня рождения академика РАН  
Рудольфа Иосифовича Салганика



В 1957 г. при создании Института цитологии и генетики Сибирского отделения АН СССР в Новосибирском научном центре директор-организатор член-корреспондент АН СССР Николай Петрович Дубинин предложил возглавить лабораторию нуклеиновых кислот кандидату биологических наук Рудольфу Иосифовичу Салганику. Заведующим лабораторией нуклеиновых

кислот, а затем, с 1970 г., лабораторией молекулярной генетики он был с 1957 г. до 1994 г. (с 1994 г. Р.И. Салганик проживает в США). В 1994 г. лаборатория была реорганизована в Отдел молекулярной генетики. В 1994–2000 гг. Р.И. Салганик назначается заведующим Отделом молекулярной генетики и одновременно – заведующим лабораторией молекулярных механизмов мутагенеза (с 2000 г. по 4 октября 2006 г. – ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов мутагенеза).

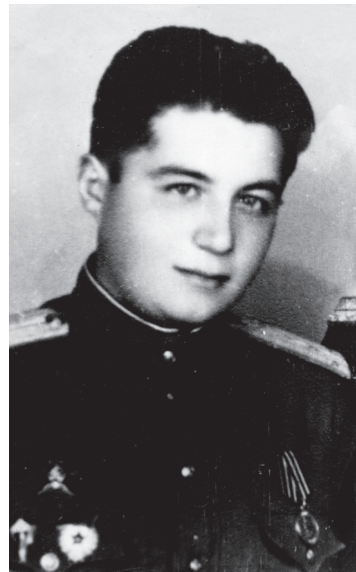
Р.И. Салганику были присвоены научные звания: профессор по кафедре «Физическая химия» (1971 г.); член-корреспондент РАН (1981 г.); действительный член РАН, академик РАН (1992 г.).

Рудольф Иосифович Салганик родился 12 июня 1923 г. в Киеве в семье служащих: отец – Салганик Иосиф Хаскелевич, мать – Песя Иосифовна. В 1940 г. после окончания школы Р.И. Салганик поступил в 1-й Киевский медицинский институт, в 1942 г. он был мобилизован и переведен на военный факультет 2-го Московского медицинского института, окончив который он в 1944–1946 гг. воевал в рядах Советской Армии сначала в качестве врача парашютно-десантного батальона, а затем командира санитарной роты

гвардейского стрелкового полка на 3-м Украинском фронте. Рудольф Иосифович участвовал в боях за освобождение Венгрии, Австрии и Чехословакии. Сотни людей были им спасены, а один младенец появился на свет только потому, что рядом оказались два военных врача – Рудольф Салганик и Вениамин Вотяков. Через 22 года фронтовые друзья снова встретились в Венгрии, куда были приглашены на свадьбу Шандора-Вениамина-Рудольфа. После демобилизации Р.И. Салганик работал ассистентом кафедры физиологии Киевского медицинского института, а с 1948 г. – старшим научным сотрудником биохимической лаборатории Института питания Минздрава УССР в Киеве. В 1954 г. он защитил кандидатскую диссертацию «Влияние гормона щитовидной железы на некоторые показатели образования белков в организме».

В первый же год существования лаборатории нуклеиновых кислот Р.И. Салганик высказал предположение о том, что ферменты, деполимеризующие нуклеиновые кислоты – нуклеазы, могут задерживать размножение патогенных вирусов в организме животных и человека (и излечивать вирусные заболевания) в связи с высокой чувствительностью к нуклеазам вирусных нуклеиновых кислот, освобождающихся в процессе заражения клетки от защитных белковых оболочек. Не будучи вирусологом, он «вторгся на чужую территорию», по мнению «комиссаров» советской биологии, которые летоисчисление научных достижений вели от сессии ВАСХНИЛ 1948 г. Его первая статья о действии нуклеаз на вирусную инфекцию вернулась из Киева с разгромной рецензией. Но ждать, пока нуклеиновыми кислотами (в первую очередь вирусными), генами и хромосомами будет «позволено» заниматься, врач – боевой офицер не собирался.

В лабораторных экспериментах, проводимых вместе с Тамарой Григорьевной Панковой, Александром Николаевичем Мосоловым и Александром Алексеевичем Трухачевым, было показано, что РНКазы задерживают размножение вируса гриппа в куриных эмбрионах, вируса полиомиелита в культуре ткани человека, а ДНКазы – аденовируса и вируса герпеса в клеточных культурах. Введение РНКазы увеличивало выживаемость мышей, зараженных вирусом гриппа, с 16 до 60 %. После того как было установлено,



Р.И. Салганик. Военные годы.

что ДНКазы и РНКазы в терапевтических дозах не обладают цитопатическими и мутагенными свойствами, исследователи перешли к клиническим испытаниям. Ферментные препараты нуклеазы оказались эффективными в лечении ряда тяжелых вирусных поражений нервной системы, заболеваний глаз, ведущих к слепоте, вирусных менингоэнцефалитов, опоясывающего лишая и др. Затем принцип лечения вирусных заболеваний нуклеазами был распространен и в ветеринарии. Р.И. Салганик предложил использовать для этого очень экономичные бактериальные ферменты, полученные в лаборатории ген-направленным мутагенезом.

Сотрудница лаборатории с 1965 г. Тамара Анатольевна Баталина после защиты кандидатской диссертации «Изучение действия панкреатической РНКазы на размножение некоторых РНК-содержащих вирусов» изучала противовирусные свойства нуклеаз бактериального происхождения. Она показала, что эндонуклеаза, продуцируемая бактериями *Serratia marcescens*, обладает способностью подавлять размножение как ДНК-, так и РНК-содержащих вирусов. Эти результаты послужили предпосылкой для испытания и в последующем – для успешного использования нуклеазы при вирусном параличе пчел. В 1976 г. в Англии на международном конгрессе пчеловодов «Апимондия» Р.И. Салганику вручили медаль за выдающуюся работу по защите пчел от вирусных болезней.

В 1961 г. Р.И. Салганик предположил, что такие фундаментальные молекулярно-генетические процессы, как репликация и транскрипция, связаны с различными физико-химическими состояниями ДНК в клетке. Сотрудниками лаборатории Верой Степановной Дашкевич и Григорием Моисеевичем Дымшицем было определено, что в интенсивно делящихся клетках карциномы Эрлиха и регенерирующей печени крыс содержание одноцепочечной ДНК резко возрастает при репликации. Усиление процессов транскрипции в клетках печени крыс, наблюдаемое при регенерации или субстратной индукции, не сопровождалось изменениями вторичной структуры ДНК. С помощью разработанного в лаборатории метода двойной химической модификации азотистых оснований в одноцепочечной ДНК карбодиимидом и электронно-плотной фосфорновольфрамовой кислотой денатурированные участки были визуализированы под электронным микроскопом. Их размер был около 600 пар нуклеотидов, что соответствовало 2–3 фрагментам Оказаки, обнаруженным у млекопитающих лишь в 1970-е годы. В 1971 г. Г.М. Дымшиц защитил кандидатскую диссертацию на тему «Исследование состояния ДНК регенерирующей печени крыс при репликации», а в 1975 г. описал белок, прочно связанный с репликативной ДНК, обладающий свойствами SSB.

В 1966 г. на Объединенном ученом совете по биологическим наукам Сибирского отделения АН СССР Р.И. Салганик защитил докторскую диссертацию по теме «Некоторые вопросы взаимосвязи между биологическими функциями и состоянием ДНК».

В 1962 г. Р.И. Салганик высказал предположение о том, что высокая реакционная способность денатурированных участков ДНК может играть особую роль в возникновении мутаций, сочетая, например, действие ультрафиолета как фактора, дестабилизирующего двойную спираль, и химических мутагенов, избирательно реагирующих с азотистыми основаниями, можно получать определенные ограниченные спектры мутаций. Тамара Михайловна Морозова, Валентина Федоровна Древич и Елена Архиповна Васюнина изучали взаимодействие гидроксилamina, диметилсульфата и хромофорного производного азотистого иприта с нативной и денатуриро-

ванной ДНК *in vitro*. На синхронизированных культурах *Escherichia coli* было показано, что повышенной чувствительностью к действию мутагенов обладают реплицирующиеся участки ДНК. Микробиологами Еленой Николаевной Ворониной, Зоей Ивановной Панфиловой и Александрой Степановной Пословиной методом локализованного мутагенеза был получен целый ряд штаммов-суперпродуцентов ферментов, например эндонуклеазы, амилазы, липазы, хитиназы. Елена Николаевна Воронина работала в лаборатории нуклеиновых кислот ИЦиГ СО АН СССР с 1959 г. Ее исследования относились к области направленного мутагенеза. В 1971 г. ей была присуждена ученая степень кандидата биологических наук по теме «Изучение возможности контролировать мутационный процесс у *E. coli* действием химических мутагенов в сочетании с факторами, изменяющими состояние ДНК в клетке».

В середине 1960-х гг. в лаборатории нуклеиновых кислот были развернуты работы по изучению влияния экзогенной РНК на синтез белков и нуклеиновых кислот в злокачественных клетках. Верой Петровной Томсон было показано, что при инъекции мышам двуспиральных искусственных РНК на 40 % уменьшается нарастание массы асцитных клеток карциномы Эрлиха за счет снижения их митотической активности. В препаратах РНК, выделенных из различных тканей животных, были обнаружены примеси, которые и обладали свойством кейлонов – тканеспецифично (но не видоспецифично) тормозить митотическую активность. Валентина Ивановна Рыкова идентифицировала их как протеогликаны – сложные белки, модифицированные сульфатированными углеводными цепями. До 2012 г., более 40 лет, Валентина Ивановна занималась изучением состава и структуры протеогликанов при различных патологиях, их влияния на развитие сколиоза и остеопороза, злокачественной трансформации и на старение.

В начале 1970-х гг. путем селекции и инбридинга крыс Вистар, чувствительных к катарактогенному эффекту галактозы, Ниной Александровной Соловьевой под руководством Салганика была создана линия крыс, у которой ряд признаков галактоземии развивался спонтанно. В 1996 г. линия была зарегистрирована



Р.И. Салгаником как OXYS в международной базе данных Rat genome. Ее состояние в дальнейшем контролировалось по признаку ранней спонтанной катаракты, сцепленно с которым животные наследовали синдром преждевременного старения – комплекс ассоциированных со старением заболеваний. На сегодня в ИЦиГ СО РАН имеется 100-е поколение крыс OXYS. Линия OXYS – признанная модель таких заболеваний, как сенильная катаракта, возрастная макулярная дегенерация, остеопороз. Модель активно используется для исследования механизмов развития этих заболеваний, а также для оценки эффективности новых способов профилактики и лечения. Недавно показано, что ранние нейродегенеративные изменения в мозге крыс OXYS развиваются на фоне изменений, характерных для болезни Альцгеймера.

С 1965 г. в лаборатории нуклеиновых кислот работал выпускник Ленинградского государственного университета Владимир Александрович Бердников. В его кандидатской диссертации «Электрофоретический анализ изменения гистонов в эволюции» было показано, что диапазон изменения электрофоретической подвижности гистона H1 у видов одной таксономической группы коррелирует не с геологическим возрастом группы, а, скорее, с ее видовым многообразием, что свидетельствует об участии генов гистона H1 в адаптивной эволюции.

По инициативе Р.И. Салганика в 1970 г. было организовано СКТБ биологически активных веществ Главмикробиопрома, и на протяжении пяти лет он возглавлял эту организацию. Проводимые в лаборатории нуклеиновых кислот под его руководством Аидой Герасимовной Ромащенко и Еленой Архиповой Васюниной исследования химического и ферментативного синтеза нуклеотидов и нуклеозидов позволили на опытно-промышленной базе СКТБ БАВ впервые в стране производить в значительных масштабах активированные нуклеотиды и ферменты, обеспечившие развитие в СССР работ по обратной транскрипции и генной инженерии. В 1979 г. Р.И. Салганик в составе коллектива авторов был удостоен Государственной премии за участие и осуществление научной программы проекта «Обратная транскриптаза (ревертаза)», посвященного ферментативному синтезу структурных генов и их использованию для изучения

генетического аппарата животных и вирусов. На базе СКТБ БАВ были также развернуты работы по иммобилизации ферментов на растворимых и нерастворимых полимерах, в результате которых были созданы иммобилизованные протеазы как новые препараты для лечения ряда заболеваний человека и животных. Если ферменты присоединить прочными ковалентными связями к полимерным носителям, то вместо десятков минут они сохраняют свою активность десятки дней. Иммобилизованные ферменты обладают способностью избирательно расщеплять белки омертвевших тканей и гнойных масс, не повреждая живые клетки. Экспериментальные и клинические исследования проводились медиками Александром Михайловичем Гончаром и Александром Семеновичем Коганом. С роговицы глаз, ставшей непрозрачной из-за химического или термического ожога, нельзя удалить непрозрачный омертвевший слой скальпелем. Растворимый вариант иммобилизованной протеазы «Иммозим» удаляет его в течение нескольких дней, восстанавливая прозрачность роговицы и зрение. Значительные результаты были достигнуты также и в лечении осложненных ран, абсцессов, трофических язв, пролежней, маститов, эндометритов, гайморитов и иных заболеваний такого рода.

С середины 1960-х гг. в лаборатории нуклеиновых кислот ИЦиГ СО АН СССР начались работы по изучению механизмов транскрипции и регуляции экспрессии генов. Три рабочие группы возглавили кандидаты наук, старшие научные сотрудники С.В. Аргутинская, В.Л. Кнорре и Т.М. Морозова.

Валерия Леонидовна Кнорре – сотрудник лаборатории с 1961 г. В 1953 г. она окончила химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Ее учителем был академик Н.М. Эммануэль. В 1964 г. В.Л. Кнорре защитила диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук по теме «Кинетика и механизм окисления 1,2-дифенилэтана молекулярным и связанным кислородом». Она убедительно показала ингибирующее влияние синтетических олигорибонуклеотидов на синтез РНК некоторыми бактериальными и фаговыми РНК-полимеразами. Такие промотороподобные конкурентные ингибиторы транскрипции рас-

смаивались как средство борьбы с патогенными микроорганизмами, новый тип антибиотиков. Под руководством В.Л. Кнорре проведен цикл исследований процесса взаимодействия ДНК-зависимых РНК-полимераз прокариот (бактерии *Escherichia coli*, бактериофагов T7 и T3) с олигодезоксирибонуклеотидами, а также способности специфически связываемых олигонуклеотидов конкурентно тормозить синтез РНК, катализируемый соответствующей РНК-полимеразой. С использованием реакционно-способных аналогов олигонуклеотидов была также изучена субъединичная топография взаимодействия РНК-полимеразы *Escherichia coli* с одно- и двуцепочечными олигонуклеотидами, которые являются аналогами промоторных районов генов. В этой работе принимали участие Валерий Анатольевич Поспелов и Людмила Кузьминична Савинкова.

Известный биохимик, молекулярный биолог Тамара Михайловна Морозова в 1952 г. окончила биологический факультет Ленинградского государственного университета. С 1958 г. по 1990 г. она сотрудник лаборатории нуклеиновых кислот (с 1970 г. – лаборатории молекулярной генетики) ИЦиГ СО АН СССР. В 1955 г. она защитила диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Углеводно-фосфорный обмен в головном мозгу при отравлении метгемоглобинообразователями». Т.М. Морозова впервые показала, что такие индукторы транскрипции, как тирозин, инсулин, гидрокортизон не только индуцируют ДНК-зависимый синтез мРНК, но и вызывают интенсивное образование основных элементов белок-синтезирующего аппарата клетки – тРНК, рибосом. На примере нескольких стероидных гормонов (эстрадиола, альдостерона, гидрокортизона) было показано избирательное связывание гормона с хроматином клеток-мишеней, причем на примере гидрокортизона было установлено, что рецептором гормона в хроматине являются негистоновые белки. Наиболее яркие результаты Т.М. Морозова получила при исследовании плейотропного действия эстрадиола на рост нормальных и малигнизированных тканей. Впервые было показано, что эстрадиол, взаимодействуя с рецепторами гормона в плазматических мембранах клеток-мишеней, последовательно включает в них ряд систем

вторичных посредников: протеинкиназы С, казеинкиназы II, аденилатциклазы и цАМФ-зависимых протеинкиназ, а также тирозиновых протеинкиназ-продуктов протоонкогенов. Было установлено, что осуществляемое этими системами фосфорилирование белков клеточных мембран, цитозоля и ядер играет ключевую роль в стимулировании эстрадиолом пролиферации клеток-мишеней. В ходе изучения влияния эстрогенов на рост опухоли молочной железы человека Т.М. Морозовой был описан механизм этого явления и предложен критерий определения эстрадиол-зависимости злокачественных опухолей. Среди ее учеников д.б.н. Т.И. Меркулова, кандидаты биологических наук И.А. Лавриненко, З.Б. Левашова, Р.Л. Митина, И.Н. Нагибнева, О.М. Сидоркина.

Студенческие годы Светланы Владимировны Аргутинской совпали с военным временем. С сентября 1940 г. по июнь 1945 г. она – студентка звероохотоведческого факультета Московского зоотехнического, впоследствии пушно-мехового института, г. Балашиха Московской области. По окончании института ей была присвоена квалификация зоотехника-зверовода высшей квалификации. С сентября 1945 г. она работала в должности младшего научного сотрудника отдела кормления центральной научно-исследовательской лаборатории пушного звероводства Министерства внешней торговли СССР (впоследствии НИИ пушного звероводства и кролиководства Министерства РСФСР). В 1958 г. ей была присуждена ученая степень кандидата биологических наук. Диссертация на тему «Фосфорно-кальциевое питание норок» была защищена на Ученом совете Московской ветеринарной академии.

2 февраля 1959 г. С.В. Аргутинская была принята в Институт цитологии и генетики СО АН СССР в отдел материальных основ наследственности, в лабораторию нуклеиновых кислот на должность младшего научного сотрудника. С 1967 г. она – старший научный сотрудник лаборатории. Она исследовала механизмы защитного действия полианионов при радиационном поражении, а также роль активации дезоксирибонуклеазы в генезе этого поражения. Ею обнаружены изменения депротейназной и дезоксирибонуклеазной активности ядер клеток регенерирующей печени и исследована

способность регенерирующей печени отвечать на гормональную индукцию в зависимости от содержания в них ДНК. Вместе с Николаем Павловичем Мертвцовым она изучала гормональную индукцию синтеза РНК и ферментов. Ими был выявлен эффект резкого торможения индуцированной транскрипции в ответ на длительное введение гидрокортизона, гастрин и фенотарбитала, проанализирована независимая индукция тирозин- $\alpha$ -кетоглутарат трансминазы в печени крыс разными факторами. Среди учеников С.В. Аргутинской академик Казахской Академии наук Р.И. Берсимбаев, кандидаты наук Н.М. Чащина и В.Н. Чесноков.

Р.И. Салгаником была высказана смелая идея о существовании многоклеточного функционального ансамбля в желудке крыс из тесно взаимодействующих клеток (эндокринные, обкладочные и главные клетки), регулируемого гормоном гастрин и его посредниками – гистамином и ЦМФ. Этот комплекс обеспечивает наиболее эффективную регуляцию процесса желудочной секреции, необходимую для физиологических функций органа. Экспериментальное подтверждение этому было получено в серии биохимических и цитологических работ С.В. Аргутинской, Р.И. Берсимбаева и Е.В. Киселевой, опубликованных в 1970–1980-х гг.

В 1970 г. лаборатория нуклеиновых кислот была переименована в лабораторию молекулярной генетики. Р.И. Салганик на новом уровне продолжил работы по ген-направленным воздействиям на ДНК. Вместе с сотрудниками лаборатории Григорием Леонидовичем Диановым и Александром Владимировичем Мазиным были разработаны методы введения в двуспиральную молекулу ДНК комплементарных одонитевых фрагментов, несущих реакционные группы. Путем активации этих групп стало возможным получение мутаций в избранных генах или их отдельных участках. Г.Л. Дианов и А.В. Мазин стали лауреатами премии Ленинского комсомола за работу «Новые энзиматические и химические методы направленного мутагенеза, модификации и рестрикции ДНК для генной инженерии». В 1990 г. Рудольф Иосифович Салганик вместе с Ниной Ивановной Гриневой, Дмитрием Георгиевичем Кнорре и Зоей Алексеевной Шабаровой был удостоен Ленинской премии «За создание основ адресованной модификации генетических

структур». Методы направленных модификаций ДНК позволили экспериментально обосновать концепцию молекулярных механизмов геномных мутаций и рекомбинаций (перетасовок генов и их частей), преддетерминированных первичной структурой ДНК, и выяснить способы индукции рекомбинаций.

В числе учеников Р.И. Салганика Т.А. Баталина, Р.И. Берсимбаев, Е.Н. Воронина, И.С. Губенко, В.С. Дашкевич, Г.Л. Дианов, И.И. Дианова, А.Э. Дикалова, В.Ф. Девич, Г.М. Дымшиц, В.И. Каледин, А.П. Кузьменко, И.А. Лавриненко, Л.А. Ломова, А.В. Мазин, Н.П. Мертвцов, С.В. Неделькина, Т.Г. Панкова, З.И. Панфилова, А.С. Пословина, В.А. Поспелов, А.Г. Ромашенко, В.П. Томсонс, И.И. Тулоханов, Н.М. Чащина, В.Н. Чесноков.

Р.И. Салганик в 1958 г. был ученым секретарем ИЦиГ СО АН СССР. На протяжении 33 лет – с 1961 г. по 1994 г. – назначался заместителем директора по науке ИЦиГ СО АН СССР/ИЦиГ СО РАН.

В Новосибирском государственном университете Р.И. Салганик работал по совместительству: доцент (1964–1969 гг.), профессор (1969–1976 гг.) кафедры физической химии; в 1977–1994 гг. – профессор кафедры молекулярной биологии. Он читал лекционные курсы «Биохимия» и «Физиологическая химия», спецкурсы «Молекулярная биология» и «Функциональная биология (молекулярные основы физиологических процессов)». Его блестящие лекции «заразили» биохимией, молекулярной биологией и молекулярной генетикой сотни выпускников НГУ. Многие из них стали высококлассными специалистами и сегодня работают в престижных университетах и научных центрах России, Украины, Казахстана, Великобритании, Германии, Франции и США.

Р.И. Салганик избирался в состав Ученого совета ИЦиГ СО АН СССР, входил в состав Объединенного ученого совета по биологическим наукам СО АН СССР, входил в состав Специализированного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора биологических наук при ИЦиГ СО АН СССР (1976–1994 гг.).

В 1962 г. Р.И. Салганик входил в состав редколлегии журнала «Известия Сибирского отделения АН СССР»; с 1963 г. по 1968 г. –





Лаборатории нуклеиновых кислот (молекулярной биологии) 17 лет. 1974 г. Слева направо: 1-й ряд, сидят: Ариадна Александровна Соколенко, Тамара Михайловна Игонина, Иван Михайлович Левин, Валентина Федоровна Древич, Рудольф Иосифович Салганик, Аида Герасимовна Ромашенко, Светлана Владимировна Аргутинская, Григорий Леонидович Дианов; 2-й ряд, стоят: Олег Е. Гордиенко, Николай Павлович Мертвецов, Владимир Александрович Бердников, Валентина Ивановна Рыкова, Елена Николаевна Воронина, Лидия Егоровна Заварзина, Вера Петровна Томсонс, Татьяна Валентиновна Аршинова, Екатерина Никитична Пыжова, Григорий Моисеевич Дымшиц, Инна Молдестовна Грязнова; 3-й ряд: Виктор Николаевич Чесноков, Валерий Постелов, Любовь Васильевна Чекурова, Вера Степановна Дашкевич, Нина Александровна Соловьева, Елена Архиповна Васюнина, Татьяна Ивановна Меркулова, Тамара Григорьевна Панкова.



в состав редколлегии журнала «Известия Сибирского отделения АН СССР. Серия биолого-медицинских наук»; с 1969 г. по 1990 г. – «Известия Сибирского отделения АН СССР. Серия биологические науки»; с 1991 г. по 1993 г. – «Известия Сибирского отделения РАН. Сибирский биологический журнал» (с 1989 г. он был ответственным редактором журнала).

Воинский подвиг и достижения в науке и подготовке научных кадров Р.И. Салганика высоко отмечены правительством СССР. Он был награжден орденом «Красной Звезды» (1947 г.), Орденом Отечественной войны I степени (1985 г.). В 1967 г., в год десятилетия образования СО АН СССР, за создание Новосибирского научного центра и достигнутые успехи в развитии науки он был награжден орденом Трудового Красного Знамени. В 1983 г. за развитие биологической науки, подготовку научных кадров и в связи с 60-летием со дня рождения он был награжден вторым орденом Трудового Красного Знамени. Среди наград Р.И. Салганика медали: «За победу над Германией в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг.», «20 лет победы над Германией», «50 лет Советской Армии и Военно-Морского Флота», «За доблестный труд. В ознаменование 100-летия со дня рождения В.И. Ленина».

В 1979 г. за достигнутые успехи в научной работе и активное участие в общественной жизни д.б.н., профессор Р.И. Салганик был занесен в Книгу почета Новосибирского научного центра.

После переезда в США Рудольф Иосифович Салганик работает в Университете Северной Каролины, продолжая поддерживать связь с бывшими своими сотрудниками лаборатории молекулярной генетики и учениками.

## ЛИТЕРАТУРА О Р.И. САЛГАНИКЕ

- Члену-корреспонденту АН СССР Р.И. Салганику – 60 лет // Вестн. АН СССР. 1983. № 10. С. 139.
- Салганик Руд. Иос. // Советский энциклопедический словарь. М.: Изд-во Сов. энцикл., 1987. Изд. 4-е. С. 1161.
- Шумный В., Дымшиц Г. «Жизнь коротка – нужно спешить!» // Наука в Сибири. 26 июня 1998 г. № 25 (2161).
- Салганик Рудольф Иосифович // Российская академия наук. Сибирское отделение: Персональный состав. Новосибирск: Наука, 2007. 603 с. (С. 230–231).
- Академику Салганику Рудольфу Иосифовичу – 85 лет! // <http://www.ras.ru/news/shownews.aspx?id=44676fa3-c627-442d-80ec-7cfdbe658be4&print=1>

Шумный В.К., Захаров И.К., Кикнадзе И.И., Иванова Л.Н., Попова Н.К., Дымшиц Г.М. Генетика прирастает Сибирью. Первые два десятилетия Института цитологии и генетики СО АН СССР – начало и становление / Отв. ред. В.К. Шумный, Н.А. Колчанов, И.К. Захаров. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2012. 354 с.

## ИЗБРАННЫЕ ПУБЛИКАЦИИ Р.И. САЛГАНИКА

- Салганик Р.И. Влияние гормона щитовидной железы на использование белков, поступающих в организм // Биохимия. 1952. Т. 17. Вып. 6. С. 649–654.
- Салганик Р.И. Изучение возрастных особенностей обновления белков плазмы и тканей белых крыс при помощи меченого метионина // Врачебное дело. 1954. № 12. С. 10–1068.
- Салганик Р.И. О характере влияния гормона щитовидной железы на образование белков в организме в зависимости от условий питания // Биохимия. 1954. Т. 19. Вып. 6. С. 641–644.
- Салганик Р.И. О характере гормона щитовидной железы на образование белков в организме в зависимости от условий питания // Врачебное дело. 1954. № 12. С. 1063–1067.
- Салганик Р.И. Влияние температуры внешней среды на скорость включения радиометионина в белки тканей // Опыт применения радиоактивных изотопов в медицине. Тр. Киев. рентгено-радиологического и онкологического ин-та и республ. науч. конф. по применению радиоактивных изотопов в медицине 18–20 января 1954 г. / Под ред. Р.Е. Калецкого, И.Т. Шевченко. Киев: Гос. мед. изд-во УССР, 1955. С. 61–62.
- Салганик Р.И. Влияние физиологического состояния организма на связывание метионина  $S^{35}$  белками плазмы *in vitro* // Вопр. мед. химии. 1956. Т. 11. Вып. 6. С. 424–426.
- Салганик Р.И. Включение глицина- $1-C^{14}$  в ядерные белки клеток животного организма в связи с некоторыми воздействиями на дезоксирибонуклеиновую кислоту ядер // Биохимия. 1958. Т. 23. Вып. 3. С. 377–381.
- Салганик Р.И., Ятель Т.П., Мосолов А.Н. Инактивация вируса гриппа нуклеазами и восстановление инфекционных свойств его с помощью нуклеиновых кислот // Докл. АН СССР. 1959. Т. 129. № 1. С. 212–215.
- Салганик Р., Морозова Т.М., Кикнадзе И.И. Изучение восстановления нуклеиновых кислот в изолированных ядрах, подвергшихся действию дезоксирибонуклеазы // Докл. АН СССР. 1959. Т. 129. № 4. С. 947–949.
- Салганик Р.И., Морозова Т.М., Древич В.Ф. Изучение синтеза дезоксирибонуклеиновой кислоты в изолированных клеточных ядрах // Биохимия. 1961. Т. 26. Вып. 3. С. 399–407.
- Салганик Р.И., Томсон В.П., Протас Л.К. Изучение действия рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы на размножение вируса полиомиелита в культуре ткани // Изв. СО АН СССР. 1961. № 12. С. 78–81.
- Салганик Р.И., Грязнова И.М., Древич В.Ф., Морозова Т.М. О механизме стимулирующего влияния полианионов на синтез белков в изолированных клеточных ядрах

- после действия дезоксирибонуклеазы // Докл. АН СССР. 1962. Т. 145. № 2. С. 453–456.
- Салганик Р.И., Штерншис Ю.С. Применение дезоксирибонуклеазы при нагноительных процессах в легких // Клиническая медицина. 1962. Т. 40. № 6. С. 95–100.
- Салганик Р.И., Трухачев А.А. Действие дезоксирибонуклеазы на размножение аденовируса в культуре ткани // Изв. СО АН СССР. Сер. биол.-мед. наук. 1963. № 8. Вып. 2. С. 99–101.
- Аргутинская С.В., Салганик Р.И. Защитное действие полианионов при облучении мышей летальными дозами рентгеновых лучей // Радиобиология. 1963. Т. 3. № 2. С. 276–280.
- Морозова Т.М., Салганик Р.И. Исследование влияния диметилсульфата на нативную и денатурированную ДНК // Изв. СО АН СССР. Сер. биол.-мед. наук. 1964. № 4. Вып. 1. С. 59–63.
- Салганик Р.И., Мосолов А.Н., Китаева Т.Г. О механизме действия нуклеаз на вирус гриппа // Вопр. вирусологии. 1964. № 1. С. 62–66.
- Колен А.А., Михайловская И.Е., Салганик Р.И. Применение дезоксирибонуклеазы для лечения вирусных заболеваний глаз // Изв. СО АН СССР. Сер. биол.-мед. наук. 1964. № 8. Вып. 2. С. 145.
- Салганик Р.И., Кнорре В.Л. Влияние дейтериевого замещения на температуру перехода спираль–клубок в ДНК // Биофизика. 1964. Т. 9. Вып. 2. С. 160–161.
- Бандура З.И., Воронина Е.Н., Пословина А.С., Горюхова Н.М., Салганик Р.И. Изучение совместного действия химических мутагенов и ультрафиолетовых лучей на возникновение обратных мутаций у *E. coli* 113-3 // Радиобиология. 1964. Т. 4. Вып. 6. С. 865–869.
- Морозова Т.М., Горель Ф.Л., Салганик Р.И. Изучение реакции нативной и денатурированной ДНК с хромовым производным азотистого иприта // Биохимия. 1965. Т. 30. № 1. С. 67–73.
- Дашкевич В.С., Бердышев Г.Д., Салганик Р.И. Исследование состояния ДНК в интенсивно делящихся клетках // Биохимия. 1966. Т. 31. Вып. 3. С. 548–555.
- Кнорре В.Л., Салганик Р.И. Диссоциация ДНП под действием дезоксирибонуклеазы I // Биохимия. 1966. Т. 31. Вып. 4. С. 712–719.
- Салганик Р.И. Некоторые вопросы взаимосвязи между биологическими функциями и состоянием ДНК: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск: ИЦиГ СО АН СССР, 1966. 48 с.
- Панфилова З.И., Воронина Е.Н., Пословина А.С., Горюхова Н.М., Салганик Р.И. Изучение совместного действия химических мутагенов и ультрафиолетовых лучей на возникновение обратных мутаций у *Escherichia coli* // Генетика. 1966. № 2. С. 49–56.
- Мертвцов Н.П., Салганик Р.И., Аргутинская С.В. О независимой индукции тирозин- $\alpha$ -кетоглутарат трансминазы в печени крыс разными факторами // Генетика. 1966. № 8. С. 89–93.
- Salganik R.I., Drevich V.F., Vasyunina E.A. Isolation of ultraviolet-denatured regions of DNA and their base composition // J. Mol. Biol. 1967. V. 30. No. 1. P. 219–222.
- Трухачев А.А., Салганик Р.И. Действие дезоксирибонуклеазы на включение тимидина- $H^3$  в клетки, зараженные вирусом осповакцины // Вопр. вирусологии. 1967. № 3. С. 319–323.
- Salganik R.I., Martynova R.P., Matienko N.A., Ronichevskaya G.M. Effect of deoxyribonuclease on the course of lymphatic leukaemia in AKR mice // Nature. 1967. V. 214. No. 5083. P. 100–102.
- Trukhachev A.A., Salganik R.I. The effect of desoxyribonuclease on the synthesis of DNA of vaccinia virus // Virology. 1967. V. 33. No. 3. P. 552–555.
- Salganik R.I., Dashkevich V.S., Dymshits G.M. Studies of replicating DNA of regenerating rat liver using chemical modifications with water-soluble carbodiimide // Biochim. Biophys. Acta. 1967. V. 149. P. 603–606.
- Дымшиц Г.М., Дашкевич В.С., Салганик Р.И. Исследование некоторых свойств «гибридной» РНК в составе ДНК печени крыс // Молекуляр. биология. 1968. Т. 2. Вып. 4. С. 508–512.
- Дашкевич В.С., Дымшиц Г.М., Салганик Р.И. Изучение состояния ДНК регенерирующей печени крыс при репликации и транскрипции // Молекуляр. биология. 1968. Т. 2. Вып. 4. С. 562–567.
- Воронина Е.Н., Пословина А.С., Салганик Р.И. Регуляция спектра мутаций у *Escherichia coli* путем воздействия химическими мутагенами в различные периоды репликации ДНК // Генетика. 1968. Т. 4. № 7. С. 89–94.
- Трухачев А.А., Керкис Т.И., Ромашенко А.Г., Горель Ф.Л., Салганик Р.И. Исследование связи между противовирусной и ферментативной активностью дезоксирибонуклеазы // Вопр. вирусологии. 1969. № 5. С. 532–537.
- Томсон В.П., Вексман А.А., Салганик Р.И. Влияние экзогенной РНК и гомополирибонуклеотидов на синтез белка в асцитных клетках карциомы Эрлиха // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук. 1969. № 15. Вып. 3. С. 87–90.
- Салганик Р.И., Панкова Т.Г., Игонина Т.М. Влияние рибонуклеазы в клетках хориоаллантоисных оболочек, зараженных вирусом гриппа // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук. 1969. № 15. Вып. 3. С. 83–87.
- Salganik R.I., Argutinskaya S.V., Bersimbaev R.I. Induction of transcription in the stimulating action of a gastrin pentapeptide on gastric acid secretion // Experientia. 1971. V. 27. No. 1. P. 53–54.
- Bersimbaev R.I., Argutinskaya S.V., Salganik R.I. The stimulating action of gastrin pentapeptide and histamine of adenyl cyclase activity in rat stomach // Experientia. 1971. V. 27. No. 12. P. 1389–1390.
- Берсимбаев Р.И., Аргутинская С.В., Салганик Р.И. Влияние пентагастрина и гистамина на активность аденилциклазы в желудке крыс // Биохимия. 1972. Т. 37. Вып. 4. С. 792–796.
- Дашкевич В.С., Дымшиц Г.М., Салганик Р.И., Уланов Б.П. О дестабилизации вторичной структуры ДНК регенерирующей печени крыс в процессе репликации // Молекуляр. биология. 1972. Т. 6. Вып. 5. С. 689–697.
- Салганик Р.И., Трухачев А.А., Баталина Т.А. Противовирусное действие дезоксирибонуклеазы и рибонуклеазы // Ингибиторы вирусной активности. Рига, 1972. С. 147–152.
- Салганик Р.И., Соловьева Н.А. Индукция галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы печени крыс под действием

- галактозы и экспериментальная галактоземия // *Вопр. мед. химии*. 1972. Т. 18. Вып. 5. С. 472–477.
- Salganik R.I. Some possibilities of mutation control concerned with local increase of DNA sensitivity to chemical mutagens // *Biol. Zentralblatt*. 1972. Bd. 91. Heft 1. Z. 49–59.
- Салганик Р.И., Трухачев А.А., Баталина Т.А., Панкова Т.Г., Томсонс В.П., Ромашенко А.Г., Горель Ф.Л. Противовирусное действие дезоксирибонуклеазы и рибонуклеазы // *Проблемы теоретической и прикладной генетики*. Новосибирск: ИЦиГ СО АН СССР, 1973. С. 112–119.
- Христоролюбова Н.Б., Шилов А.Г., Киселева Е.В., Салганик Р.И. Морфометрическое изучение ультраструктуры клеток печени крыс в процессе гормональной индукции // *Цитология*. 1973. Т. 15. № 3. С. 254–259.
- Салганик Р.И., Аргутинская С.В., Берсимбаев Р.И., Зимонина Т.В. Влияние пентагастрина, гистамина и циклического 3',5'-АМФ на активность карбоангидразы в слизистой желудка крыс // *Биохимия*. 1973. Т. 38. Вып. 1. С. 174–177.
- Salganik R.I., Vasyunina E.A., Poslovina A.S., Andreeva I.S. Mutagenic action of N4-hydroxycytidine on *Escherichia coli* В *cyt* // *Mutat. Res*. 1973. V. 20. P. 1–5.
- Mertvetsov N.P., Chesnokov V.N., Salganik R.I. Specific changes in the activity of tyrosine aminotransferase isoenzymes in rat liver after cortisol treatment and partial hepatectomy // *Biochim. Biophys. Acta*. 1973. V. 315. P. 61–65.
- Мертвецов Н.П., Сапрыкин В.А., Чесноков В.Н., Салганик Р.И. Индукция в печени крыс под действием кортизола изоферментов тирозинаминотрансферазы, высокочувствительных к действию протеаз // *Биохимия*. 1974. Т. 39. Вып. 1. С. 3–8.
- Salganik R.I., Mertvetsov N.P., Gordienko O.E., Chesnokov V.N., Semenova L.A. Impairment of induction of glycolytic enzymes and development of insulin resistance in rats as a result of continuous insulin treatment // *Acta Endocrinol*. 1974. V. 76. P. 319–331.
- Соловьева Н.А., Морозкова Т.С., Салганик Р.И. Получение сублинии крыс с признаками наследственной галактоземии и исследование их биохимических особенностей // *Генетика*. 1975. Т. 11. № 5. С. 63–71.
- Васюнина Е.А., Пословина А.С., Андреева И.С., Салганик Р.И. Влияние аденина, аденозина, адениловых нуклеотидов на мутагенное действие гидроксилamina // *Генетика*. 1975. Т. 11. С. 127–132.
- Салганик Р.И., Киселева Е.В., Берсимбаев Р.И., Христоролюбова Н.Б. Многоклеточный биохимический ансамбль, обеспечивающий секрецию соляной кислоты в желудке крыс // *Докл. АН СССР*. 1975. Т. 224. № 5. С. 1220–1222.
- Salganik R.I., Bersimbaev R.I., Argutinskaya S.V., Kiseleva E.V., Khristolyubova N.B., Deribas V.I. Integration of biochemical functions of different cells of rat gastric mucosa for hydrochloric secretion // *Mol. Cell Biochem*. 1976. V. 12. No. 3. P. 181–191.
- Кумарев В.П., Райт А.С., Райт В.К., Салганик Р.И. Иммунизация белков и ферментов на альдегидосилохромах // *Биоорганическая химия*. 1976. Т. 2. № 5. С. 700–705.
- Назаренко И.А., Беляева Т.А., Воробьева Н.В., Неханевич И.Ф., Потапов В.А., Ромашенко А.Г., Юшкова Л.Ф., Салганик Р.И. Выделение фермента, катализирующего полимеризацию дезоксирибонуклеозиддифосфатов, из препаратов ДНК-полимеразы I *E. coli* // *Молекулярная биология*. 1976. Т. 10. Вып. 6. С. 1231–1237.
- Салганик Р.И., Мананкова Н.М., Семенова Л.А. Гипохолестеринемический эффект индукции микросомальных ферментов печени у крыс // *Вопр. мед. химии*. 1977. № 4. С. 468–473.
- Nazarenko I.A., Potapov V.A., Romaschenko A.G., Salganik R.I. Separation of the enzyme catalysing polymerization of deoxyribonucleoside diphosphates from the preparations of *Escherichia coli* DNA polymerase I // *FEBS Letters*. 1978. V. 86. No. 2. P. 201–204.
- Salganik R.I. Some patterns of genetic induction of protein synthesis in animal cells // *The Cell Nucleus*. V. 7. Chromatin, Part D. N.Y., a. o.: Acad. Press, 1979. P. 327–367.
- Salganik R.I. Enzyme induction and deinduction in animal cell associations // *Macromolecules in the Functioning Cell*. N.Y., London: Plenum Press, 1979. P. 219–235.
- Назаренко И.А., Бобко Л.Е., Ромашенко А.Г., Хрипин Ю.Л., Салганик Р.И. Исследование природы безматричного синтеза d(A-T)-сополимера, катализируемого препаратами ДНК-полимеразы I *Escherichia coli* // *Молекулярная биология*. 1979. Т. 13. Вып. 1. С. 216–227.
- Nazarenko I.A., Bobko E.L., Romaschenko A.G., Khripin Yu.I., Salganik R.I. A study on the unprimed poly(dA-dT) synthesis catalyzed by preparation of *E. coli* DNA polymerase I // *Nucl. Acids Res*. 1979. V. 6. No. 7. P. 2545–2560.
- Дианов Г.Л., Бондарь Т.С., Салганик Р.И. Исследование комплементарного взаимодействия множественно алкилированных полирибонуклеотидов // *Молекулярная биология*. 1979. Т. 13. № 2. С. 303–306.
- Дианов Г.Л., Овчинникова Л.П., Воронина Е.Н., Козоца Е.Б., Салганик Р.И. Получение направленных мутаций у фага T7 с помощью полиалкилирующих РНК, комплементарных избранным генам // *Докл. АН СССР*. 1979. Т. 248. № 2. С. 465–468.
- Салганик Р.И., Соловьева Н.А., Мананкова Н.М. Коррекция симптомов наследственных заболеваний в эксперименте путем ферментативного импринтинга // *Докл. АН СССР*. 1980. Т. 253. № 6. С. 1480–1484.
- Salganik R.I., Dianov G.L., Ovchinnikova L.P., Voronina E.N., Kokoza E.B., Mazin A.V. Gene-directed mutagenesis in bacteriophage T7 provided by polyalkylating RNAs complementary to selected DNA site // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1980. V. 77. No. 5. P. 2796–2800.
- Salganik R.I., Mertvetsov N.P., Chesnokov V.N. Selective sensitivity of hormone-induced tyrosine aminotransferase and hexokinase isoenzymes in rat liver to the action of protease: their role in cell homeostasis // *Biochimie*. 1980. V. 62. No. 1. P. 167–176.
- Salganik R.I., Gryaznova I.M., Markel A.L., Manankova N.M., Solovyeva N.A. Enzymic «imprinting» as the result of early postnatal administration of enzyme inducers to animals // *Experientia*. 1980. V. 36. P. 43–44.
- Мазин А.В., Дианов Г.Л., Салганик Р.И. Использование алкилирующих производных ДНК для направленного воздействия на геном // *Молекулярная биология*. 1981. Т. 15. № 1. С. 252–256.

- Аргутинская С.В., Аршинова Т.В., Селятицкая В.Г., Салганик Р.И. Исследование причин снижения индукции ферментов при длительном введении гормона: рецепция кортизола в клетке печени крыс // Проблемы эндокринологии. 1981. Т. 27. № 3. С. 43–48.
- Салганик Р.И. Некоторые методологические вопросы молекулярной генетики: критерии значимости и цели исследований // Методологические и философские проблемы биологии / Отв. ред. Д.К. Беляев. Новосибирск: Наука, 1981. С. 33–41.
- Kaina B., Dianov G.L., Rieger R., Salganik R.I. Attempts to induce site-directed chromosome aberration in *Vicia faba* by mutagen addressing // Biol. Zbl. 1981. V. 100. P. 181–194.
- Салганик Р.И., Соловьева Н.А., Мананкова Н.М., Томсон В.П. Коррекция наследственных ферментопатий в эксперименте путем неонатальной индукции ферментов // Вопр. мед. химии. 1982. № 3. С. 8–15.
- Соловьева Н.А., Салганик Р.И. Исследование биохимических механизмов развития наследственной галактоземии у крыс линии W/SSM // Генетика. 1982. Т. 18. № 3. С. 420–427.
- Соловьева Н.А., Кандауров В.А., Зайдман А.М., Салганик Р.И. Наследственная галактоземия у крыс: биохимические механизмы развития заболевания // Вопр. мед. химии. 1982. № 3. С. 15–21.
- Салганик Р.И., Соловьева Н.А., Кандауров В.А. Коррекция симптомов наследственной галактоземии у крыс линии W/SSM путем ферментативного импринтинга // Генетика. 1982. Т. 18. № 3. С. 428–433.
- Воробьева Н.В., Небрат Л.Т., Потапов В.А., Ромашенко А.Г., Салганик Р.И., Юшкова Л.Ф. Обратная транскрипция гетерополимерной РНК с помощью РНК-зависимой ДНК-полимеразы *Escherichia coli* // Молекуляр. биология. 1982. Т. 16. Вып. 5. С. 977–983.
- Аргутинская С.В., Берсимбаев Р.И., Ершова Л.П., Киселева Е.В., Христолюбова Н.Б., Салганик Р.И. Биохимические механизмы регуляции секреции пепсина в желудке // Вопр. мед. химии. 1982. Т. 28. Вып. 1. С. 92–98.
- Салганик Р.И., Коган А.С., Гончар А.М., Семенова Л.А., Земцова Л.В., Старостина В.К., Фомичева В.Ф. Атромбогенные материалы, полученные путем иммобилизации трипсина на поверхности синтетических полимеров // Вопр. мед. химии. 1982. Т. 28. Вып. 1. С. 113–115.
- Рыкова В.И., Роничевская Г.М., Салганик Р.И. Химические и биологические свойства кейлоноподобных протеогликанов из тканей животных // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук. 1982. № 10. Вып. 2. С. 144–150.
- Мазин А.В., Дианов Г.Л., Овчинникова Л.П., Салганик Р.И. Индукция направленных мутаций в гене устойчивости к тетрациклину плазмиды pBR323 с помощью комплементарных одностранных фрагментов ДНК, несущих алкилирующие группы // Докл. АН СССР. 1983. Т. 268. № 4. С. 979–982.
- Салганик Р.И. Направленные химические воздействия на избранные гены // Вестн. АН СССР. 1983. № 11. С. 58–67.
- Томсон В.П., Пыринова Г.Б., Корохов Н.П., Киселева Е.В., Христолюбова Н.Б., Салганик Р.И. Обратная транскриптаза из печени крыс: происхождение и вероятные функции // Докл. АН СССР. 1983. Т. 272. № 6. С. 1498–1501.
- Salganik R.I., Parvez H., Tomsons V.P., Shumskaya I.A. Probable role of reverse transcriptions in learning correlation between hippocampal RNA-dependent DNA synthesis and learning ability in rat // Neosci. Lett. 1983. V. 36. P. 317–322.
- Салганик Р.И., Мазин А.В., Дианов Г.Л., Овчинникова Л.П. Индукция повторяющихся нуклеотидных последовательностей. Вероятные механизмы эволюции генома и геномной конверсии // Генетика. 1984. Т. 20. № 8. С. 1244–1254.
- Таиров М.М., Берсимбаев Р.И., Аргутинская С.В., Дерибас В.И., Киселева Е.В., Христолюбова Н.Б., Салганик Р.И. Биохимические механизмы регуляции выделения желудочной слизи у крыс; роль простагландина E<sub>2</sub> и гистамина // Вопр. мед. химии. 1984. Т. 30. № 4. С. 28–32.
- Киселева Е.В., Воронцова Л.А., Христолюбова Н.Б., Таиров М.М., Аргутинская С.В., Салганик Р.И. Количественный анализ ультраструктурных мукоцидов желудка крыс после действия простагландина // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 1985. Т. 88. № 1. С. 82–85.
- Дианов Г.Л., Васюнина Е.А., Синецына О.М., Овчинникова Л.П., Салганик Р.И. Молекулярные механизмы возникновения полных и мозаичных мутаций // Генетика. 1985. Т. 21. № 8. С. 1253–1260.
- Салганик Р.И., Дианов Г.Л., Мазин А.В. Мутации, преддетерминированные первичной структурой ДНК // Генетика. 1986. Т. 22. № 10. С. 2398–2408.
- Меркулова Т.И., Соловьев В.В., Колчанов Н.А., Плисов С.Ю., Салганик Р.И. Выявление нуклеотидных последовательностей, специфичных для 5'-фланкирующих районов генов, регулируемых глюкокортикоидами, методом компьютерного анализа // Бюл. эксперим. биол. и медицины. 1986. № 4. С. 466–468.
- Гончар А.М., Коган А.С., Салганик Р.И. Раневой процесс и иммобилизованные протеолитические ферменты. Новосибирск: Наука, 1986. 119 с.
- Соловьева Н.А., Гинзбург Э.Х., Казаринова Ф.М., Кандауров В.В., Салганик Р.И. Повышенный транспорт галактозы в клетки как причина развития наследственной галактоземии у крыс // Вопр. мед. химии. 1987. Т. 33. С. 41–47.
- Салганик Р.И. Молекулярные механизмы стресс-индуцированной наследственной изменчивости // Генетика. 1987. Т. 23. № 6. С. 1050–1064.
- Салганик Р.И., Тимченко Т.В., Дианов Г.Л. Молекулярные механизмы делеций, возникающих в результате двунитевых разрывов в ДНК // Докл. АН СССР. 1987. Т. 296. № 1. С. 226–231.
- Киселева Е.В., Дикалова А.В., Дударева Н.А., Христолюбова Н.Б., Салганик Р.И. Структурная организация генома хлоропластов *Beta vulgaris* L. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 302. № 5. С. 1229–1232.
- Синецына О.И., Дианов Г.Л., Салганик Р.И. Репарационная эксцизия противоположащих химических повреждений двух нитей ДНК вызывает двунитевые разрывы //



- Докл. АН СССР. 1989. Т. 306. С. 214–217.
- Меркулов В.М., Меркулова Т.И., Салганик Р.И. Влияние конформации ДНК на взаимодействие глюкокортикоидрецепторного комплекса с глюкокортикоидрегулируемым геном // Докл. АН СССР. 1989. Т. 306. № 2. С. 489–492.
- Карамышева Т.В., Мазин А.В., Сапарбаев М.К., Дианов Г.Л., Салганик Р.И. Эффективность химического мутагенеза при множественных повреждениях одной и двух нитей плазмидной ДНК // Генетика. 1991. Т. 27. № 2. С. 210–217.
- Адаричев В.А., Дымшиц Г.М., Мишина Е.С., Салганик Р.И. и др. Нерадиоактивный гибридизационный тест на заражение человека *Plasmodium falciparum* // Биополимеры и клетка. 1993. Т. 9. № 2. С. 19–23.
- Ерисковская Н.Е., Керкис А.Ю., Соловьева Н.А., Салганик Р.И. Наследственная гиперпродукция свободных радикалов. Индукция канцерогенеза // Докл. АН. 1994. Т. 338. № 2. С. 255–258.
- Salganik R.I., Solovyova N.A., Dikalov S.I., Grishaeva O.N., Semenova L.A., Popovsky A.V. Inherited enhancement of hydroxyl radical generation and lipid peroxidation in the S strain rats results in DNA rearrangements degenerative diseases and premature aging // Biochem. Res. Comm. 1994. V. 199. P. 726–733.
- Salganik R.I., Shabalina I.G., Solovyova N.A., Kolosova N.G., Solovyov V.N., Kolpakov A.R. Impairment of respiratory functions in mitochondria of rats with inherited hyperproduction of free radicals // Biochem. Biophys. Commun. 1994. V. 205. No. 1. P. 180–185.
- Соловьева Н.А., Салганик Р.И., Гришаева О.Н., Дикалов С.И., Семенов Д.И. Биохимические механизмы развития наследственной кардиомиопатии у крыс линии W/SSM // Бюл. эксперим. биол. и медицины. 1995. Т. 8. С. 151–154.
- Салганик Р.И. Генетика оксидативного стресса, его опасности и преимущества // Современные концепции эволюционной генетики. Ч. 2. Новосибирск, 1997. С. 308–311.
- Вихрева Л.А., Салганик Р.И. и др. Роль цитохрома P 450 в метаболизме S-этинилтиофосфатов // Изв. АН. 2000. № 1. С. 33–36.
- Салганик Р.И. Он стоял за нас горой // Век Лаврентьева. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2000. С. 232–233.

УДК 575.16: 575.2: 575.827.5

## ДОМСТИЦИРУЕМЫЕ ЛИСИЦЫ: МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ, ВОВЛЕКАЕМЫЕ В ОТБОР ПО ПОВЕДЕНИЮ

© 2013 г. Л.Н. Трут<sup>1</sup>, Ю.Э. Гербек<sup>1</sup>, А.В. Харламова<sup>1</sup>, Р.Г. Гулевич<sup>1</sup>, А.В. Кукекова<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois, USA, e-mail: avk@illinois.edu

Поступила в редакцию 7 марта 2013 г. Принята к публикации 14 мая 2013 г.

Несмотря на то что одомашнивание животных со времен Дарвина вызывает большой интерес у генетиков и эволюционистов, основной вопрос о генетических механизмах этого процесса до сих пор в должной мере не прорабатывался. В настоящей статье излагаются некоторые результаты экспериментального моделирования исторической одомашнивания на одном из объектов промышленного разведения – серебристо-черной лисице (*Vulpes vulpes*). Статья сфокусирована на роли отбора в трансформации поведения этих животных, приведшего к созданию уникальных популяций ручных и агрессивных лисиц. С целью анализа молекулярно-генетической природы различий в поведении этих уникальных лисиц были созданы дополнительные ресурсы: сконструирована мейотическая карта генома лисицы, путем скрещиваний ручных и агрессивных лисиц получены информативные расщепляющиеся субпопуляции, совершенствован применяемый ранее метод количественной оценки поведенческих фенотипов. В работе использовались интегральные поведенческие фенотипы (главные компоненты – ГК1 и ГК2), полученные в результате анализа регистрируемых видеокamerой этологических параметров. Главный результат состоит в том, что при использовании интервального QTL-картирования на 12-й хромосоме лисиц идентифицирован регион, наиболее тесно ассоциированный с ручным поведением. Принципиальное значение этого результата усиливается тем, что он оказался гомологичным региону на 5-й хромосоме собак, который интерпретируют как регион, ответственный за раннюю одомашнивание волка и его эволюционный переход в примитивную собаку.

**Ключевые слова:** серебристо-черные лисицы, экспериментальная одомашнивание, молекулярно-генетический анализ поведения, дестабилизирующий отбор, расщепляющиеся популяции.

### ВВЕДЕНИЕ

Серебристо-черная лисица – это форма красной лисицы (*Vulpes vulpes*), характеризующаяся серебристо-черной окраской. Уже более ста лет она является объектом промышленного клеточного разведения во всем мире. Ее разведение началось в Южной Канаде (Prince Edward Island), а затем распространилось по всему миру из-за высокой ценности серебристо-черной окраски. В России серебристо-черная лисица разводится с начала XX в. Иными словами, ее естественная одомашнивание, т. е. адаптация к новым социальным условиям, длится уже более ста лет. В начале 1950-х годов в России началась

ее одомашнивание в контролируемых условиях эксперимента, инициированного академиком Д.К. Беляевым и осуществляемого доктором биологических наук Л.Н. Трут (Трут, 2007). Д.К. Беляев гипотетически считал, что отбор лисиц по поведению, а именно по их реакции на главный фактор новой социальной среды – человека, мог быть определяющей силой, действующей в ходе одомашнивания животных (Belyaev, 1969; Беляев, 1972).

Д.К. Беляев предполагал, что гены, контролирующие поведение, обладают крайне широким спектром плейотропного действия. Поэтому он думал, что отбор на несвойственное диким животным поведение (дружелюбное

отношение к человеку) мог влиять на многие регуляторные процессы и порождать новую изменчивость поведенческих, физиологических и морфологических признаков. Экспериментальная domestикация лисицы представляет собой модельный эксперимент для тестирования этих предположений (Belyaev, 1979; Trut, 1999; Trut *et al.*, 2009, 2012).

Анализ митохондриальной ДНК лисиц экспериментальной популяции идентифицировал канадскую лисицу как главного (если не единственного) предка экспериментальных и контрольных лисиц, которые содержатся на экспериментальной ферме Института цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН (Statham *et al.*, 2011).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ДОМСТИКАЦИЯ СЕРЕБРИСТО- ЧЕРНЫХ ЛИСИЦ И ЕЕ ПОСЛЕДСТВИЯ

Экспериментальное воспроизведение процесса domestикации осуществляется уже более 60 лет – первые линии наиболее толерантных к человеку лисиц были заложены Д.К. Беляевым на одной из эстонских ферм в 1951–1952 гг. Потомки этих линий, а также отобранные на разных лисьих фермах лисицы, не проявляющие ярко выраженных реакций дикости на человека, составили группу основателей в количестве 100 самок и 30 самцов domestикаруемой популяции. Все они в 1960-х годах были перевезены на экспериментальную звероферму ИЦиГ.

Лисицы разводились на этой ферме в режиме аутбридинга. Единственным критерием подбора размножающихся пар и отбора их потомков служили реакции на человека. В течение первых 3–4 поколений отбора произошла генетическая элиминация реакции агрессивности и трусости. Начиная с четвертого поколения, главная задача отбора состояла в усилении эмоционально положительной реакции на человека. Критерии оценки поведения, ход отбора и его эффективность детально описаны в ряде обзоров (Трут, 1980; Трут и др., 2004; Trut *et al.*, 2009). В начале 1970-х годов был начат отбор в противоположном направлении – на усиление агрессивной реакции на человека. Главный результат первого этапа эксперимента состоял в создании уникальных популяций domestикаруемых и агрессивных лисиц.

При отборе лисиц на domestикацию происходили генетические изменения регуляторных систем онтогенеза, прежде всего – ослабление функциональной активности гипоталамо-гипофизарной надпочечниковой системы (ГГНС) (Трут и др., 1972; Оськина и др., 2008). Особенно важно отметить, что эффекты отбора по поведению на ГГНС прослеживаются на уровне не только фенотипических параметров активности этой системы, но также экспрессии ключевых генов системы, кодирующих кортикотропин-релизинг фактор, проопиомеланокортин и рецептор глюкокортикоидов (Gulevich *et al.*, 2004; Оськина и др., 2008; Гербек и др., 2010). Доместикация вовлекает в сферу своего действия не только гормональные, но и нейромедиаторные системы онтогенеза (Naumenko, Belyaev, 1980). В связи с проблемой domestикации особого внимания заслуживает серотониновая система мозга, участвующая в ингибировании агрессивного поведения. У domestикаруемых лисиц были выявлены более высокие уровень серотонина в мозге и активность ключевого фермента его синтеза (Ророва, 2006). Интересно, что роль именно серотониновой медиаторной системы была неоднократно продемонстрирована в регуляции эмбриогенеза (Бузников, 1987; Cote *et al.*, 2007).

Принципиальное значение имеет тот факт, что трансформация поведения лисиц в сторону домашнего в ходе эксперимента сопровождалась возникновением ряда фенотипических новшеств, которые имеются у собак и у других домашних животных. Эти новшества затрагивали, прежде всего, такой признак, как окраска мехового покрова: возникновение специфически локализованных депигментированных пятен («Star» фенотип) и светло-бурых подпаленных участков («Mottling» фенотип). Характерными морфологическими маркерами domestикаруемых лисиц, так же, как и других домашних животных, являются вислоухость, «лаечный» (свернутый в кольцо или полукольцо) хвост, укорочение и расширение лицевого черепа; у отдельных животных наблюдалось также укорочение хвоста и лап (Trut, 1999; Трут, 2007; Trut *et al.*, 2009).

Генетическая основа морфологических и физиологических изменений, которые появляются в ходе отбора лисиц по поведению, остается пока неясной. Для объяснения этого феномена можно привлечь два основных генетических

механизма – генетическое сцепление и генную плейотропию. Если гены, участвующие в контроле того или иного фенотипического изменения, локализованы в тесной близости к генам, контролирующим поведение, то отбор, действующий на гены поведения, будет неизбежно действовать на тесно сцепленные соседние гены. Если определенные аллели поведенческих генов и соседних генов находятся в одном и том же гаплотипе, то они будут наследоваться вместе, пока не пройдет достаточное число поколений, для того чтобы этот гаплотип был разрушен рекомбинационными событиями.

Альтернативные объяснения, основанные на генной плейотропии, означают, что гены, вовлекаемые в контроль поведения, могут также вовлекаться в другие регуляторные процессы и играть важную роль в ходе развития. Феномен, известный в биологии как неотения, или задержанное развитие, служит одним из аргументов этой точки зрения. Действительно, многогранные поведенческие и морфологические изменения, наблюдаемые у ручных лисиц и собак, связаны с задержкой некоторых процессов развития. Это, в свою очередь, служит подтверждением концепции дестабилизирующего отбора, которую разработал Д.К. Беляев (Belyaev, 1979).

Чтобы пролить некоторый свет на молекулярные механизмы, лежащие в основе феномена дестабилизации развития, наблюдаемого при отборе лисиц на domestикацию, необходимо, прежде всего, идентифицировать генетическую основу domestикационного поведения лисиц.

### **МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ЛОКАЛИЗАЦИИ ЛОКУСОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РАЗЛИЧИЯ**

Хотя созданные путем отбора domestизируемая и агрессивная популяции лисиц изучаются уже более 60 лет, только в последнее время стал возможен систематический подход к идентификации молекулярных механизмов и локализации локусов, контролирующих поведенческие различия между лисицами ручной и агрессивной популяций. Классический генетический подход к геномному картированию позволил создать в конце 1990-х годов первичную карту генома лисиц и полностью реконструировать кариотип

лисиц (Graphodatsky *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1999). Чтобы начать активное исследование молекулярной генетики поведения у этих лисиц, были необходимы дополнительные ресурсы, включающие набор родословных животных из расщепляющегося поколения для картирования, набор соответствующих молекулярных маркеров, генетическая карта генома лисы и адекватные методы для количественной оценки поведения.

Несмотря на то что разведение агрессивных и ручных лисиц осуществлялось в режиме аутбридинга, гены, контролирующие селекционируемое поведение, к периоду нашего исследования если и не были полностью фиксированы, то были близки к этому состоянию. Об этом свидетельствовали крайне низкая вариабельность поведенческих реакций на человека среди потомков как в ручной, так и агрессивной популяции, а также повышенная частота встречаемости аллелей генов, находящихся под селективным давлением, что было продемонстрировано в ходе последующего QTL-анализа поведения (Kukekova *et al.*, 2011b).

Для получения животных и создания родословных, необходимых для картирования соответствующих генов, скрещивали между собой ручных и агрессивных лисиц. Кроссбредное потомство ( $F_1$ ) далее скрещивали либо с исходными родительскими линиями, либо между собой. В результате были созданы расщепляющиеся поколения соответственно беккроссов и интеркроссов.

На основе нуклеотидной последовательности генома и генетической карты сцепления собаки был идентифицирован набор микросателлитных маркеров, общих для собак и лисиц (Kukekova *et al.*, 2004). Из 700 протестированных собачьих микросателлитных маркеров около 60 % хорошо гибридизовались с лисьей ДНК. Для построения мейотической карты сцепления генома лисицы животные из 37 родословных, представленных 3 поколениями (ручных и агрессивных родителей, кроссбредного  $F_1$  и расщепляющихся беккроссов и интеркроссов), были генотипированы по 320 маркерам (Kukekova *et al.*, 2007). В настоящее время создана вторая версия мейотической генетической карты лисицы на основе генотипирования 916 потомков информативных поколений с ис-



пользованием 93 дополнительных микросателлитных маркеров. Усредненная по полу карта лисицы покрывает 16 аутосом и X-хромосому лисицы, общая протяженность карты составляет 1548,5 сМ (Kukekova *et al.*, 2012).

Выравнивание мейотической карты лисицы по нуклеотидной последовательности генома собаки выявило высокую консервативность порядка расположения маркеров в гомологичных регионах двух этих видов и дало основание для предсказания гомологии генов лисицы и собаки (Kukekova *et al.*, 2007, 2011a).

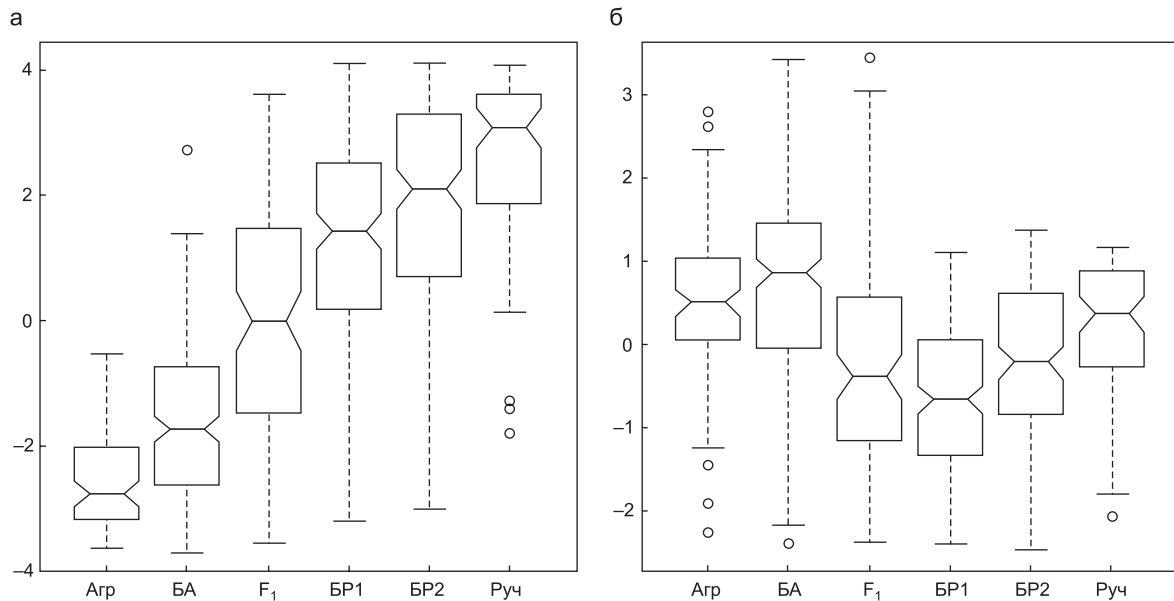
### ЕДИНАЯ КОЛИЧЕСТВЕННАЯ СИСТЕМА ОЦЕНКИ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ ФЕНОТИПОВ У СЕРЕБРИСТО-ЧЕРНЫХ ЛИСИЦ

При отборе лисиц на доместикацию и агрессивность селекционируемые линии разошлись очень быстро (за 2–3 поколения). В ходе отбора применялись отдельные балльные шкалы для оценки ручного и агрессивного поведения, многократно описанные в ряде обзоров (Трут 1980; Trut, 1980, 1999). Использование этих двух систем балльной оценки поведения было оправдано в ходе всего отбора и привело к созданию уникальных популяций ручных и агрессивных лисиц. Однако для целей молекулярно-генетического анализа и поиска локусов количественных признаков (QTL), описывающих поведение, была нужна единая количественная система оценки от самого сильного проявления агрессивных реакций до максимальной экспрессии ручного поведения. Поведение лисиц – потомков расщепляющихся экспериментальных популяций – характеризовалось широким спектром изменчивости и проявлением у некоторых особей элементов как агрессивного, так и ручного паттерна поведения, характерного для лисиц исходных родительских популяций. Все это и заставило разработать новую систему количественной оценки поведенческих фенотипов, которая бы работала во всех экспериментальных популяциях лисиц.

Эта система представляла собой модифицированную оценку поведения лисиц, которая использовалась в ходе всего отбора. Поведение тестировали в разных ситуациях: а) наблюдатель стоит у закрытой клетки животного;

б) открывает клетку; в) пытается осуществить тактильный контакт с животным (трогает его рукой, если это возможно); г) закрывает клетку и спокойно стоит у клетки. Видеорегистрацию поведения лисиц осуществляли в ходе всего тестирования (Kukekova *et al.*, 2008).

В ходе последующей расшифровки видеозаписей были идентифицированы дискретные поведенческие элементы. Все эти элементы были оценены по их информативности, воспроизводимости, стабильности и частоте встречаемости у протестированных животных (Kukekova *et al.*, 2008). Минимальный набор из 50 элементов (признаков) надежно дифференцирует лисиц вдоль оси «ручное – агрессивное поведение». Поскольку все экспериментальные лисицы содержатся в одинаковых условиях, имеют одинаковые контакты с человеком, и поскольку поведение лисиц тестировали в одни и те же временные периоды, используя стандартный тест, влияние средовых условий было сведено к минимуму. Общее число протестированных лисиц составляло 1003, среди которых: ручные лисицы (83), агрессивные (80), гибриды  $F_1$  (93), беккроссы на ручного родителя (293), беккроссы на агрессивного родителя (202) и интеркроссы  $F_2$  (252). Идентифицированные у всех этих животных элементы поведения были проанализированы одним из методов многомерного анализа – методом главных компонент, который позволяет заменить большое число исходных признаков меньшим числом некоррелируемых между собой новых интегральных показателей (главных компонент), в которые каждый исходный признак входит с определенными весовым коэффициентом и знаком (Jackson, 1991). В этом новом наборе полученных нами данных первые две главные компоненты (ГК1 и ГК2) описывают соответственно 33 и 9 % общей изменчивости поведения (Kukekova *et al.*, 2011a). ГК1 четко дифференцирует ручных лисиц от агрессивных. Распределение средних значений ГК1 у лисиц всех экспериментальных популяций (ручных, агрессивных,  $F_1$ -гибридов, беккроссов на ручного и агрессивного родителя, а также  $F_2$ -интеркроссов) ясно иллюстрирует линейный градиент наследуемого поведения, ранжируемого от агрессивного до ручного, что, в свою очередь, соответствует относительной доле агрессивных и ручных предков в каждой экспериментальной популяции (рис. 1, а).



**Рис. 1.** Распределение (box plot) животных из экспериментальных популяций по значениям главных компонент: ГК1 (а), PC2 (б).

Агр – агрессивные лисицы, БА – беккроссы на агрессивного родителя, F<sub>1</sub> – агрессивные × ручные, BP1, BP2 – два набора беккроссов на ручного родителя, Руч – ручные лисицы.

Распределение средних величин ГК2 в экспериментальных популяциях не следует такому линейному градиенту (рис. 1, б).

На основе поведенческих элементов, которые вносят вклад в эти две главные компоненты, можно дать им биологическую интерпретацию. При сравнении вкладов признаков в ГК1 и ГК2 видно, что эти две главные компоненты отражают различные аспекты поведения. ГК1, судя по абсолютной величине вкладов исходных признаков в эту компоненту, а также их знаков, описывает широкий спектр изменчивости поведения – от агрессивного до ручного. Так, например, максимальный вклад в ГК1 вносят признаки, описывающие: местонахождение животного в клетке во время теста, т. е. дистанцию, которую животное сохраняет между собой и экспериментатором (вблизи экспериментатора либо в дальних секторах клетки); положение хвоста (хвост напряжен, опущен вниз и поджат или поднят вверх, загнут в кольцо, или животное виляет хвостом); голосовые реакции (предупреждающие об атаке рыкообразные звуки или призывное скуление), положение ушей (напряженно прижатые или расслабленные). ГК2 можно интерпретировать как активное–пассивное поведение. Максимальные вклады в эту компоненту

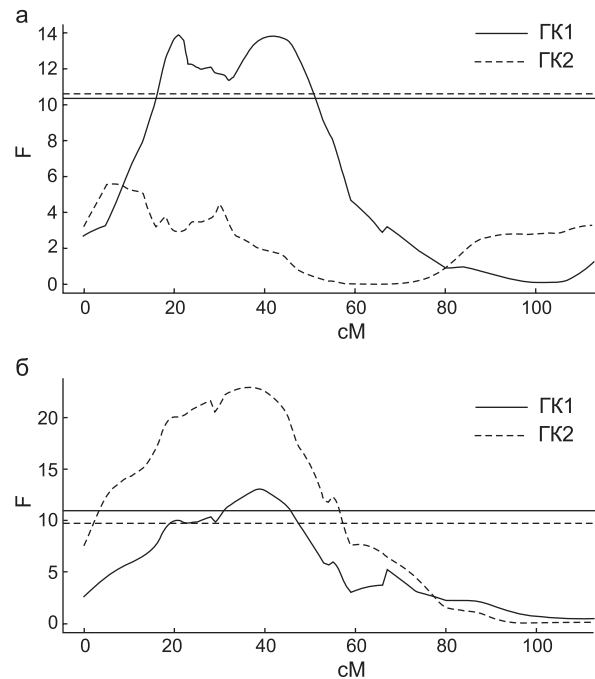
вносят признаки, демонстрирующие различные аспекты двигательной активности животного во время теста – животное подходит к экспериментатору (независимо от мотива этого движения – для позитивного контакта или для атаки) либо остается неподвижным (как в дальних секторах клетки, так и в непосредственной близости к экспериментатору).

### ПОИСК ЛОКУСОВ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ (QTL), АССОЦИИРОВАННЫХ С ПОВЕДЕНИЕМ

Значения ГК1 и ГК2 использовали как фенотипы при интервальном картировании ассоциированных с поведением локусов количественных признаков (Seaton *et al.*, 2002) в информативных родословных лисиц. Для QTL-картирования использовали находящееся в свободном доступе программное обеспечение Grid-QTL ([www.gridqtl.org.uk](http://www.gridqtl.org.uk)). Для анализа беккроссов на ручного и агрессивного родителя, а также для анализа комбинированного набора данных использовали алгоритм VCF2. Для картирования родословных F<sub>2</sub> использовали алгоритм F2inbred. Пороговое значение

F-статистики определяли по 1 тыс. пермутаций (Kukekova *et al.*, 2011a).

Картирование, проведенное с использованием всего набора данных, включающих все экспериментальные родословные, идентифицировало локус для ГК1 на хромосоме 12 лисиц (VVU12), в широком диапазоне от 10 до 60 сМ (рис. 2, а). Необходимо подчеркнуть, что регион 12-й хромосомы лисицы был насыщен микросателлитными маркерами более плотно по сравнению с остальным геномом. Общее число микросателлитов, картированных на хромосому 12, составило 50, число микросателлитов в регионе ГК1 – более 30 (Kukekova *et al.*, 2011a). Для ГК2 при анализе всего набора данных не выявлено достоверного пика на 12-й хромосоме, однако у беккроссов на ручного родителя для ГК2 также идентифицирован локус на 12-й хромосоме (рис. 2, в). Эти различия в картировании могут быть связаны с особенностями экспрессии поведенческих признаков в разных экспериментальных популяциях. Можно допустить, что, несмотря на то что по определению ГК1 и ГК2 являются независимыми поведенческими фенотипами, эта независимость не является полной. ГК2 может усиливать экспрессию ГК1; так, если животное агрессивное, то пассивное поведение, оцениваемое по ГК2, будет уменьшать экспрессию агрессии, в то время как активное будет ее усиливать. То же самое справедливо и для ручного животного. В популяциях беккроссов распределение поведения, оцениваемого по ГК1, смещено в сторону повторяющегося родителя, т. е. размах изменчивости поведения от ручного до агрессивного уменьшается. При этих обстоятельствах ГК2 увеличивает этот размах, влияя на экспрессию ГК1. Поэтому можно думать, что ГК1 и ГК2, рассчитанные на основе общего корреляционного матрикса, объединяющего все экспериментальные субпопуляции, являются независимыми друг от друга, но коррелируют друг с другом в отдельно взятых субпопуляциях беккроссов (Kukekova *et al.*, 2012). И действительно, в популяциях беккроссов на ручного родителя между ГК1 и ГК2 наблюдается очень высокая корреляция (коэффициент корреляции Спирмена  $r = 0,75-0,8$ ). В расщепляющейся популяции  $F_2$ , где распределение поведения нормальное, не выявлено корреляции между этими двумя компонентами ( $r = -0,06$ ). Поэтому вполне

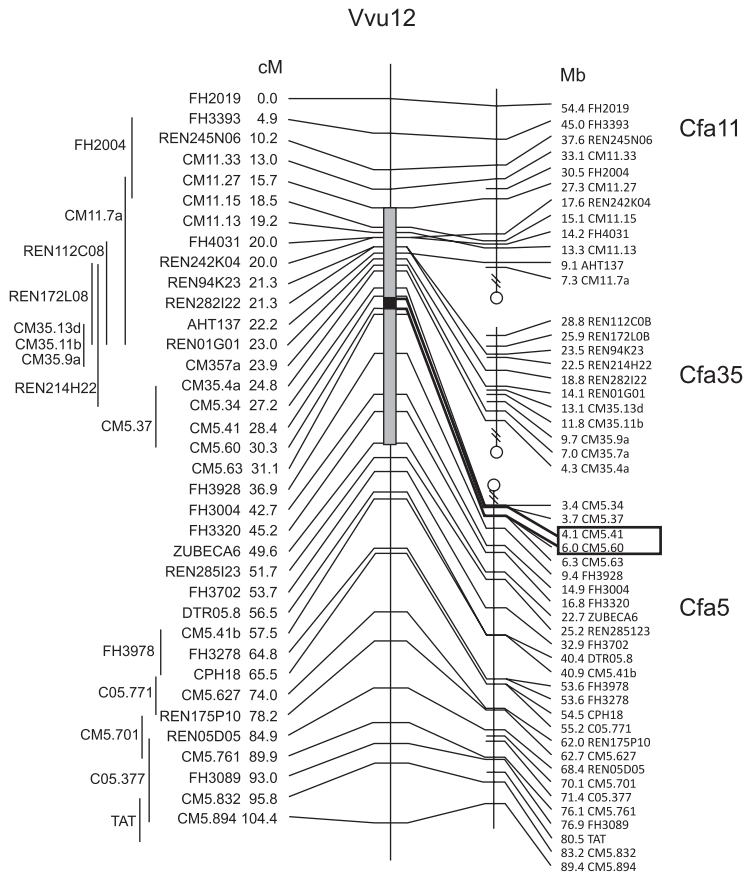


**Рис. 2.** Интервальное картирование двух первых главных компонент (ГК1 и ГК2) для поведения серебристо-черных лисиц на хромосоме 12 лисицы (VVU12).

а – объединенные данные для всех экспериментальных популяций лисиц (беккроссов на ручных родителей, беккроссов на агрессивных родителей и  $F_2$ ); б – данные для популяции беккроссов на ручных родителей. На вертикальной оси – F-статистика. На горизонтальной оси – расстояние на хромосоме в сантиморганах. Горизонтальные линии – соответствующее пороговое значение F для уровня значимости  $P < 0,01$  (из: Kukekova *et al.*, 2011).

возможно, что QTL для ГК2 на 12-й хромосоме в популяции беккроссов на ручного родителя отражает усиленную экспрессию ГК1.

Примечательно, что идентифицированный на 12-й хромосоме лисиц локус для ГК1 оказался гомологичным региону на 5-й хромосоме собак (рис. 3), который, как показано, был вовлечен в эволюционный переход волка в примитивную собаку (VonHoldt *et al.*, 2010). Эти факты указывают на то, что domestикационное поведение у собак и лисиц имеет сходную генетическую основу. Но что самое главное – они также подтверждают исходную идею эксперимента с лисицами, высказанную в свое время Д.К. Беляевым и состоящую в том, что ключевым фактором перехода дикого животного в домашнюю форму служит отбор животных по поведению, а именно – на толерантное (ручное) поведение по отношению к человеку (Belyaev, 1979).



**Рис. 3.** Мейотическая карта сцепления 12-й хромосомы лисицы (Vvu12; левая сторона рисунка), выравненная по нуклеотидной последовательности гомологичных хромосом собаки (Cfa11, Cfa35, Cfa5; правая сторона рисунка).

Данные и карта из: Kukekova *et al.*, 2011. По центру рисунка серый интервал, обозначающий границы для ГК1 у лисицы, и черный интервал – регион, гомологичный локусу CFA 5, вовлеченный в эволюционный переход волка в собаку (VonHoldt *et al.*, 2010).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом Минобрнауки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. Соглашение № 8474; Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология»; Программой Президиума РАН «Динамика и сохранение генофондов».

## ЛИТЕРАТУРА

- Беляев Д.К. Генетические аспекты domestikации животных // Проблемы domestikации животных и растений. М.: Наука, 1972. С. 39–45.
- Бузников Г.А. Нейротрансмиттеры в онтогенезе. М.: Наука, 1987. 232 с.
- Гербек Ю.Э., Гулевич Р.Г., Оськина И.Н., Плюснина И.З. Влияние материнской метилобогашенной диеты на экспрессию гена рецептора глюкокортикоидов в гиппокампе у крыс, селективируемых по поведению // Цитология и генетика. 2010. Т. 2. № 44. С. 108–113.
- Оськина И.Н., Гербек Ю.Э., Шихевич С.Г. и др. Изменение гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и иммунной систем при отборе животных на domestikационное поведение // Информ. вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 1/2. С. 39–49.

Трут Л.Н. Роль поведения в domestikационных преобразованиях животных (на примере серебристо-черных лисиц): Дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск: ИЦиГ СО АН СССР, 1980. 410 с.

Трут Л.Н. Домestikация животных в историческом процессе и в эксперименте // Информ. вестник ВОГиС. 2007. Т. 11. № 2. С. 273–289.

Трут Л.Н., Науменко Е.В., Беляев Д.К. Изменения гипофизарно-надпочечниковой функции серебристо-черных лисиц при селекции по поведению // Генетика. 1972. Т. 8. № 5. С. 35–43.

Трут Л.Н., Плюснина И.З., Оськина И.Н. Эксперимент по domestikации лисиц и дискуссионные вопросы эволюции собак // Генетика. 2004. Т. 40. № 6. С. 794–807.

Belyaev D.K. Domestication of animals // Sci. J. 1969. V. 5. P. 47–52.

Belyaev D.K. Destabilizing selection as a factor in domestication // J. Hered. 1979. V. 70. P. 301–308.

Cote F., Fligny C., Bayard E. *et al.* Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 329–334.

Graphodatsky A.S., Beklemisheva V.R., Dolf G. High-resolution GTG-banding patterns of dog and silver fox chromosomes: description and comparative analysis // Cytogenet. Cell Genet. 1995. V. 69. P. 226–231.

Gulevich R.G., Oskina I.N., Shikhevich S.G. *et al.* Effect of selection for behavior on pituitary-adrenal axis and proopiomelanocortin gene expression in silver foxes (*Vulpes vulpes*) // Physiol. Behav. 2004. V. 82. P. 513–518.

- Jackson J.E. A User's Guide to Principal Components. N.Y.: Wiley, 1991. P. 10–15.
- Kukekova A.V., Trut L.N., Chase K. *et al.* Mapping loci for fox domestication: deconstruction/reconstruction of a behavioral phenotype // *J. Behavior Genetics*. 2011a. V. 41. No. 4. P. 593–606.
- Kukekova A.V., Trut L.N., Oskina I.N. *et al.* A marker set for construction of a genetic map of the silver fox (*Vulpes vulpes*) // *J. Hered.* 2004. V. 95. No. 3. P. 185–194.
- Kukekova A.V., Trut L.N., Oskina I.N. *et al.* A meiotic linkage map of the silver fox, aligned and compared to the canine genome // *Genome Res.* 2007. V. 17. P. 387–399.
- Kukekova A.V., Trut L.N., Chase K. *et al.* Measurement of segregating behaviors in experimental silver fox pedigrees // *Behav. Genet.* 2008. V. 38. P. 185–194.
- Kukekova A.V., Johnson J.L., Teiling C. *et al.* Sequence comparison of prefrontal cortical brain transcriptome from a tame and an aggressive silver fox (*Vulpes vulpes*) // *BMC Genomics*. 2011b. 12:482 doi: 10.1186/1471-2164-12-482.
- Kukekova A.V., Temnykh S.V., Johnson J.L. *et al.* Genetics of behavior in the silver fox // *Mamm. Genome*. 2012. V. 23. No. 1/2. P. 164–177.
- Naumenko E.V., Belyaev D.K. Neuroendocrine mechanisms in animal domestication // *Problems in general genetics. Proc. XIV Intern. Cong Genet.* / Ed. D.K. Belyaev. M.: Mir, 1980. Book 2. P. 12–24.
- Popova N.K. From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system // *BioEssays*. 2006. V. 28. P. 495–503.
- Seaton G., Haley C.S., Knott S.A. *et al.* QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees // *Bioinformatics*. 2002. V. 18. No. 2. P. 339–340.
- Statham M.J., Trut L.N., Sacks B.N. *et al.* On the origin of a domesticated species: Identifying the parent population of Russian silver foxes (*Vulpes vulpes*) // *Biol. J. Linnean Soc.* 2011. V. 103. No. 1. P. 168–175.
- Trut L.N. The genetics and phenogenetics of domestic behavior // *Problems in General Genetics. Proc. of the XIV Intern. Congr. of Genetics* / Ed. D.K. Belyaev. 1980. Book 2. P. 123–137.
- Trut L.N. Early Canid domestication: The Farm Fox Experiment // *Amer. Sci.* 1999. V. 87. P. 160–169.
- Trut L., Oskina I., Kharlamova A. Animal evolution during domestication: the domesticated fox as a model // *BioEssays*. 2009. V. 31. No. 3. P. 349–360.
- Trut L.N., Oskina I.N., Kharlamova A.V. Experimental studies of early canid domestication // *The Genetic of the Dog* / Eds E.A. Ostrander, A. Ruvinsky. 2nd ed. CAB International. 2012. Ch. 2. P. 12–37.
- Von Holdt B.M., Pollinger J.P., Lohmueller K.E. *et al.* Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication // *Nature*. 2010. V. 8. No. 464(7290). P. 898–902.
- Yang F., O'Brien P.C., Milne B.S. *et al.* A complete comparative chromosome map for the dog, red fox, and human and its integration with canine genetic maps // *Genomics*. 1999. V. 62. No. 2. P. 189–202.

## FOX DOMESTICATION: MOLECULAR MECHANISMS INVOLVED IN SELECTION FOR BEHAVIOR

L.N. Trut<sup>1</sup>, Yu.E. Herbeck<sup>1</sup>, A.V. Kharlamova<sup>1</sup>, R.G. Gulevich<sup>1</sup>, A.V. Kukekova<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois, USA, e-mail: avk@illinois.edu

### Summary

Although animal domestication has enjoyed the attention of geneticists and evolutionary biologists since Darwin's times, the focal question about genetic basis of this process has not been duly considered. We have presented here some results of experimental modeling of historical domestication in silver foxes (*Vulpes vulpes*), one of the object of commercial breeding. Attention is focused on the role of artificial selection in the transformation of behavior of these animals, which has created the unique populations of tame and aggressive foxes. Additional resources were developed to analyze the molecular nature of differences in the behavior of these unique foxes: the meiotic map of the fox genome was constructed, crosses of tame and aggressive animals obtained informative segregating subpopulations, and the formerly applied method of quantification of behavioral phenotypes was improved. Integrated behavioral phenotypes (principal components PC1 and PC2) used in the study were obtained by analysis of ethological parameters recorded by a camcorder. The most important result is that the region most closely associated with tame behavior was identified on fox chromosome 12 by QTL interval mapping. The result is the more so significant that the region is similar to the region on canine chromosome 5 presumed to be responsible for early domestication of wolves and their evolutionary transformation to primitive dogs.

**Key words:** silver fox, experimental domestication, molecular-genetic analysis of behavior, destabilizing selection, segregating populations.



УДК 576.3:57.017.642:602.9

## ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА\*

© 2013 г. А.Г. Мензоров

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия;  
Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,  
Новосибирск, Россия, e-mail: menzorov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 6 марта 2013 г. Принята к публикации 17 марта 2013 г.

Рассмотрены современные представления об эмбриональных стволовых клетках мыши и человека. Обсуждаются предпосылки и методы их получения, стратегия доказательства плюрипотентности, проблемы при долговременном культивировании *in vitro*. Освещены некоторые проблемы биологии эмбриональных стволовых клеток и перспективы использования для клеточной терапии.

**Ключевые слова:** эмбриональные стволовые клетки, плюрипотентность.

### ВВЕДЕНИЕ

Клетки млекопитающих отличаются по способности к делению и дифференцировке. Тотипотентные клетки, такие, как зигота и бластомеры, способны дифференцироваться в экстраэмбриональные ткани и формировать эмбрион. На стадии бластоцисты потенциал клеток эмбриона уже ограничен, клетки трофобласта дадут экстраэмбриональные ткани, а клетки внутренней клеточной массы (ВКМ) – ткани эмбриона. Эмбриональные стволовые (ЭС) клетки получают из ВКМ бластоцисты. Как и клетки ВКМ, они обладают способностью к самообновлению и плюрипотентностью, т. е. потенциалом к дифференцировке в клетки, производные трех зародышевых листков: эктодермы, мезодермы и энтодермы, а также в клетки зародышевого пути. Долгое время считалось, что ЭС клетки не способны давать экстраэмбриональные производные, однако недавно было экспериментально показано, что в популяции ЭС клеток есть клетки, обладающие таким потенциалом (Macfarlan *et al.*, 2012). При развитии эмбриона потенциал к дифференцировке постепенно снижается. Следующий этап потери потенциала к дифференцировке после плюрипотентных ЭС

клеток – мультипотентные стволовые клетки, такие, как гемопоэтические. Гемопоэтические стволовые клетки способны дифференцироваться во все клеточные типы крови. Олигопотентные стволовые клетки, например миелоидные предшественники, могут дифференцироваться в несколько типов клеток. Унипотентные клетки, такие, как тучные клетки, – только в один. И, наконец, нуллипотентность соответствует терминальной дифференцировке.

Способность ЭС клеток мыши и человека к неограниченному делению в культуре и дифференцировке в производные трех зародышевых листков сделала их важным объектом для использования в качестве модели для изучения эмбрионального развития, генетических заболеваний и, говоря об ЭС клетках мыши, для получения трансгенных животных. ЭС клетки человека – один из перспективных источников клеточного материала для клеточной терапии различных заболеваний.

### НАЧАЛО: ТЕРАТОКАРЦИНОМЫ МЫШИ

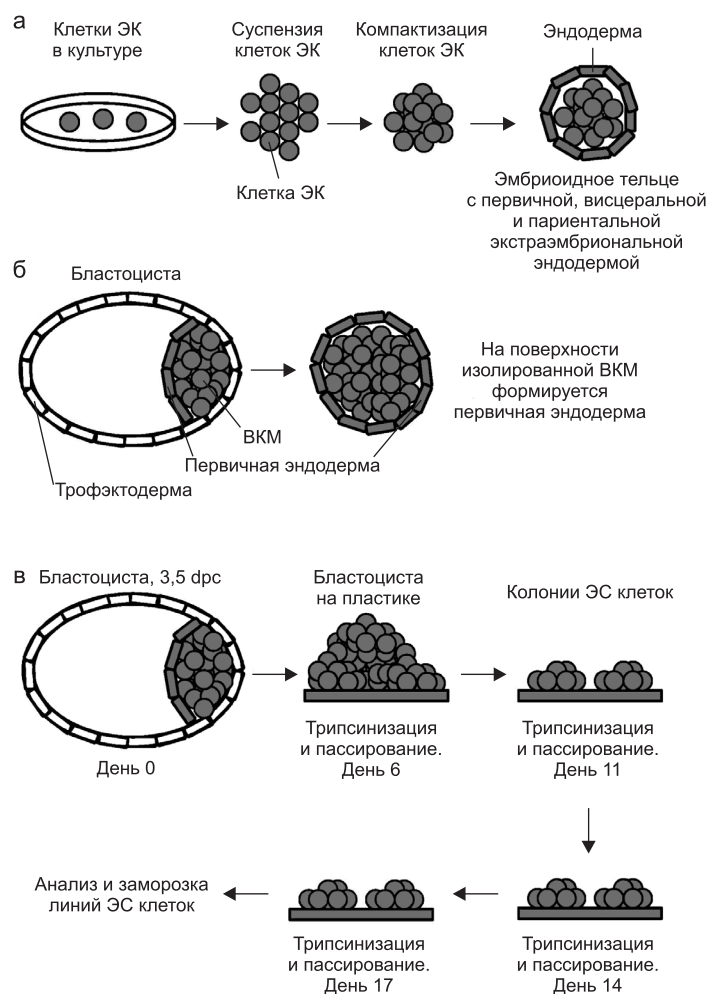
Тератокарцинома – это герминативная опухоль, состоящая из смеси дифференцированных и недифференцированных клеток. В 1954 г. было

\* Работа написана на основе доклада, прочитанного в ИЦиГ СО РАН ([http://www.bionet.nsc.ru/asp/?page\\_id=86](http://www.bionet.nsc.ru/asp/?page_id=86)).

показано, что из клеток эмбриональной тератокарциномы (ЭК) мышей линии 129 формируются как быстро дифференцирующиеся клетки, так и подобные им недифференцированные (Stevens, Little, 1954). Фактически это определение эмбриональных стволовых клеток, в котором отражена как способность к самообновлению, так и, частично, плюрипотентность. Клетки ЭК получают из спонтанных опухолей семенников мыши. Их основные характеристики *in vivo* – перевиваемость и способность индивидуальной клетки дать спектр дифференцированных тканей. Так как при получении клеток ЭК *in vitro* образуется мультиклональная популяция, возникает вопрос, действительно ли клетки ЭК дифференцируются в клеточные типы различных зародышевых листков, или же популяция клеток изначально гетерогенная и уже содержит различные клетки-предшественники. В 1972 г. было показано, что клоны, полученные из индивидуальных клеток ЭК, сохраняют способ-

ность к дифференцировке в разные типы клеток, т. е. дифференцировка действительно проходит *in vitro* (Evans, 1972). Следует отметить, что для сохранения плюрипотентности клеток ЭК Мартин Эванс использовал питающие (фидерные) клетки, облученные гамма-излучением фибробласты цыпленка. Оказалось, что выделяемые ими ростовые факторы необходимы для поддержания плюрипотентности.

Клетки ЭК в 1950–1970-е гг. стали уникальной системой для изучения дифференцировки плюрипотентных клеток *in vitro*. Дифференцировка клеток ЭК с образованием эмбрионных телец напоминает дифференцировку внутренней клеточной массы (ВКМ) нормального эмбриона (рис. 1, а, б). При этом в отличие от эмбриона *in vivo* их можно сравнительно легко изучать. Таким образом, можно считать, что клетки эмбриональной карциномы ведут себя в культуре, как клетки эмбриона в норме, но вне контекста (Martin, Evans, 1975).



**Рис. 1.** Культивирование плюрипотентных клеток мыши.

а – формирование эмбрионных телец при дифференцировке клеток ЭК; б – формирование эмбрионных телец при изолировании ВКМ (Evans, 2011, с модификациями); в – схема получения линий ЭС клеток (Vruja *et al.*, 2006, с модификациями).

Помимо дифференцировки *in vitro* в клетки, производные трех зародышевых листков, плюрипотентность клеток ЭК была показана с помощью формирования химерных мышей. После введения клеток ЭК в бластоцисту были получены мыши, имеющие потомков клеток ЭК в тканях, производных экто-, мезо- и энтодермы (Mintz, Illmensee, 1975; Papaioannou *et al.*, 1975). В отличие от клеток эмбриона практически все линии клеток ЭК имеют анеуплоидию и другие генетические и эпигенетические нарушения, поэтому они не вносят вклад в зародышевый путь, т. е. не проходят гаметогенез. Лишь некоторые линии клеток ЭК с околодиплоидным хромосомным составом способны формировать функциональные гаметы (Bradley *et al.*, 1984).

В 1978 г. был сделан еще один важный для характеристики клеток ЭК шаг – были получены моноклональные антитела на поверхностный антиген SSEA1 (stage-specific embryonic antigen 1, стадийспецифичный эмбриональный антиген 1) клеток ЭК линии F9 (Solter, Knowles, 1978). Оказалось, что SSEA1 можно использовать как для специфичной окраски клеток ЭК, так и для окраски ВКМ и зародышевых клеток мыши.

### ПОЛУЧЕНИЕ ЭС КЛЕТОК МЫШИ

К 1981 г. были разработаны методы культивирования клеток ЭК, в том числе с использованием питающих клеток, протоколы дифференцировки и найден поверхностный антиген SSEA1, позволяющий их идентифицировать. Кроме того, линия мышей 129 с высокой частотой образования спонтанных тератокарцином оказалась очень удачным выбором для получения ЭС клеток мыши. Так, позднее было показано, что только из трех линий мышей можно легко получить ЭС клетки: 129, C57BL и BALB (Hanna *et al.*, 2010b). С использованием этих достижений в 1981 г. две группы исследователей впервые получили эмбриональные стволовые клетки мыши. Эванс и Кауфман получили ЭС клетки путем высевания бластоцист на слой фидерных клеток (Evans, Kaufman, 1981). Мартин Гейл в том же году опубликовала метод получения ЭС клеток с помощью иммунохирургического выделения ВКМ (Martin, 1981). Этот метод не получил распространения, а предложенный Мартин термин

«эмбриональные стволовые клетки» до сих пор используется.

Основные принципы получения ЭС клеток мыши за более чем 30 лет изменились незначительно. Кратко один из современных протоколов представлен на рис. 1, в. Бластоцисты на стадии 3,5 дрс высаживают на слой фидерных клеток, эмбриональных фибробластов мыши, инактивированных митомицином С. Среда для культивирования содержит DMEM (минимальная необходимая среда, модификация Дульбекко), 20 % KSR (нокаутный заменитель сыворотки), NEAA (дополнительные аминокислоты), L-глутамин, антибиотики и LIF (фактор ингибирования лейкемии). Через 6 дней бластоцисту дезагрегируют трипсином до единичных клеток или конгломератов из нескольких клеток и пересаживают на фидерные клетки в среду с 20 %-й эмбриональной сывороткой. На следующий день среду снова меняют на содержащую KSR и клетки культивируют до появления колоний. Затем пассирование повторяют до получения достаточного количества клеток для заморозки и анализа, например, нескольких миллионов клеток. Морфологически колонии ЭС клеток мыши многослойные, с четкими краями, границ между клетками не видно, а клетки имеют большое ядерно-цитоплазматическое соотношение.

Эмбриональная сыворотка должна быть специально протестирована на способность поддерживать рост ЭС клеток. Сыворотка содержит множество ростовых факторов, большинство лотов сыворотки стимулируют дифференцировку ЭС клеток и, соответственно, непригодны для культивирования плюрипотентных клеток. KSR в отличие от сыворотки – синтетический заменитель сыворотки, который имеет известный и полностью контролируемый состав. Кроме того, KSR не поддерживает рост трофобластных стволовых клеток, которые могут контаминировать культуру ЭС клеток. Сыворотка в вышеописанном протоколе используется для инактивации трипсина и, возможно, дает некоторые необходимые для поддержания плюрипотентности факторы. Роль LIF заключается в блокировке дифференцировки ЭС клеток, показано, что в присутствии LIF можно получить ЭС клетки без фидерных клеток (Nichols *et al.*, 1990). Считается, что физиологическая

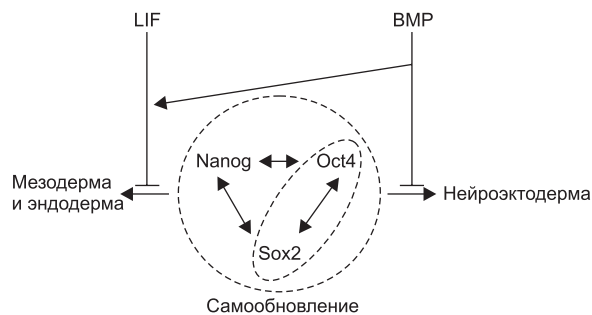


роль этого фактора – поддержание жизнеспособности клеток ВКМ в диапаузе.

### ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ ЭС КЛЕТОК МЫШИ

Плюрипотентность ЭС клеток обеспечивается ключевыми транскрипционными факторами – Oct4, Sox2 и Nanog. На рис. 2 представлена упрощенная схема сети генов, регулирующей плюрипотентность. Транскрипционный фактор Oct4 связывается с октамером 5'-ATTTGCAT-3', экспрессия этого фактора показана в плюрипотентных клетках и клетках зародышевого пути. Oct4 осуществляет регуляцию транскрипции как сам по себе, так и в комплексе с транскрипционным фактором Sox2. Транскрипционный фактор Nanog (Tír na nÓg (Тир на Ног) – в кельтской мифологии «остров юных», страна вечной молодости) экспрессируется в плюрипотентных клетках и обеспечивает самообновление ЭС клеток (Chambers *et al.*, 2003).

Транскрипционные факторы Oct4, Sox2 и Nanog представляют собой внутреннюю регуляторную сеть. Внешние сигналы, факторы LIF и BMP4 (костный морфогенный белок 4), связываются с рецепторами на поверхности клетки и активируют сигнальные пути JAK-Stat и MAPK. В результате LIF ингибирует дифференцировку в мезодерму и эндодерму, BMP4 – в нейроэктодерму, ЭС клетки остаются в недифференцированном состоянии. В целом самообновление ЭС клеток регулируют внешние и



**Рис. 2.** Поддержание плюрипотентности в ЭС клетках мыши (Friel *et al.*, 2005, с модификациями).

внутренние факторы. Изучение роли LIF и BMP4 в поддержании плюрипотентности в 2003 г. позволило исследователям *de novo* получить плюрипотентные ЭС клетки без использования сыворотки (Ying *et al.*, 2003). Авторы использовали среду, содержащую комплексные добавки В2 и N27, вместе с LIF и BMP4.

Плюрипотентность – это способность к самообновлению и дифференцировке. Для ЭС клеток мыши существуют методы дифференцировки *in vitro* и *in vivo*. Самый простой в лабораторных условиях метод оценки плюрипотентности – дифференцировка *in vitro*. В табл. 1 приведены основные способы дифференцировки *in vitro* с описанием достоинств и недостатков. В целом спонтанная дифференцировка в эмбрионидные тельца является аналогом эмбрионального развития. Использование сокультивирования со стромальными клетками позволяет осуществлять направленную диф-

**Таблица 1**

Методы дифференцировки ЭС клеток *in vitro* (Nishikawa *et al.*, 2007, с модификациями)

Характеристики	Методы		
	Эмбрионидные тельца	Сокультивирование	Использование матрикса
Тип дифференцировки	Аналог эмбрионального развития	Направленная дифференцировка	Направленная дифференцировка
Подбор условий культивирования	Просто	Просто	Сложно
Технические сложности	Просто	Культивирование стромальных клеток	Просто
Морфогенез	Возможен	Сложно	Сложно
Цена	Низкая	Средняя	Высокая
Сортировка клеток	Абсолютно необходима	Необходима	Часто не требуется
Лимитирующие факторы	Сортировка клеток	Сортировка клеток	Подбор условий культивирования

ференцировку. Стромальные клетки образуют поверхность, имитирующую нормальное клеточное окружение, кроме того, они выделяют различные сигнальные молекулы, которые могут стимулировать или ингибировать различные пути дифференцировки. Использование полимерного матрикса, которым покрывают дно пластиковых чашек, в некоторых случаях позволяет эффективно направлять дифференцировку (Nishikawa *et al.*, 2007). Для дифференцировки в различные типы клеток используют такие покрытия, как фибронектин, коллаген, поли-L-орнитин, поли-L-лизин, матригель, желатин и др. На сегодняшний день ЭС клетки удалось дифференцировать во множество типов клеток, таких, как адипоциты, остеобласты, астроциты, различные типы нейронов, гемопоэтические клетки, эндотелиальные, гепатоциты, кератиноциты, мышечные и др. (Wobus, Boheler, 2005). Совсем недавно из ЭС клеток были получены функциональные сперматозоиды и даже ооциты (Hayashi *et al.*, 2011, 2012).

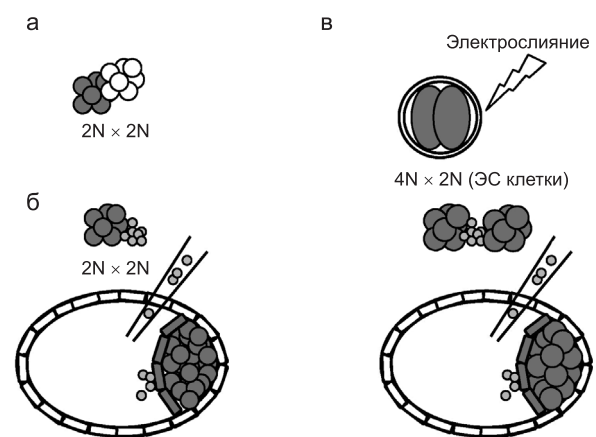
Дифференцировка *in vivo* включает в себя тесты на формирование тератом и получение химерных животных. Для получения тератом ЭС клетки вводят сингенным или иммунодефицитным мышам, например, подкожно в область загривка. Это приводит к образованию опухоли (тератомы) с тканями и даже органами, напоминающими нормальные производные трех зародышевых листков. Присутствие в тератомах молекулярных маркеров дифференцированных тканей и иммуногистохимический анализ позволяют делать вывод о плюрипотентности ЭС клеток в случае присутствия производных трех зародышевых листков.

Второе направление *in vivo* тестирования плюрипотентности – получение химерных животных (рис. 3). Наиболее простой способ – агрегация ЭС клеток с морулой с последующей подсадкой реципиентному животному (рис. 3, а). Можно также проводить агрегацию группы ЭС клеток с двумя морулами (метод «сэндвича»). Другой вариант – инъекция ЭС клеток в бластоцисту (рис. 3, б). Из-за удобства химеризм обычно оценивают по доле клеток донора в коже, т. е. по цвету шерсти. Линию реципиентных мышей выбирают так, чтобы окраска отличалась от линии донора. При этом химеры с незначительным вкладом клеток донора могут быть не

распознаны, а анализ на химеризм по тканям внутренних органов обычно не проводят из-за трудоемкости. Относительно недавно появился метод тетраплоидной комплементации (Nagy *et al.*, 1990, 1993). ЭС клетки агрегируют с тетраплоидными морулами или же вводят в бластоцисту тетраплоидной бластоцисты (рис. 3, в). Тетраплоидные клетки образуют экстраэмбриональные производные, а эмбрион формируется в основном из клеток донора, так как тетраплоидные клетки медленнее делятся и могут иметь ограниченный потенциал к дифференцировке. Так можно получить мышью, практически целиком состоящую из дифференцированных производных ЭС клеток. Прохождение ЭС клетками теста тетраплоидной комплементации можно считать наиболее сильным доказательством плюрипотентности.

### ПОЛУЧЕНИЕ ЭС КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Через 17 лет после получения ЭС клеток мыши в разделе «Краткие сообщения» журнала «Science» была опубликована первая статья по получению ЭС клеток человека (Thomson *et al.*, 1998). Для получения ЭС клеток группа Томсона использовала 14 эмбрионов на стадии дробления, которых культивировали до стадии



**Рис. 3.** Получение химерных мышей (Tam, Rossant, 2003, с модификациями).

а – агрегация двух восьмиклеточных эмбрионов; б – агрегация восьмиклеточного эмбриона с ЭС клетками или инъекция ЭС клеток в бластоцисту; в – тетраплоидная комплементация: агрегация тетраплоидного ( $4n$ ) восьмиклеточного эмбриона с диплоидными ( $2n$ ) ЭС клетками или инъекция диплоидных ЭС клеток в тетраплоидную бластоцисту.

бластоцисты. После иммунохирургического выделения клеток ВКМ и их дальнейшего культивирования удалось получить 5 линий ЭС клеток: Н1, Н13 и Н14 – (46, XY), Н7 и Н9 – (46, XX). Интересно, что эта же группа в 1995 г. получила ЭС клетки макаки-резуса, используя тот же протокол (Thomson *et al.*, 1995). Почему получение ЭС клеток приматов потребовало столько лет? Здесь можно сделать несколько предположений. Для культивирования ЭС клеток очень важны свойства сыворотки крови телят, одного из компонентов среды для культивирования. Некоторые лоты сыворотки могут поддерживать рост ЭС клеток в недифференцированном состоянии, однако большая часть стимулирует дифференцировку. В настоящее время для культивирования ЭС клеток человека используют синтетические заменители сыворотки с известным составом. Кроме того, оказалось, что техника культивирования ЭС клеток человека отличается от таковой для мыши. Клетки мыши при пересадке трипсином разбивают до одноклеточной суспензии, так как они обладают клоногенностью. Что касается человеческих ЭС клеток, они клоногенностью практически не обладают и гибнут при отсутствии клеточных контактов, если не применять, например, ингибитор ROCK киназы Y-27632 (Watanabe *et al.*, 2007). Кроме того, для поддержания ЭС клеток человека в недифференцированном состоянии не требуется LIF, зато необходим bFGF, основной фактор роста фибробластов. Таким образом, культивирование ЭС клеток человека существенно отличается от культивирования ЭС клеток мыши. И, возможно, самая большая сложность – получение разрешения этической комиссии на работу с человеческими эмбрионами требует времени. Таким образом, различия в свойствах ЭС клеток человека и мыши и более высокая требовательность ЭС клеток человека к условиям культивирования затруднили их получение.

### ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ ЭС КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Колонии ЭС клеток человека плоские, с достаточно четкими границами между клетками. Среди поверхностных маркеров можно выделить SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 и TRA-1-81

(Thomson *et al.*, 1998). Интересно, что в отличие от ЭС клеток мыши SSEA1 экспрессируется на поверхности ЭС клеток человека, уже начавших дифференцировку. Как и для ЭС клеток мыши регуляция плюрипотентности осуществляется ключевыми транскрипционными факторами Oct4, Sox2 и Nanog.

ЭС клетки человека дифференцируются при отсутствии в среде для культивирования bFGF. *In vitro* дифференцировка с образованием эмбрионидных телец путем сокультивирования или культивирования на матриксе также позволяет получить множество различных типов клеток (Wobus, Boheler, 2005). *In vivo* тест на плюрипотентность для ЭС клеток человека – образование тератом при введении иммунодефицитным мышам. Например, в работе Томсона в тератомах из потомков ЭС клеток человека было показано образование эпителия желудочно-кишечного тракта (энтодерма), кости, хряща, гладкой и поперечнополосатой мускулатуры (мезодерма), нейрального эпителия, эмбриональных ганглиев и эпителиальных клеток (эктодерма) (Thomson *et al.*, 1998). По понятным причинам тест на химеризм для человека недоступен.

### СРАВНЕНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ

Свойства ЭС клеток человека и мыши существенно различаются. В табл. 2 представлена их сравнительная характеристика. Оба клеточных типа позитивны по экспрессии щелочной фосфатазы, хотя в настоящее время этот маркер уже не считается специфичным только для плюрипотентных клеток. Другие поверхностные маркеры ЭС клеток различаются. Основные транскрипционные факторы, регулирующие плюрипотентность, совпадают, кроме того, активность теломеразы делает возможным самообновление и тех и других ЭС клеток. Существенные отличия видны в факторах, необходимых для поддержания плюрипотентности, например, для ЭС клеток мыши это LIF, а для человека – bFGF. Морфологически ЭС клетки человека и мыши отличаются, кроме того, без применения специальных факторов ЭС клетки человека практически не обладают клоноген-

**Таблица 2**  
Сравнительная характеристика  
ЭС клеток мыши и человека  
(Wobus, Boheler, 2005, с модификациями)

Характеристика	ЭС клетки мыши	ЭС клетки человека
SSEA-1	+	–
SSEA-3, SSEA-4	–	+
TRA-1-60, TRA-1-81	–	+
Щелочная фосфатаза	+	+
Oct4, Sox2, Nanog	+	+
Активность теломеразы	+	+
Факторы, необходимые для самообновления	LIF, BMP4, фидер*	bFGF, фидер*
Рост <i>in vitro</i>	Многослойные колонии	Плоские колонии
Эмбрионидные тельца	Простые и сложные	Простые
Дифференцировка	3 зародышевых листка и зародышевый путь	3 зародышевых листка и трофобласт
Формирование тератом	+	+
Статус X-хромосом	ХаХа	ХаХа/ХаXi

\* Не является необходимым.

ностью. Для ЭС клеток человека характерна спонтанная дифференцировка в клетки трофобласта, в то время как до недавнего времени считалось, что для ЭС клеток мыши такая дифференцировка нехарактерна, ее возможность была подтверждена лишь сравнительно недавно (Macfarlan *et al.*, 2012). ЭС клетки мыши могут дифференцироваться в гаметы, это было показано с помощью химерных животных и недавно – *in vitro* (Hayashi *et al.*, 2011, 2012). Для ЭС клеток человека дифференцировка в гаметы пока не получена. Еще одно отличие ЭС клеток мыши и человека – статус X-хромосом. Для ЭС клеток мыши не характерна инактивация X-хромосом, оба гомолога активны, в то время как в различных линиях ЭС клеток человека

или же среди клеток одной линии могут быть как Ха/Ха, так и Ха/Xi клетки.

Тот факт, что ЭС клетки мыши и человека имеют существенные различия, вызывает вопрос, а действительно ли ЭС клетки человека можно считать «настоящими» эмбриональными стволовыми? Следует отметить, что для мыши плюрипотентность помимо ЭС клеток показана для эпибластных стволовых клеток (эпиСК), выделяемых из эпибласта постимплантационного эмбриона, и для герминальных стволовых клеток (ГСК), получаемых из гонадного валика. Эти клеточные типы хотя и считаются плюрипотентными, но имеют ограниченный потенциал к дифференцировке. В табл. 3 приведено сравнение ЭС клеток и эпиСК. Было предложено называть ЭС клетки, полученные из ВКМ на «ранней» стадии плюрипотентности, «naïve», а более «поздние» эпиСК – «primed» (Hanna *et al.*, 2010b). ЭС клетки и эпиСК отличаются клоногенностью, по морфологии, способности давать химеры, активности ключевых транскрипционных факторов, статусу инактивации X-хромосом. Можно видеть, что

**Таблица 3**  
Сравнительная характеристика  
ЭС клеток и эпиСК  
(Hanna *et al.*, 2010b, с модификациями)

Характеристика	«Naïve» стволовые клетки	«Primed» стволовые клетки
Тип клеток	ЭС клетки, ГСК	ЭпиСК
Эмбриональные тельца	+	+
Тератомы	+	+
Химеры	+	–
Клоногенность	Высокая	Низкая
Время удвоения	10–14 ч	14–16 ч
Морфология колоний	Куполообразная	Уплющенная
SSEA-1, щелочная фосфатаза	+	+
Oct4, Sox2	+	+
Nanog, Klf2, Klf4, Rex1, Stella	Высокая++	Низкая/нет +/-
Статус X-хромосом	ХаХа	ХаXi



свойства эписК мыши и ЭС клеток человека во многом схожи. Это позволяет предположить, что ЭС клетки человека соответствуют «primed» плюрипотентности.

Говоря об ЭС клетках мыши, нужно отметить, что только от ограниченного числа линий мышей удастся получить «naïve» ЭС клетки, например из 129, C57BL и BALB. Для получения ЭС клеток из других линий мышей и других видов грызунов, например крысы, необходимо использовать дополнительные факторы, такие, как «2i», ингибиторы киназ GSK3b и ERK1/2 (Buehr *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008). Интересно, что условия культивирования позволяют манипулировать статусом плюрипотентности. Добавление 2i к эписК мыши позволяет перевести их в «naïve» состояние. Для ЭС клеток человека также удалось перевести их из «primed» состояния в «naïve» добавлением флорсколина и 2i, но только на несколько пассажей (Hanna *et al.*, 2010a).

Таким образом, ЭС клетки человека и мыши имеют достаточно существенные различия, связанные не только с различной биологией двух видов, но и со статусом плюрипотентности. С этим также связаны различия протоколов дифференцировки ЭС клеток и неприменимость многих данных, полученных на ЭС клетках мыши, для изучения человеческих ЭС клеток.

### ПРОБЛЕМЫ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ЭС КЛЕТОК *IN VITRO*

Культивирование *in vitro* приводит к различным эпигенетическим и генетическим нарушениям. Методом тетраплоидной комплементации были получены мыши, практически полностью происходящие из ЭС клеток (Nagy *et al.*, 1990, 1993). Часть рожденных особей имела различные нарушения, а при использовании ЭС клеток на поздних пассажах получить живых мышей не удавалось. Было сделано предположение, что при культивировании *in vitro* нарушается статус импринтированных генов. И действительно, изучение статуса импринтинга двух генов с материнской экспрессией (*Igf2r* и *H19*) и двух – с отцовской (*Igf2*, *U2af1-rs1*) выявило нарушение импринтинга как *in vitro* в ЭС клетках, так и у родившихся мышат (Dean *et al.*, 1998). Считается, что около 1 % генов млекопитающих

имеют монородительскую экспрессию, так что в условиях *in vitro*, когда импринтинг для выживания клеток не важен, создаются предпосылки для накопления эпигенетических аномалий.

Хромосомный состав ЭС клеток мыши также изменяется при культивировании. В 2006 г. был проведен масштабный цитогенетический анализ 540 линий ЭС клеток, доступных для исследователей в Японии (Sugawara *et al.*, 2006). Оказалось, что только 66,5 % линий имели диплоидный кариотип, т. е. 40 хромосом. Среди наиболее часто встречающихся аномалий хромосомного состава были трисомии по хромосомам 8 и 11. Это подтверждает ранее полученные данные о том, что трисомия по этим хромосомам увеличивает скорость роста ЭС клеток и, соответственно, такие клетки получают преимущество в культуре (Liu *et al.*, 1997). Следует отметить, что этот анализ был выполнен на доступных, т. е. уже охарактеризованных линиях клеток, а значит, линии с грубыми нарушениями кариотипа в него не попали. В то же время в одной из работ при получении ЭС клеток среди 15 линий было только две, имеющие более 50 % диплоидных клеток и не имеющие видимых перестроек (Nichols *et al.*, 1990). По нашим unpublished данным, только 21 из 32 линий ЭС клеток на ранних пассажах культивирования имели диплоидное модальное число хромосом. Кроме изменения числа хромосом, могут также возникать небольшие делеции и транслокации (Guo *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2008).

ЭС клетки человека имеют относительно стабильный статус импринтированных генов (Rugg-Gunn *et al.*, 2007). Для ЭС клеток человека так же, как и для мышинных, характерны присутствие и накопление различных хромосомных аномалий при культивировании. Помимо грубых нарушений, таких, как тетраплоидизация и трисомия, с помощью современных методов удалось показать нарушения также и на уровне небольших участков ДНК и отдельных нуклеотидов. Так, Лаурент с соавт. (Laurent *et al.*, 2011) исследовали изменение копийности различных генов в ЭС клетках человека в процессе культивирования. Было проведено полногеномное генотипирование 1140419 однонуклеотидных полиморфизмов в 69 линиях ЭС клеток человека (130 образцов), 11 линиях соматических стволовых клеток (11 образцов),

41 линии первичных клеток (41 образец) и в 20 типах тканей (67 образцов). Оказалось, что для ЭС клеток характерны дупликации участков хромосом 12, 17 и 20. Найдено 152 региона со значимым различием числа дупликаций между стволовыми клетками и соматическими, из них 18 высоко представлены в плюрипотентных клетках. Особо следует отметить то, что две из таких дупликаций находились рядом или включали гены *NANOG* (9 из 69 ЭС клеток) и характерную для ЭС клеток ДНК-метилтрансферазу *DNMT3B* (7 из 69 ЭС клеток). Следует отметить, что мутации, затрагивающие *DNMT3B*, наблюдаются во многих опухолях, так что склонность плюрипотентных клеток *in vitro* к их накоплению вызывает некоторые опасения. Таким образом, ЭС клетки человека имеют многочисленные хромосомные нарушения, которые невозможно выявить рутинным кариотипированием.

Как могут возникать хромосомные нарушения? Один из описанных механизмов для ЭС клеток человека – нарушение числа центросом, вызывающее анеуплоидию (Holubcová *et al.*, 2010). Интересное объяснение нестабильности кариотипа было предложено в работе Мантел с соавт. (Mantel *et al.*, 2007). Они показали, что при делении дифференцированной клетки необходимо прохождение точки контроля сборки веретена деления. Если число хромосом диплоидное, деление продолжается, а если возникла анеуплоидия – клетка уходит в апоптоз. В то же время плюрипотентные клетки проходят контрольную точку и независимо от результата продолжают деление. Такое поведение характерно для ЭС клеток как мыши, так и человека. В соответствии с этим механизмом при дифференцировке в эмбриональные тельца наблюдается апоптоз клеток, имеющих нарушения хромосомного состава.

### **ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИМЕНЕНИЕ ЭС КЛЕТОК МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА**

Есть два связанных направления использования ЭС клеток: трансгенез и клеточная терапия. Направленное изменение генома ЭС клеток позволяет включать и выключать выбранные гены, определять их функции и создавать модели заболеваний. Изменения, внесенные в ЭС клетки мыши, можно затем исследовать на ор-

ганизменном уровне, получив трансгенных животных. Дифференцировка ЭС клеток человека позволяет получить различные типы клеток, которые с некоторыми ограничениями могут быть использованы для клеточной терапии.

Для применения ЭС клеток необходимо их охарактеризовать. Первая стадия анализа – соответствие морфологии, затем – кариотипирование, ЭС клетки с анеуплоидным числом хромосом непригодны для большинства исследований. Следующий этап – анализ экспрессии генов. Оптимально проводить полногеномный анализ, но как более дешевый вариант можно использовать ОТ-ПЦР и иммуноцитохимический анализ на присутствие основных молекулярных маркеров ЭС клеток, таких, как Oct4, Sox2, Nanog и др. Желательно проверить статус метилирования импринтированных генов; нарушения импринтинга могут негативно сказаться на корректности последующей дифференцировки. Способность к дифференцировке проверяется *in vitro* с помощью образования эмбриональных телец, *in vivo* – получением тератом в иммунодефицитных мышах и созданием химерных животных, в том числе тетраплоидной комплементацией. По понятным причинам для ЭС клеток человека анализ дифференцировки ограничивается эмбриональными тельцами и тератомами. Для предсказания потенциала к дифференцировке ЭС клеток человека был разработан эффективный полуколичественный подход (Bock *et al.*, 2011). После дифференцировки ЭС клеток человека в эмбриональные тельца проводили анализ экспрессии 500 тканеспецифических генов. Сравнение с контрольными линиями ЭС клеток позволяет сделать прогноз о применимости линий плюрипотентных клеток для дифференцировки в производные экто-, эндо- и мезодермы. Таким образом, предложенный метод позволяет быстро и относительно дешево оценивать потенциал ЭС клеток человека.

Многие исследователи сталкиваются с невозможностью воспроизведения результатов экспериментов при использовании различных линий ЭС клеток. Как уже было сказано ранее, ЭС клетки только ограниченного числа линий мышей можно относительно легко получить *in vitro*. Подавляющее число исследований выполнено с использованием ЭС клеток, происходящих

от линии мышей 129, реже встречаются работы, выполненные на ЭС клетках генотипа C57BL. Для ЭС клеток человека была похожая ситуация. До недавнего времени большинство исследований проводили на трех линиях ЭС клеток, полученных Томсоном: H1, H7 и H9. Сейчас в мире создано много линий ЭС клеток, и исследователи уже не так ограничены в выборе. Фактически использование клеток только трех линий мышей или же трех линий ЭС клеток человека показывает, что большая часть сведений о биологии ЭС клеток как мыши, так и человека получена на основе анализа всего лишь трех генотипов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование ЭС клеток для клеточной терапии на модельных животных или человеке имеет ограничения. В терапии наследственных заболеваний человека это, прежде всего, иммунологическое отторжение чужеродного генетического материала. Кроме того, большинство протоколов дифференцировки в настоящее время не позволяет получить трехмерную структуру тканей и органов, ограничивая возможности применения ЭС клеток для клеточной терапии.

Недавние исследования позволили обойти проблему иммунологической несовместимости. Оказалось, что сверхэкспрессия нескольких ключевых для плюрипотентности ЭС клеток транскрипционных факторов позволяет индуцировать плюрипотентность в фибробластах мыши (Takahashi, Yamanaka, 2006). В дальнейшем были получены индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека и других видов (Медведев и др., 2011). То есть сейчас стало возможным получение пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, что позволяет после дифференцировки использовать для клеточной терапии клетки генотипа пациента. Недостаток этого метода – возможность сохранения недифференцированных клеток, которые могут дать опухоль, или же реактивации вирусов, использованных для получения плюрипотентных клеток с тем же результатом.

Относительная простота репрограммирования фибробластов в плюрипотентные клетки инициировала поиск подходов к прямому репро-

граммированию. В 2010 г. впервые были получены нейроны из фибробластов мышей, минуя промежуточный этап дедифференцировки в плюрипотентное состояние (Vierbuchen *et al.*, 2010). Этот метод в перспективе также позволит получать пациент-специфические клетки.

Таким образом, в настоящее время плюрипотентные стволовые клетки широко используются как для фундаментальных, так и для прикладных исследований. Данные, полученные при изучении ЭС клеток мыши и человека, создали основу для изучения и использования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и приблизили применение клеточной терапии человека.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 12-04-31345). Автор выражает благодарность Н.М. Матвеевой за ценные замечания к тексту статьи.

### ЛИТЕРАТУРА

- Медведев С.П., Шевченко А.И., Сухих Г.Т., Закиян С.М. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2011. 216 с.
- Bock C., Kiskinis E., Verstappen G. *et al.* Reference maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines // *Cell*. 2011. V. 144. No. 3. P. 439–452.
- Bradley A., Evans M., Kaufman M.H., Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines // *Nature*. 1984. V. 309(5965). P. 255–256.
- Bryja V., Bonilla S., Cajanek L. *et al.* An efficient method for the derivation of mouse embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2006. V. 24. No. 4. P. 844–849.
- Buehr M., Meek S., Blair K. *et al.* Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts // *Cell*. 2008. V. 135. No. 7. P. 1287–1298.
- Chambers I., Colby D., Robertson M. *et al.* Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells // *Cell*. 2003. V. 113. No. 5. P. 643–655.
- Dean W., Bowden L., Aitchison A. *et al.* Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell-derived mouse fetuses: association with aberrant phenotypes // *Development*. 1998. V. 125. No. 12. P. 2273–2282.
- Evans M.J. The isolation and properties of a clonal tissue culture strain of pluripotent mouse teratocarcinoma cells // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1972. V. 28. P. 163–196.
- Evans M. Discovering pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2011. V. 12. No. 10. P. 680–686.

- Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // *Nature*. 1981. V. 292. P. 154–156.
- Friel R., van der Sar S., Mee P.J. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signaling // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005. V. 57. No. 13. P. 1894–1903.
- Guo J., Jauch A., Heidi H.G. *et al.* Multicolor karyotype analyses of mouse embryonic stem cells // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 2005. V. 41. No. 8/9. P. 278–283.
- Hanna J., Cheng A.W., Saha K. *et al.* Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2010a. V. 107. P. 9222–9227.
- Hanna J.H., Saha K., Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues // *Cell*. 2010b. V. 143. No. 4. P. 508–525.
- Hayashi K., Ohta H., Kurimoto K. *et al.* Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells // *Cell*. 2011. V. 146. No. 4. P. 519–532.
- Hayashi K., Ogushi S., Kurimoto K. *et al.* Offspring from oocytes derived from *in vitro* primordial germ cell-like cells in mice // *Science*. 2012. [DOI:10.1126/science.1226889].
- Holubcová Z., Matula P., Sedláčková M. *et al.* Human embryonic stem cells suffer from centrosomal amplification // *Stem Cells*. 2011. V. 29. No. 1. P. 46–56.
- Laurent L.C., Ulitsky I., Slavin I. *et al.* Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture // *Cell. Stem. Cell*. 2011. V. 8. No. 1. P. 106–118.
- Li P., Tong C., Mehrian-Shai R. *et al.* Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts // *Cell*. 2008. V. 135. No. 7. P. 1299–1310.
- Liang Q., Conte N., Skarnes W.C., Bradley A. Extensive genomic copy number variation in embryonic stem cells // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. No. 45. P. 17453–17456.
- Liu X., Wu H., Loring J. *et al.* Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission // *Dev. Dyn.* 1997. V. 209. No. 1. P. 85–91.
- Macfarlan T.S., Gifford W.D., Driscoll S. *et al.* Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity // *Nature*. 2012. V. 487. No. 7405. P. 57–63.
- Mantel C., Guo Y., Lee M.R. *et al.* Checkpoint-apoptosis uncoupling in human and mouse embryonic stem cells: a source of karyotypic instability // *Blood*. 2007. V. 109. No. 10. P. 4518–4527.
- Martin G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1981. V. 78. P. 7634–7638.
- Martin G.R., Evans M.J. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies *in vitro* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1975. V. 72. P. 1441–1445.
- Mintz B., Illmensee K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1975. V. 72. P. 3585–3589.
- Nagy A., Gocza E., Diaz E.M. *et al.* Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse // *Development*. 1990. V. 110. No. 3. P. 815–821.
- Nagy A., Rossant J., Nagy R. *et al.* Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. No. 18. P. 8424–8428.
- Nichols J., Evans E.P., Smith A.G. Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity // *Development*. 1990. V. 110. No. 4. P. 1341–1348.
- Nishikawa S., Jakt L.M., Era T. Embryonic stem-cell culture as a tool for developmental cell biology // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2007. V. 8. No. 6. P. 502–507.
- Papaioannou V.E., McBurney M.W., Gardner R.L., Evans M.J. Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos // *Nature*. 1975. V. 258. P. 70–73.
- Rugg-Gunn P.J., Ferguson-Smith A.C., Pedersen R.A. Status of genomic imprinting in human embryonic stem cells as revealed by a large cohort of independently derived and maintained lines // *Hum. Mol. Genet.* 2007. V. 16. No. 2. P. 243–251.
- Solter D., Knowles B.B. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1) // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1978. V. 75. P. 5565–5569.
- Stevens L.C., Little C.C. Spontaneous testicular teratomas in an inbred strain of mice // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1954. V. 40. P. 1080–1087.
- Sugawara A., Goto K., Sotomaru Y. *et al.* Current status of chromosomal abnormalities in mouse embryonic stem cell lines used in Japan // *Comp. Med.* 2006. V. 56. No. 1. P. 31–34.
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. 2006. V. 126. No. 4. P. 663–676.
- Tam P.P., Rossant J. Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian development // *Development*. 2003. V. 130. No. 25. P. 6155–6163.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // *Science*. 1998. V. 282. No. 5391. P. 1145–1147.
- Thomson J.A., Kalishman J., Golos T.G. *et al.* Isolation of a primate embryonic stem cell line // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. No. 17. P. 7844–7848.
- Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z.P. *et al.* Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors // *Nature*. 2010. V. 463. No. 7284. P. 1035–1041.
- Watanabe K., Ueno M., Kamiya D. *et al.* A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol.* 2007. V. 25. No. 6. P. 681–686.
- Wobus A.M., Boheler K.R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy // *Physiol. Rev.* 2005. V. 85. No. 2. P. 635–678.
- Ying Q.L., Nichols J., Chambers I., Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3 // *Cell*. 2003. V. 115. No. 3. P. 281–292.



---

## MOUSE AND HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS

**A.G. Menzorov**

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia;  
Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia  
e-mail: menzorov@bionet.nsc.ru

### Summary

This mini review is focused on the current state in the field of mouse and human embryonic stem (ES) cell biology. Methods of ES cell derivation, pluripotency assessment and problems associated with long term cultivating *in vitro* are discussed. Attention is given to some unresolved questions of ES cell biology and prospects of ES cells in cell therapy.

**Key words:** embryonic stem cells, pluripotency.

УДК 615.277.3:577.213:575.111:575.26

## ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА УМЕРЕННЫХ ПОВТОРОВ В ГЕНОМЕ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МЫШЕЙ НА ФОНЕ ИНЪЕКЦИИ ЦИКЛОФОСФАНА И ЭКЗОГЕННОЙ ДНК ЧЕЛОВЕКА

© 2013 г. Е.В. Долгова<sup>1</sup>, А.В. Прокопенко<sup>1</sup>, В.П. Николин<sup>1</sup>, Н.А. Попова<sup>1,2</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>,  
Е.Р. Черных<sup>3</sup>, А.А. Останин<sup>3</sup>, С.С. Богачев<sup>1</sup>, Т.С. Гвоздева<sup>4</sup>, Е.М. Малкова<sup>5</sup>,  
О.С. Таранов<sup>5</sup>, В.А. Рогачев<sup>1</sup>, А.В. Панов<sup>6</sup>, С.Н. Загребельный<sup>2</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> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,  
Новосибирск, Россия;

<sup>3</sup> Институт клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, Россия;

<sup>4</sup> Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия;

<sup>5</sup> ГНЦ ВБ «Вектор», наукоград Кольцово, Новосибирская область, Россия;

<sup>6</sup> WellsStar College of Health and Human Services,  
Kennesaw State University, Kennesaw, Georgia, USA;

<sup>7</sup> ООО «Панаген», Горно-Алтайск, Россия

Поступила в редакцию 24 мая 2012 г. Принята к публикации 4 июня 2012 г.

Инъекции экзогенной ДНК в определенный промежуток времени после введения цитостатика циклофосфана (ЦФ) приводят к заболеванию и гибели экспериментальных мышей (Долгова и др., 2011). В ходе проведенных исследований установлено, что экзогенная ДНК активно проникает во внутренние компартменты клеток костного мозга (ККМ), где подвергается процессингу (Долгова и др., 2012). При этом именно ККМ в первую очередь подвержены деструктивному воздействию синергичного влияния двух препаратов (Долгова и др., 2013).

В настоящем исследовании показано, что количество умеренных повторов генома мононуклеаров костного мозга мышей, подверженных воздействию цитостатика ЦФ, достоверно ниже, чем у необработанных животных. Указанный феномен фиксируется в промежуток времени 18–24 ч после инъекции ЦФ, когда остановлена репликация, в момент конечной фазы репарации двуцепочечных разрывов (ДЦР), существующих как промежуточный интермедиат репарации межцепочечных сшивок (МЦС). При инъекциях экзогенной ДНК в промежуток времени 18–30 ч после предобработки ЦФ количество умеренных повторов сохраняется на исходном уровне. Совокупность полученных фактов предполагает, что фрагменты экзогенной ДНК принимают участие в процессе репарации ДЦР таким образом, что нарушается корректный ход репаративного процесса.

**Ключевые слова:** циклофосфан, экзогенная ДНК, межцепочечные сшивки, умеренные повторы генома, гомологичная рекомбинация.

### ВВЕДЕНИЕ

В предыдущих исследованиях было показано, что инъекции экзогенной ДНК в определенный промежуток времени после введения

цитостатика ЦФ приводят к заболеванию и гибели экспериментальных мышей (Долгова и др., 2011). При этом именно ККМ в первую очередь подвержены деструктивному воздействию синергичного влияния двух препаратов (Дол-

гова и др., 2013). Как было определено, одним из показателей, характеризующих воздействие ЦФ как монопрепарата, так и в сочетании с экзогенной ДНК, является количество умеренных *B1* и *B2* повторов в геноме ККМ, и в частности мононуклеарных клеток экспериментальных животных.

В настоящее время в мировой литературе существует множество подтверждений тому, что геном эукариотической клетки является динамичной структурой по отношению к количеству составляющих его нуклеотидов (последовательностей). В ходе эмбрио- и онтогенеза под воздействием внешних и внутренних факторов возникают множественные изменения, связанные с переключением групп генов, активностью транспозонов и др. Указанные события могут являться следствием изменения количества нуклеотидных последовательностей ДНК генома (Jack *et al.*, 1988; Taussig, 1988; Jahn, Klobutcher, 2002; Tower, 2004; Wang *et al.*, 2004; Hancock, 2005; Lansdorp, 2005; Moore, Purugganan, 2005; Смирнов, 2007; Kotnis *et al.*, 2008; Tseng *et al.*, 2008).

Репарация различных повреждений ДНК, возникших как в процессе жизнедеятельности клетки, так и в результате внешнего воздействия, также является одним из механизмов, который может влиять на изменение количества генетического материала, контекстного содержания генома, структуры хроматина и активности хромосомы в целом. Частным случаем количественного изменения нуклеотидного содержания генома является изменение числа tandemно повторенных последовательностей (Pâques *et al.*, 1998).

В мировой литературе существует множество данных о том, что районы tandemно повторенных последовательностей часто подвергаются перестройкам в ходе рекомбинационных процессов, происходящих в клетке при репарации различного рода повреждений ДНК (Pâques *et al.*, 1998; Jurka *et al.*, 2005; Lansdorp, 2005; Kobayashi, 2008). Одним из факторов, приводящих в действие репаративную машину клетки, является алкилирующий цитостатик ЦФ, который формирует МЦС, представляющие смертельную опасность для эукариотической клетки (Abrams *et al.*, 1981; Fleming, 1997; Mazur, Czyzewska, 2001; Salem *et al.*, 2010). В первую

очередь воздействие ЦФ приводит к остановке репликации (Akkari *et al.*, 2000; Le Breton *et al.*, 2011) и, как следствие, к недорепликации определенного количества геномных последовательностей. Таким образом, если остановка репликации произошла в начальный период синтеза, то недореплицированным остается значительная часть генома. Соотношение количества определенных последовательностей генетического материала клетки в этот момент времени будет отличаться от такового после завершения S-фазы клеточного цикла.

Если в момент репарации МЦС в ядре присутствует экзогенная ДНК, то она может стать непосредственным участником репаративного процесса (Лихачева и др., 2008). В первую очередь, вовлечение экзогенной ДНК в процесс репарации может приводить к различным структурным изменениям генома эукариотической клетки (Likhacheva *et al.*, 2007; Yakubov *et al.*, 2007). Кроме этого, фрагменты экзогенной ДНК, по-видимому, могут активировать своими двуцепочечными (ДЦ) концами аварийные лигазы клетки, что, в свою очередь, может привести к несанкционированному объединению ДЦ-концов, существующих как интермедиаты репарации МЦС. В этом случае физическая, но не функциональная целостность хроматина будет восстановлена, S-фаза клеточного цикла завершится, количество ДНК удвоится и соотношение последовательностей генома будет соответствовать соотношению, существующему до репликации.

В настоящем исследовании описывается феномен уменьшения количества *B1* и *B2* повторов в ККМ мышей, находящихся под воздействием ЦФ в промежутке времени 18–24 ч после введения цитостатика. Одновременно с этим даются экспериментальные доказательства того, что количество указанных типов повторов в ККМ не изменяется при инъекциях экзогенной ДНК мышам в промежуток времени 18–30 ч после введения ЦФ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Приготовление зондов

*Alu* повтор (AC002400.1, 53494-53767, состоит из конечной и начальной части двух тан-

демно расположенных повторов: *AluJ* и *AluY*) нарабатывали с помощью ПЦР, используя в качестве матрицы геномную ДНК человека. Были подобраны специфические для человеческого генома праймеры: **Pr.9:** CGAGG CGGGA GGATC ACTTG AGCCC; **Pr.11:** GCGCG CGCCA CCACG CCCGGC.

Реакцию проводили в 100 мкл: 1×Taq буфер (10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,3 мкг ДНК-матрицы; по 10 пмоль праймеров; 0,2 mM dNTPs; 5 ед. Taq-полимеразы. Для амплификации использовался следующий температурный режим: 94 °C – 2 мин – 1 цикл (94 °C – 30 с, 72 °C – 1,5 мин) – 35 циклов, 4 °C – хранение.

*B1* и *B2* повторы нарабатывали ПЦР с матрицы мышинной ДНК и выделяли из агарозного геля электроэлюцией.

Подобранные специфические праймеры для *B1* повтора: **Pr.3:** CCGGG CATGG TGGTG CATGCCT; **Pr.4:** TTCTCTGTAGCCCTGGTGTC CTGGA. Специфические праймеры для *B2* повтора: **B2 for:** GGTTG TGAGC CACCA TGT; **B2 rev:** GGGGC TGGAG AGATG GCT (Serdobova, Kramerov, 1998).

Для амплификации специфических фрагментов мышинного генома использовался следующий температурный режим: 94 °C – 2 мин – 1 цикл (94 °C – 30 с, T<sub>0</sub> °C – 40 с, 72 °C – 30 с) – 35 циклов, 10 °C – хранение. Для *B1* повтора T<sub>0</sub> = 68 °C, для *B2* повтора T<sub>0</sub> = 62 °C. Затем при помощи набора для клонирования ампликонов в векторе с тупыми концами повторы встраивали в плазмиду pBluescript II. После проведенной трансформации электрокомпетентных клеток XL1-Blue MRF' клетки высевались на чашку, содержащую ампициллин, X-Gal, IPTG, белые колонии отбирались и наращивались в 3 мл ночной культуры. Плазида из клеток выделялась при помощи лизиса кипячением по методике, описанной в статье Маниатис с соавт. (1984). ДНК клонов была наработана в препаративном количестве. После определения нуклеотидной последовательности были отобраны клоны, ДНК которых использовалась в последующих экспериментах.

Последовательность *B1* повтора:

**CCGGGCATGGTGGTGCATGCCTTTAATC**  
**CCAGCACTCGGGAGGCAGAGGCAGACGG**  
**ATTCTGAGTTCCAGGACAGCCTGGTCTAC**

**AAAGTGAGTTCCAGGACACCAGGGCTA**  
**CAGAGAA.**

Последовательность *B2* повтора:

**GGTTGTGACCACCATGTGGTTGCTGGGA**  
**ATTGAACTCAGGACCTCTGGAAGAGCAGT**  
**CAGTGCTCTTACCGCTGAGCCATCTCTCC**  
**AGCCCC.**

Мечение *B1* повтора <sup>32</sup>P-dATP проводили при помощи ПЦР-амплификации. Реакционная смесь содержала 1×Taq буфер; 0,1 мкг плазмиды pBSII со встроенным повтором; по 10 пмоль праймеров M13 forward и M13 reverse; 0,05 mM dGTP, dCTP, dTTP; 0,025 mM dATP; 1,3 МБк <sup>32</sup>P-dATP; 5 ед. Taq-полимеразы. Температурный режим: 95 °C – 2 мин – 1 цикл (95 °C – 30 с, 56 °C – 40 с, 72 °C – 1 мин) – 35 циклов; 72 °C – 5 мин – 1 цикл, хранение при 10 °C.

#### Выделение ДНК из ядер ККМ экспериментальных мышей

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

#### Количественная дот-блот-гибридизация

ДНК, выделенную из ядер ККМ экспериментальных и контрольных мышей, в количестве от 0,1 до 5000 нг денатурировали кипячением в 0,4 N NaOH и наносили на мембрану Zeta-Probe Genomic Tested Blotting Membrane (Bio-Rad). Предварительно данная ДНК была обработана



панкреатической РНКазой 10 мкг/мл в течение 30 мин при 37 °С и депротеинизирована экстракцией фенол/хлороформ в соотношении 1 : 1. ДНК пересаждали при помощи добавления 0,1 объема 3 М NaAc, pH 5,2 и 0,6 объема изопропанола. Концентрация ДНК была измерена на спектрофотометре Nanodrop. Мембранные фильтры гибридизовали с <sup>32</sup>P меченой ДНК в 0,25 М фосфатно-солевом буфере, pH 7,2, 7 % SDS в течение 12 ч при 65 °С. Мембрану дважды отмывали по 30 мин сначала в 0,02 М фосфатно-солевом буфере, 5 % SDS при 68 °С, затем в 0,02 М фосфатно-солевом буфере 1 % SDS. Мембранные фильтры экспонировали с рентгеновской пленкой или проводили засветку на Molecular Imager FX Pro+ (Bio-Rad). Количество меченого материала относительно контролей определяли при помощи программы Quantity One.

### Выделение мононуклеаров из ККМ

ККМ мышей вымывали из трубчатых костей физиологическим раствором (0,9 % NaCl), тщательно ресуспендировали. Суспензию аккуратно наслаивали на 3 мл смеси фикола-урографина (15 % урографин, 7 % фикола, ρ1.119), центрифугировали при 1500 об/мин в течение 30 мин при 4 °С. После центрифугирования вся клеточная масса разделялась на клетки, составляющие интерфазное кольцо (мононуклеары) и осадок.

Мононуклеары отбирали в новую пробирку, добавляли физиологический раствор до 4 мл и осаждали центрифугированием при 1200 об/мин в течение 5 мин при 4 °С. К осадку клеток добавляли 0,5 мл лизирующего буфера (10 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 50 мМ NaCl, 10 мМ ЭДТА, 0,15 мМ спермин, 0,15 мМ спермидин), содержащего 1 % Тритон X-100 (Roberts, 1986). Смесь центрифугировали при 1400 об/мин в течение 5 мин при 4 °С. Осадок обрабатывали протеиназой К и депротеинизировали экстракцией фенол/хлороформ в соотношении 1 : 1. Верхнюю фракцию аккуратно отбирали пипеткой в новую пробирку. ДНК пересаждали при помощи добавления 0,1 объема 3 М NaAc, pH 5,2 и 0,6 объема изопропанола. Осадок промывали 200 мкл 70 % этилового спирта и растворяли в небольшом объеме воды.

### Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) анализ

Праймер для анализа мышинной ДНК: **P29**: CCGGC CTTAC (Бутовская и др., 2009).

Реакционная смесь содержала: 1×Taq буфер, 0,1 мкг ДНК-матрицы; 0,4 мкМ праймера; 0,1 мМ dNTPs; 1 ед. Taq-полимеразы. Температурный режим: 95 °С – 2 мин – 1 цикл (95 °С – 30 с, 38 °С – 40 с, 72 °С – 1 мин) – 30 циклов; 72 °С – 5 мин – 1 цикл, хранение при 4 °С.

При проведении ПЦР аналогичным образом с использованием единичного специфического праймера на умеренный мышинный *B1* повтор (Рг. 3) изменяли только температуру отжига праймера (68 °С).

### Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных о количестве меченого материала относительно контролей в проведенных экспериментах по совместному введению ЦФ и экзогенной ДНК проводилась при помощи инструментов программы Microsoft Excel. На рисунках показаны стандартные отклонения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Характеристика изменения количества последовательностей, гомологичных *B1* повтору мышинного генома, в хроматине мононуклеарной фракции ККМ мышей, обработанных ЦФ или сочетанием ЦФ и экзогенной ДНК

В ранних работах при исследовании лейкостимулирующей активности инъекций препаратов экзогенной ДНК на фоне действия цитостатика ЦФ в группе экспериментальных животных была отмечена массовая гибель мышей, достигавшая 80 % (Likhacheva *et al.*, 2007). Оказалось, что в наибольшей степени инъекции двух препаратов воздействуют на систему ККМ (Долгова и др., 2012, 2013).

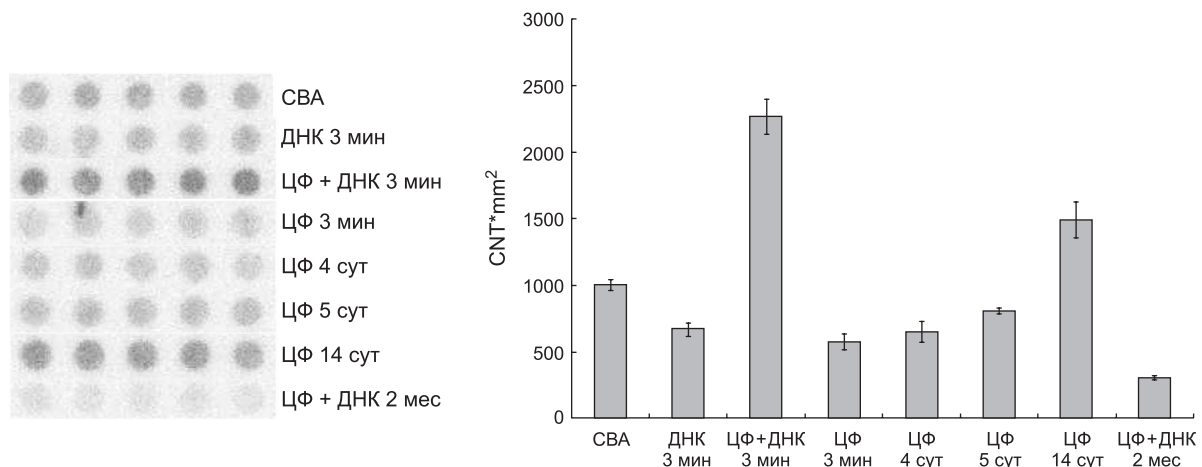
В первоначальных экспериментах предполагалось провести количественную оценку достигаемой в ККМ экзогенной ДНК. Для этого была проведена серия дот-блот гибридизаций с геномной ДНК, выделенной из ядер ККМ

экспериментальных мышей (ЦФ 200 мг/кг; ЦФ и ДНК человека 18–30 ч, каждый час по 0,5 мг) с использованием в качестве зонда ДНК  $^{32}\text{P}$  меченого *Alu* повтора человека. *Alu* повтор был выбран по причине того, что эта последовательность была использована в экспериментах начального этапа исследований, где было показано присутствие фрагментов ДНК человека во фракции геномной ДНК экспериментальных мышей (Likhacheva *et al.*, 2007). В результате проведенных экспериментов было замечено, что интенсивность гибридационного сигнала в образцах, выделенных после инъекций мышам ЦФ в виде монопрепарата, значительно варьируется в зависимости от времени, а также отличается от сигнала гибридизации *Alu* повтора с ДНК из ККМ интактных мышей. Одновременно с этим также наблюдались видимые изменения в интенсивности сигнала гибридизации в образцах геномной ДНК, выделенных из ККМ мышей, обработанных ЦФ и экзогенной ДНК (рис. 1).

Геном многих эукариот содержит повторенные последовательности длиной 80–400 п.н. – SINE-элементы (Short Interspersed Elements) или короткие ретротранспозоны, названные так за их способ распространяться по геному с помощью ретротранспозиции – процесса, включающего в себя обратную транскрипцию РНК с последующей интеграцией в геном. Для мышинного генома на настоящий момент опи-

сано порядка 8 различных семейств SINE (Kramerov, Vassetzky, 2005). Одними из первых были открыты семейства *B1* и *B2* элементов (Krayev *et al.*, 1980; Vassetzky *et al.*, 2003), представляющие собой небольшие последовательности длиной около 140 и 200 п.н. и составляющие 2 и 0,8 % от общего генома мыши соответственно.

Многочисленные блот-гибридизации, выполненные в предыдущих исследованиях, свидетельствовали о том, что между *Alu* повтором человека и геномной ДНК мыши существует перекрестная гомология, выявляемая в предельно жестких условиях гибридизации и отмывки. При этом зона гомологичной перекрестной гибридизации визуализировалась как размазанное облако, захватывающее всю длину пробега геномной ДНК мыши (Likhacheva *et al.*, 2007). Это является следствием того, что в геноме мыши присутствуют умеренно повторяющиеся последовательности, перекрестно гибридизующиеся с человеческим *Alu* повтором (Vassetzky *et al.*, 2003). Было сделано предположение, что отмечаемая разница в интенсивности гибридационного сигнала в образцах геномной ДНК, выделенной из ККМ мышей, обработанных ЦФ и экзогенной ДНК, связана не столько с присутствием человеческой ДНК в ККМ, сколько с количественными изменениями в гомологичных *Alu* повтору повторяющихся последовательностях ДНК генома мыши.



**Рис. 1.** Гибридизация дот-блота с ДНК  $^{32}\text{P}$  меченого *Alu* повтора человека.

Слева – картина засветки мембраны с нанесенными образцами ДНК (по 0,5 мкг в каждой точке), выделенной из ядер ККМ экспериментальных мышей через различные промежутки времени после инъекции ЦФ в виде монопрепарата или в сочетании с инъекциями экзогенной ДНК человека. Справа – количественная оценка силы гибридационного сигнала, проведенная при помощи программы Quantity One.

Известно, что в момент созревания предшественников лимфоцитов разных классов происходит соматическая рекомбинация. Данный процесс мог быть причиной выявляемого при дот-гибридизации изменения количества повторов в геноме определенной популяции клеток (Farzaneh *et al.*, 1982; Johnstone, Williams, 1982; Vatolin *et al.*, 1997). Также известно, что обработка ЦФ приводит к изменению соотношения клеток-предшественников в костном мозге. ЦФ практически не влияет на супрессию моноклеарной фракции костного мозга, из которой развиваются лимфоциты и антигенпрезентирующие клетки: макрофаги и дендритные клетки (Salem *et al.*, 2010). Таким образом, чтобы обогатить фракцию ККМ популяцией клеток, с наибольшей вероятностью отвечающей на проводимые обработки, из общего пула ККМ была выделена моноклеарная фракция.

Первоначально для сравнительной оценки интенсивности и динамики гибридизации неспецифического *Alu* и специфического *B1* зондов была проведена серия сравнительных гибридизаций с геномной ДНК экспериментальных мышей. В условиях жесткой гибридизации, как описано в «Материалах и методах», оказалось, что *B1* повтор не имеет перекрестной гибридизации ни с *Alu* повтором, ни с суммарной ДНК человека. Благодаря этому в данном случае можно было оценить изменение количества именно

*B1* повтора вне зависимости от присутствия во фракции геномной ДНК последовательностей экзогенного происхождения.

Как видно из рис. 1 и 2, существует выраженная корреляция между интенсивностью гибридизации обоих зондов. Интенсивность сигнала гибридизации, определяемая в анализируемое время после инъекции ЦФ, меняется сходным образом. Это связано, как было сказано выше, с частичной гомологией *Alu* последовательности с повторяющимися последовательностями генома мыши, которые так же как и последовательность *B1* повтора, изменяются количественно.

Выбор *B1* повтора мыши, не гибридизующегося в используемых условиях с человеческой геномной ДНК, в качестве зонда для гибридизации позволил провести серию количественных дот-блот гибридизаций, отражающих молекулярные события в геноме, происходящие в процессе репарации ДЦР. При использовании выбранного зонда была оценена динамика изменения количества последовательностей, гомологичных *B1* повтору в геноме ККМ мышей, обработанных ЦФ как монопрепаратом, так и сочетанием ЦФ и экзогенной ДНК.

Экспериментальным мышам вводили ЦФ в дозе 200 мг/кг, затем через каждые 2 ч вплоть до 28 ч из бедренных костей мышей вымывали ККМ и отделяли фракцию моноклеаров. Так-

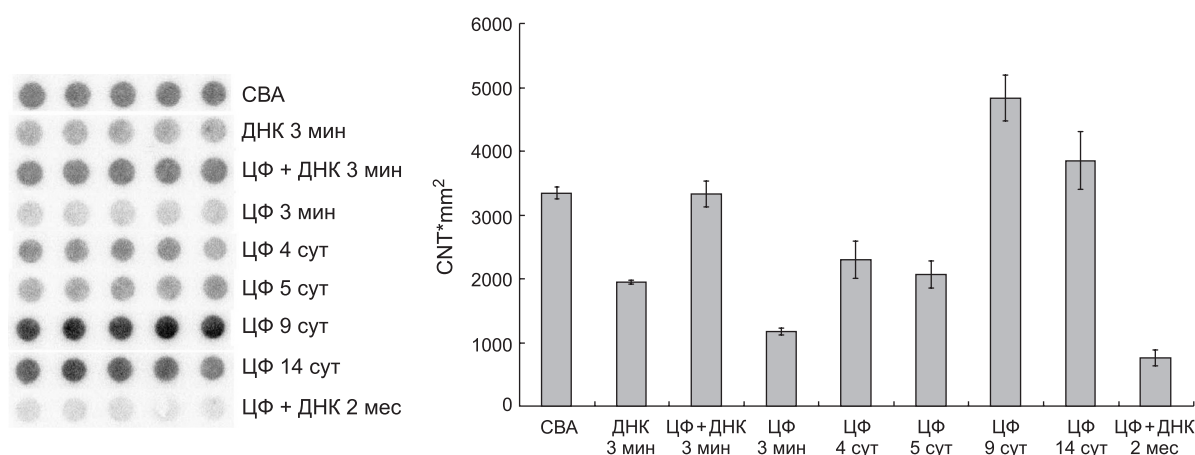
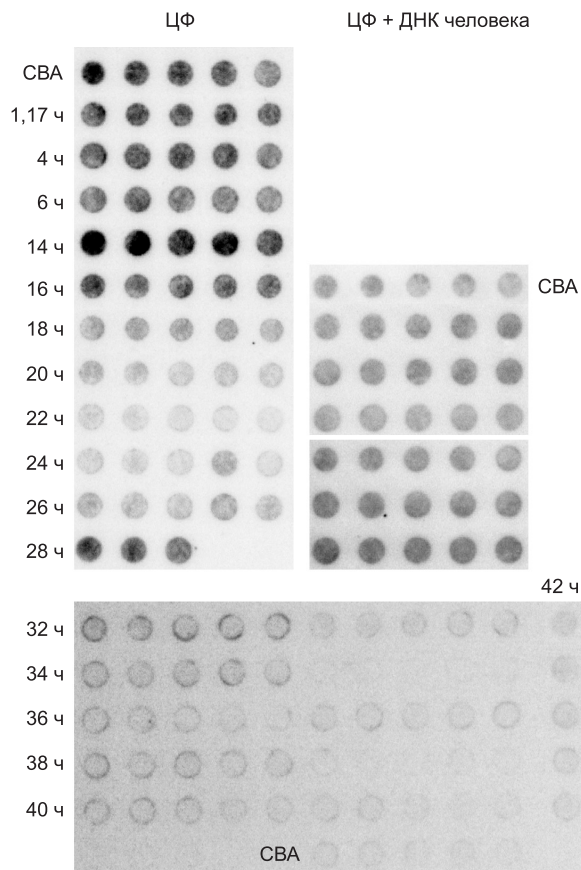


Рис. 2. Гибридизация дот-блота с ДНК  $^{32}\text{P}$  меченого *B1* повтора мыши.

Слева – картина засветки мембраны с нанесенными образцами ДНК (по 0,5 мкг в каждой точке), выделенной из ядер ККМ экспериментальных мышей через различные промежутки времени после инъекции ЦФ в виде монопрепарата или в сочетании с инъекциями экзогенной ДНК человека. Справа – количественная оценка силы гибридизационного сигнала, проведенная при помощи программы Quantity One.

же в экспериментах была представлена группа мышей, которым вводили человеческую ДНК по схеме: 18–30 ч после инъекции ЦФ, каждый час по 0,5 мг. Из клеток мононуклеарной фракции выделяли ядра и геномную ДНК. ДНК очищали от белков и РНК и измеряли концентрацию. Образцы нормировались по количеству ДНК и использовались для проведения дот-блот гибридизаций с меченной радиоактивным фосфором ДНК *B1* повтора. На рис. 3 и в табл. 1 представлены результаты проведенных гибридизаций, которые сведены в графике (рис. 4).

Анализ графика изменения количества *B1* повторов в геноме мышей, находящихся под воздействием ЦФ как монопрепарата, а также



**Рис. 3.** Дот-блот гибридизация с ДНК  $^{32}\text{P}$  меченого *B1* повтора мыши.

На мембраны в каждой точке нанесено по 0,1 мкг ДНК, выделенной из ядер мононуклеаров экспериментальных мышей через различные промежутки времени после инъекции ЦФ (200 мг/кг) в виде монопрепарата и ЦФ в комбинации с введением ДНК человека по 0,5 мг в промежуток времени 18–30 ч после ЦФ каждый час, а также ДНК интактной мыши СВА.

под воздействием ЦФ и экзогенной ДНК, свидетельствует о следующем. Начиная с 16 ч после введения цитостатика происходит достоверное уменьшение количества умеренного *B1* повтора в геноме анализируемых клеток, которое сохраняется до 25 ч после введения ЦФ. Через 26 ч после введения цитостатика количество последовательностей ДНК, гомологичных *B1* повтору, восстанавливается до исходного уровня. Инъекции человеческой ДНК в промежуток времени 18–30 ч после ЦФ способствуют сохранению количества повторов в геноме клеток мононуклеарной фракции ККМ.

Было интересно проследить, как ведет себя анализируемый признак в отдаленном времени после введения цитостатика. На графике (рис. 2) прослеживается динамика восстановления количества повторяющейся ДНК, гомологичной *B1* повтору, в геноме экспериментальных мышей к 4–5-м суткам после обработки цитостатиком. Подтверждается снижение количества последовательностей генома, гомологичных *B1* повтору, продемонстрированное в ранних экспериментах и суммированное на графике (рис. 4) в точке 24 ч после введения ЦФ. По мере удаления от точки начала отсчета происходит не только восстановление, но и полуторакратное увеличение количества гомологичных повтору *B1* последовательностей в геноме мононуклеарной фракции ККМ.

### Характеристика изменения количества последовательностей, гомологичных *B2* повтору мышинного генома, в хроматине ККМ мышей, обработанных ЦФ или сочетанием ЦФ и экзогенной ДНК

Обнаруженные изменения в количестве умеренного повтора генома мыши *B1* и отмеченные характеристики неспецифической гибридизации с *Alu* повтором генома человека, имеющего перекрестную гомологию с геномом мыши, свидетельствовали о следующем. По-видимому, обнаруженные в указанных экспериментальных условиях изменения в количестве *B1* повтора характеризуют общую закономерность динамики количества умеренных повторов генома мыши. Для оценки правомерности высказанного предположения был выбран другой зонд, а именно *B2* повтор, также относящийся к умеренно по-



Таблица 1

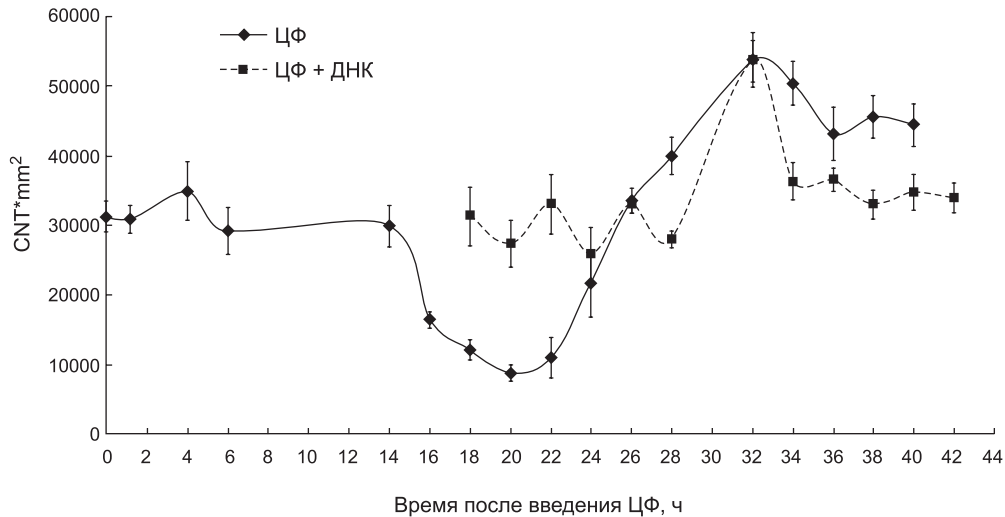
Относительная интенсивность гибридизации проб ДНК,  
выделенной из ядер мононуклеаров

Время, ч	Номера гибридизационных проб, выполненных в каждой экспериментальной точке (слева направо)					Среднее значение
	1	2	3	4	5	
ЦФ						
0	33729,2	33554,6	32561,1	35049,2	25552,4	31276
1,17	33952,5	32297,8	29645	30694,7	27994,4	30917
4	36147,4	37131,2	38516,9	36445,8	26599,7	34968
6	29539,6	34872,4	29138,4	28713	23951	29243
14	35815,7	27270,6	29434	29161,4	28126,7	29962
16	16691,9	17211,2	17291,3	16952,3	14193,2	16468
18	14910,4	11990,6	10859,6	12071,3	10861,2	12139
20	10667,8	9053,3	8786,6	8168,9	7219,3	8779
22	10534,3	9980,6	9139,9	16707,3	8531,1	10979
24	15927	13934,6	12921,6	17898,9	13372,8	21551
26	35441,1	33927,8	29889,6	38077,6	35325,4	33574
28	45367	39668,5	39350,5	37780,2	37916,5	40017
32	64562,1	57545,4	53622,1	51068	49272,3	53622
34	60505,3	55750	52770,8	50670,2	46002,5	50432
36	48468,5	46191,5	43216,2	40214,8	37667,6	43152
38	50087,2	46322	47471,6	41453,8	42754,9	45618
40	48099,5	47052,4	45299,2	41904,8	40094	44490
ЦФ+ДНК						
18	37029,3	34899,9	31375,9	28024,6	25176	31301
20	33261,9	28353,5	26742,7	25774,4	22806,5	27388
22	40356,1	35391,9	31604,4	30435,5	27777,2	33113
24	37135,1	32627,2	29846,9	28916,2	26632,4	25823
26	34546,5	32710,9	34117,3	30935,3	29998	33007
28	26327,3	25230,5	29770,6	28909,1	28060	28056
32	57113,9	52046,8	52355,9	59358,6	48272,3	53830
34	43896,7	43098,1	36626,1	37667,3	35947,8	36348
36	38869,6	38370,5	35443,6	34920,5	35045,9	36530
38	36534,8	34123,3	31939,1	32059,7	30372,1	33006
40	38315,2	37436,4	34086	32467,2	31605,6	34782
42	33330,1	37077,1	35586,5	33139,9	30802,3	33987

Примечание. Количественная оценка силы гибридизационного сигнала проводилась при помощи программы Quantity One.

вторяющимся последовательностям мышинного генома. Экспериментально проверено, что *B2* повтор не имеет перекрестной гомологии ни с *B1* повтором, ни с последовательностями генома человека, включая *Alu* повтор.

В проведенных сравнительных экспериментах были выбраны следующие группы и временные точки забора материала ККМ. В экспериментах по анализу динамики изменения количества *B1* повтора в мышинном геноме было



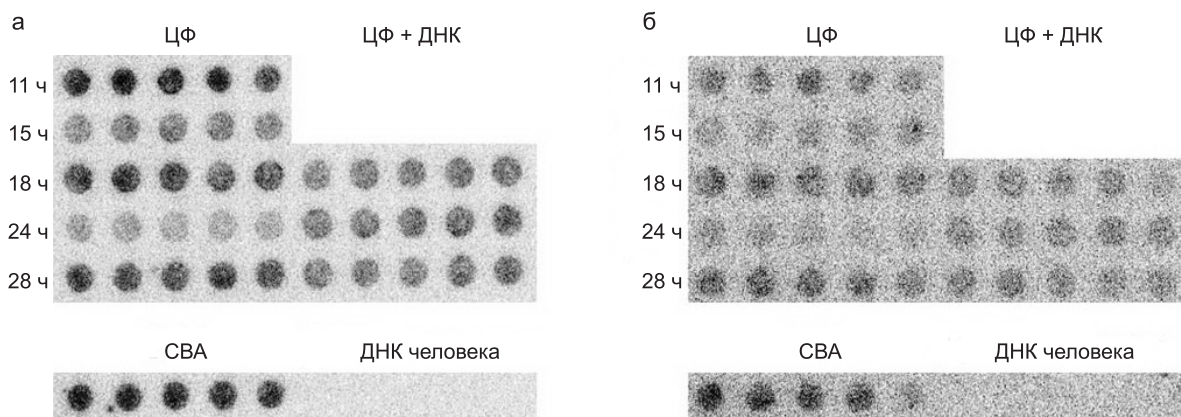
**Рис. 4.** Относительное количество *B1* повторов (пропорциональное силе гибридизационного сигнала) в геноме мононуклеарных клеток мышей после инъекции ЦФ (200 мг/кг) в виде монопрепарата (сплошная кривая) и ЦФ с последующими инъекциями экзогенной ДНК человека в промежуток времени 18–30 ч после инъекции цитостатика (пунктирная кривая).

Нулевая точка – ДНК из ядер ККМ интактных мышей. CNT\*mm<sup>2</sup> – относительные единицы, характеризующие силу радиоактивного сигнала мембраны на единицу площади, подсчитанные в программе Quantity One.

определено, что основные события, связанные с количественными изменениями в геноме мыши, начинаются через 16 ч с момента инъекции ЦФ и заканчиваются к 26 ч. В связи с этим были сформированы группы мышей для анализа происходящих в геноме событий в точках 11, 15, 18, 24, 28 ч для группы ЦФ и 18, 24, 28 ч для группы мышей, обработанных сочетанием препаратов ЦФ и экзогенной ДНК. В случае

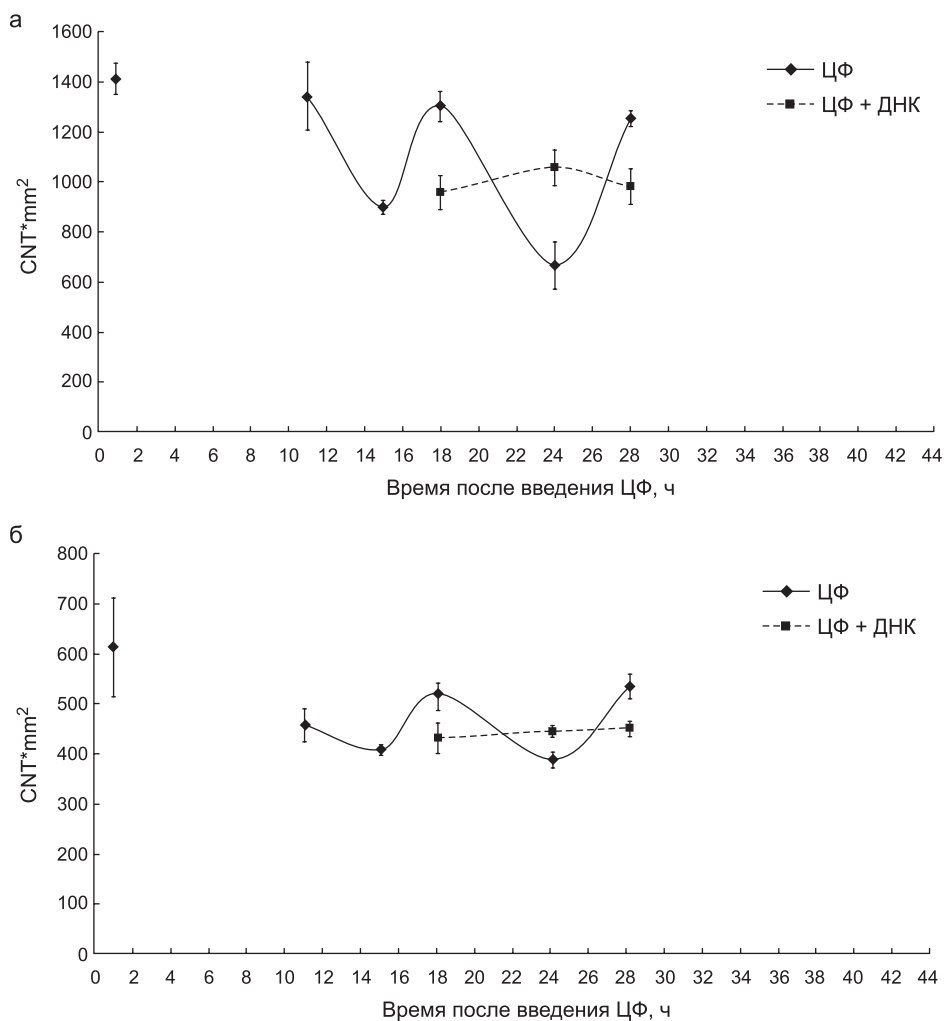
анализа синергичного действия двух препаратов инъекции экзогенной ДНК проводились ежедневно в указанный отрезок времени в количестве 0,5 мг ДНК на инъекцию. Результаты проведенных экспериментов представлены на рис. 5, 6 и в табл. 2.

В описываемых экспериментах ДНК для гибридизации выделялась из общей популяции ККМ без выделения мононуклеаров. Такой



**Рис. 5.** Дот-блот гибридизация с ДНК <sup>32</sup>P меченого *B1* (а) и *B2* (б) повторов мыши.

На мембраны в каждой точке наносили по 0,1 мкг ДНК, выделенной из ядер ККМ экспериментальных мышей через различные промежутки времени после инъекции ЦФ (200 мг/кг) в виде монопрепарата и после совместных инъекций ЦФ и ДНК человека (18–30 ч, каждый час по 0,5 мг).



**Рис. 6.** Относительное количество *B1* повторов (а) и *B2* повторов (б) в геноме ККМ экспериментальных мышей (пропорциональное силе гибридизационного сигнала) после инъекции ЦФ (200 мг/кг) в виде монопрепарата (сплошные кривые) и после инъекции ЦФ с последующим введением экзогенной ДНК человека в промежуток времени 18–30 ч после инъекции цитостатика (пунктирные кривые).

Отдельные точки – ДНК из ядер ККМ интактных мышей. CNT\*mm<sup>2</sup> – относительные единицы, характеризующие силу радиоактивного сигнала мембраны на единицу площади, подсчитанные в программе Quantity One.

выбор был сделан ввиду того, что картина гибридизации *B1* повтора в экспериментах по оценке динамики количественных изменений практически не отличалась для обоих отобранных образцов клеток (моноклеары и осадок остальных ККМ, данные не приводятся). Эксперименты новой серии проводились в сравнительном режиме, где одновременно использовались два умеренных повтора мышиного генома – *B1* и *B2* повторы. Оказалось, что, как и в предыдущей серии экспериментов, в условиях использования ЦФ как монопрепарата происходят колебания в количестве после-

довательностей генома, гомологичных обоим повторам. При этом в образцах геномной ДНК, выделенной из ККМ мышей, находящихся под воздействием одновременно двух препаратов, количество повторов остается неизменным на протяжении контролируемого временного отрезка. Полученные результаты с большой долей вероятности могут указывать на тот факт, что все короткие умеренные повторы генома ККМ мыши, организованные подобным образом с анализируемыми *B1* и *B2*, претерпевают сходные количественные изменения в реакции на репаративные процессы, связанные с ре-

Таблица 2

Относительная интенсивность гибридизации проб ДНК, выделенной из ядер ККМ

Время, ч	Номера гибридизационных проб, выполненных в каждой экспериментальной точке (слева направо)					Среднее значение
	1	2	3	4	5	
<i>B1</i> повтор						
ЦФ						
11	1416,73	1475,41	1404,19	1327,94	1083,65	1342
15	812,23	942,06	962,14	941,59	832,01	898
18	1326,06	1410,53	1385,81	1145,24	1246,60	1303
24	685,48	719,72	645,81	647,67	632,29	666
28	1277,28	1235,84	1215,34	1324,58	1216,07	1254
ЦФ+ДНК						
18	847,24	961,11	936,79	999,03	1050,15	959
24	992,67	964,52	1054,37	1107,20	1160,08	1056
28	959,38	940,30	890,25	1046,86	1076,52	983
СВА						
	1482,13	1438,17	1419,03	1429,82	1290,57	1412
<i>B2</i> повтор						
ЦФ						
11	465,58	451,99	516,79	439,53	412,43	457
15	389,77	382,56	411,63	418,97	442,04	409
18	527,29	539,32	521,79	523,14	490,36	520
24	425,48	407,19	385,17	355,95	365,78	388
28	550,46	581,08	554,66	522,34	466,32	535
ЦФ+ДНК						
18	455,96	450,38	428,64	448,65	370,84	431
24	461,05	431,13	433,78	448,92	447,38	444
28	459,74	475,61	442,83	441,83	433,44	451
СВА						
	724,13	674,05	625,94	608,85	428,65	612

Примечание. Количественная оценка силы гибридизационного сигнала проводилась при помощи программы Quantity One.

парацией МЦС, вызванных обработкой ЦФ и присутствием в ядре этих клеток фрагментов экзогенной ДНК.

Попытки прямого (из точно подсчитанного числа ККМ) определения количества копий умеренных повторов во фракции геномной ДНК ККМ в указанных экспериментальных условиях оказались неудачными. В указанный промежуток времени вся популяция ККМ во всех экспериментальных группах вступает в апоптоз. В результате указанного процесса образуются апоптотические тельца, которые при подсчете

воспринимаются как целые клетки. Такая ситуация не позволяет соотнести количественную оценку повторяющихся последовательностей ДНК генома с числом клеток и, следовательно, не позволяет провести корректный сравнительный анализ.

#### RAPD анализ

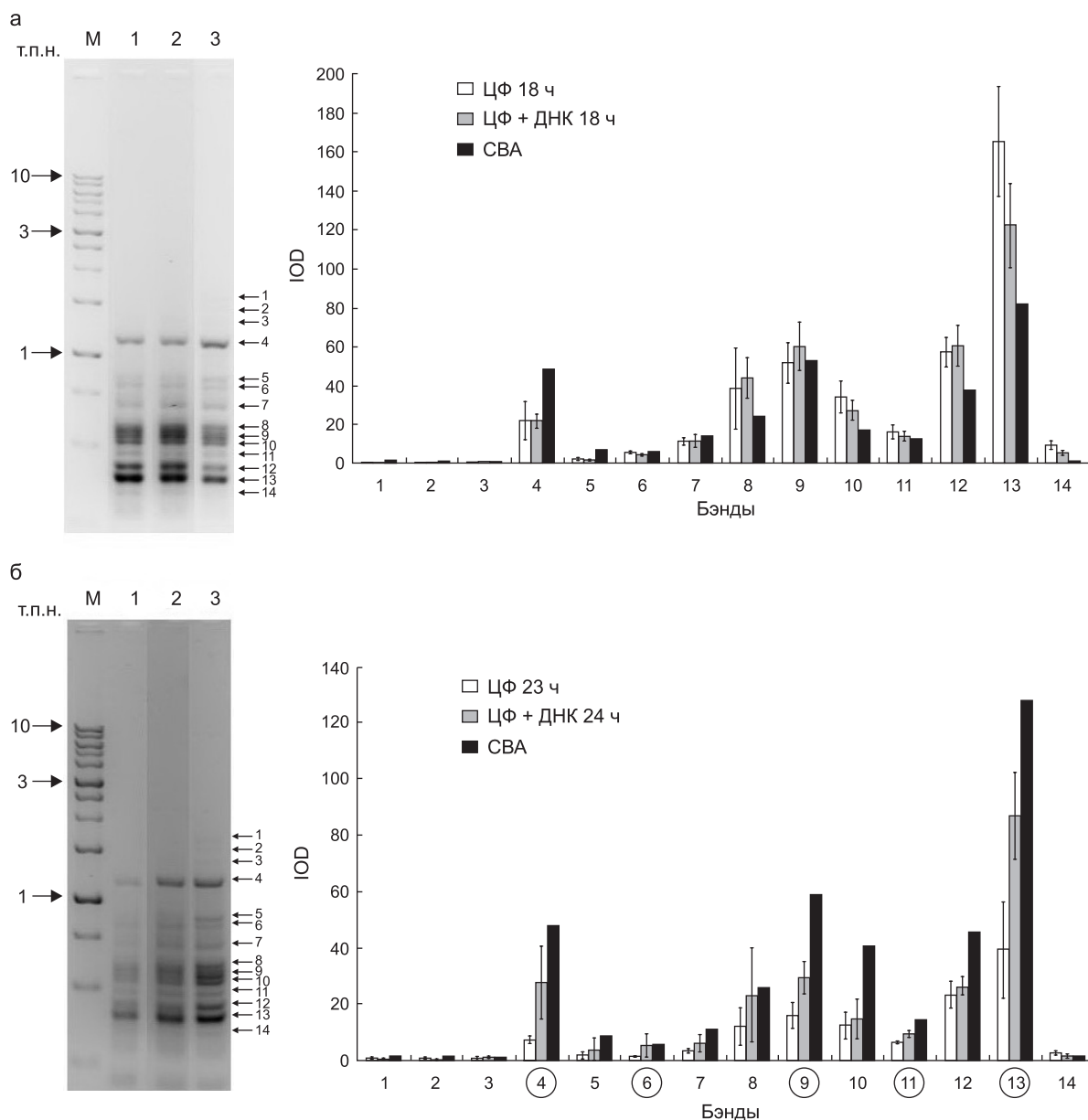
Обнаруженное изменение количества повторяющихся последовательностей предполагало, что в геноме произошли масштабные изменения,



которые можно обнаружить не только методом дот-гибридизации, но и другими способами.

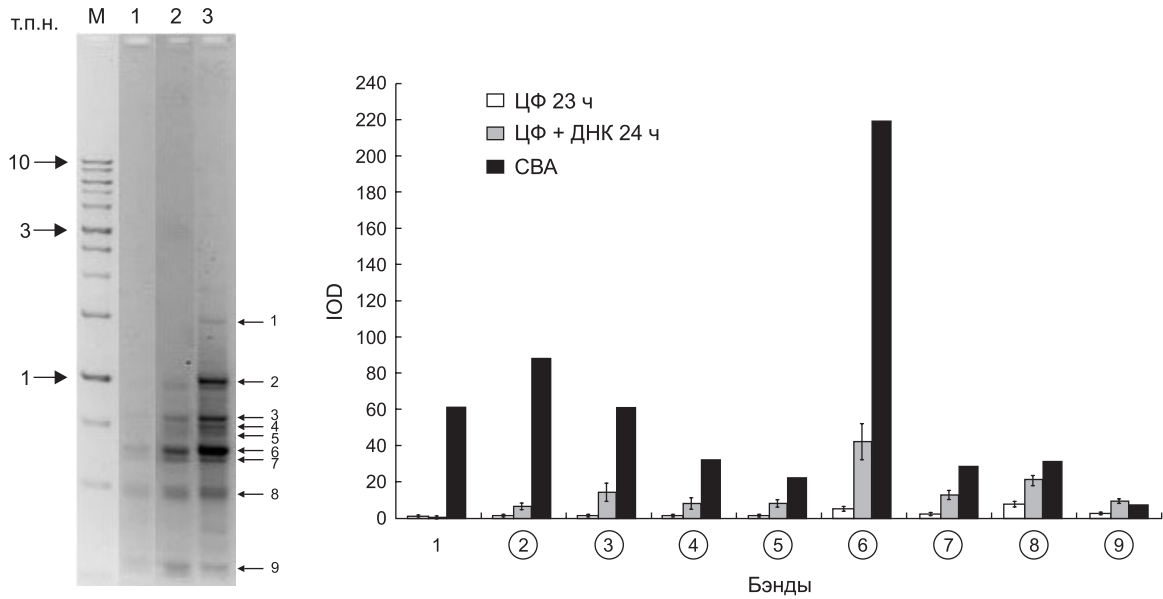
Был проведен RAPD ПЦР, который позволил зафиксировать значимые изменения в интенсивности бэндов, синтезирующихся в ходе ПЦР при использовании геномной ДНК двух групп: получавших ЦФ как монопрепарат и ЦФ в соче-

тании с ДНК. В RAPD анализе использовались стандартный праймер (Бутовская и др., 2009) и праймер на *B1* повтор мыши. Полученные результаты (рис. 7, 8) свидетельствуют о том, что через 18 ч глобальных изменений в геноме еще не произошло, тогда как через 24 ч наблюдается достоверное изменение интенсивности специ-



**Рис. 7.** Результаты RAPD ПЦР-амплификации образцов ДНК, выделенных из ККМ мышей после обработки ЦФ в виде монопрепарата (1) и в сочетании с введением фрагментированной ДНК человека (2) через 18 ч (а) и 23–24 ч (б), а также интактной мыши (3).

М – маркер молекулярного веса. Стрелками обозначены синтезированные ПЦР продукты. Интенсивность свечения Et-Br оценивалась с использованием программы Gel-Pro Analyzer (MediaCybernetics). Результаты обработки представлены в диаграммах справа. На диаграмме (б) кружками отмечены номера бэндов, для которых наблюдается достоверное изменение интенсивности RAPD спектра.



**Рис. 8.** Результаты ПЦР с использованием праймера на *B1* повтор мыши образцов ДНК, выделенных из ККМ интактной мыши (3) и мышей после обработки ЦФ в виде монопрепарата (1) и в сочетании с введением фрагментированной ДНК человека (2) через 23–24 ч после введения цитостатика.

М – маркер молекулярного веса. Стрелками обозначены синтезированные ПЦР продукты. Интенсивность свечения Et-Br оценивалась с использованием программы Gel-Pro Analyzer (MediaCybernetics). Результаты обработки представлены в диаграмме справа. На диаграмме кружками отмечены номера бэндов, для которых наблюдается достоверное изменение интенсивности свечения.

фических бэндов. В группе ЦФ происходит снижение интенсивности специфических RAPD фрагментов. В соответствии с результатами предыдущих экспериментов в группе ЦФ+ДНК изменения не затрагивают области синтеза специфических RAPD фрагментов, что означает, что эти участки хроматина сохранились в составе генома, и, по-видимому, в исходном количестве.

## ОБСУЖДЕНИЕ

### Изменение относительного количества умеренных повторов в суммарной ДНК геномной фракции ККМ экспериментальных животных и возможные механизмы этого процесса

Два главных вопроса следуют из совокупности полученных результатов. Во-первых, в чем причина изменения (как снижение (рис. 2, 4), так и увеличение (рис. 2)) количества умеренных повторов при воздействии ЦФ. И, во-вторых, почему количество умеренных повторов

сохраняется при инъекциях экзогенной ДНК на фоне предобработки ЦФ.

При сопоставлении временных параметров изменения *B1* и *B2* повторов с репарацией ДЦР в ККМ мышей (Долгова и др., 2011) оказалось, что уменьшение количества анализируемых последовательностей приходится как раз на момент репарации ДЦР первого и основного пула ККМ. Этот факт означает, что уменьшение количества умеренных повторов в геноме ККМ мышей связано с процессом образования и репарации ДЦР. Присутствие в указанный отрезок времени в мышинном организме экзогенной ДНК полностью предотвращает процесс изменения относительного количества анализируемых повторяющихся последовательностей.

Существуют два принципиально различных механизма возникновения неравного соотношения специфических последовательностей генома в определенный момент времени клеточного цикла. Указанные события могут являться либо следствием истинного изменения количества определенных участков генома, либо результатом недорепликации районов хроматина, содер-

жащих анализируемые последовательности. И в том, и другом случаях количественный анализ выявит относительное изменение в соотношении последовательностей генома. При анализе литературы было обнаружено несколько механизмов, которые позволили объяснить изменение количества умеренных повторов в геноме экспериментальных животных.

Во-первых, масштабность изменения количества *B1* и *B2* повторов в геноме ККМ мышей (уменьшение на 20 %) в анализируемый промежуток времени говорит в пользу того, что основной вклад в данный процесс вносит механизм, связанный с недорепликацией умеренных повторов в клетках мышей, обработанных ЦФ. В результате процесса недорепликации количество *B* повторов на единицу количества ДНК в суммарной фракции геномного материала у таких животных значительно меньше, чем в контроле.

В ККМ мышей группы, получившей инъекцию ЦФ, образуются МЦС, которые распознаются клеткой при вхождении в S-фазу клеточного цикла, когда репликативная(ые) вилка(и) наталкивается на повреждение (Niedernhofer *et al.*, 2004, Akkari *et al.*, 2000). В этот момент в месте МЦС образуется ДЦР, что запускает каскадный путь активации ареста клеточного цикла (Niedernhofer *et al.*, 2004; Warmerdam, Kanaar, 2010). Наряду с этим происходит активация систем репарации ДЦР. При этом возобновление продвижения по клеточному циклу не наступит до тех пор, пока все повреждения не будут удалены из внутриядерного пространства клетки (Shibata *et al.*, 2010).

Origin репликации (точка начала репликации) эукариот располагаются через каждые 50 т.п.о. и являются двунаправленными (Hamlin, 1992), а скорость репликации составляет порядка 50 нуклеотидов/с. Количество МЦС, индуцированных ЦФ (200 мг/кг), составляет 2500 на геном (Akkari *et al.*, 2000). Так как распределение МЦС в геноме происходит, по всей видимости, стохастически, то максимальное расстояние движущейся репликативной вилки до МЦС после начала репликации составит порядка 25 т.п.о., которые будут пройдены репликативной вилкой за 8 мин, что соответствует периоду ранней S-фазы. В описанной ситуации, когда произошла остановка репликации, но какое-то количество ДНК уже успело

закончить репликацию, удвоение генома прошло неравномерно. При этом в суммарной фракции геномной ДНК меняется относительное количество определенных последовательностей – становится больше участков ДНК, которые успели удвоиться, и, соответственно, уменьшается количество тех последовательностей, которые реплицируются в последнюю очередь.

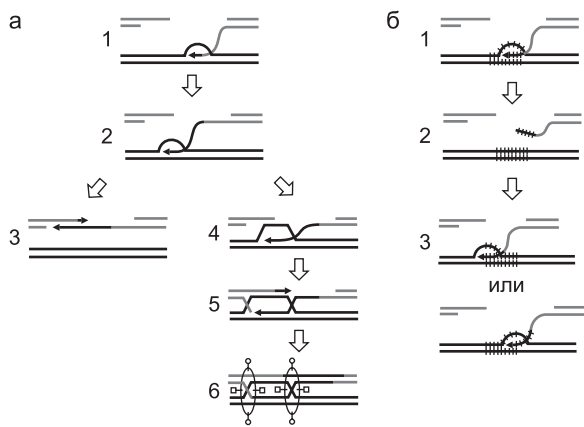
Проведенный анализ литературных данных предполагает, что анализируемые повторы находятся в недореплицированных участках генома и равновесие в соотношении геномных последовательностей сдвигается в сторону уже удвоившейся ДНК (Кимиссаренко и др., 1986; Herrick *et al.*, 2011).

Как известно, к районам ранней репликации в первую очередь относятся районы эухроматина, а именно уникальные последовательности ДНК, включая гены домашнего хозяйства, гены, отвечающие за процесс апоптоза и т. д. (Herrick *et al.*, 2011). Считается, что SINE элементы, такие, как *B1*, *B2* повторы мышей и *Alu* повтор человека, относятся к раннереплицирующимся последовательностям ДНК. Тем не менее существуют исследования, в которых показано, что в поздне-реплицирующейся ДНК также содержатся мобильные элементы и повторенные последовательности, такие, как LINE и SINE (Кимиссаренко и др., 1986; Herrick 2011). Показано, что только 86 % SINE последовательностей реплицируются в ранней фазе репликации, тогда как 14 % приходятся на позднюю S-фазу (Holmquist *et al.*, 1986). В наших экспериментах количество *B1* и *B2* повторов в геноме мыши в указанных экспериментальных условиях уменьшается ориентировочно на 20 %, что хорошо согласуется с выводами, полученными в работе Holmquist с соавт. (1986). В этой связи наиболее вероятным объяснением уменьшения количества *B1* и *B2* повторов в геноме мыши в указанных экспериментальных условиях является эффект недорепликации этих структур, вызванный остановкой клеточного цикла вследствие появления ДЦР, индуцированных МЦС.

Во-вторых, помимо описанного объяснения уменьшения количества повторов, наблюдаемого в наших экспериментах, известны другие механизмы, способные вносить вклад в изменение количества повторов в рамках существующих моделей репарации ДЦР.

Определенная часть МЦС, индуцированных ЦФ, в обязательном порядке затрагивает участки локализации умеренных повторов, поскольку указанные повторы составляют более 20 % генома мыши. Возникает ситуация репарации МЦС в районе сосредоточения повторенных последовательностей генома.

Существует теоретическая база, характеризующая возможность увеличения или уменьшения количества тандемно повторяющихся последовательностей генома. Причиной увеличения или уменьшения количества тандемных повторов в геноме может служить репарация ДЦР, как это описано для *S. cerevisiae* (Paques, Haber, 1999). ДЦР у дрожжей в S-фазе репарируется главным образом путем гомологичной рекомбинации (ГР). Если при репаративном процессе в гомологичной матричной цепи присутствуют тандемные повторы, то в процессе гомологичной рекомбинации возникает целый ряд новосинтезированных цепей ДНК, содержащих разное количество тандемно повторенных мономеров. Механизм такого изменения связан



**Рис. 9.** Схема изменения копийности тандемных повторов.

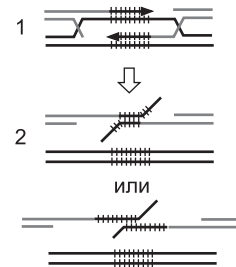
а – репарация ДЦР. 1 – инвазия процессированного 3'-конца ДЦР в гомологичный участок цепи ДНК; 2 – начало синтеза ДНК с матрицы гомологичной цепи ДНК; 3 – отсоединение новосинтезированной цепи ДНК, матричная гомологичная цепь ДНК остается в исходном виде; 4 – образование структуры Холлидея; 5 – использование второго 3'-конца ДЦР в качестве затравки для синтеза ДНК; 6 – разрезание структуры Холлидея эндонуклеазами, при этом может произойти либо генная конверсия, либо кроссинговер, оба эти процесса ведут к изменениям в структуре как репарируемой, так и матричной нитей ДНК; б – модель увеличения или уменьшения количества тандемных повторов в геноме. 1, 2 – инвазия и синтез ДНК с процессированного 3'-конца ДЦР; 3 – повторная инвазия (Paques, Haber, 1999).

с тем, что если вновь синтезированная цепь ДНК отсоединилась от матричной молекулы и не находит внешний гомологичный участок, необходимый для спаривания, то она может заново инвазировать в то же место гомологичной цепи ДНК (рис. 9). Последующий синтез того же фрагмента будет служить причиной амплификации данного участка в геноме и, как следствие, увеличения числа повторов.

С другой стороны, тандемно расположенные повторы, синтезированные в процессе рекомбинации, могут отжигаться друг с другом при гомологичном спаривании с соответствующим гомологичным участком не только концевыми последовательностями повторов, но и повторами, находящимися во внутренней части синтезированной цепи ДНК (рис. 10). При дальнейшей репарации выступающие концы, содержащие определенное количество повторов, гидролизуются специфичной эндонуклеазой и удаляются из генома. Благодаря такому процессу может происходить уменьшение количества повторов.

Известно, что в норме при репарации МЦС в геноме происходит образование ДЦР, которые впоследствии удаляются после прохождения гомологичной рекомбинации (Akkari *et al.*, 2000; De Silva *et al.*, 2000; Niedernhofer *et al.*, 2004).

Предполагается, что изменения в количестве случайным образом тандемно расположенных *B* повторов определяются принципами, описанными в цитируемой работе, что приводит или к уменьшению, или увеличению их количества в геноме ККМ.



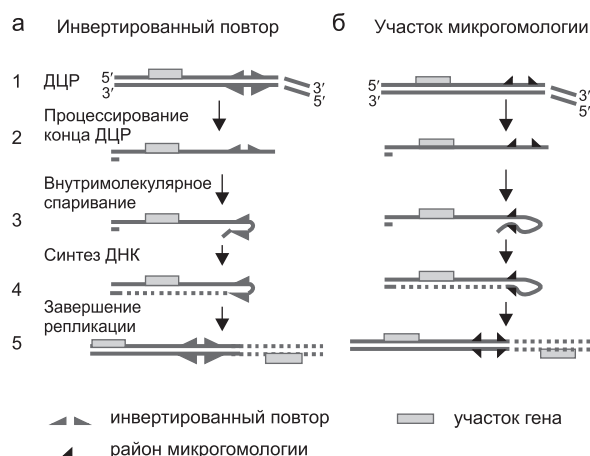
**Рис. 10.** Уменьшение копийности тандемных повторов.

1 – синтез тандемных повторов с обоих 3'-концов ДЦР на матрице гомологичной цепи ДНК; 2 – возможные пути отжига концов ДЦР после отсоединения от гомологичной цепи ДНК (Paques, Haber, 1999).



Еще один механизм изменения количества повторов представлен в работе Tanaka с соавт. (2007), в которой показано, что МЦС ведут к образованию палиндромных последовательностей и увеличению копийности генов. В момент, когда в клетке образован ДЦР, происходит процессинг ДЦ конца разрыва, в результате чего остается свободно свисающий 3'-конец молекулы ДНК. В случае наличия в одноцепочечном участке ДНК инвертированных повторов или участков микрогомологии происходит их спаривание с комплементарной последовательностью, располагающейся на этой же молекуле ДНК. Образуется шпилька, содержащая 3'-ОН, который служит заправкой для синтеза цепи ДНК, происходящего в рамках процесса репарации. В конечном итоге, когда репарация повреждений в клетке завершена и репликативные вилки восстановлены, в месте ДЦ разрыва появляется палиндромная последовательность, представляющая собой удвоенную копию участка ДНК одной хромосомы. Размер синтезируемого палиндома может достигать до 8 т.п.о. (рис. 11). В результате такого синтеза может происходить изменение копийности умеренных повторов, а также генов и участков ДНК, расположенных в районе палиндрома.

Фрагменты экзогенной ДНК, локализованные в пространстве ядра ККМ в момент репарации ДЦР, подпадают под действие репарационно-рекомбинационной системы клетки и, по-видимому, становятся субстратом некоторых стадий процесса репарации МЦС. Одновременно эти фрагменты, как предполагается, активируют альтернативные репаративные факторы (вероятно, связанные с механизмом NHEJ (Ku70/80, лигаза IV, лигаза III)). Такой эффект нарушает законный репаративный процесс. Можно предположить, что связывание вновь активированных факторов альтернативной репарации происходит в первую очередь и предпочтительно с ДЦ концами хромосом. Следствием этого является немедленное ковалентное объединение всей совокупности ДЦ концов ДНК хромосом, находящихся в ядре. При этом ДЦ концы экзогенных фрагментов ДНК вовлекаются в происходящий процесс лигирования, что сопровождается появлением в геномной фракции ДНК экзогенных последовательностей.



**Рис. 11.** Модель удвоения специфического участка хромосомы.

Одним из основных интермедиатов репарации МЦС являются ДЦР (1). В процессе репарации происходит процессирование конца ДЦР, в результате чего остается свободный 3'-конец молекулы ДНК (2). Если в участке одноцепочечной ДНК располагаются инвертированные повторы (а) или участки микрогомологии (б), то между указанными последовательностями происходит спаривание и на конце нити ДНК образуется шпилька (3). 3'-ОН служит заправкой для синтеза цепи ДНК, происходящего в рамках процесса репарации (4). По окончании процесса репарации репликативные вилки восстанавливаются и завершается синтез ДНК. При этом в месте ДЦР образуется палиндромная последовательность, представляющая собой удвоенную копию участка одной нити ДНК (Tanaka *et al.*, 2007).

Поскольку NHEJ является более быстрым и не зависящим от гомологии механизмом репарации ДЦР по сравнению с деликатным механизмом ГР, то при его активации происходят немедленное негомологичное воссоединение ДЦР и восстановление непрерывности нити хромосом (Warmerdam, Kanaar, 2010). Подтверждением этому служат результаты, демонстрирующие исчезновение ДЦР из внутриядерного пространства ККМ мышей, обработанных ЦФ, в течение 10 минут после первой инъекции экзогенной ДНК (Долгова и др., 2011). В результате аварийного восстановления целостности генома синтез ДНК возобновляется и уменьшение относительного количества повторов, связанное с остановкой репликации, не происходит.

Следует заметить, что с большой долей вероятности описанные механизмы вносят определенный вклад в обнаруженный процесс изменения количества умеренных повторов, однако, учитывая масштаб изменений, они не

могут полностью объяснить обнаруженный феномен.

В проведенных экспериментах также был обнаружен эффект увеличения количества исследуемых повторяющихся последовательностей ДНК во фракции геномной ДНК ККМ в удаленное от исходной точки (введение ЦФ) время (рис. 1, 2, 4). Возможно, что такое изменение связано с естественным замещением популяции ККМ потомками прогениторных клеток. Известно, что воздействие цитостатика приводит к полному опустошению костного мозга к 5 сут после инъекции. К 10–13 сут количество ККМ может превосходить исходный уровень (Николин и др., 2006; Likhacheva *et al.*, 2007). Увеличение количества повторов в этой новой популяции ККМ может отражать процессы, происходившие в клетках-предшественниках в момент активной репарации повреждений, индуцированных ЦФ. Можно предположить, что в этих клетках произошла амплификация умеренных повторов в ответ на агрессию цитостатиком по механизму, описанному в работе Raques и Haber (1999). Причины различного поведения дифференцированных и плюрипотентных клеток могут быть связаны с уровнем потенциальной генетической пластичности, присущей этим типам клеток.

Таким образом, в настоящей работе описывается феномен уменьшения количества *B1* и *B2* повторов в ККМ мышей, находящихся под воздействием ЦФ в промежутке времени 18–24 ч после введения цитостатика. При этом количество указанных типов повторов в ККМ не изменяется при инъекциях экзогенной ДНК мышам в промежуток времени 18–30 ч после введения ЦФ. Предполагается, что данное изменение связано с процессом репарации ДЦР в ККМ. Фрагменты экзогенной ДНК, интернализирующиеся во внутриклеточном пространстве ККМ в момент репарации повреждений, интерферируют репаративный процесс, идущий по пути ГР, следствием чего является сохранение количества повторов на исходном уровне.

## ЛИТЕРАТУРА

- Бутовская П.Р., Павлова Г.В., Мартиросян И.А. и др. Соматический мозаицизм у мышей, выявляемый методом RAPD-PCR // Молекуляр. генет., микробиол. и вирусология. 2009. № 1. С. 3–7.
- Долгова Е.В., Николин В.П., Попова Н.А. и др. Интернализация экзогенной ДНК во внутренние компартменты клеток костного мозга мышей // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012. Т. 16. № 2. С. 397–414.
- Долгова Е.В., Николин В.П., Попова Н.А. и др. Патологические изменения, возникающие в организме мышей, обработанных сочетанием циклофосфана и экзогенной ДНК // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2013. Т. 17. № 1. С. 129–146.
- 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.
- Кимиссаренко С.В., Лукинов Д.И., Черепенко Е.И. Биосинтез различных классов последовательностей ядерной ДНК при пролиферации клеток мышинной плазмидотомы МОРС-21 // Биополимеры и клетка. 1986. Т. 2. № 4. С. 220–23.
- Лихачева А.С., Рогачев В.А., Николин В.П. и др. Участие экзогенной ДНК в молекулярных процессах, протекающих в соматической клетке // Вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 3. С. 426–473.
- Маниатис Е., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М.: Мир, 1984. 480 с.
- Николин В.П., Попова Н.А., Себелева Т.Е. и др. Влияние экзогенной ДНК на восстановление лейкопоэза и противоопухолевый эффект циклофосфана // Вопр. онкологии. 2006. Т. 52. С. 336–340.
- Смирнов Г.Б. Почему редуцируются бактериальные геномы? // Бреслеровские чтения. СПб.: Наука, 2007. С. 34–60.
- Abrams R.A., McCormack K., Bowles C., Deisseroth A.B. Cyclophosphamide treatment expands the circulating hematopoietic stem cell pool in dogs // J. Clin. Invest. 1981. V. 67. No. 5. P. 1392–1399.
- Akkari Y.M., Bateman R.L., Reifsteck C.A. *et al.* DNA replication is required to elicit cellular responses to psoralen-induced DNA interstrand cross-links // Mol. Cell Biol. 2000. V. 20. No. 21. P. 8283–8289.
- De Silva I.U., McHugh P.J., Clingen P.H. *et al.* Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells // Mol. Cell Biol. 2000. V. 20. P. 7980–7990.
- Farzaneh F., Zalin R., Brill D., Shall S. DNA strand breaks and ADP-ribosyl transferase activation during cell differentiation // Nature. 1982. V. 300. No. 5890. P. 362–366.
- Fleming R.A. An overview of cyclophosphamide and ifosfamide pharmacology // Pharmacotherapy. 1997. V. 17. P. 146–154.
- Jack H.M., McDowell M., Steinberg C.M. *et al.* Looping out and deletion mechanism for the immunoglobulin heavy-chain class switch // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 1581–1585.
- Jahn C.L., Klobutcher L.A. Genome remodeling in ciliated protozoa // Annu. Rev. Microbiol. 2002. V. 56. P. 489–520.
- Jurka J., Kohany O., Pavlicek A. *et al.* Clustering, duplication and chromosomal distribution of mouse SINE ret-

- rotransposons // *Cytogenet. Genome Res.* 2005. V. 110. P. 117–123.
- Hamlin J.L. Mammalian origins of replication // *Bioassays.* 1992. V. 14. No. 10. P. 651–659.
- Hancock J.M. Gene factories, microfunctionalization and the evolution of gene families // *Trends Genet.* 2005. V. 21. P. 591–595.
- Herrick J. Genetic variation and DNA replication timing, or why is there late replicating DNA? // *Evolution.* 2011. V. 65. No. 11. P. 3031–3047.
- Holmquist G.P., Caston L.A. Replication time of interspersed repetitive DNA sequences in hamsters // *Biochim. Biophys. Acta.* 1986. V. 868. No. 2/3. P. 164–177.
- Johnstone A.P., Williams G.T. Role of DNA breaks and ADP-ribosyl transferase activity in eukaryotic differentiation demonstrated in human lymphocytes // *Nature.* 1982. V. 300. No. 5890. P. 368–370.
- Kobayashi T. A new role of the rDNA and nucleolus in the nucleus-rDNA instability maintains genome integrity // *Bioassays.* 2008. V. 30. No. 3. P. 267–272.
- Kotnis A., Kannan S., Sarin R. *et al.* Case-control study and meta-analysis of SULT1A1 Arg213His polymorphism for gene, ethnicity and environment interaction for cancer risk // *Br. J. Cancer.* 2008. V. 99. P. 1340–1347.
- Kramerov D.A., Vassetzky N.S. Short retroposons in eukaryotic genomes // *Int. Rev. Cytol.* 2005. V. 247. P. 165–221.
- Krayev A.S., Kramerov D.A., Skryabin K.G. *et al.* The nucleotide sequence of the ubiquitous repetitive DNA sequence B1 complementary to the most abundant class of mouse fold-back RNA // *Nucl. Acids Res.* 1980. V. 8. No. 6. P. 1201–1215.
- Lansdorp P.M. Major cutbacks at chromosome ends // *Trends Biochem. Sci.* 2005. V. 30. P. 388–395.
- Le Breton C., Hennion M., Arimondo P.B. *et al.* Replication-fork stalling and processing at a single psoralen interstrand crosslink in *Xenopus* egg extracts // *PLoS one.* 2011. V. 6. No. 4. P. e18554.
- Likhacheva A.S., Nikolin V.P., Popova N.A. *et al.* Integration of human DNA fragments into the cell genomes of certain tissues from adult mice treated with cytostatic cyclophosphamide in combination with human DNA // *Gene Ther. Mol. Biol.* 2007. V. 11. P. 185–202.
- Mazur L., Czyzewska A. Immunocytochemical analysis of apoptotic bone marrow cells after treatment of mice with WR-2721 and chemotherapeutic drugs // *Folia Histochem. Cytobiol.* 2001. V. 39. No. 2. P. 63–66.
- Moore R.C., Purugganan M.D. The evolutionary dynamics of plant duplicate genes // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2005. V. 8. P. 122–128.
- Niedernhofer L.J., Odijk H., Budzowska M. *et al.* The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks // *Mol. Cell Biol.* 2004. V. 24. No. 13. P. 5776–5787.
- Paques F., Haber J.E. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999. V. 63. No. 2. P. 349–404.
- Pvques F., Leung W.Y., Haber J.E. Expansions and contractions in a tandem repeat induced by double-strand break repair // *Mol. Cell. Biol.* 1998. V. 18. No. 4. P. 2045–2054.
- Roberts D.B. *Drosophila: a practical approach.* Oxford-Washington, DC: IRL Press, 1986. 295 p.
- Salem M.L., El-Naggar S.A., Cole D.J. Cyclophosphamide induces bone marrow to yield higher numbers of precursor dendritic cells *in vitro* capable of functional antigen presentation to T cells *in vivo* // *Cell Immunol.* 2010. V. 261. No. 2. P. 134–143.
- Serdobova I.M., Kramerov D.A. Short retroposons of the B2 superfamily: evolution and application for the study of rodent phylogeny // *J. Mol. Evol.* 1998. V. 46. P. 202–214.
- Shibata A., Barton O., Noon A.T. *et al.* Role of ATM and the damage response mediator proteins 53BP1 and MDC1 in the maintenance of G(2)/M checkpoint arrest // *Mol. Cell. Biol.* 2010. V. 30. No. 13. P. 3371–3383.
- Tanaka H., Cao Y., Bergstrom D.A. *et al.* Intrastrand annealing leads to the formation of a large DNA palindrome and determines the boundaries of genomic amplification in human cancer // *Mol. Cell. Biol.* 2007. V. 27. No. 6. P. 1993–2002.
- Taussig M.J. Molecular genetics of immunoglobulins // *Immunol. Suppl.* 1988. V. 1. P. 7–15.
- Tower J. Developmental gene amplification and origin regulation // *Annu. Rev. Genet.* 2004. V. 38. P. 273–304.
- Tseng H., Chou W., Wang J. *et al.* Mouse ribosomal RNA genes contain multiple differentially regulated variants // *PLoS One.* 2008. V. 3. P. e1843.
- Vassetzky N.S., Ten O.A., Kramerov D.A. B1 and related SINEs in mammalian genomes // *Gene.* 2003. V. 319. P. 149–160.
- Vatolin S.Y., Okhapkina E.V., Matveeva N.M. *et al.* Scheduled perturbation in DNA during *in vitro* differentiation of mouse embryo-derived cells // *Mol. Reprod. Dev.* 1997. V. 47. No. 1. P. 1–10.
- Wang R.C., Smogorzewska A., de Lange T. Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres // *Cell.* 2004. V. 119. No. 3. P. 355–368.
- Warmerdam D.O., Kanaar R. Dealing with DNA damage: relationships between checkpoint and repair pathways // *Mutat Res.* 2010. V. 704. No. 1/3. P. 2–11.
- Yakubov L.A., Rogachev V.A., Likhacheva A.C. *et al.* Natural human gene correction by small extracellular genomic DNA fragments // *Cell Cycle.* 2007. V. 6. P. 2293–2301.

**CHARACTERISTIC CHANGES IN THE COPY NUMBER  
OF INTERSPERSED REPEATS IN BONE MARROW CELLS OF MICE  
TREATED WITH CYCLOPHOSPHAMIDE AND EXOGENOUS HUMAN DNA**

**E.V. Dolgova<sup>1</sup>, A.V. Prokopenko<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>, 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.V. Panov<sup>6</sup>, S.N. Zagrebelnyi<sup>2</sup>, M.A. Shurdov<sup>7</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 and 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

Mice were observed to get sick and die upon administration of exogenous DNA in a specific period of time following their pretreatment with the cytostatic cyclophosphamide (CP) (Dolgova *et al.*, 2011). It was established that exogenous DNA reaches internal compartments of bone marrow cells (BMCs) where it is processed (Dolgova *et al.*, 2012a). Thus, BMCs appear to be the primary targets for the synergic action of these preparations (Dolgova *et al.*, 2012b).

In the present study, we show that the copy number for mouse interspersed genomic repeats decreases in the genome of mouse mononuclear cells as a result of interstrand cross-link (ICL) repair after pre-treatment with cytostatic CP. This phenomenon occurs within the time span from 18 to 24 h following CP injection, which corresponds to the final step in the repair of the majority of double-strand breaks (DSBs), as predominant intermediates in ICL repair. Injections of exogenous DNA in CP-pretreated mice preserve the copy number of interspersed repeats at the original level. Our results suggest that the fragments of exogenous DNA participate in ICL-induced DSB repair, thereby compromising the repair process.

**Key words:** cyclophosphamide, exogenous DNA, interstrand cross-links, short interspersed repeat (SINE), homologous recombination.



УДК 537.533.35:575.826:579.252.58:591.557

## ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ *DROSOPHILA MELANOGASTER*, ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАТОГЕННЫМ ШТАММОМ БАКТЕРИЙ *WOLBACHIA*

© 2013 г. А.А. Струнов, Ю.Ю. Илинский, И.К. Захаров, Е.В. Киселева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,  
e-mail: strunov.anton@gmail.com

Поступила в редакцию 6 апреля 2013 г. Принята к публикации 30 апреля 2013 г.

Патогенный штамм *Wolbachia* wMelPop обнаруживается в центральной нервной системе, мышцах и сетчатке *Drosophila melanogaster* и сокращает выживаемость своего хозяина в два раза. Это делает возможным его применение для борьбы с насекомыми – вредителями сельского хозяйства и переносчиками различных заболеваний человека. Любая симбиотическая ассоциация в природе находится под действием различных стрессов, таких, как голодание, пониженная или повышенная температура и другие, которые существенно влияют на особенности взаимоотношения партнеров. В настоящей работе исследовано действие пониженной (16 °С) и повышенной (29 °С) температур на выживаемость и продолжительность жизни самок *D. melanogaster*, инфицированных *Wolbachia* штамма wMelPop; а также проведен анализ ультраструктуры клеток мозга и распределения в них бактерий. Увеличение времени содержания вылетевших имаго при повышенной температуре снижает их продолжительность жизни, причем влияние температуры проявляется после трех дней экспозиции. На 7-й день содержания мух при повышенной температуре в клетках их мозга появляются электронноплотные структуры, напоминающие деградирующие бактерии, количество которых резко возрастает к 13-му дню инкубации при 29 °С. На основании данных популяционного и электронно-микроскопического анализа нами выделен критический период воздействия повышенной температуры с 7-го по 13-й день после начала экспозиции, после которого происходит резкое снижение выживаемости *D. melanogaster*.

**Ключевые слова:** *Drosophila melanogaster*, патогенный штамм *Wolbachia* wMelPop, электронная микроскопия, повышенная температура.

### ВВЕДЕНИЕ

Эндосимбионты *Wolbachia* являются одними из самых распространенных грамотрицательных бактерий в природе, населяющих в основном репродуктивные органы артропод и некоторых нематод и передающихся из поколения в поколение по материнской линии (Serbus *et al.*, 2008). Помимо репродуктивных органов *Wolbachia* обнаруживаются также в различных типах тканей личинок и взрослых особей своих хозяев (Dobson *et al.*, 1999; McGraw *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2005; Жукова и др., 2008). Влияние *Wolbachia* варьирует от мутуалистического до

паразитического в зависимости от вида хозяина и штамма бактерий (Serbus *et al.*, 2008). Штамм *Wolbachia* wMelPop является ярким примером патогенного эндосимбионта, который активно размножается в клетках мозга, сетчатки и мышц *Drosophila melanogaster* и снижает продолжительность жизни (ПЖ) хозяина в два раза по сравнению с незараженной линией (Min, Benzer, 1997). Паразитический штамм *Wolbachia* может быть использован в качестве безвредного для окружающей среды агента в борьбе с вредителями сельского хозяйства и переносчиками различных заболеваний человека. Так, недавно был осуществлен успешный перенос штамма



wMelPop в организм москита *Aedes aegypti*, основного переносчика лихорадки Денге, и продемонстрировано сохранение инфекции в его последующих поколениях (McMeniman *et al.*, 2009). Инфицированные москиты с высоким титром бактерий в голове, груди и брюшке имели сокращенную на 50 % продолжительность жизни (ПЖ), и *Wolbachia* оказывали прямое влияние на обособление вируса в организме хозяина (Moreira *et al.*, 2009). Однако перед применением wMelPop в полевых испытаниях необходимо выяснять, как этот штамм будет взаимодействовать с хозяином в условиях постоянно меняющейся окружающей среды.

Известно, что любой организм в природе подвержен действию различных стрессовых факторов. Одним из них является температура, которая оказывает значительное влияние на физиологические и биохимические процессы, а также поведенческие реакции животных (Thomas, Blanford, 2003). В данной работе мы исследовали влияние временного воздействия повышенной температуры (29 °C) на ПЖ и выживаемость самок *D. melanogaster*, как инфицированных так и неинфицированных патогенным штаммом *Wolbachia* wMelPop. С помощью электронной микроскопии при различных температурных режимах мы провели сравнение морфологии клеток мозга самок *D. melanogaster*, а также проанализировали ультраструктуру и распределение бактерий в этих клетках. По результатам данного исследования мы определили специфический период воздействия повышенной температуры, при котором происходит существенное снижение выживаемости *D. melanogaster* и нарушается ультраструктура *Wolbachia*. Увеличение числа бактерий в клетках и изменение морфологии *Wolbachia* выдвигаются в качестве главного фактора, снижающего среднюю ПЖ и выживаемость мух.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

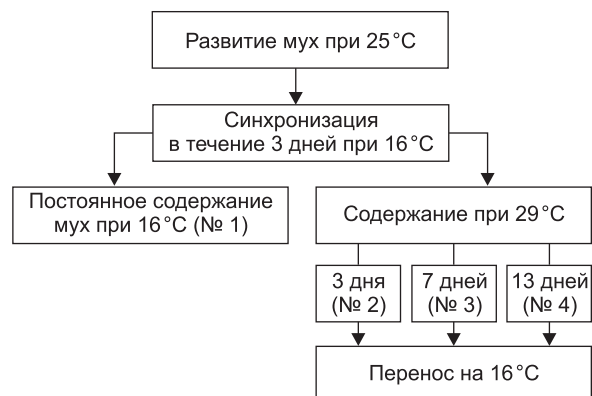
### Объект исследования

Линия мух *D. melanogaster* w1118, зараженная патогенным штаммом *Wolbachia* wMelPop, была любезно предоставлена профессором Скотом О'Нейлом (Университет Квинсленда, Австралия). Неинфицированную линию по-

лучили путем содержания мух в течение двух поколений на корме с добавлением 0,03 % тетрациклина (вес/объем). Инфекционный статус линии проверяли с помощью ПЦР (данные не приведены). С учетом того что бактерии *Wolbachia* передаются из поколения в поколение по материнской линии (Serbus *et al.*, 2008), в данной работе мы проводили эксперименты на самках *D. melanogaster* w1118.

### Тест на продолжительность жизни

Эксперимент по выживаемости инфицированных и неинфицированных самок проводился при нескольких температурных режимах. В каждом отдельном эксперименте было взято от 90 до 210 мух по 30 особей на пробирку со стандартным изюмным кормом. Самки *D. melanogaster* развивались при комнатной температуре (23–25 °C) и при вылете из куколок переносились на определенный температурный режим (рис. 1). В качестве контроля ПЖ использовали самок, содержащихся постоянно при пониженной температуре 16 °C, и вели учет каждые 3 дня до полной гибели мух. В опыте вылетевшие имаго определенное количество дней (3, 7 и 13) содержались при повышенной температуре (29 °C), а затем при температуре 16 °C до полной гибели (рис. 1). Учет ПЖ проводился по дням, соответствующим контролю. Мух переносили на свежий корм каждые 5 дней при содержании при температуре 16 °C и каждый день – при температуре 29 °C.



**Рис. 1.** Схема эксперимента по исследованию продолжительности жизни самок *D. melanogaster*, инфицированных и неинфицированных патогенным штаммом *Wolbachia* wMelPop.

Кривые выживаемости мух были построены по методу Каплана–Майера и проанализированы с помощью лог-ранк теста.

### Просвечивающая электронная микроскопия

Фиксация образцов мозга самок *D. melanogaster w1118* для электронной микроскопии проводилась по методу Terasaki с соавт. (2001). Образцы выделяли в 0,1 М фосфатном буфере (pH = 7,4) и фиксировали в 2,5 %-м (вес/объем) глутаровом альдегиде (Fluka, Швейцария) на том же буфере в течение 2,5 ч. После фиксации образцы 3 раза по 5 мин отмывали фосфатным буфером и постфиксировали 1 ч в 1 %-м (вес/объем) OsO<sub>4</sub> (ОАО Аурат, Россия) и 0,8 %-м (вес/объем) калии железосинеродистом на том же буфере. Затем материал инкубировали 12 ч при 4 °С в 1 %-м водном растворе уранил ацетата (Serva, Германия). После этого образцы мозга дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации (30, 50, 70, 96 % по 10 мин и 100 % в течение 20 мин) и ацетоне (дважды по 20 мин) и заключали в смолу Agar 100 Resin (Agar, Великобритания). Полутонкие срезы образцов получали с помощью ультратома Reichert-Jung (Австрия), окрашивали метиленовым синим и анализировали под световым микроскопом Axioscop 40 (Zeiss, Германия). Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме Leica ultracut (Leica, Австрия), окрашивали цитратом свинца по Рейнольдсу (Reynolds, 1963) и анализировали в электронном микроскопе JEOL JEM-100SX (JEOL, Япония).

Фиксация образцов мозга проводилась на 30-й день постоянного содержания мух при 16 °С, а также на 30-й день содержания мух при 16 °С после обработки повышенной температурой в течение 3, 7 и 13 дней.

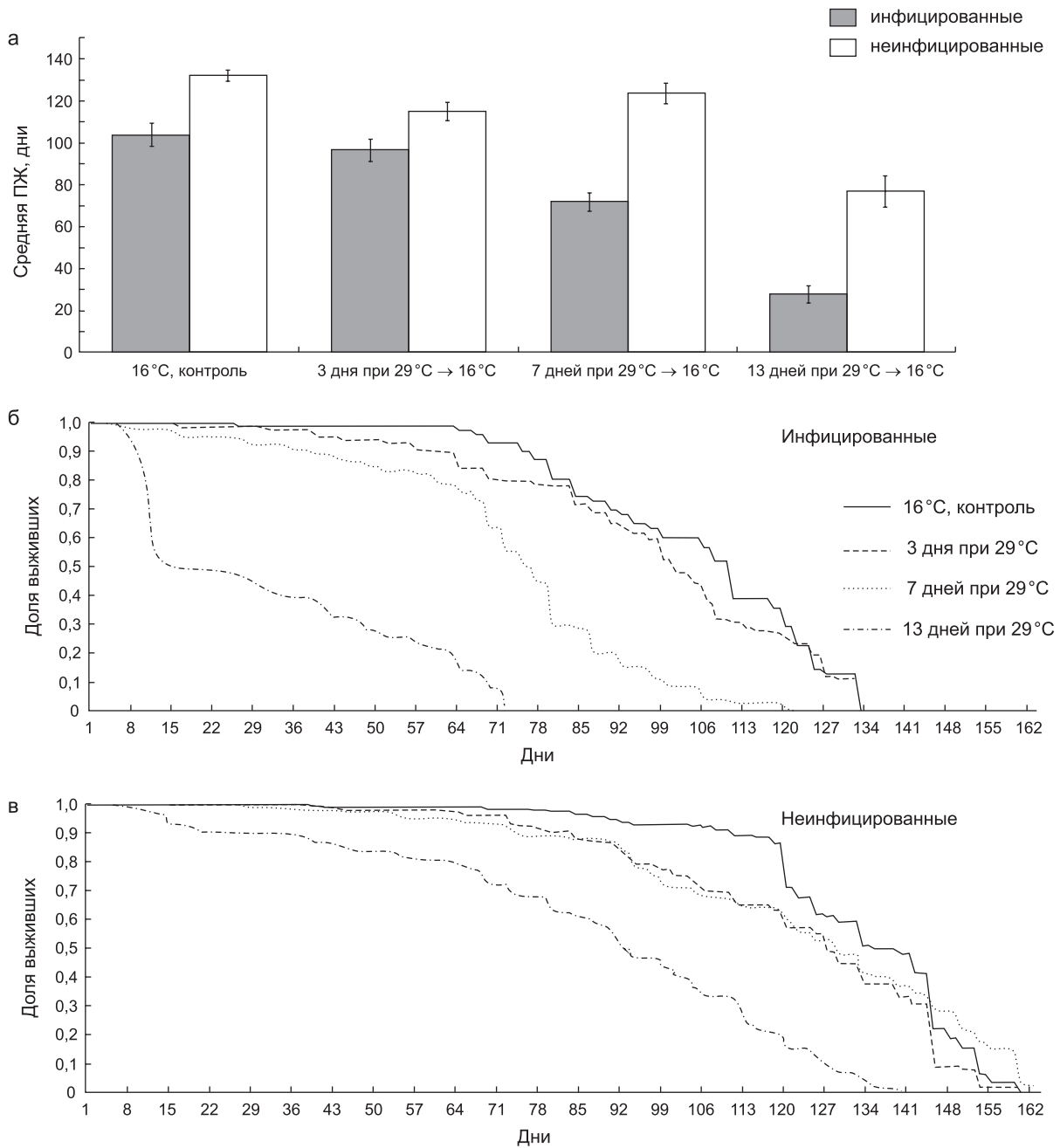
## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Средняя продолжительность жизни и выживаемость инфицированных и неинфицированных самок при различных температурных режимах

Тест на ПЖ зараженных и незараженных *wMelPop* самок *D. melanogaster w1118* прово-

дился при 4 различных температурных режимах, условно обозначенных как № 1, 2, 3 и 4. При режиме № 1 мух постоянно содержали при 16 °С и полученные данные по их ПЖ и выживаемости использовали в качестве контроля. При режимах № 2, 3 и 4 мух содержали при повышенной температуре 29 °С в течение 3, 7 и 13 дней соответственно и впоследствии переносили в пониженную температуру (16 °С), где они содержались до полной гибели. По результатам экспериментов были построены графики средней ПЖ и кривые выживаемости (рис. 2, а–в). Средняя ПЖ зараженных и незараженных самок в условиях постоянного содержания при 16 °С составила  $103,8 \pm 5,6$  и  $132,3 \pm 2,6$  дней соответственно (рис. 2, а). В условиях температурного режима № 2 средняя ПЖ инфицированных мух достоверно не отличалась от контроля и составляла  $96,7 \pm 5,3$  дней, а неинфицированные мухи жили на ~10 % меньше ( $114,9 \pm 4,2$  дней). При режиме № 3 средняя ПЖ зараженных самок сократилась на ~30 % ( $72,1 \pm 4,5$  дней), а у незараженных – лишь на 7 % ( $123,8 \pm 4,9$  дней) по сравнению с контролем. 13 дней содержания при повышенной температуре (режим № 4) оказали существенное влияние на среднюю ПЖ, сократив ее у инфицированных самок на 75 % ( $28,1 \pm 4,0$  дней) и на 40 % у неинфицированных ( $77,0 \pm 7,7$ ) по сравнению с контролем.

Данные, полученные по выживаемости самок при различных температурных режимах, были разбиты на две группы. Первую группу использовали для сравнения выживаемости зараженных (рис. 2, б) и незараженных (рис. 2, в) самок в равных условиях их содержания, чтобы оценить влияние инфекции на организм хозяина. Вторая группа использовалась для сравнения выживаемости только неинфицированных самок, чтобы выявить действие различных температурных режимов на мух (рис. 2, в). По данным из первой группы выживаемость инфицированных самок была достоверно ниже выживаемости неинфицированных при всех температурных режимах (режим № 1:  $\chi^2 = 117$ , d.f. = 1,  $P < 0,0001$ ; режим № 2:  $\chi^2 = 75$ , d.f. = 1,  $P < 0,0001$ ; режим № 3:  $\chi^2 = 194$ , d.f. = 1,  $P < 0,0001$ ; режим № 4:  $\chi^2 = 147$ , d.f. = 1,  $P < 0,0001$ ). По данным из второй группы по сравнению



**Рис. 2.** Средняя продолжительность жизни (а) и кривые выживаемости (б, в) зараженных и незараженных самок *D. melanogaster willis*, содержавшихся при 16 °С постоянно (режим № 1), а также после обработки повышенной температурой 29 °С в течение 3, 7 и 13 дней (режимы № 2, 3, 4 соответственно).

с контролем обработка повышенной температурой оказывала действие только в случае содержания мух при режимах № 3 и № 4 (режим № 3 :  $\chi^2 = 11$ , d.f. = 1,  $P < 0,004$ ; режим № 4:  $\chi^2 = 220$ , d.f. = 1,  $P < 0,0001$ ), а при режиме № 2 воздействие 29 °С было статистически незначимым ( $\chi^2 = 0,35$ , d.f. = 1,  $P < 0,84$ ).

### Ультраструктура клеток мозга и распределение бактерий при различных температурных режимах

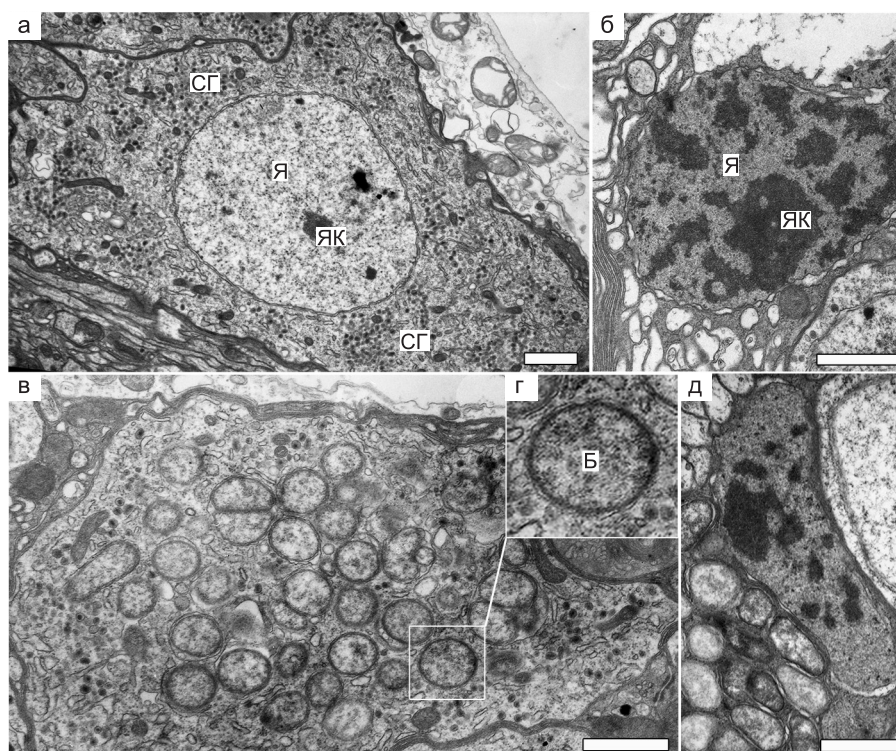
Для того чтобы оценить влияние различных температурных режимов на строение клеток мозга, ультраструктуру бактерий и их распределение в этих клетках, а также проанализировать

причину резкого снижения продолжительности жизни и выживаемости самок при температурных режимах № 3 и № 4, были проведены электронно-микроскопические исследования. Согласно данным популяционного анализа, на 30-й день содержания инфицированных мух при 16 °С без воздействия повышенной температуры гибнет лишь 1 % особей. В этой же точке после 3 дней воздействия температурой 29 °С гибнет незначительно больше мух – 2 %. После 7 дней воздействия повышенной температурой на 30-й день при 16 °С погибает около 10 % насекомых, а после 13 дней – более половины (60 %). Подобная динамика выживаемости мух обусловила выбор точки фиксации (30-й день) образцов мозга для электронной микроскопии. Электронно-микроскопический анализ показал, что клетки нейронов и глиии располагаются в основном по периферии мозга мух (данные не показаны). Внутреннее пространство мозга заполнено преимущественно аксонами и дендритами нейронов, тесно контактирующих и фор-

мирующих сложные переплетения – нейропилы (Loesel *et al.*, 2002).

**Режим № 1. Постоянное содержание самок при 16 °С (контроль).** Ультраструктурный анализ клеток мозга контрольной группы мух (16 °С) показал, что тела нейронов имеют, как правило, вытянутую форму и цитоплазму, обогащенную органеллами и специфически секреторными гранулами (рис. 3, а). Ядра клеток имеют чаще всего округлую форму с электронно-светлым матриксом и содержат 1–2 ядрышка. Клетки глиии хорошо выявляются по множественным отросткам цитоплазмы, контактирующим с близлежащими телами нейронов, и по электронно-плотному округлому или вытянутому ядру, занимающему большой объем клетки и содержащему многочисленные глыбки гетерохроматина и 1–2 ядрышка (рис. 3, б).

*Wolbachia* штамма wMelPop имеют округлую, реже вытянутую форму (рис. 3, в, г). Их оболочка состоит из трех мембран, две из которых, внутренние, имеют бактериальное, а



**Рис. 3.** Ультраструктурная организация клеток центрального отдела мозга мух и распределение бактерий в этих клетках при постоянном содержании при 16 °С.

а, б – незараженные бактериями нейрон и клетка глиии соответственно; в, г, д – распределение бактерий в теле нейрона (в, г) и в клетке глиии (д); Я – ядро, ЯК – ядрышко, СГ – секреторные гранулы, Б – бактерии. Масштаб – 1 мкм.

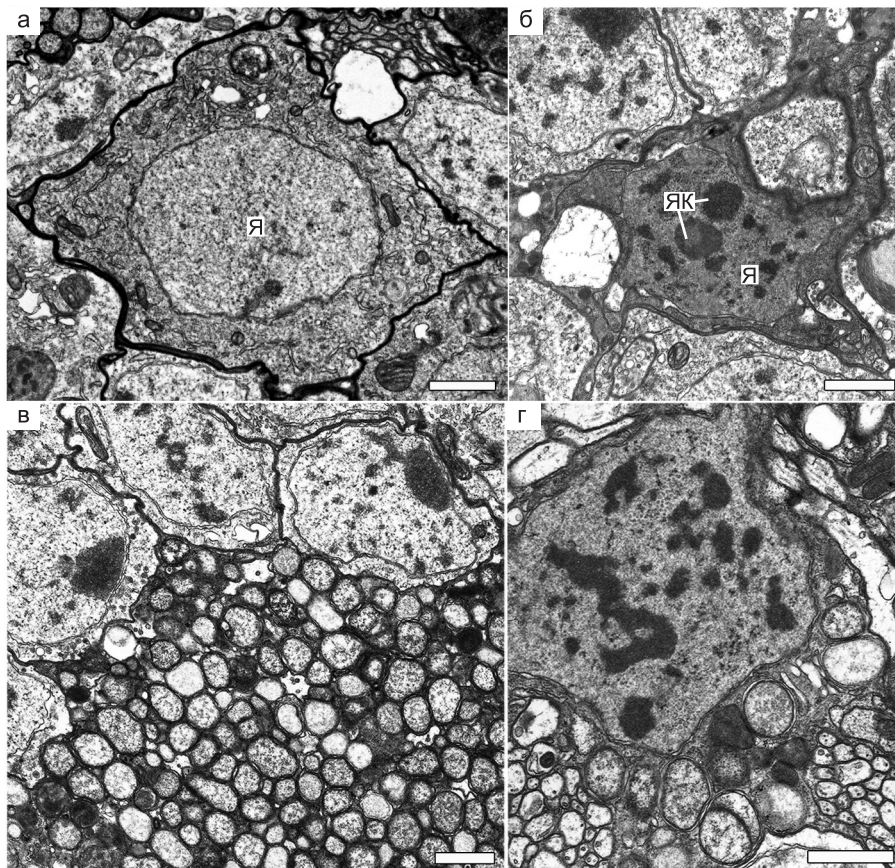


внешняя – хозяйское происхождение. Бактерии были обнаружены в обоих типах клеток мозга. В нейронах они располагаются небольшими скоплениями от 5 до 30 бактерий на срез клетки, часто недалеко от ядра в месте отхождения аксона от сомы (рис. 3, в). Иногда встречаются скопления бактерий, лежащие под общей наружной мембраной. По сравнению с нейронами клетки глии содержат меньше *Wolbachia* (1–15 бактерий на срез клетки), тесно контактирующих с ядром и образующих небольшие плотные скопления (рис. 3, д).

**Режим № 2. Содержание самок в течение 3 дней при температуре 29 °С и последующее их содержание при температуре 16 °С.** Ультраструктура клеток мозга *D. melanogaster* после 3 дней содержания при повышенной температуре не изменяется по сравнению с контролем (рис. 4, а, б). Титр бактерий в клетках мозга, пре-

имущественно в нейронах, немного увеличивается. Бактерии образуют плотные скопления, занимающие иногда пространство нескольких клеток (рис. 4, в). В клетках глии плотность *Wolbachia* остается неизменной по сравнению с контролем (рис. 4, г).

**Режим № 3. Содержание самок в течение 7 дней при температуре 29 °С и последующее их содержание при 16 °С.** После 7 дней содержания мух при 29 °С ультраструктура нейронов и клеток глии не отличается от контроля (рис. 5, а, б). Увеличение количества *Wolbachia* происходит как в телах нейронов, так и в глии (рис. 5, в, г). Бактерии в соме нейронов формируют плотные скопления, занимающие пространство нескольких близлежащих клеток. На границе скоплений иногда выявляются расширенные межклеточные полости, образующиеся, возможно, в результате разрушения клеток мозга



**Рис. 4.** Ультраструктурная организация клеток центрального отдела мозга мух и распределение в них бактерий после содержания мух при 29 °С в течение 3 дней и последующего их переноса в 16 °С.

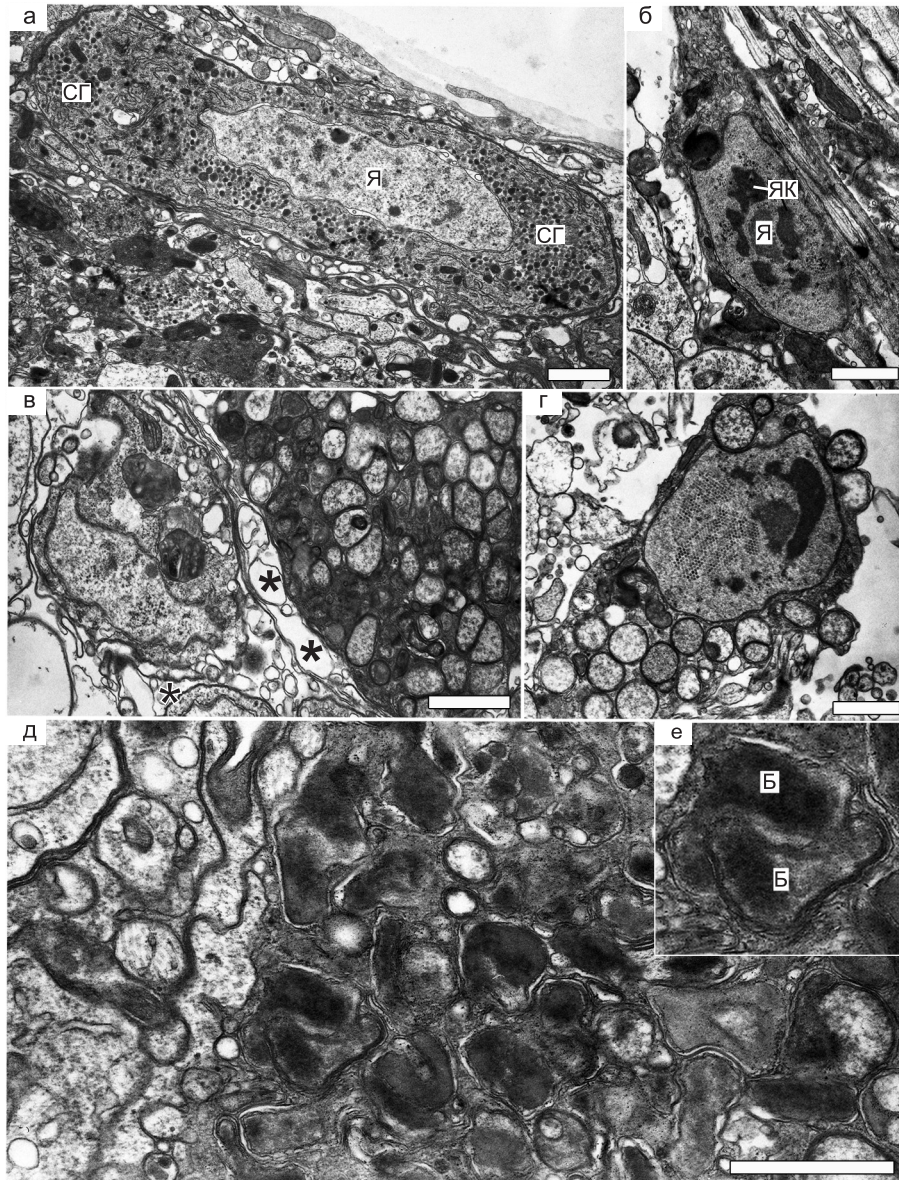
а, б – незараженные бактериями нейрон и клетка глии соответственно; в, г – распределение бактерий в теле нейрона (в) и клетке глии (г); Я – ядро, ЯК – ядрышко. Масштаб – 1 мкм.



вследствие активной пролиферации бактерий (рис. 5, в). В клетках глии накопление *Wolbachia* происходит менее интенсивно по сравнению с нейронами. Количество бактерий в этих клетках варьирует от 1 до 20 и больших скоплений не обнаруживается (рис. 5, г). В телах нейронов помимо типичных бактерий *Wolbachia* со светлым матриксом нами были обнаружены элект-

ронно-плотные структуры с тройной оболочкой, напоминающие деградирующие бактерии (рис. 5, д). Подобные структуры были описаны ранее в яичниках (Жукова и др., 2008).

**Режим № 4. Содержание самок в течение 13 дней при температуре 29 °С и последующее их содержание при температуре 16 °С.** При содержании мух в течение 13 дней при повы-



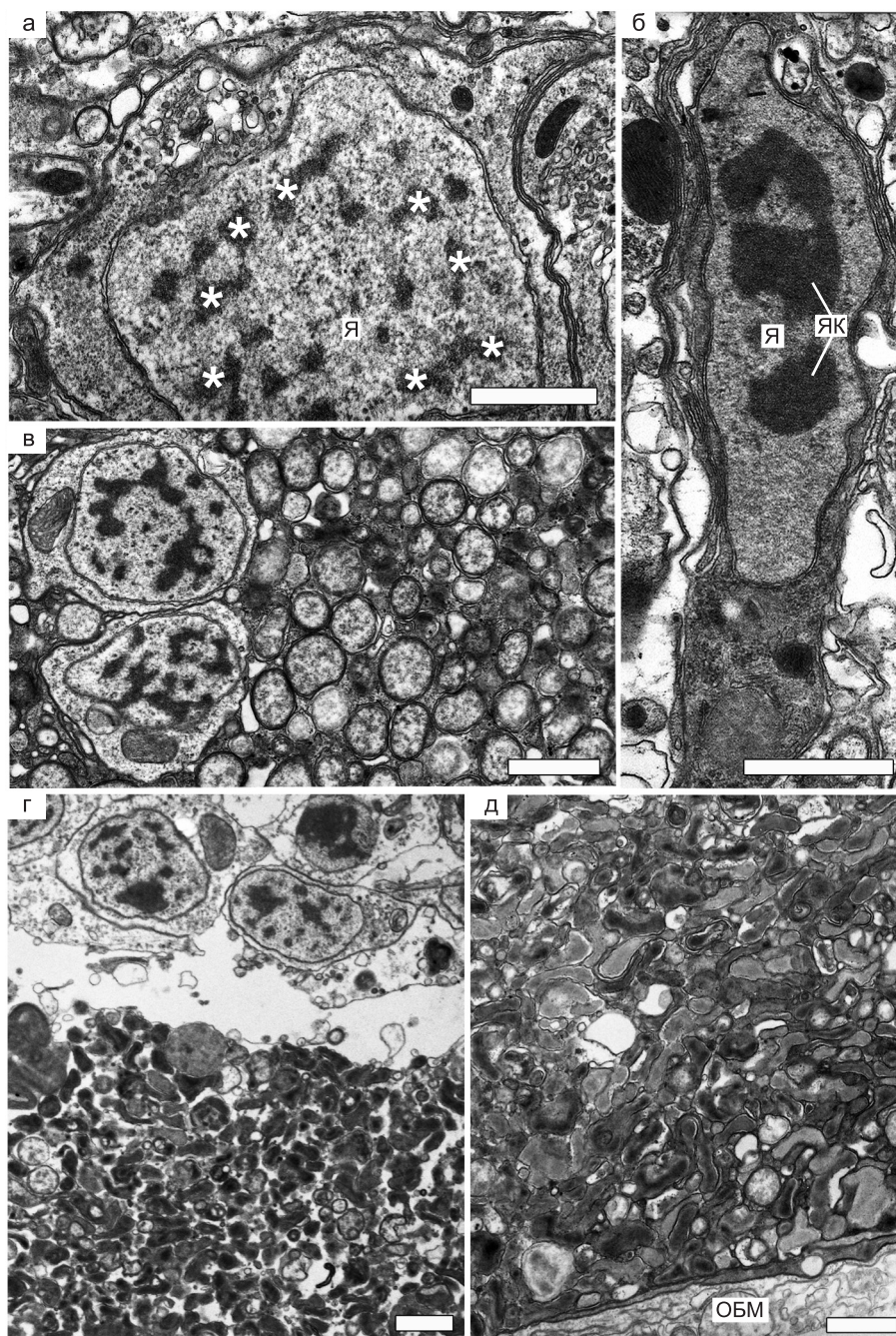
**Рис. 5.** Ультраструктурная организация клеток центрального отдела мозга мух и распределение бактерий в этих клетках при предварительной обработке 29 °С в течение 7 дней и последующем переносе в 16 °С.

а, б – незараженные бактериями тело нейрона и клетка глии соответственно; в, г – распределение бактерий в теле нейрона (в) и клетке глии (г); звездочками обозначены межклеточные полости; д – скопление бактерий в виде электронно-плотных структур; е – увеличенное изображение двух электронно-плотных структур. Я – ядро, ЯК – ядрышко, СГ – секреторные гранулы, Б – бактерии. Масштаб – 1 мкм.



шенной температуре и последующем их содержании при температуре 16 °С ультраструктура клеток мозга почти не изменяется (рис. 6, а, б), хотя в ядрах нейронов появляются многочислен-

ные глыбки компактного хроматина (рис. 6, а). Бактерии образуют большие скопления, занимающие пространство нескольких клеток, в основном нейронов (рис. 6, в). Помимо типичных



**Рис. 6.** Ультраструктурная организация клеток центрального отдела мозга мух и распределение бактерий в этих клетках при предварительном содержании мух при температуре 29 °С в течение 13 дней с последующим их содержанием при температуре 16 °С.

а, б – незараженные бактериями тело нейрона и клетка глии соответственно; белыми звездочками обозначены глыбки компактного хроматина; в – распределение бактерий в теле нейрона; г, д – большие скопления бактерий в виде электронно-плотных структур выходят под оболочку мозга; Я – ядро, ЯК – ядрышко, ОБМ – оболочка мозга. Масштаб – 1 мкм.

скоплений бактерий, часто встречаются крупные скопления электронно-плотных структур, которые обнаруживаются также под оболочкой мозга *D. melanogaster* (рис. 6, г, д). Кроме того, в этой области выявляются фрагменты разрушенных клеток.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Жизнеспособность эктотермных животных значительно зависит от температурных условий (Precht *et al.*, 1973; Cossins, Bowler, 1987). В окружающей среде организмы испытывают ежедневные флуктуации температур, часто с амплитудой более, чем 10 °С. В природе животное, попав в стрессовые условия, обычно стремится покинуть их как можно быстрее, поэтому воздействие определенной температуры происходит лишь кратковременно. Оптимальная температура развития *D. melanogaster* составляет 22 °С. При ее повышении сроки развития мух сокращаются и достигают минимума (8–9 дней) при 29 °С. Было показано, что жизнеспособность *D. melanogaster* стабильна при температуре от 14 до 26 °С и падает до нуля при снижении температуры до 10 °С или увеличении до 33 °С (Petavy *et al.*, 2001). Постоянное содержание *D. melanogaster w1118*, инфицированных *Wolbachia* штамма wMelPop, при 29 °С вызывает снижение их ПЖ примерно в 2 раза по сравнению с ПЖ при температуре 25 °С (Min, Benzer, 1997). В то же время при пониженной температуре 16 °С мухи этой линии живут примерно в 3 раза дольше по сравнению с их ПЖ при температуре 25 °С (Вайсман и др., 2009). Таким образом, температура 29 °С является стрессовой, но не критической для *D. melanogaster* и снижает их ПЖ, а температура 16 °С входит в диапазон стабильной температуры для жизнеспособности мух и замедляет их метаболизм, приводя к увеличению ПЖ в сравнении с оптимальной температурой 20–25 °С. Результаты нашего исследования показали, что перенос *D. melanogaster* в условия пониженной температуры 16 °С может частично или полностью восстанавливать ПЖ неинфицированных бактериями *D. melanogaster w1118*, которые до этого содержались при температуре 29 °С. Полное восстановление ПЖ происходит при содержании мух при повышенной температуре в первые три дня после вылета имаго включитель-

но. При воздействии температурой 29 °С дольше указанного периода происходит постепенное снижение выживаемости при температуре 16 °С. С помощью электронной микроскопии нами было установлено, что при любом температурном режиме содержания неинфицированных мух нервные клетки имеют типичную морфологию, что не противоречит вышеперечисленным данным о стабильной жизнеспособности мух при температуре 16 °С и некритическом действии температуры 29 °С.

В случае симбиотической ассоциации необходимо учитывать воздействия температуры отдельно на каждого из симбионтов, а также на их взаимоотношения в целом. Известно, что даже незначительные температурные изменения могут воздействовать на устойчивость хозяина к инфекционному агенту, а также влиять на вирулентность и размножение паразита (Thomas, Blanford, 2003). Например, в холодных условиях окружающей среды грибковый патоген *Entomophaga grylli* действует как смертельный фактор на популяцию кузнечиков *Zonocerus variegatus*. Однако в солнечные дни при увеличении температуры даже на 2 °С инфицированный хозяин восстанавливается от болезни и создает устойчивую группу особей (Chapman, Page, 1979). Показано, что повышенная температура (30–33 °С) элиминирует *Wolbachia* из организма двухточечного паутиного клеща *Tetranychus urticae* (van Orijnen, Breeuwer, 1999) и значительно сокращает титр бактерий у москитов *Aedes albopictus* (Wiwatanaratnabutr, Kittayapong, 2009). А у *D. melanogaster*, инфицированных *Wolbachia* штамма wMelPop, она приводит к активной пролиферации бактерий и преждевременной гибели хозяина (Min, Benzer, 1997). Пониженные температуры (12 °С) способствуют элиминации бактерий *Wolbachia* у паразитических ос *Trichogramma* (Pintureau *et al.*, 2003). Также было показано, что у наездников *Nasonia vitripennis* при 18 °С снижается титр *Wolbachia* на 65 % по сравнению с количеством бактерии, выявляемым при 25 °С (Bordenstein S.R., Bordenstein S.R., 2011).

Согласно нашим данным, постоянное содержание инфицированных штаммом wMelPop *D. melanogaster* при 16 °С не приводит к элиминации бактерий из организма хозяина. Несмотря на значительное увеличение средней



ПЖ инфицированных мух при пониженной температуре по сравнению со средней ПЖ при 25 °С, негативное влияние *Wolbachia* на выживаемость сохраняется. Этот результат противоречит данным, полученным ранее (Вайсман, 2009), которые демонстрируют, что мухи аналогичной инфицированной линии жили дольше неинфицированной. Наши данные показали, что средняя ПЖ инфицированных wMelPop мух при 16 °С постепенно падает с увеличением времени содержания при 29 °С. *Wolbachia* относятся к мезофильным бактериям, для которых оптимальной температурой для размножения считается 37 °С, хотя деление/размножение бактерий может идти в широком температурном диапазоне: от 22 до 42 °С (Кашнер, 1981). Температура 29 °С не является оптимальной температурой роста для мезофильных бактерий, но ее длительное воздействие, вероятно, приводит к постепенному увеличению скоплений бактерий. С помощью электронно-микроскопического анализа клеток мозга мух нами были обнаружены большие скопления бактерий, начиная с 7-го дня воздействия повышенной температурой. К 13-му дню экспозиции инфицированных мух количество крупных скоплений возрастает и появляются агрегаты электронно-плотных структур, предположительно, гибнущих бактерий. Аналогичные структуры в клетках мозга *D. melanogaster* w1118, содержащихся длительное время при 29 °С, были обнаружены ранее другой группой (Min, Benzer, 1997). Появление электронно-плотных образований в цитоплазме клеток было описано у нематод *Dirofilaria immitis*, инфицированных *Wolbachia*, и, по мнению W.J. Kozek (2005), эти структуры представляют собой одну из стадий размножения эндосимбионтов. Однако в другой работе было показано, что такие изменения морфологии бактерий являются показателями постепенной деградации эндосимбионтов (Hayes, Burgdorfer, 1982). Совокупность вышеперечисленных данных и наших исследований позволяет считать, что электронно-плотные структуры являются гибнущими бактериями *Wolbachia*. Причин гибели симбионтов может быть несколько. Одна из них – множественные разрушения клеток мозга и выход активно размножающихся при длительном воздействии повышенной температурой бактерий в межклеточное пространство. *Wolbachia*

являются внутриклеточными симбионтами и могут существовать вне клетки хозяина лишь несколько дней (Rasgon *et al.*, 2006). В мозге мух, содержащихся при температуре 16 °С, после 13 дней воздействия температурой 29 °С нами были зарегистрированы большие скопления гибнущих бактерий, вышедших из разрушенных клеток под оболочку мозга. Поскольку в ткани мозга встречаются также большие скопления *Wolbachia* типичной морфологии, можно предположить, что они представляют собой новообразованные конгломераты, а электронно-плотные скопления сформировались ранее и уже начинают разрушаться. Второй причиной может быть слишком большое скопление бактерий, что приводит к недостатку питательных веществ, необходимых для микроорганизмов, и постепенной их деградации.

Таким образом, в данной работе впервые проведена сравнительная оценка различных периодов воздействия повышенной температурой на выживаемость *D. melanogaster* w1118, инфицированных и неинфицированных патогенным штаммом *Wolbachia*. Пониженная температура не элиминирует *Wolbachia* штамма wMelPop из организма хозяина и увеличивает среднюю ПЖ *D. melanogaster* по сравнению с 25 °С. Данные популяционного и электронно-микроскопического анализа позволяют выделить критический период (7–13 дней) воздействия повышенной температурой, после которого происходит снижение выживаемости мух при температуре 16 °С, сопровождающееся образованием в ткани мозга больших скоплений деградирующих бактерий. Замедленный вывод продуктов деградации бактерий из ограниченного пространства в ткани мозга, вероятно, вызывает гибель клеток, что приводит к общему снижению жизнеспособности насекомого. Существенное снижение выживаемости мух и образование конгломератов электронно-плотных структур свидетельствуют о том, что разрушающиеся бактерии являются главным фактором, снижающим продолжительность жизни мух.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность М.В. Жуковой за плодотворное обсуждение полученных в данной работе результатов. Работа выполнена

при финансовой поддержке интеграционного проекта Программы Президиума РАН «Динамичность генофондов, генотипическая и фенотипическая изменчивость в популяции» № 30.33.

## ЛИТЕРАТУРА

- Вайсман Н.Я., Илинский Ю.Ю., Голубовский М.Д. Популяционно-генетический анализ продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*: сходные эффекты эндосимбионта *Wolbachia* и онкосупрессора *lgl* в условиях температурного стресса // Журн. общ. биологии. 2009. Т. 70. № 5. С. 438–447.
- Кашнер Д. Жизнь микробов в экстремальных условиях. Л.: Мир, 1981. 522 с.
- Жукова М.В., Воронин Д.А., Киселева Е.В. Изменение ультраструктуры симбиотических бактерий *Wolbachia* в яичниках и ранних эмбрионах *Drosophila* под влиянием повышенной температуры // Цитология. 2008. Т. 50. № 12. С. 1050–1060.
- Bordenstein S.R., Bordenstein S.R. Temperature affects the tripartite interactions between bacteriophage WO, *Wolbachia*, and cytoplasmic incompatibility // PLoS One. 2011. V. 6. e29106.
- Chapman R.F., Page W.W. Factors affecting the mortality of the grasshopper, *Zonocerus variegatus*, in Southern Nigeria // J. Anim. Ecol. 1979. V. 48. P. 271–288.
- Clark M.E., Anderson C., Cande J., Karr T.L. Widespread prevalence of *Wolbachia* in laboratory stocks and the implications for *Drosophila* research // Genetics. 2005. V. 170. P. 1667–1675.
- Cossins A., Bowler K. Temperature Biology of Animals. London: Chapman and Hall, 1987. 339 p.
- Dobson S.L., Bourtzis K., Braig H.R. *et al.* *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues // Insect. Biochem. Mol. Biol. 1999. V. 29. P. 153–160.
- Hayes S.F., Burgdorfer W. Reactivation of *Rickettsia rickettsii* in *Dermacentor andersoni* ticks: an ultrastructural analysis // Infect. Immun. 1982. V. 37. P. 779–785.
- Kozek W.J. What is new in the *Wolbachia/Dirofilaria* interaction? // Vet. Parasitol. 2005. V. 133. P. 127–132.
- Loesel R., Nässel D.R., Strausfeld N.J. Common design in a unique midline neuropil in the brains of arthropods // Arthropod Struct. Dev. 2002. V. 31. P. 77–91.
- McGraw E.A., Merritt D.J., Droller J.N., O'Neill S.L. *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host // Proc. Natl Acad. Sci. US. 2002. V. 99. P. 2918–2923.
- Min K.T., Benzer S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 10792–10796.
- McMeniman C.J., Lane R.V., Cass B.N. *et al.* Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti* // Science. 2009. V. 323. P. 141–144.
- Moreira L.A., Iturbe-Ormaetxe I., Jeffery J.A. *et al.* A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium* // Cell. 2009. V. 139. P. 1268–1278.
- Petavy G., David J.R., Gilbert P., Moreteau B. Viability and rate of development at different temperatures in *Drosophila*: a comparison of constant and alternating thermal regimes // J. Therm. Biol. 2001. V. 26. P. 29–39.
- Pintureau B., Pizzol J., Bolland P. Effects of endosymbiotic *Wolbachia* on the diapause in *Trichogramma* hosts and effects of the diapause on *Wolbachia* // Entomol. Exp. Appl. 2003. V. 106. P. 193–200.
- Precht H.J., Christophersen H., Hensel H., Larcher W. Temperature and Life. Berlin: Springer-Verlag, 1973. 514 p.
- Rasgon J.L., Gamston C.E., Ren X. Survival of *Wolbachia pipientis* in cell-free medium // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 6934–6937.
- Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain for electron microscopy // J. Cell Biol. 1963. V. 17. P. 208–212.
- Serbus L.R., Casper-Lindley C., Landmann F., Sullivan W. The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions // Annu. Rev. Genet. 2008. V. 42. P. 683–707.
- Terasaki M., Runft L.L., Hand A.R. Changes in organization of the endoplasmic reticulum during *Xenopus* oocyte maturation and activation // Mol. Biol. Cell. 2001. V. 12. P. 1103–1116.
- Thomas M.B., Blanford S. Thermal biology in insect-parasite interactions // Trends Ecol. Evol. 2003. V. 18. No. 7. P. 344–350.
- van Opijnen T.V., Breeuwer J.A.J. High temperatures eliminate *Wolbachia*, a cytoplasmic incompatibility inducing endosymbiont, from the two-spotted spider mite // Exp. Appl. Acarol. 1999. V. 23. P. 871–881.
- Wiwatanaratnabutr I., Kittayapong P. Effects of crowding and temperature on *Wolbachia* infection density among life cycle stages of *Aedes albopictus* // J. Invertebr. Pathol. 2009. V. 102. P. 220–224.



**EFFECT OF ELEVATED TEMPERATURE  
ON THE SURVIVAL OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*  
INFECTED WITH A PATHOGENIC *WOLBACHIA* STRAIN**

**A.A. Strunov, Yu.Yu. Ilinskii, I.K. Zakharov, E.V. Kiseleva**

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: strunov.anton@gmail.com

**Summary**

The pathogenic *Wolbachia* strain wMelPop is detected in the central nervous system, muscles, and retina of *Drosophila melanogaster*. It reduces the host lifetime twofold. This fact makes it promising for control of insect pests and transmitters of human diseases. Any symbiotic association is exposed to various stress factors: starvation, heat, cold, etc., which affect the symbiont interaction significantly. This study considers the action of cold (16 °C) and heat (29 °C) on the survival and lifetime of *D. melanogaster* females infected by the *Wolbachia* strain wMelPop. The ultrastructure of brain cells and the bacterium distribution in them were studied. Longer (starting from three days) exposure of imagoes to elevated temperature reduces their lifetime. On day 7 of exposure to heat, electron-dense bodies appear in brain cells of the flies. They look like degrading bacteria. Their amount increases dramatically by day 13 of incubation at 29 °C. On the grounds of populational and EM analysis, we recognized the critical time of heat action: days 7–13 after the start of exposure. After that, the survival of *Drosophila melanogaster* decreases abruptly.

**Key words:** *Drosophila melanogaster*, pathogenic *Wolbachia* strain wMelPop, electron microscopy, elevated temperature.

УДК 575.2:582.542.1

## РЕОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА РАСТЕНИЙ В ХОДЕ АЛЛОПОЛИПЛОИДИЗАЦИИ

© 2013 г. А.Б. Щербань

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

Поступила в редакцию 20 марта 2013 г. Принята к публикации 6 мая 2013 г.

Рассмотрены молекулярно-генетические механизмы реорганизации генома растений в процессе аллополиплоидизации. Подчеркнута особая роль ранних генетических изменений, изучение которых проводилось с использованием уникальной модели синтетических аллополиплоидов. Обобщены данные о различных геномных изменениях на ранних стадиях аллополиплоидизации, включающих активацию мобильных элементов, хромосомные перестройки, эпигенетические и транскриптомные изменения и др. Отмечено важное значение этих изменений в формировании устойчивой организации аллополиплоидного генома, обеспечивающей эволюционный успех и распространенность аллополиплоидов среди высших растений.

**Ключевые слова:** аллополиплоидия, отдаленная гибридизация, высшие растения, мобильный элемент, полимеразная цепная реакция.

Синтетические аллополиплоиды растений являются уникальной моделью для изучения ранних стадий аллополиплоидизации, поскольку сравнение с материалом родителей дает возможность дискриминировать геномные изменения под действием аллополиплоидии от полиморфизмов внутри родительских видов. С использованием данной модели были получены доказательства ранних генетических изменений у таких объектов, как пшеница, рапс, хлопок, видов *Arabidopsis*, и при этом характер и масштаб изменений, а также время их появления отличались в зависимости от объекта. Генетические изменения в ходе аллополиплоидизации укладываются в концепцию «геномного шока», впервые предложенную Б. Мак-Клинтон (McClintock, 1984). Она же высказала идею об участии мобильных генетических элементов (МЭ) в ответе на стрессовые факторы, в частности, отдаленную гибридизацию.

### ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ, СВЯЗАННЫЕ С МОБИЛЬНЫМИ ЭЛЕМЕНТАМИ

Межвидовая гибридизация является стрессовым фактором, который может провоцировать транскрипцию и транспозицию МЭ (Comai *et al.*, 2000; Kashkush *et al.*, 2003; Parisod *et al.*, 2010). Накоплению инсерций МЭ в ходе аллополиплоидизации могут способствовать следующие процессы: 1) наличие «запасных» копий генов вызывает снижение давления отбора против инсерций, вызывающих негативный эффект (Matzke M.A., Matzke A.J., 1998); 2) эффект «бутылочного горлышка», связанный с редуцией размера популяции вновь образованного аллополиплоида, благоприятствует случайной фиксации нейтральных или умеренно негативных инсерций (Parisod *et al.*, 2010); 3) гибридизация между отдаленными геномами провоцирует «геномный шок», активирующий

МЭ и тем самым способствующий инсерционному мутагенезу (McClintock, 1984).

В ряде случаев были получены доказательства увеличения транспозиционной активности (пролиферации) уже в первых поколениях полиплоидных растений (Madlung *et al.*, 2005; Parisod *et al.*, 2009; Petit *et al.*, 2010; Sarilar *et al.*, 2013). Этот процесс затрагивал главным образом молодые и активные семейства МЭ с небольшой копийностью (Petit *et al.*, 2010; Sarilar *et al.*, 2013). В целом же пролиферация МЭ у аллополиплоидов носит строго избирательный характер и не приводит к общему взрыву транспозиционной активности (Kashkush *et al.*, 2003; Beaulieu *et al.*, 2009; Parisod *et al.*, 2009).

Более часто у аллополиплоидов наблюдалась элиминация специфических транспозон-ассоциированных ПЦР-фрагментов (ТА-фрагменты) того или другого родителя, что может быть связано с делецией соответствующих участков генома или с перестройками, затрагивающими сайты инсерции МЭ (Beaulieu *et al.*, 2009; Parisod *et al.*, 2009; Petit *et al.*, 2010). Как правило, эти делеции затрагивают либо отцовский, либо материнский геном, интенсивность их может сильно варьировать в зависимости от МЭ и его хромосомной локализации. Так, например, у синтетического *Nicotiana tabacum* ( $2n = 48$ ) наблюдалась элиминация ТА-фрагментов отцовского генома (Petit *et al.*, 2010), тогда как у аллотетраплоида *Spartina anglica* ( $2n = 124$ ) элиминировали фрагменты материнского происхождения (Parisod *et al.*, 2009). У синтетического аллотетраплоида *Brassica napus* ( $2n = 38$ ) неаддитивный профиль ТА-фрагментов характерен для транспозона *MITE*, локализованного в интерстициальных районах хромосом, тогда как перичентромерный ретротранспозон *Athila* характеризуется преимущественно аддитивным ТА-профилем (Sarilar *et al.*, 2013).

Со временем процессы дифференциальной пролиферации и элиминации МЭ могут приводить к значительной реорганизации генома. Например, у аллополиплоидов хлопчатника (*Gossypium*) разные семейства МЭ распространились из одного генома в другой после аллополиплоидизации (Zhao *et al.*, 1998), а у аллополиплоидов *Nicotiana*, образовавшихся около 1 млн лет назад, произошел существенный обмен МЭ между субгеномами (Lim *et al.*,

2007). Однако существуют и другие примеры. У природного аллотетраплоида *B. napus* (геном ААСС) не выявлено распространение САСТА-транспозона *Bot1*, специфичного для С-генома, на хромосомы А-генома (Alix *et al.*, 2008). Анализ различных семейств МЭ (транспозонов и ретроэлементов) у мягкой пшеницы *T. aestivum* ( $2n = 42$ ) также не выявил их обмена между субгеномами (Sergeeva *et al.*, 2010; Salina *et al.*, 2011; Щербань и др., 2012). В то же время в субгеномах *T. aestivum* происходили обширные делеции в результате неравного или незаконного кроссинговера между последовательностями МЭ, что указывает на важную роль последних в хромосомных реорганизациях под влиянием аллополиплоидии (Chantret *et al.*, 2005; Vento *et al.*, 2008). Модель незаконной рекомбинации с участием последовательностей МЭ рассматривается для объяснения факта делеции локуса *Hardness* в различных субгеномах полиплоидных пшениц (Chantret *et al.*, 2005).

Возникает вопрос: каким образом аллополиплоидный геном контролирует пролиферацию МЭ? Основную роль в активации/супрессии МЭ играют эпигенетические процессы, связанные с метилированием ДНК и модификацией гистоновых белков (Ng, Gurdon, 2008). Показано, что деметилирование ДНК обеспечивает транскрипцию белков, участвующих в процессах вырезания (копирования) и встраивания МЭ (Tsukahara *et al.*, 2009). Контролирующее влияние генома, приводящее к замолчанию (сайленсингу) МЭ, осуществляется благодаря участию малой интерферирующей РНК (миРНК) (Ha *et al.*, 2009). Предложена модель дозозависимого влияния миРНК на пролиферацию МЭ в ходе аллополиплоидизации. В результате гибридизации количество материнской миРНК в  $F_1$  зиготе недостаточно для полного контроля инсерций МЭ как материнского, так и отцовского происхождения. Редукция миРНК в  $F_1$  приводит к активации мобильных элементов и, как следствие, индукции генетической нестабильности, которая может обуславливать низкую фертильность аллополиплоида. Со временем стабильность генома восстанавливается благодаря увеличению экспрессии миРНК, участвующей в сайленсинге МЭ (Ha *et al.*, 2009).

Следует отметить, что не всегда транспозиционная активность коррелирует с уровнем

транскрипции МЭ. Так, у синтетических аллополиплоидов пшеницы (Kashkush *et al.*, 2002) и у межвидового гибрида арабидопсиса (Madlung *et al.*, 2005) было обнаружено усиление транскрипции МЭ, которое, однако, не приводило к увеличению числа транспозиций. Эпигенетические изменения, связанные с усилением (ослаблением) транскрипции МЭ, могут оказывать влияние на экспрессию соседних генов, приводя к функциональной реорганизации генных сетей и фенотипической изменчивости (Kashkush *et al.*, 2003; Slotkin, Martienssen, 2007).

И наконец, принимая во внимание высокую мутагенность МЭ, можно рассматривать их роль в качестве модификаторов, направляющих структурную дивергенцию генов-гомеологов в сторону суб- или неофункционализации (см. далее) (Walsh, 2003). Косвенным свидетельством этой роли служат следы инсерций МЭ в регуляторных и кодирующих районах у большинства известных генов растений. Были предложены различные механизмы участия МЭ в структурно-функциональной дивергенции генов (Bennetzen, 2005), однако остается неясной степень реализации этих механизмов у тех или иных аллополиплоидов.

Таким образом, быстрые изменения МЭ на ранних стадиях аллополиплоидизации согласуются с концепцией геномного шока и предполагают их роль в качестве индукторов генетической изменчивости на разных уровнях организации генома (McClintock, 1984; Comai *et al.*, 2003). Индукция генетической нестабильности может иметь негативные последствия для организма, поэтому в процессе эволюции происходит постепенное восстановление контролирующего влияния генома на пролиферацию МЭ, что выражается в их количественных, структурных и эпигенетических изменениях.

### ХРОМОСОМНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ

С использованием методов хромосомного окрашивания (GISH, FISH), генетического картирования и молекулярного анализа получены доказательства геномных перестроек как внутри, так и между отдельными субгеномами у аллополиплоидов (Leitch, Bennett, 1997; Wendel, 2000; Chen *et al.*, 2004; Bento *et al.*, 2008). Предполагается, что хромосомные изменения

способствуют становлению вновь образованных аллополиплоидов в качестве отдельных видов (Hegarty, Hiscock, 2005). Наряду с этим указанные изменения способствуют адаптации к резко меняющимся условиям внешней среды, поскольку только такие изменения могут обеспечивать «экстремальное» фенотипическое разнообразие (Hegarty, Hiscock, 2005).

На моделях синтетических полиплоидов было показано, что хромосомные реорганизации возникают сразу после объединения геномов или в течение нескольких поколений после гибридизации (Song *et al.*, 1995; Feldman *et al.*, 1997; Lukens *et al.*, 2006). Менее охарактеризованы более поздние реорганизации, приводящие к изменению числа хромосом и редукции размера генома (Leitch, Bennett, 2004; Lysak *et al.*, 2006). Большая часть хромосомных изменений происходит в ходе мейоза и опосредована механизмом гомологичной рекомбинации (Gaeta, Pires, 2010). Делеции, дубликации и транслокации возникают при восстановлении двуцепочечных разрывов (ДЦР) на одной нити ДНК (внутрихромосомная рекомбинация), по всему геному (эктопическая рекомбинация) либо между гомеологичными хромосомами (гомеологичная рекомбинация). У аллополиплоидов, в отличие от диплоидных растений, происходит изменение сценария мейоза, связанное с добавлением гомеологичных хромосом другого генома. Ограничение спаривания только гомологичными хромосомами достигается благодаря генетическому контролю со стороны локусов, контролирующих конъюгацию хромосом (Griffiths *et al.*, 2006). Тем не менее у большинства аллополиплоидов наблюдается смешанный тип мейоза, а именно: некоторые хромосомы образуют биваленты, тогда как другие склонны образовывать мультиваленты – «сегментная аллополиплоидия» (Stebbins, 1971). Мультиваленты, состоящие из гомео- и гомологичных хромосом, могут давать различные конфигурации в ходе метафазы: перекрещенные структуры, кольца и сцепленные хромосомы. Гомеологичные ассоциации наряду с паралогичными приводят к различным перестройкам хромосом, анеуплоидии и усложненным вариантам наследования признаков (Gaeta, Pires, 2010). Так, например, в геноме аллотетраплоида *B. napus* многие генетические локусы имеют 6 копий, тогда как предковые диплоидные виды содер-

жат по три паралогичных локуса, возникших в результате древних дупликаций. Большинство бивалентов, наблюдаемых у аллогамноидов этого вида в ходе мейоза, образуются между хромосомами-гомеологами, тогда как 30 % возникают внутри одного из субгеномов, по-видимому, в результате объединения хромосом, содержащих дублированные районы (Nicolas *et al.*, 2009). Однако данные по генетическим изменениям, возникающим в результате паралогичных ассоциаций хромосом, пока весьма ограничены. В то же время имеется много данных, касающихся генетических изменений в результате гомеологичных рекомбинаций (Gaeta, Pires, 2010). Так, у синтетических полиплоидов *B. napus* анализ рестрикционного полиморфизма фрагментов ДНК выявил как делеции, так и дубликации гомеологичных локусов (Parkin *et al.*, 1995; Pires *et al.*, 2004; Gaeta *et al.*, 2007). У недавно сформированных аллополиплоидов *Tragopogon* изменения генетических маркеров были в ряде случаев обусловлены гомеологичной рекомбинацией (Tate *et al.*, 2009). У аллополиплоидов *Nicotiana* и *Arabidopsis* различные изменения (делеции, амплификации, транслокации) в локусах генов, кодирующих рибосомальную РНК (гены рРНК, или рДНК), могли возникнуть в результате гомеологичной рекомбинации, конверсии и неравного кроссинговера (Pontes *et al.*, 2004; Kovarik *et al.*, 2008). Предполагается, что важную роль в реорганизации рДНК у аллотетраплоида *A. suecica* играли транспозон-опосредованные разрывы и рекомбинации хромосом (Pontes *et al.*, 2004). Следует отметить, что ряд синтетических полиплоидов, например, хлопчатника (Rong *et al.*, 2004), арабидопсиса (Comai *et al.*, 2000) проявляли мейотическую стабильность и, как следствие, имели низкую частоту анеуплоидии и хромосомных реорганизаций. Тем не менее у них был обнаружен высокий уровень фенотипической вариабельности, по-видимому, связанный с другими механизмами генетической изменчивости (Comai *et al.*, 2000).

### СТРУКТУРНАЯ ДИВЕРГЕНЦИЯ ГОМЕОЛОГИЧНЫХ ХРОМОСОМ

При рассмотрении влияния поведения хромосом в ходе мейоза на фертильность аллополиплоида предполагается, что фертильные

аллополиплоиды либо уже обладают определенным уровнем контроля над спариванием хромосом, либо приобретают этот контроль в ходе эволюции. В этой связи большое значение имеет структурная дивергенция хромосом-гомеологов, которая обеспечивает преимущественное спаривание гомологичных хромосом в ходе мейоза (Levy, Feldman, 2002). Свой вклад в структурную дивергенцию гомеологов могут вносить односторонняя элиминация и реорганизация повторяющихся последовательностей ДНК (Ozkan, Feldman, 2009).

Анализ различных межвидовых и межродовых гибридов *Aegilops* × *Triticum* показал, что элиминация ДНК происходит уже на ранних стадиях формирования аллополиплоида в F<sub>1</sub> и/или в первом поколении после хромосомного удвоения, при этом данный процесс является стабильно воспроизводимым и может захватывать до 15 % геномной ДНК (Ozkan *et al.*, 2001; Shaked *et al.*, 2001). Элиминация затрагивала главным образом только один из субгеномов у тетраплоидов и два субгенома у гексаплоидов и, как следствие, приводила к увеличению структурной дивергенции между хромосомами-гомеологами. Способность элиминировать часть ДНК положительно коррелировала с фертильностью гибридов и отрицательно коррелировала с частотой образования мультивалентов (Levy, Feldman, 2004). Наряду с изменением общего содержания ДНК у аллополиплоидов наблюдались количественные изменения в отдельных фракциях повторяющихся последовательностей. Так, значительная редукция повторяющейся субтеломерной последовательности Spelt1 была обнаружена в первом поколении искусственных амфиплоидов *Triticum*–*Aegilops*, при этом выявленные изменения не зависели ни от уровня пloidности, ни от направления скрещивания (Salina *et al.*, 2004). С использованием тех же амфиплоидов другие авторы показали, что примерно 70–90 % геном-специфичного тандемного повтора pGc1R-1a подверглись элиминации уже в S<sub>2</sub>–S<sub>3</sub> поколениях (Han *et al.*, 2005).

Другим физическим изменением, которое может влиять на структуру хроматина и, как следствие, на спаривание хромосом, является изменение степени метилирования ДНК. У синтетических аллополиплоидов пшеницы ука-



занные изменения затронули 13 % генетических локусов (Shaked *et al.*, 2001). Интересно, что у синтетического аллотетраплоида *A. suecica* были случаи, когда метилирование затрагивало только один из двух родительских геномов (Madlung *et al.*, 2002), что указывает на эпигенетическую супрессию одного из геномов (см. в следующем разделе).

В настоящий момент не ясны механизмы, лежащие в основе всех вышеуказанных изменений геномной ДНК у аллополиплоидов, тем не менее показано, что они приводят к стабилизации генотипа и повышению уровня фертильности, что является необходимым условием для становления аллополиплоидов в качестве новых видов.

### ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ТРАНСКРИПТОМНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ

К эпигенетическим изменениям, как известно, относят такие генетические изменения, которые могут стабильно поддерживаться на протяжении многих делений соматических клеток, но при этом не связаны с изменением первичной структуры ДНК (Ng, Gurdon, 2008). В рамках данного обзора будут рассмотрены транскрипционные механизмы, связанные с метилированием ДНК и модификациями гистоновых белков.

Одним из наиболее известных эпигенетических феноменов, наблюдаемых у аллополиплоидов, является «ядрышковое доминирование», или эпигенетическое подавление экспрессии генов рРНК в одном из субгеномов (Preuss, Pikaard, 2007). Ядрышковое доминирование возникает независимо от направления скрещивания, что указывает на отсутствие роли гаметного импринтинга. Направление доминирования не является случайным для каждой конкретной комбинации геномов, в то же время эффект доминирования является тканезависимым и определяется стадией развития и дифференцировки клеток (Chen, Pikaard, 1997). Участие эпигенетических механизмов в данном феномене подтверждается фактом дерепрессии рРНК генов у гибридов с помощью обработки ингибиторами ферментов, модифицирующих ДНК и гистоновые белки (Chen, Pikaard, 1997; Chen *et al.*, 1998; Lawrence *et al.*, 2004). Подхо-

ды обратной генетики позволили идентифицировать факторы модификации хроматина и раскрыть механизм ядрышковой супрессии, важную роль в котором играет миРНК (Chen, Pikaard, 1997; Preuss *et al.*, 2008). Последняя, как было показано выше, участвует также в сайленсинге транспозонов и повторяющихся последовательностей ДНК гетерохроматина (Lippman, Martienssen, 2004). Следует отметить, что в некоторых случаях, как, например, у синтетических аллополиплоидов пшеницы, была выявлена связь между подавлением транскрипции рДНК локусов и их делецией в первых поколениях после скрещивания (Shcherban *et al.*, 2008; Щербань и др., 2008).

При сравнительном анализе экспрессии генов у синтетических аллополиплоидов и соответствующих родителей были обнаружены два основных типа изменений генетической экспрессии: односторонняя экспрессия (как в случае доминирования генов рРНК) и неаддитивная экспрессия (когда суммарный уровень у гибрида не равен среднему значению уровней экспрессии у родителей) (Qi *et al.*, 2012). У синтетического аллогексаплоида пшеницы односторонний тип экспрессии был отмечен у 3 % генов-гомеологов, тогда как неаддитивный тип характерен для 16 % генов (Pumphrey *et al.*, 2009). У синтетического аллотетраплоида хлопчатника (AD-геном) 30 % гомеологичных генов проявляли односторонний паттерн экспрессии (A- или D-геном специфичный) на разных стадиях развития индивидуальных клеток волокна (Novav *et al.*, 2008). Большая часть этих генов проявляла D-геном специфичный паттерн экспрессии, что также характерно для природного аллотетраплоида. Односторонняя экспрессия гомеологов также обнаружена у аллополиплоидов арабидопсиса, сахарного тростника, у гибрида *Cucumis × hytivus* (Comai *et al.*, 2000; Mudge *et al.*, 2009; Zhuang, Chen, 2009). Во многих случаях было показано, что доминирование экспрессии одного из родителей имеет тканеспецифичный характер, т. е. зависит от органа, стадии развития, а также от воздействия биотического/ абиотического стресса (Adams *et al.*, 2004; Chaudhary *et al.*, 2009; Buggs *et al.*, 2010; Dong, Adams, 2011).

Было показано, что в основе транскриптомных изменений у аллополиплоидов лежат эпиге-

нетические механизмы, связанные с метилированием ДНК (Shaked *et al.*, 2001; Madlung *et al.*, 2002). Так, обработка растений 5-азациитидином (ингибитор ДНК-метилтрансферазы) приводила к появлению большого спектра фенотипических отклонений у синтетического аллотетраплоида *Arabidopsis suecica* по сравнению с родительскими видами (Madlung *et al.*, 2002). Это указывает на важное значение эпигенетических механизмов в поддержании баланса генов и их продуктов в ходе развития полиплоидного растения. Однако не всегда эпигенетические изменения обуславливают изменения экспрессии генов. У хлопчатника не выявлены изменения спектров метилирования ДНК, которые бы объясняли особенности экспрессии гомеологичных генов в составе природных и синтетических аллополиплоидов этого вида (Liu *et al.*, 2001). Это различие между арабидопсисом и хлопчатником указывает на отсутствие универсального механизма, контролирующего экспрессию генов у аллополиплоидов; по-видимому, для каждого вида характерно специфическое сочетание генетического и эпигенетического регуляторных механизмов (Chaudhary *et al.*, 2009).

### СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ДИВЕРГЕНЦИЯ ГОМЕОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ

Три основных пути определяют эволюцию гомеологичных генов с момента возникновения аллополиплоида (Adams, Wendel, 2005; Chaudhary *et al.*, 2009). Первый путь – субфункционализация, или разделение первоначальной функции между дублированными генами, при этом они функционально комплементируют друг друга. Данный феномен характерен для ранних стадий формирования аллополиплоидов и приводит к сохранению значительного числа генов в дублированном состоянии (Chaudhary *et al.*, 2009). Процесс субфункционализации преобладает над процессом элиминации гомеологичных генов, который является довольно редким (Grover *et al.*, 2007). В ходе дальнейшей эволюции аллополиплоида один из дублированных генов может приобрести новую функцию в результате неофункционализации. Наиболее ранние проявления неофункционализации в ходе формирования аллополиплоида

были обнаружены у синтетического хлопчатника (Chaudhary *et al.*, 2009). В этой работе уже в F<sub>1</sub> поколении было зафиксировано появление принципиально новых паттернов экспрессии у 15 генов. В эволюционной перспективе процесс неофункционализации так же, как в случае первого пути, приводит к сохранению обеих копий генов, но при этом накопление мутаций приводит к их постепенной дивергенции друг относительно друга. Исходя из этого следует предполагать, что наиболее ранними являются события субфункционализации генов и с возрастом аллополиплоида возрастает вероятность их неофункционализации (Adams, Wendel, 2005). Частным случаем неофункционализации является «уход от адаптивного конфликта», или разделение двух разных функций исходного гена между его копиями, хотя некоторые авторы рассматривают этот механизм как отдельный (Hittinger, Carroll, 2007; Des Marais, Rausher, 2008). И наконец, третий путь эволюции гомеологичных генов – это псевдофункционализация (когда один из генов теряет какую-либо функцию, превращаясь в псевдоген) (Adams, Wendel, 2005; Chaudhary *et al.*, 2009).

Скорость структурно-функциональной дивергенции генов-гомеологов в ходе аллополиплоидизации значительно варьирует в зависимости от вида. У недавно сформированного аллополиплоида *Tragopogon* субфункционализация целого ряда генов произошла в течение 80 лет (Buggs *et al.*, 2010). У межвидового гибрида арабидопсиса 5–6 % генов проявляли неаддитивный паттерн экспрессии (Wang *et al.*, 2006). Изменения паттернов экспрессии в природном аллотетраплоиде хлопчатника, возникшем 1–2 млн лет назад, произошли у 25 % гомеологичных генов (Adams *et al.*, 2003). В составе аллогексаплоидной пшеницы *T. aestivum* половина гомеологичных генов подверглась структурно-функциональным изменениям в течение 10 млн лет эволюции, а процесс псевдофункционализации завершился в течение 45–50 млн лет (Pont *et al.*, 2011). Рис (*Oryza sativa*) как пример палеополиплоида показал изменения экспрессии 88–96 % генов в течение 50–70 млн лет (Throude *et al.*, 2009). Таким образом, аллополиплоидизация уже на ранних стадиях индуцирует быстрые изменения экспрессии у большого числа генов, что приводит к ремо-

делированию генных сетей и создает основу для структурно-функциональной дивергенции генов, обеспечивающей широкую адаптацию полиплоидных растений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование уникальной модели синтетических аллополиплоидов позволило установить, что уже на ранних стадиях формирования аллополиплоида происходят: хромосомные реорганизации (Song *et al.*, 1995; Feldman *et al.*, 1997; Wendel, 2000; Chen *et al.*, 2004; Bento *et al.*, 2008), изменения паттерна метилирования ДНК (Shaked *et al.*, 2001; Madlung *et al.*, 2002; Beaulieu *et al.*, 2009), активация мобильных генетических элементов (Comai *et al.*, 2000; Kashkush *et al.*, 2003; Parisod *et al.*, 2010) и изменения транскриптома (Adams *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Pumphrey *et al.*, 2009; Gaeta *et al.*, 2010). Все эти изменения обеспечивают стабилизацию генотипа аллополиплоида, восстановление его фертильности и расширение адаптационного потенциала, что позволяет осваивать новые экологические ниши и обуславливает эволюционный успех полиплоида в конкуренции с диплоидными видами.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (проект 6.14).

## ЛИТЕРАТУРА

- Щербань А.Б., Адонина И.Г., Салина Е.А. Вклад *Ty3-gypsy* ретроинверсии *Lila* в специфичность D-генома мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. // Молекуляр. биология. 2012. Т. 46. С. 584–593.
- Щербань А.Б., Сергеева Е.М., Бадаева Е.Д., Салина Е.А. Анализ изменений 5S рДНК у синтетических аллополиплоидов *Triticum* × *Aegilops* // Молекуляр. биология. 2008. Т. 42(4). С. 604–611.
- Adams K.L., Cronn R., Percifield R., Wendel J.F. Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 4649–4654.
- Adams K.L., Percifield R., Wendel J.F. Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid // Genetics. 2004. V. 168. P. 2217–2226.
- Adams K.L., Wendel J.F. Polyploidy and genome evolution in plants // Curr. Opin. Plant Biol. 2005. V. 8. P. 135–141.
- Alix K., Joets J., Ryder C.D. *et al.* The *CACTA* transposon *Bot1* played a major role in *Brassica* genome divergence and gene proliferation // Plant J. 2008. V. 56. P. 1030–1044.
- Beaulieu J., Jean M., Belzile F. The allotetraploid *Arabidopsis thaliana* – *Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea* as an alternative model system for the study of polyploidy in plants // Mol. Genet. Genomics. 2009. V. 281. P. 421–435.
- Bennetzen J.L. Transposable elements, gene creation and genome rearrangement in flowering plants // Curr. Opin. Genet. Develop. 2005. V. 15. P. 621–627.
- Bento M., Pereira H.S., Rocheta M. *et al.* Polyploidization as a retraction force in plant genome evolution: sequence rearrangements in *Triticale* // PLoS ONE. 2008. V. 3. e1402.
- Buggs R.J., Elliott N.M., Zhang L. *et al.* Tissue-specific silencing of homeologs in natural populations of the recent allopolyploid *Tragopogon mirus* // New Phytol. 2010. V. 186. P. 175–183.
- Chantret N., Salse J., Sabot F. *et al.* Molecular basis of evolutionary events that shaped the *Hardness* locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *Aegilops*) // Plant Cell. 2005. V. 17. P. 1033–1045.
- Chaudhary B., Flagel L., Stupar R.M. *et al.* Reciprocal silencing, transcriptional bias and functional divergence of homeologs in polyploid cotton (*Gossypium*) // Genetics. 2009. V. 182. P. 503–517.
- Chen Z.J., Comai L., Pikaard C.S. Gene dosage and stochastic effects determine the severity and direction of uniparental rRNA gene silencing (nucleolar dominance) in *Arabidopsis* allopolyploids // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 14891–14896.
- Chen Z.J., Pikaard C.S. Transcriptional analysis of nucleolar dominance in polyploid plants: biased expression/silencing of progenitor rRNA genes is developmentally regulated in *Brassica* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 3442–3447.
- Chen Z., Wang J., Tian L. *et al.* The development of an *Arabidopsis* model system for genome-wide analysis of polyploidy effects // Biol. J. Linn. Soc. 2004. V. 82. P. 689–700.
- Comai L., Madlung A., Josefsson C., Tyagu A. Do the different parental ‘heteronomes’ cause genomic shock in newly formed allopolyploids? // Phil. Trans. Roy. Soc. London. 2003. Ser. B. Biological Sciences. V. 358. P. 1149–1155.
- Comai L., Tyagi A.P., Winter K. *et al.* Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids // Plant Cell. 2000. V. 12. P. 1551–1568.
- Des Marais D.L., Rausher M.D. Escape from adaptive conflict after duplication in an anthocyanin pathway gene // Nature. 2008. V. 454. P. 762–765.
- Dong S.W., Adams K.L. Differential contributions to the transcriptome of duplicated genes in response to abiotic stresses in natural and synthetic polyploids // New Phytol. 2011. V. 190. P. 1045–1057.
- Feldman M., Liu B., Segal G. *et al.* Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes // Genetics. 1997. V. 147. P. 1381–1387.
- Gaeta R., Pires J. Homoeologous recombination in allopolyploids: the polyploid ratchet // New Phytol. 2010. V. 186. P. 18–28.
- Gaeta R.T., Pires J.C., Iniguez-Luy F. *et al.* Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype // Plant Cell. 2007. V. 19. P. 3403–3417.

- Griffiths S., Sharp R., Foote T.N. *et al.* Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat // *Nature*. 2006. V. 439. P. 749–752.
- Grover C.E., Kim H., Wing R.A. *et al.* Microcolinearity and genome evolution in the *AdhA* region of diploid and polyploid cotton (*Gossypium*) // *Plant J.* 2007. V. 50. P. 995–1006.
- Ha M., Lu J., Tian L. *et al.* Small RNAs serve as a genetic buffer against genomic shock in *Arabidopsis* interspecific hybrids and allopolyploids // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 17835–17840.
- Han F., Fedak G., Guo W., Liu B. Rapid and repeatable elimination of a parental genome-specific DNA repeat (pGc1R-1a) in newly synthesized wheat allopolyploids // *Genetics*. 2005. V. 170. P. 1239–1245.
- Hegarty M., Hiscock S. Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies // *New Phytol.* 2005. V. 165. P. 411–423.
- Hittinger C.T., Carroll S.B. Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch // *Nature*. 2007. V. 449. P. 677–681.
- Hovav R., Udall J.A., Chaudhary B. *et al.* Partitioned expression of duplicated genes during development and evolution of a single cell in a polyploid plant // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 6191–6195.
- Kashkush K., Feldman M., Levy A.A. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid // *Genetics*. 2002. V. 160. P. 1651–1659.
- Kashkush K., Feldman M., Levy A.A. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat // *Nat. Genet.* 2003. V. 33. P. 102–106.
- Kovarik A., Dadejova M., Lim Y.K. *et al.* Evolution of rDNA in *Nicotiana* allopolyploids: a potential link between rDNA homogenization and epigenetics // *Ann. Botany*. 2008. V. 101. P. 815–823.
- Lawrence R.J., Earley K., Pontes O. *et al.* A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance // *Mol. Cell*. 2004. V. 13. P. 599–609.
- Leitch I., Bennett M. Polyploidy in angiosperms // *Trends Plant Sci.* 1997. V. 2. P. 470–476.
- Leitch I.J., Bennett M.D. Genome downsizing in polyploid plants // *Biol. J. Linn. Soc.* 2004. V. 82. P. 651–663.
- Levy A.A., Feldman M. The impact of polyploidy on grass genome evolution // *Plant Physiol.* 2002. V. 130. P. 1587–1593.
- Levy A.A., Feldman M. Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization // *Biol. J. Linn. Soc.* 2004. V. 82. P. 607–613.
- Lim K.Y., Kovarik A., Matyasek R. *et al.* Sequence of events leading to near-complete genome turnover in allopolyploid *Nicotiana* within five million years // *New Phytol.* 2007. V. 175. P. 756–763.
- Lippman Z., Martienssen R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing // *Nature*. 2004. V. 431. P. 364–370.
- Liu F., Cui X., Horner H. *et al.* Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize // *Plant Cell*. 2001. V. 13. P. 1063–1078.
- Lukens L.N., Pires J.C., Leon E. *et al.* Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized *Brassica napus* allopolyploids // *Plant Physiol.* 2006. V. 140. P. 336–348.
- 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.
- Madlung A., Masuelli R.W., Watson B. *et al.* Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic *Arabidopsis* allotetraploids // *Plant Physiol.* 2002. V. 129. P. 733–746.
- Madlung A., Tyagi A.P., Watson B. *et al.* Genomic changes in synthetic *Arabidopsis* polyploids // *Plant J.* 2005. V. 41. P. 221–230.
- Matzke M.A., Matzke A.J. Polyploidy and transposons // *Trends Ecol. Evol.* 1998. V. 13. P. 241.
- McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge // *Science*. 1984. V. 226. P. 792–801.
- Mudge S.R., Osabe K., Casu R.E. *et al.* Efficient silencing of reporter transgenes coupled to known functional promoters in sugarcane, a highly polyploid crop species // *Planta*. 2009. V. 229. P. 549–558.
- Ng R.K., Gurdon J.B. Epigenetic inheritance of cell differentiation status // *Cell Cycle*. 2008. V. 7. P. 1173–1177.
- Nicolas S.D., Leflon M., Monod H. *et al.* Genetic regulation of meiotic cross-overs between related genomes in *Brassica napus* haploids and hybrids // *Plant Cell*. 2009. V. 21. P. 373–385.
- Ozkan H., Feldman M. Rapid cytological diploidization in newly formed allopolyploids of the wheat (*Aegilops-Triticum*) group // *Genome*. 2009. V. 52(11). P. 926–934.
- Ozkan H., Levy A.A., Feldman M. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group // *Plant Cell*. 2001. V. 13. P. 1735–1747.
- Parisod C., Alix K., Just J. *et al.* Impact of transposable elements on the organization and function of allopolyploid genomes // *New Phytol.* 2010. V. 186. P. 37–45.
- Parisod C., Salmon A., Zerjal T. *et al.* Rapid structural and epigenetic reorganization near transposable elements in hybrid and allopolyploid genomes in *Spartina* // *New Phytol.* 2009. V. 184. P. 1003–1015.
- Parkin I.A., Sharpe A.G., Keith D.J., Lydiat D.J. Identification of the A and C genomes of amphidiploid *Brassica napus* (oilseed rape) // *Genome*. 1995. V. 38. P. 1122–1131.
- Petit M., Guidat C., Daniel J. *et al.* Mobilization of retrotransposons in synthetic allotetraploid tobacco // *New Phytol.* 2010. V. 186. P. 135–147.
- Pires J.C., Zhao J., Schranz M.E. *et al.* Flowering time divergence and genomic rearrangements in resynthesized *Brassica* polyploids (Brassicaceae) // *Biol. J. Linn. Soc.* 2004. V. 82. P. 675–688.
- Pont C., Murat F., Confolent C. *et al.* RNA-seq in grain unveils fate of neo- and paleopolyploidization events in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Genome Biol.* 2011. V. 12. P. R119.
- Pontes O., Neves N., Silva M. *et al.* Chromosomal locus rearrangements are a rapid response to formation of the allotetraploid *Arabidopsis suecica* genome // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 18240–18245.
- Preuss S., Costa-Nunes P., Tucker S. *et al.* Multi-megabase silencing in nucleolar dominance results from siRNA-directed *de novo* DNA methylation recognized by specific



- methylecytosine binding proteins // *Mol. Cell.* 2008. V. 32. P. 673–684.
- Preuss S., Pikaard C.S. rRNA gene silencing and nucleolar dominance: insights into a chromosome-scale epigenetic on/off switch // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1769. P. 383–392.
- Pumphrey M., Bai J., Laudencia-Chingcuanco D. *et al.* Non-additive expression of homoeologous genes is established upon polyploidization in hexaploid wheat // *Genetics.* 2009. V. 181. P. 1147–1157.
- Qi B., Huang W., Zhu B. *et al.* Global transgenerational gene expression dynamics in two newly synthesized allohexaploid wheat (*Triticum aestivum*) lines // *BMC Biol.* 2012. V. 10. P. 3.
- Rong J., Abbey C., Bowers J.E. *et al.* A 3347-locus genetic recombination map of sequence-tagged sites reveals features of genome organization, transmission and evolution of cotton (*Gossypium*) // *Genetics.* 2004. V. 166. P. 389–417.
- Salina E.A., Numerova A.M., Ozkan H., Feldman M. Alterations in subtelomeric tandem repeats during early stages of allopolyploidy in wheat // *Genome.* 2004. V. 47. P. 860–867.
- Salina E.A., Sergeeva E.M., Adonina I.G. *et al.* The Ty3-gypsy group LTR retrotransposon *Fatima*: the impact on B-genome specificity of polyploid wheats // *BMC Plant Biol.* 2011. V. 11. P. 99.
- Sarilar V., Palacios P.M., Rousselet A. *et al.* Allopolyploidy has a moderate impact on restructuring at three contrasting transposable element insertion sites in resynthesized *Brassica napus* allotetraploids // *New Phytol.* 2013. doi: 10.1111/nph.12156.
- Sergeeva E.M., Salina E.A., Adonina I.G., Chalhoub B. Evolutionary analysis of the CACTA DNA-transposon *Caspar* across wheat species using sequence comparison and *in situ* hybridization // *Mol. Genet. Genomics.* 2010. V. 284. P. 11–23.
- Shaked H., Kashkush K., Ozkan H. *et al.* Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat // *Plant Cell.* 2001. V. 13. P. 1749–1759.
- Shcherban A.B., Badaeva E.D., Amosova A.V. *et al.* Genetic and epigenetic changes of rDNA in a synthetic allotetraploid *Aegilops sharonensis* × *Ae. umbellulata* // *Genome.* 2008. V. 51. P. 261–271.
- Slotkin R.K., Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome // *Nature Rev. Genet.* 2007. V. 8. P. 272–285.
- Song K.M., Lu P., Tang K.L., Osborn T.C. Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. P. 7719–7723.
- Stebbins G.L. Chromosomal evolution in higher plants. London, UK: Edward Arnold, 1971.
- Tate J.A., Symonds V.V., Doust A.N. *et al.* Synthetic polyploids of *Tragopogon miscellus* and *T. mirus* (Asteraceae): 60 years after Ownbey's discovery // *Amer. J. Bot.* 2009. V. 96. P. 979–988.
- Throude M., Bolot S., Bosio M. *et al.* Structure and expression analysis of rice paleo duplications // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. 1248–1259.
- Tsukahara S., Kobayashi A., Kawabe A. *et al.* Bursts of retrotransposition reproduced in *Arabidopsis* // *Nature.* 2009. V. 461. P. 423–426.
- Walsh B. Population-genetic models of the fates of duplicate genes // *Genetica.* 2003. V. 118. P. 279–294.
- Wang J., Tian L., Lee H.S. *et al.* Genome wide nonadditive gene regulation in *Arabidopsis* allotetraploids // *Genetics.* 2006. V. 172. P. 507–517.
- Wendel J.F. Genome evolution in polyploids // *Plant Mol. Biol.* 2000. V. 42. P. 225–249.
- Zhao X.P., Si Y., Hanson R.E. *et al.* Dispersed repetitive DNA has spread to new genomes since polyploid formation in cotton // *Genome Res.* 1998. V. 8. P. 479–492.
- Zhuang Y., Chen J.F. Changes of gene expression in early generations of the synthetic allotetraploid *Cucumis* × *hytivus* Chen et Kirkbride // *Genet. Res. Crop Evol.* 2009. V. 56. P. 1071–1076.

## THE REORGANIZATION OF PLANT GENOMES DURING ALLOPOLYPLOLIDISATION

A.B. Shcherban

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

### Summary

Molecular mechanisms governing plant genome reorganization in the course of allopolyploidization are reviewed. The special role of early genetic changes, which were studied by using a unique model of synthetic allopolyploids, is emphasized. The data on various genomic changes at early stages of allopolyploidization, including activation of mobile elements, chromosomal rearrangements, epigenetic and transcriptomic changes, etc., are summarized. We note that these changes provide evolutionary success of allopolyploids and their prevalence among higher plants due to formation of stable organization of the allopolyploid genome.

**Key words:** allopolyploids, remote hybridization, higher plants, mobile element, polymerase chain reaction.



УДК 633.16

## ЯЧМЕНЬ ГОЛОЗЕРНЫЙ: ПРОИСХОЖДЕНИЕ, РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

© 2013 г. А.В. Железнов<sup>1</sup>, Т.В. Кукоева<sup>2</sup>, Н.Б. Железнова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение  
Сибирский научно-исследовательский институт кормов Сибирского отделения  
Российской академии сельскохозяйственных наук, пос. Краснообск, Новосибирская область,  
Россия, e-mail: korma@online.nsc.ru;

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,  
e-mail: kukoeva@bionet.nsk.ru

Поступила в редакцию 27 февраля 2013 г. Принята к публикации 19 апреля 2013 г.

Рассмотрены вопросы происхождения и распространения голозерного ячменя (*Hordeum vulgare* L.), его химический состав и урожайность. Показано, что современные методы молекулярной биологии позволяют получать более глубокие знания по доместикационной истории и разнообразию голозерного ячменя, чем традиционные методы популяционной генетики. Подчеркнуто значение селекции для повышения урожайности голозерного ячменя, а, следовательно, для расширения его посевов. В этой связи рассмотрены методы и направления селекции. Для развития селекции голозерного ячменя большое значение имеет зародышевая плазма из стран Юго-Восточной Азии, Китая, Японии и других регионов. Поэтому сохранению этой зародышевой плазмы необходимо уделять пристальное внимание.

**Ключевые слова:** ячмень, голозерный ячмень, происхождение, урожайность, белок, селекция, вегетационный период, адаптация, признак, генетика.

Ячмень – одно из старейших хлебных растений, возделывается во всех земледельческих областях земного шара. Широкий ареал ячменя обусловлен многими ценными его качествами. Благодаря высокой адаптивной способности, его выращивают в самых крайних условиях: высоко в горах и на степных просторах, в условиях повышенного увлажнения или сухих степей. Ячмень – самая скороспелая и поэтому самая северная культура. Его посевы встречаются от 70° с.ш. до пустынь Сахары и поднимаются в горные районы Китая, Непала и Индии до 5 тыс. м над уровнем моря. Ячмень – важная продовольственная, кормовая и техническая культура. Ячменная крупа, мука и солод имеют лекарственное значение. Поэтому ячмень был важной зерновой культурой в древнем Египте, Месопотамии и Греции (Жуковский, 1964).

Огромный ареал и тысячелетия возделывания ячменя определили большое межвидовое и

внутривидовое разнообразие рода *Hordeum* L. Наибольший интерес представляют голозерные ячмени. В состав *H. vulgare* L. входят подвиды многорядного голозерного *convar. coeleste* и двурядного *convar. nudum* ячменя. У голозерного ячменя, как у пшеницы и ржи, цветковые чешуи отлетают от зерновок при обмолоте, поэтому зерно этих культур всегда чистое. Различные формы голозерного ячменя отличаются повышенным содержанием белка и незаменимых аминокислот, в первую очередь лизина. Некоторые формы имеют повышенный иммунитет к мучнистой росе (*Eresiphe graminis*). Голозерным ячменям Китая и Японии свойственна низкорослость. Даже в самых хороших условиях выращивания их высота не превышает 40–50 см. Голозерные крупнозерные, крупнокосые ячмени горного Дагестана выделяются своим высоким качеством и продуктивностью (Вавилов, 1965).

В России первым, кто обратил внимание на голозерные ячмени, был агроном Д.В. Федоров. Он пытался привлечь внимание сельскохозяйственной общественности к проблеме возделывания голозерных ячменей. Но она, к сожалению, так и не получила должного развития (Цит. по: Грязнов, 1996).

### ПРОИСХОЖДЕНИЕ ГОЛОЗЕРНОГО ЯЧМЕНЯ

Проблема происхождения культурных растений представляет большой интерес не только потому, что она является частью общебиологической проблемы видообразования и эволюции, но и потому, что она тесно связана с историей становления человеческой цивилизации. При обсуждении вопроса о происхождении культурных растений рассматриваются, как правило, три основные проблемы: место введения в культуру, время введения в культуру, ближайшие сородичи культурных растений.

Специальные исследования по происхождению голозерного ячменя не проводились. Эта проблема если и обсуждалась, то только в контексте происхождения ячменя в целом. Самые ранние упоминания о голозерном ячмене встречаются в документах, обнаруженных в Хузестане (раскопки Ali Kosh), где наряду с пленчатыми ячменями найдены шестирядные голозерные формы. Полученные с помощью радиоизотопного метода данные указывают на период 7900 лет до нашей эры. Таким образом, голозерный ячмень появился значительно позднее пленчатого ячменя, который произрастал в докерамический неолит (9700–9300 лет до новой эры) (Helback, 1959).

Что касается вопроса о первичном центре происхождения голозерного ячменя, то наиболее определенно этот вопрос решил Н.И. Вавилов. Разработанный им дифференциально-географический метод позволил установить, что центром формирования голозерных ячменей являются Восточная и Юго-Восточная Азия, Китай и прилегающие к нему страны. В пользу такого заключения говорит тот факт, что Юго-Восточная Азия является центром формирования не только голозерного ячменя, но и крупнозерных голых овсов, метельчатого проса (*Panicum miliacium*) с тонкими, легко обрубивающимися цветочными

пленками (Вавилов, 1965. С. 94). Вместе с тем Н.И. Вавилов не считал вопрос о географической локализации первичного окультуривания дикорастущего ячменя решенным, допуская возможность существования лишь одного такого центра (Ходьков, 1985). Более того, в работах Н.И. Вавилова (1957) можно видеть, какое большое значение он отводит странам Передней Азии (Турция, Сирия, Израиль, Иордания, Месопотамия, Закавказье) в процессах эволюции культурного и дикого ячменя. При использовании ДНК-маркеров было показано, что Гималаи могут рассматриваться как возможный центр доместикации голозерного ячменя (Badr *et al.*, 2000). Обособленность гималайских голозерных ячменей была подтверждена в работе Dickin с соавт. (2012). Эти авторы провели многомерный анализ агрономических признаков, который позволил сгруппировать изучаемые образцы в соответствии с регионами их происхождения. Гималайские местные линии образовали восточный и западный кластеры, что позволило рассматривать Гималаи как центр происхождения голозерного ячменя. Подтверждением тому также является работа Murphy и Witcombe (1986), в которой показано, что пленчатые и голозерные ячмени из Гималаев отличаются друг от друга по ряду признаков и что они просто сосуществуют в Гималаях. Однако разнообразие пленчатых ячменей гораздо больше, чем голозерных. Низкий уровень разнообразия гималайских голозерных ячменей объясняют влиянием генетического дрейфа или эффектом основателя, а высокий уровень разнообразия пленчатых ячменей – широкомасштабным культивированием для кормления животных и пивоварения (Manjunatha *et al.*, 2007). В отношении места происхождения голозерного ячменя существует еще одно представление, также основанное на данных молекулярного анализа маркеров, сцепленных с геном *nud*. Маркер sKT7, тесно связанный с *nud* локусом, имеет 4 аллеля: I, II, III и IV (Taketa *et al.*, 2004). Все 4 аллеля были найдены у дикого ячменя, тогда как аллель IV был обнаружен только у одного образца из юго-западного Ирана. Все пленчатые образцы имели аллели I, II или III, а все исследуемые образцы голозерного ячменя имели только аллель IV. На основе своих исследований авторы выдвинули предположение о том, что голозерный ячмень

имеет монофилетическое происхождение и был одомашнирован, вероятно, в юго-западном Иране. Отсюда он мигрировал в Центральную Азию. Это предположение совпадает с данными археологических раскопок, проведенных в Ali Kosh на территории юго-западного Ирана. Второе не менее важное заключение, сделанное этими исследователями, состоит в том, что голозерные формы и пленчатые формы одомашнированного ячменя произошли независимо от различных диких предков.

Наряду с гипотезой монофилетического происхождения существует гипотеза множественного независимого происхождения голозерного ячменя, основанная на морфологических наблюдениях. Она подразумевает появление голозерных ячменей независимо и в Эфиопии, и в Восточной Азии (Орлов, 1929; Helback, 1959).

Наиболее вероятным путем возникновения голозерного ячменя можно рассматривать возникновение мутации по гену, контролирующему пленчатость зерновки ячменя, с последующей дивергенцией пленчатых и голозерных форм. Естественный процесс возникновения голозерного ячменя был подтвержден экспериментально (Nybom, 1954; Киселева, 1977; Киселева, Солоненко, 1981; Murphy, Witcombe, 1986). Однако это не единственный способ возникновения признака голозерности у ячменя. Растения видов рода *Hordeum* могут спонтанно и искусственно скрещиваться с растениями других родов, например *Roegneria* и *Elytrigia* (Ходьков, 1985).

Допустив возможность появления голозерного ячменя мутационным путем, необходимо дать ответ на другой вопрос: появилась ли такая мутация у дикорастущего предка или у одомашнированного пленчатого ячменя? Решить этот вопрос на основе современных данных не представляется возможным. Необходимы дальнейшие исследования в этом направлении. Вместе с тем следует заметить, что Taketa с соавт. (2008) осуществили клонирование гена *Nud* и подтвердили монофилетическое происхождение голозерного ячменя.

В одной из своих работ Д. Харлан (1973) писал, что мы до абсурда мало знаем о сородичах ячменя. Перефразируя Д. Харлана, можно сказать, что мы очень мало знаем о происхождении ячменя. Сегодня это демонстрируют исследования, проведенные с помощью ДНК-

технологий. Расширение этих исследований может пролить свет на происхождение ячменя, в том числе и ячменя голозерного. Без познания общей картины эволюции рода *Hordeum* L. невозможно понять происхождение и историю доместикации отдельных частей этого рода.

## РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГОЛОЗЕРНОГО ЯЧМЕНЯ

Согласно обзору Takahashi (1955), голозерный ячмень распространен в мире довольно широко. Но в одних странах его посевы занимают 95 % площадей, отведенных под культуру ячменя, в других – только 50 % и меньше. Так, в странах Юго-Восточной и Центральной Азии выращивают только голозерный ячмень. В Китае, Корее и Японии голозерные и пленчатые ячмени выращиваются в равных пропорциях, т. е. по 50 % каждый. Однако в направлении с востока на запад площади, занимаемые голозерным ячменем, резко сокращаются, и он совсем не высевается в странах Нового Света. Такое распределение голозерного ячменя связано не только с естественными факторами, но и с человеческим фактором. В странах, где голозерный ячмень является важнейшим продуктом питания, он возделывается в широких масштабах. Больше того, он становится предметом селекционного улучшения. Например, в Италии, Нидерландах и Греции голозерный ячмень используется не только в качестве корма животным, но и для производства диетической ячменной муки и крупы и некоторых других продуктов. Поэтому в этих странах, хотя и в небольших масштабах, ведется селекционная работа с голозерным ячменем (Anisrkov, Krolevets, 2008). В России голозерный ячмень практически не выращивается. Однако, по сообщениям Э.Э. Гешеле (1956), в китайских хрониках было указано, что в конце XIII в. предки хакасов сеяли просо, пшеницу и ячмень, в том числе гималайский (голозерный). Интересные исторические данные о посевах гималайского ячменя в Сибири приводит в своей книге Н.А. Сурин (2011): «Сведения о посевах голозерного ячменя в Восточной Сибири относятся к началу XIX в. В эти годы среди посевов ячменя появился так называемый гималайский ячмень, который был впервые заимствован в 1826 г. вице-президентом Императорского Московского сель-

скохозяйственного общества С.И. Гагариным у австрийского герцога Иоанна. Автор данного сообщения Т.С. Бурнашов передал небольшое количество семян в Нерчинск и уведомил, что "гималайский ячмень посеялся в первых числах мая, и он оказался рослым и теперь уже колосится, кажется, он должен быть хорош. По снятии его я не премину поделиться им на первый случай в Камчатку, и при разведении в большем виде, хоть и во всю Сибирь". Отмечалось при этом "... Он не боится инеев, и, будучи оставлен мною в нашем крае до октября месяца, в первом году не вызяб; второе – не теряет семена как пшеница; третье – гнездится как рожь; четвертое – не требует для молотбы больше труда, нежели другие хлеба, что доказывает, что он не сыпуч". Как видно, уже в те далекие времена были известны слабые и сильные стороны голозерного ячменя.

### ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЗЕРНА

**Белки.** Преимущество голозерного ячменя над пленчатым по содержанию белка отмечалось во многих работах (Dziamba, Rachon, 1988; Goldenberg, Kvachadze, 1990; Oscarsson *et al.*, 1996). При изучении 49 образцов голозерного ячменя было установлено, что содержание белка у этих образцов варьировало от 14,6 до 17,0 %. В то же время содержание белка у пленчатых ячменей достигало только 13 % (Atanassov *et al.*, 1999a). Однако еще раньше было показано (Лукьянова и др., 1990), что содержание белка в зерне ячменя обусловлено генотипом, несмотря на большую фенотипическую изменчивость признака. Видимо, поэтому в определении содержания белка в зерне ячменя большое значение имеет происхождение образцов. Эти авторы обобщили огромный материал и дали сравнительную характеристику двурядных и шестирядных пленчатых и голозерных ячменей по содержанию белка и лизина. Они показали, что голозерные ячмени Японии содержат белка на 0,9 % больше, чем пленчатые ячмени, а голозерные ячмени Таджикистана уступали пленчатым на 0,5–1,6 %. Они также показали, что в пределах каждой изученной группы голозерного ячменя различного географического происхождения имеются образцы с повышенным и пониженным содержанием белка. Аналогичные закономерности были отмечены по содержанию лизина и некоторых

других незаменимых аминокислот (Трофимовская, 1972; Грязнов, 1996; Atanassov *et al.*, 1999a). Особенно рельефно превосходство голозерного ячменя по содержанию аминокислот показано в исследованиях ЗАО «Премикс» Тимашевского района Краснодарского края. Здесь содержание лизина в зерне голозерного ячменя составило 0,65 %, а в зерне пленчатого ячменя – 0,44 %. По содержанию аргинина и гистидина превышение показателей в голозерном ячмене больше на 28 %, чем в пленчатом ячмене. По содержанию лейцина и изолейцина голозерный ячмень превосходил пленчатый на 42,8 %. Сумма аминокислот в голозерном ячмене была выше на 52,4 %, чем в пленчатом ячмене и составила соответственно 16,4 и 10,7 % ([http://www.agroyug.ru/page/item/\\_id-637/13.01.2012](http://www.agroyug.ru/page/item/_id-637/13.01.2012)).

Белки ячменя неоднородны по своему составу и свойствам. Они состоят из белковых фракций, извлекаемых различными растворителями. Было найдено (Сичкарь, Иванов, 1958; Трофимовская, 1972), что большую часть белков ячменя составляет фракция гордеинов – от 15,6 до 46,4 % (среднее 34,4 %). Для сравнения скажем, что содержание альбуминов колеблется от 7,5 до 28,8 % (среднее 12,5 %), глобулинов – от 7,0 до 21,9 % (среднее 12,7 %), глютеинов – от 18,0 до 47,5 % (среднее 27,0 %). Методом электрофореза было показано, что фракции ячменя гетерогенны и состоят из компонентов, различающихся по своим физико-химическим свойствам, в том числе по электрофоретической подвижности. В частности, фракция гордеина состоит из 6–19 компонентов (Конарев и др., 1979). Электрофоретические спектры белков специфичны для сортов. Поэтому они использовались как маркеры для идентификации образцов (Doll, Brown, 1979; Shewry *et al.*, 1983), для анализа генетического разнообразия (Shewry, Mifflin, 1982; Heisel *et al.*, 1986; Roininen *et al.*, 1992) и исследования филогенетических связей между образцами различного эколого-географического происхождения (Moralejo *et al.*, 1994). Так, голозерные ячмени, полученные из трех разных генетических банков, значительно различались по гордеиновым спектрам (Atanassov *et al.*, 2001). Различия были установлены по четырем спектрам для D формы гордеинов, по 12 для C формы и по 13 для B формы, что свидетельствует о значительном полиморфизме



изучаемых коллекций. Описанный в статье полиморфизм гордеиновых спектров голозерного ячменя был аналогичен полиморфизму, наблюдаемому у пленчатых ячменей. Авторы считают, что изучение полиморфизма гордеинового локуса может оказать помощь селекционеру в поисках разнообразия источников зародышевой плазмы и оптимизации выбора родителей при скрещивании.

**Углеводы.** Известно, что углеводный комплекс ячменя включает крахмал (45–65 %), гемицеллюлозу (6–7 %), растворимые сахара (1,2–2,8 %), декстрины (2,7–4,2 %), гумми и слизи (6–8 %),  $\beta$ -D глюкан и пектиновые вещества (1,6–1,9 %) (Иванов, 1939). Все эти вещества оказывают положительное или отрицательное влияние на технологические свойства ячменя. Так, повышенное содержание крахмала увеличивает пивоваренную ценность ячменя, так как экстрактивные вещества солода состоят в основном из сахаров, образуемых из крахмала. В то же время избыточное содержание гемицеллюлозы и  $\beta$ -глюканов отрицательно влияет на пивоваренные свойства ячменя. Поэтому необходимы исследования по содержанию запасных веществ не только у пленчатых, но и голозерных ячменей. К сожалению, данных по химическому составу голозерных ячменей не так уж много. Только в одной работе (Anis'kov, Krolevets, 2008) мы нашли некоторые показатели, характеризующие содержание крахмала и жира у различных форм голозерного ячменя. Авторы этого исследования условно разделили весь экспериментальный материал на четыре группы в зависимости от содержания протеина: с низким (< 12 %), средним (12,1–14,0 %), высоким (14,1–17 %) и очень высоким содержанием протеина (> 17 %). Оказалось, что в трех первых группах разница в содержании крахмала между голозерными и пленчатыми формами была незначительной (0,5–1,5 %). Но в четвертой группе она составила 5,2 %. Это может быть свидетельством единства процессов синтеза запасных питательных веществ у ячменя. В целом указанные авторы пришли к заключению о том, что сорта голозерного ячменя превосходили по содержанию крахмала сорта пленчатого ячменя и что содержание крахмала у ячменя в сильной степени зависит от условий выращивания.

В отличие от пленчатого ячменя, голозер-

ный ячмень существенно богаче  $\beta$ -глюканом. В сухом веществе зерновки пленчатого ячменя содержится 4–8 %  $\beta$ -глюкана, а в зерновке голозерного ячменя содержится около 16 % этого углевода (Newman *et al.*, 1989).  $\beta$ -глюканы ингибируют синтез холестерина, поэтому голозерный ячмень может быть использован как возможный источник  $\beta$ -глюканов для лечения гиперхолестеринемии (Weber *et al.*, 1991; Berglung *et al.*, 1993).

**Жировые вещества** особого питательного значения не имеют, но они участвуют в сложных адсорбционных процессах, связанных с жизнедеятельностью клеток, и регулировании проницаемости их оболочек. Амплитуда изменчивости содержания жира в зерне ячменя небольшая и составляет 2–4 %. Сорта голозерного ячменя, как правило, содержат жира больше, чем пленчатые (Anis'kov, Krolevets, 2008).

## УРОЖАЙНОСТЬ

Сравнительное изучение урожайности голозерного и пленчатого ячменя, проведенное многими исследователями в разных странах, позволило сделать заключение о более низкой урожайности голозерного ячменя. На основе обобщенных данных, полученных от 93 экспериментальных станций Канады, урожайность голозерного ячменя составила только 88 % от урожайности пленчатого (Rossnagel *et al.*, 1981). На линиях пленчатого и голозерного ячменя, полученных в результате восьмикратного прерывистого беккроссирования голозерного образца пленчатым кормовым сортом, было установлено, что голозерные линии уступали пленчатым только на 6–8 % (Кирдогло и др., 1982).

При изучении коллекции голозерного ячменя в условиях Омской области было показано, что урожайность голозерного ячменя сорта Омский голозерный 1 была ниже на 8,4 %, чем урожайность стандартного сорта пленчатого ячменя Омский 88 (Anis'kov, Krolevets, 2008). Этими же авторами показано, что сорт голозерного ячменя Челябинский превысил урожайность стандартного сорта на 0,5 т (5,1 против 5,6 т/га). Многолетние оценки 54 коллекционных образцов голозерного ячменя позволили авторам сделать вывод о значительном разнообразии форм как по урожайности, так и по другим признакам.

По их данным, урожайность варьировала от 1,0 до 5,6 т/га.

В Красноярском НИИ сельского хозяйства также создан сорт голозерного ячменя Оскар, который имеет урожайность, равную урожайности стандартного пленчатого сорта Красноярский 80. В среднем за три года конкурсного испытания оба сорта сформировывали по 3,2 т/га (Сурин, 2011).

При обобщении результатов сравнительного изучения урожайности голозерного и пленчатого ячменей можно согласиться с заключением, что разрыв между урожайностью голозерного и пленчатого ячменя уменьшается (Bhatty, 1986). Причиной тому является повышение интенсивности селекционной работы с голозерными ячменями. Это заключение подтверждается и исследованиями Карабалыкской опытной станции, где получены линии голозерного ячменя, урожайность которых на 12,1–14,8 % выше, чем у пленчатого стандарта Медикум 85 (Грязнов, 1996).

Говоря об урожайности голозерного ячменя, необходимо отметить ее нестабильность и сильную зависимость от условий выращивания. А.Н. Бородыня и А.Н. Кадычegov (2009) провели оценку голозерных сортов ячменя в степной зоне Хакассии и определили вклад факторов в общую изменчивость урожайности. Оказалось, что фактор «год» почти на 70 % влиял на проявление признака «урожайность», сортовые различия, соответственно, только на 30 % определяли проявление этого признака.

#### ГЕНЕТИКА ПРИЗНАКА «ГОЛОЕ ЗЕРНО» ЯЧМЕНЯ

Геном ячменя состоит из 7 хромосом и, следовательно, из 7 групп сцепления. Различие между пленчатым и голозерным ячменем контролируется одним локусом. Пленчатая зерновка является доминантным признаком, а голая зерновка – рецессивным. Ген *nud*, контролирующий образование голого зерна, локализован на длинном плече хромосомы 7Н (Fedak *et al.*, 1972). Недавно было уточнено картирование гена *nud* (Kikuchi *et al.*, 2003). Оказалось, что он находится в районе (SCAR) КТ 2 и КТ 4 на расстоянии 0,3 сМ от проксимального и 1,2 сМ от дистального концов.

К настоящему времени выявлено появление полуголых зерновок ячменя. Они появляются под влиянием рецессивных генов полупленчатости (*smn*, *smn 2* и *sbn*). Их взаимодействие между собой и с главным геном пленчатости приводит к образованию полупленчатых зерновок ячменя (Гарис, 2008).

На основе позиционного клонирования сделано заключение, что структурная часть *nud* гена состоит из двух экзонов и одного интрона. Кроме того, был идентифицирован ERF (ethylene response factor) фактор, который регулирует биосинтез липидов. Так как фактор ERF является составляющей частью интрона, то предполагается, что ген *nud* осуществляет контроль биосинтеза липидов. Предполагаемый механизм образования пленчатой или голой зерновки у ячменя заключается в том, что рецессивный аллель *nud* не обеспечивает образования липидов на эпидермисе зерновки и, следовательно, не происходит склеивания цветковых чешуй, которые при обмолоте легко отделяются от зерновки. Доминантный аллель *Nud*, наоборот, контролирует образование липидов, которые принимают участие в склеивании цветковых чешуй и образовании пленчатого ячменя (Taketa *et al.*, 2008).

#### СЕЛЕКЦИЯ ГОЛОЗЕРНОГО ЯЧМЕНЯ

Целенаправленные исследования по созданию новых сортов голозерного ячменя проводятся в Японии, Китае, Италии, Швеции, Чехии, России, эпизодически – в Республике Беларусь и некоторых других странах. Имеются некоторые достижения в области создания новых сортов. Так, в Канаде выпущены сорта голозерного ячменя Scout и Tupper (1980 г.), Condor (1988 г.), Buck и Richard (1990 г.). В России в Государственный реестр селекционных достижений включены сорта голозерного ячменя Омский голозерный 1 (2004 г.), Омский голозерный 2 (2008 г.), Оскар (2007 г.). В Беларуси создан сорт голозерного ячменя Дублет, который проходит Государственное испытание (Цит. по: <http://innosfera.org/node/380>). В Казахском НИИ земледелия создан сорт Голозерный 20 (1980 г.). Хотя этот сорт не районирован в силу недостаточно высокой урожайности, он отличался повышенным накоплением белка в зерне,

большим сбором белка с 1 га посевов и более полноценным белком по сумме незаменимых аминокислот (Перуанская, Лебедева, 1980). Значительные успехи достигнуты также в Швейцарии, где в конце 1980-х гг. в официальный каталог внесено несколько сортов голозерного ячменя (Цит. по: Грязнов, 1996). Однако почти все сорта голозерного ячменя имеют целый ряд крупных недостатков, которые сдерживают его распространение:

- низкая адаптивная способность к меняющимся условиям среды, что влечет за собой нестабильность урожайности;

- низкая засухоустойчивость и устойчивость к полеганию;

- низкая устойчивость к грибным заболеваниям;

- выпячивание центрального зародышевого корешка за пределы сферы поверхности зерновки, что является причиной повышенного травматизма семян при обмолоте и, как следствие, пониженной их полевой всхожести.

Селекция голозерного ячменя должна быть направлена, прежде всего, на устранение указанных недостатков и увеличение его положительных свойств. Для достижения этих целей в селекционных центрах создаются программы по селекции голозерного ячменя. В программах описываются модели сортов в зависимости от их хозяйственного использования (пищевое, кормовое или лекарственное), определяются основные требования к создаваемым сортам. Например, известный советский селекционер А.Г. Быковец (1949) определил 24 требования к сортам голозерного ячменя, в том числе такие, как урожайность не ниже районированных сортов пленчатого ячменя; выравнивание урожая по годам; оптимальный вегетационный период; устойчивость к болезням и сельскохозяйственным вредителям; устойчивость к почвенной и атмосферной засухе, устойчивость против осыпания зерна.

Значительное место отведено исходному материалу, его оценке в различных условиях выращивания – на инфекционных и провокационных фонах, определению его разнообразия. Центральное место в программах занимают методы селекции. В большинстве случаев это внутривидовая гибридизация с привлечением пленчатых сортов ячменя. Это объясняется

тем, что пленчатые сорта более продвинуты с селекционной точки зрения и многие гены, контролирующие хозяйственно ценные признаки, находятся в геномах пленчатых сортов. В программах также прописываются схемы отбора и все остальные этапы селекционного процесса, вплоть до экологического, производственного сортоиспытания и передачи нового сорта на Государственное сортоиспытание.

Исходный материал является основой успеха селекции. Поэтому поискам исходного материала, его изучению уделяется особое место в селекционном процессе (Быковец, 1949; Atanassov *et al.*, 1999b, 2001; Manjunatha *et al.*, 2007; Пакуль, 2007; Anis'kov, Krolevets, 2008; Dickin *et al.*, 2012; Кукоева и др., 2012). Изучается большинство хозяйственных и биологических признаков, оцениваются границы их изменчивости, анализируется уровень их генетического разнообразия. Иными словами, проводится большая работа по фенотипированию коллекций.

Следующий этап в селекционном процессе – выбор метода создания селекционного материала, отвечающего в большей степени принятой модели сорта. В селекции ячменя наиболее часто применяется метод внутривидовой гибридизации. Большинство зарубежных и российских селекционеров используют этот метод. Все тонкости работы по созданию сортов голозерного ячменя методом внутривидовой гибридизации хорошо изложены в монографиях Н.И. Аниськова с соавт. (2007) и Н.А. Сурина (2011).

Метод экспериментального получения мутаций широко изучался на ячмене. Так, Ф.Г. Нигматулин с соавт. (1976) получили целый ряд мутантов у голозерного сорта Джау-Кабутак. Некоторые из них могли бы иметь селекционное значение, однако эта работа не была доведена до конца. Интересно отметить, что в этом эксперименте не было получено ни одного пленчатого мутанта. Но на пленчатых формах, наоборот, были получены голозерные формы ячменя под действием химических мутагенов (Горшкова, Кутова, 1976). При анализе литературы по экспериментальному мутагенезу можно сделать вывод о том, что это один из самых эффективных методов, индуцирующих широкую генетическую изменчивость как качественных, так и количественных признаков у многих сельскохозяйственных культур, в том числе и

у ячменя. К сожалению, он недостаточно оценен практическими селекционерами. Поэтому сортов, созданных этим методом, значительно меньше, по сравнению с количеством сортов, созданных традиционными методами.

Межвидовая и межродовая гибридизация как методы создания новых сортов на ячмене не применялись, хотя имеется довольно большое число экспериментальных исследований по отдаленным скрещиваниям представителей рода *Hordeum*. В этой связи уместно вспомнить о работе Г.Д. Карпеченко (1971), который провел скрещивание и получил гибриды между японской разновидностью ячменя *Hordeum vulgare* var. *Dundar-beyi* Zhuk. и афганской формой var. *sublatiglumatum* Vav. В этой работе впервые были показаны на ячмене сложные расщепления в F<sub>2</sub> и последующих поколениях и новообразования в виде растений с различными длиной и плотностью колоса, остистостью колоса и длиной вегетационного периода. Можно также назвать работу «Отдаленная гибридизация ячменя (генетические и биотехнологические аспекты)» (Першина, 1995). Хотя в этой работе не были использованы голозерные формы ячменя, установленные общие закономерности отдаленной гибридизации и методы получения новых форм растений могут быть применены в селекции голозерных ячменей. Не отрицая значения отдаленной гибридизации для изучения процессов видообразования и получения новых форм растений, следует сказать, что не исчерпаны возможности увеличения изменчивости традиционными методами, особенно для голозерного ячменя. Остаются незадействованными сложные трансгрессивные возвратные скрещивания, различные модификации метода педигри, а также различные схемы отбора. Они включены в селекционные программы по селекции голозерного ячменя. Примером таких программ могут служить программы сибирских селекционных центров и некоторых научных учреждений. Для сибирской селекции характерно использование пленчатых сортов в скрещиваниях с голозерными сортами. Так, в Кемеровском НИИ сельского хозяйства голозерные сорта из Австралии, Чехии, Мексики, Китая и Японии скрещивались с сортами пленчатого ячменя в основном сибирской селекции. При этом ставилась задача – получить гибриды с

генами устойчивости к головневым грибам, устойчивости к полеганию, скороспелости и урожайности. К настоящему времени выделены перспективные селекционные номера голозерного ячменя, которые проходят конкурсное, экологическое и производственное испытания.

Аналогичная программа была разработана в Красноярском НИИ сельского хозяйства. В соответствии с этой программой была изучена большая коллекция голозерных ячменей. В результате изучения выяснилось, что большинство образцов непригодно для производственных посевов и селекционных целей из-за неустойчивости к болезням и низкой продуктивности. Однако был выделен голозерный ячмень Белорусский 76, который имел ряд положительных признаков. От скрещивания этого сорта с сортом пленчатого ячменя Баган была выделена линия Е-34-6565, которая отличалась устойчивостью к некоторым колосовым болезням, к полеганию и довольно высокой урожайностью. Эта линия дала начало голозерному ячменю Оскар. Новый сорт относится к разновидности *nudum*, двурядный, имеет массу 1000 зерен 50–57 г, обладает устойчивостью к полеганию, но имеет слабую устойчивость к твердой и пыльной головне (Сурин, 2011).

В Омском селекционном центре также проведена большая работа по изучению коллекционного материала голозерных ячменей с использованием структурного анализа отдельных элементов урожайности. Эта работа позволила выделить перспективные образцы и сформировать генетический фонд голозерных ячменей для синтетической селекции. Здесь впервые проведены сложные скрещивания, в которых участвовали голозерные и пленчатые формы, и выделены гибриды с повышенной урожайностью, устойчивостью к полеганию и грибным болезням. Лучшие из них дали начало двум сортам: Омский голозерный 1 и Омский голозерный 2. На сегодняшний день они являются стандартами при испытании вновь создаваемых сортов голозерного ячменя. При обобщении опыта работы сибирских селекционеров по созданию сортов голозерного ячменя следует отметить, что в основе их работы лежат широкое привлечение мировой коллекции голозерных ячменей и включение в гибридизацию лучших сортов пленчатого



ячменя как источников высокой адаптивности к условиям выращивания.

### ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГОЛОЗЕРНОГО ЯЧМЕНЯ

Вопрос об использовании голозерного ячменя впервые был рассмотрен А.Г. Быковцом (1949). Он предложил 4 направления использования: для производства крупы, кормов, пива и хлеба.

На первый взгляд может показаться, что нет никакой разницы в видах использования голозерных и пленчатых ячменей. На самом деле разница есть и довольно существенная. Она кроется в особенностях той и другой формы ячменя. Из зерна ячменя производят ячневую и перловую крупу. Для получения крупы высокого качества используются наиболее ценные сорта ячменя, которые, согласно ГОСТу, должны иметь желтый цвет зерна, натуру – не менее 630 г/л. По форме зерно должно быть эллиптическим или ромбическим; консистенция эндосперма – мучнистая; выход перловой крупы не менее 44 %; вкус каши не менее 4,5 баллов. Всем этим требованиям в большей степени отвечают сорта голозерного ячменя, прежде всего, потому, что благодаря высокому содержанию белка, каши из голозерного ячменя более питательны и калорийны. Кроме того, голозерные ячмени не требуют затрат на освобождение от цветочных пленок. Поэтому замена хотя бы части пленчатого ячменя на голозерный ячмень может оказаться весьма целесообразной.

Несмотря на большое значение ячменя как продовольственной культуры, он остается прежде всего кормовым растением (Жуковский, 1964). Ячмень используется для кормления сельскохозяйственных животных как зернофуражная, пастбищная и сенажная культура. Ячменная солома может скармливаться скоту и использоваться как подстилочный материал на животноводческих фермах. В ряде работ показано, что при добавлении в рацион животных зерна или зеленой массы голозерных сортов ячменя повышается их продуктивность: у кур повышается яйценоскость на 15–18 % и на 20–25 % повышается продуктивность крупного рогатого скота, повышаются привесы у свиней (Грязнов, 1996; Сурин, 2011; <http://innosfera.org/node/380>).

При кормлении смешанным кормом восстанавливается принцип сбалансированности рационов, что позволяет повысить эффективность использования кормов на 15–30 % (Корнеев, Клейменов, 1985).

Что касается использования голозерного ячменя в пивоварении, то еще в середине прошлого столетия было установлено, что «голозерный ячмень по ряду свойств имеет преимущество по сравнению с пленчатым. Он может быть прекрасно использован как сырье для приготовления пива. Для этого необходимо внести некоторые изменения в технологический процесс, например, заменив естественную фильтрацию через пленки искусственными фильтрами» (Быковец, 1949).

Как хлебное растение голозерный ячмень не имеет никаких перспектив, так как хлеб из ячменной муки обладает низким качеством – он довольно грубый, сладковатый на вкус, быстро черствеет. Поэтому ячменная мука применяется при выпечке хлеба только как добавка к пшеничной муке. Примесь ячменя к пшенице до 30 % не оказывает отрицательного влияния на вкусовые качества и степень черствости хлеба. Выращивание ячменя в качестве хлебного растения – вынужденная мера для высокогорных районов, так как там не растут пшеница и рожь.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, анализ литературы, посвященной изучению голозерного ячменя, свидетельствует о все возрастающем внимании к этой культуре. В основе такого внимания лежат некоторые свойства голозерного ячменя, которых нет у пленчатого ячменя. Это более высокое содержание в зерне белка и лизина, более высокое содержание  $\beta$ -глюкана, который ингибирует синтез холестерина и снижение стоимости продуктов после переработки голозерного ячменя. Отмечено, что в иностранной литературе приоритетными для изучения являются проблемы доместикации голозерных ячменей, их разнообразия, устойчивости к болезням и вредителям. Отечественная литература посвящена в основном вопросам практической селекции, изучению химического состава зеленой массы и зерна голозерного ячменя.

Исследования проводятся как классическими методами популяционной генетики (белковый полиморфизм, фенетический полиморфизм), так и современными методами с использованием ДНК-маркеров. Последние более интересны, так как позволяют изучать внутри- и межпопуляционный полиморфизм, пути расселения и микроэволюционные процессы в популяциях голозерного ячменя. Именно этим методом удалось показать, что полиморфизм голозерного ячменя существенно меньше, чем пленчатого. Было также показано, что Юго-Западный Иран является наиболее вероятным местом происхождения голозерного ячменя. Дальше он мигрировал в Афганистан, Пакистан, страны Юго-Восточной Азии, Китай, Корею и Японию. Миграция на Запад, к сожалению, не произошла, вероятно, потому, что голозерный ячмень не смог конкурировать с пшеницей и рожью, которые оказались более приспособленными к мезо- и ксерофитным условиям.

Из обзора литературы можно сделать заключение о том, что пленчатость или голозерность являются ключевыми признаками. Считается, что эти признаки помогут пролить свет на происхождение и доместикационную историю *Hordeum vulgare* в целом и голозерного ячменя в частности.

Скрещивания пленчатых ячменей с локальными местными сортами голозерного ячменя являются успешной стратегией их селекции. Поэтому местные сорта голозерного ячменя из Японии, Китая, стран Юго-Восточной Азии, Гималаев и Эфиопии представляют большую селекционную ценность. К сожалению, разнообразие этих форм постоянно сокращается. Необходимо предпринять меры для сохранения местных сортов и дикорастущих форм голозерного ячменя *in situ* и *ex situ*.

## ЛИТЕРАТУРА

- Аниськов Н.И., Калашник Н.А., Козлова Г.Я., Поползухин П.В. Голозерный ячмень в Западной Сибири. Омск: Сфера, 2007. 155 с.
- Бородыня А.Н., Кадычегев А.Н. Изменчивость признаков голозерного овса и ячменя в степных условиях Хакасии // Вестн. КрасГАУ. 2009. № 4. С. 51–55.
- Быковец А.Г. Голозерный ячмень, его разнообразие и пути селекции. М.: Сельхозгиз, 1949. 87 с.
- Вавилов Н.И. Мировые ресурсы сортов хлебных злаков зерновых, бобовых, льна и их использование в селекции. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1957. 462 с.
- Вавилов Н.И. Центры происхождения культурных растений. Избр. тр. М.; Л.: Наука, 1965. С. 94.
- Гарис Д.В. Селекционно-генетическая оценка сортов и гибридов голозерного и пленчатого ячменя в условиях Среднего Прииртышья: Дис. ... канд. с.-х. наук. Омск, 2008. 28 с.
- Гешеле Э.Э. Возникновение земледелия в Сибири // Сельское хозяйство Сибири. 1956. № 6. С. 95–96.
- Горшкова В.А., Кутова А.А. Изучение биохимических мутантов ярового ячменя // Эффективность химических мутагенов в селекции. М.: Наука, 1976. С. 194–197.
- Грязнов А.А. Ячмень Карабалыкский (корм, крупа, пиво). Кустанай: Кустанайский печатный двор, 1996. 446 с.
- Жуковский П.М. Культурные растения и их сородичи. Л.: Колос, 1964. С. 157–171.
- Иванов Н.Н. Биохимические показатели качества пивоваренного ячменя // Изв. АН СССР. 1939. Сер. биол. № 6. С. 887–897.
- Карпеченко Г.Д. Теория отдаленной гибридизации. Избр. тр. М.: Наука, 1971. С. 147–209.
- Кирдогло Е.К., Левицкий А.П., Гаркавый О.П. Влияние признака голозерности у ячменя на урожайность и кормовые достоинства зерна // Науч.-техн. бюл. ВСГИ. Одесса, 1982. С. 28–34.
- Киселева Г.Н. Специфичность мутагенеза при воздействии ЭМС с фитогормонами на разные стадии развития ячменя: Дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 1977. 16 с.
- Киселева Г.Н., Солоненко Л.П. Изучение голозерного мутанта ячменя сорта Винер // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук. 1981. № 5. Вып. 1. С. 82–88.
- Конарев В.Г., Дягилова Г.Е., Гаврилюк И.П., Трофимовская А.Я. Сортная идентификация ячменя по электрофоретическим спектрам гордеина // Бюл. ВИР. 1979. Вып. 92. С. 30–40.
- Корнеев П.Л., Клейменов Н. Оптимизация кормления сельскохозяйственных животных при экономном расходовании кормов // Междунар. с.-х. журнал. 1985. № 4. С. 52–56.
- Куюева Т.В., Железнова Н.Б., Железнов А.В. Изучение исходного материала голозерных форм ячменя (*Hordeum vulgare* L.) в условиях Новосибирской области // Тр. V Междунар. науч.-практ. конф. «Новейшие направления развития аграрной науки в работах молодых ученых». Новосибирск, 2012. С. 314–317.
- Лукьянова М.В., Трофимовская А.Я., Гудкова Г.Н. и др. Ячмень // Культурная флора СССР. Л.: Агропромиздат. Ленингр. отд-ние, 1990. Т. II. Ч. 2. С. 267–294.
- Нигматулин Ф.Г., Ошуров Н., Муминшоева З. Характеристика мутантов, индуцированных мутагенами у сорта голозерного ячменя Джау-Кабута // Эффективность химических мутагенов в селекции. М.: Наука, 1976. С. 189–193.
- Орлов А.А. Ячмени Абиссинии и Эритреи // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1929. Т. 20. С. 283–345.
- Пакуль В.Н. Результаты селекционной работы Кемеровского НИИСХ за период 1995–2005 гг. // Результаты и перспективы селекции сельскохозяйственных культур в селекцентрах Сибирского отделения Россельхозакадемии и их сети. Новосибирск, 2007. С. 20–24.
- Перуанская О.Н., Лебедева В.С. Аминокислотный состав

- зерна ячменя // Вестн. сельскохозяйственной науки Казахстана. 1980. № 7. С. 98.
- Першина Л.А. Отдаленная гибридизация ячменя: (генетические и биотехнологические аспекты): Дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск, 1995. 35 с.
- Сичкарь Н.М., Иванов Н.Н. Биохимия ячменя // Биохимия культурных растений М.; Л., 1958. Т. 1. С. 234–330.
- Сурин Н.А. Адаптивный потенциал сортов зерновых культур Сибирской селекции и пути его совершенствования (пшеница, ячмень, овес). Новосибирск, 2011. 707 с.
- Трофимовская А.Я. Ячмень (эволюция, классификация, селекция). Л.: Колос, 1972. С. 145–160.
- Харлан Д.Р. Происхождение ячменя // Ячмень. М.: Колос, 1973. С. 9–60.
- Ходьков Л.Е. Голозерные и безостые ячмени. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1985. 133 с.
- Anis'kov N.I., Krolevets S.S. Study of naked barley cultivars of the VIR World collection under conditions of the Siberian Irtysh river region // Rus. Agricultural Sci. 2008. V. 34. P. 293–295.
- Atanassov P., Zaharieva M., Merah O., Monneveux P. Genetic and environmental variation useful traits in a collection of naked barley. II. Yield components and water efficiency // Cereal Res. Communications. 1999a. V. 27. No. 3. P. 315–322.
- Atanassov P., Zaharieva M., Perez Vendrell A.M., Monneveux P. Genetic and environmental variation of useful traits in a collection of naked barley II. Quality related traits // Cereal Res. Communications. 1999b. V. 27. No. 3. P. 323–330.
- Atanassov P., Borries Ch., Zaharieva M., Monneveux Ph. Hordein polymorphism and variation of agromorphological traits in a collection of naked barley // Genetic Res. and Crop Evol. 2001. V. 48. P. 353–360.
- Badr A., Muller K., Schafer-Pregl R. *et al.* On the origin and domestication history of Barley (*Hordeum vulgare* L.) // Mol. Biol. Evol. 2000. V. 17. No. 4. P. 499–510.
- Berglung P.T., Holm E.T., Factnaught C.E. Hulless barley: alternative uses // Barley Newsletter. 1993. V. 36. P. 130–131.
- Bhatty R.S. The potential of hull-less barley, a Review // Cereal Chemistry. 1986. V. 63. P. 97–103.
- Dickin E., Steele K., Edwards-Jones G., Wright D. Agronomic diversity of naked barley (*Hordeum vulgare* L.): a potential resource for breeding new food barley for Europe // Euphatica. 2012. V. 184. No. 1. P. 85–99.
- Doll H., Brown A.H.D. Hordein variation in wild (*Hordeum spontaneum*) and cultivated (*Hordeum vulgare*) barley // Canad. J. Genet. Cytol. 1979. V. 21. P. 391–404.
- Dziamba S., Rachon L. Differentiation of yield component in naked-grained and husked spring barley varieties grown in pure and mixed // Biuletyn Instytutu Hodowli Aklimatyzacji Roslin. 1988. V. 167. P. 79–85.
- Fedak G., Tsuchya T., Helgason S.B. Use of monotelotrisomics for linkage mapping in barley // Canad. J. Genet. Cytol. 1972. V. 14. P. 949–957.
- Goldenberg Z.V., Kvachadze M.V. Content of protein and amino acid tryptophan in a grain of some forms of barley // Soobshcheniya Akademii Nauk Gruzinskoi SSR. 1990. V. 139. P. 397–400.
- Helback H. Domestication of food plants in the old world // Science. 1959. V. 153. P. 365–372.
- Heisel S.E., Peterson D.M., Jones B.L. Identification of US barley cultivars by SDS – PAGE of hordeins // Cereal Chemistry. 1986. V. 63. P. 500–505.
- Kikuchi S., Taketa S., Ichii M., Kawasaki S. Efficient fine mapping of naked caryopsis gene (*nud*) by HEGS (High Efficiency Genome Scanning)/AFLP in barley // Theor. and Appl. Genet. 2003. V. 108. P. 73–78.
- Manjunatha T., Bisht I.S., Bhat K.V., Stingh B.P. Genetic diversity in barley (*Hordeum vulgare* L., ssp. *vulgare*) landraces from Uttaranchal Himalaya of India // Genetic Res. Evol. 2007. V. 54. P. 55–65.
- Maralejo M., Romagosa I., Salcedo G. *et al.* On the origin of Spanish two-rowed barleys // Theor. Appl. Genet. 1994. V. 87. P. 829–836.
- Murphy P.J., Witcombe J.R. Covered and naked barleys from the Himalaya. 1. Evidence of multivariate differences between two types // Theor. Appl. Genet. 1986. V. 71. P. 730–735.
- Newman R.K., Levis S.E., Newman C.V. *et al.* Hypocholesterolemic effect of barley food on healthy men // Nutr. Rep. Inst. 1989. V. 39. P. 749–760.
- Nybohm N. Mutation types in barley // Acta Agric. Scand. 1954. V. 4. P. 430–450.
- Oscarsson M., Anderson R., Solomonsson A., Aman P. Chemical composition of barley samples on dietary fibre components // J. Cereal Sci. 1996 V. 24. P. 161–170.
- Roininen J., Nissila E., Puolimatka M., Pulli S. Identification of barley cultivars using SDS-PAGE // Agric. Sci. Finl. 1992. No. 1. P. 73–82.
- Rosnagel B.G. Developing high energy hulless feed barley for Western Canada // Proc. 4th Intern. Barley Symp. 1981. Edinburgh, UK, 1981. P. 293.
- Shewry P.R., Mifflin B.J. Genes for storage proteins of barley // Quality of Plant Foods for Human Nutriment. 1982. V. 31. P. 251–257.
- Shewry P.R., Finch R.A., Palmar S. *et al.* Chromosomal location of *Hor-3* new locus governing storage proteins in barley // Heredity. 1983. V. 50. P. 179–190.
- Takahashi R. The origin and evolution of cultivated barley // Adv. Genet. 1955. Issue 7. P. 227–266.
- Taketa S., Kikuchi S., Awayama T. *et al.* Monophyletic origin of naked barley inferred from molecular analyses of a marker closely linked to the naked caryopsis gene (*nud*) // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 108. P. 1236–1242.
- Taketa S., Amano S., Tsujino Y. *et al.* Barley grain with adhering hulls is controlled by ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. No. 10. P. 4062–4067.
- Weber F.E., Qureshi A.A., Lupton J.R., Chaudhary V. Suppression of cholesterol biosynthesis by tocotrienol of barley bran and barley oil in hypercholesterolemic man and women // Sixth International Barley Symposium / Ed. L. Munck. Helsingborg, Sweden, 1991. 469 p.

## NAKED BARLEY: ORIGIN, DISTRIBUTION, AND PROSPECTS OF UTILISATION

A.V. Zhelesnov<sup>1</sup>, T.V. Kukoeva<sup>2</sup>, N.B. Zheleznova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Siberian Research Forage Institute, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia  
e-mail: korma@online.nsc.ru

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia  
e-mail: kukoeva@bionet.nsk.ru

### Summary

This article presents one of the most interesting forms of barley (*Hordeum vulgare* L.) and characterizes its chemical composition and productivity. It is shown that modern methods of molecular biology provide much deeper insight into the domestication history and diversity of naked barley than common methods of population genetics. The importance of selection for increasing naked barley yield and, as a consequence, for expanding its cultivation area is emphasized. Methods and directions of breeding are considered in this respect. Germplasm from South-East Asia, China, Japan, and other regions is of special significance for naked barley selection. That is why great attention should be paid to its preservation.

**Key words:** barley, naked barley, productivity, protein, breeding, vegetation period, adaptation, character, genetics.



УДК 575.111:634.11

## ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО РАЗНООБРАЗИЯ ГЕНОВ СИНТЕЗА ЭТИЛЕНА *Md-ACS1* И *Md-ACO1* В ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ГЕНПЛАЗМЕ ЯБЛОНИ

© 2013 г. И.И. Супрун, С.В. Токмаков

Северо-Кавказский зональный НИИ садоводства и виноградарства, Краснодар, Россия,  
e-mail: supruni@mail.ru

Поступила в редакцию 1 марта 2013 г. Принята к публикации 1 апреля 2013 г.

В статье приведены результаты изучения аллельного разнообразия генов синтеза этилена *Md-ACS1* и *Md-ACO1* в отечественной генплазме яблони с применением ДНК-маркерного анализа. Идентифицированы аллельные комбинации данных генов у 48 сортов яблони отечественной селекции. Выявлено, что уровень распространения аллельных комбинаций, обуславливающих высокую степень лежкости плодов, в отечественной генплазме соответствует частоте их встречаемости в мировом генофонде культуры. С учетом полученных данных начата программа по созданию селекционных форм яблони, несущих сочетание аллелей *Md-ACS1-2/2* + *Md-ACO1-1/1*, с применением ДНК-маркерного отбора для селекции сортов, обладающих наиболее высокой степенью лежкости плодов.

**Ключевые слова:** яблоня, ДНК-маркерный анализ, маркер-вспомогательная селекция, аллельное разнообразие, гены синтеза этилена *Md-ACS1* и *Md-ACO1*, лежкость плодов.

### ВВЕДЕНИЕ

Качество и конкурентоспособность плодовой продукции напрямую зависят от ее внешнего вида, который в значительной степени обуславливается способностью плодов к хранению, т. е. лежкостью. В связи с этим создание новых конкурентоспособных сортов с лежкими плодами является важнейшим направлением в современной селекции яблони.

В отличие от состава зерновых культур и орехов большая доля массы яблок приходится на содержащуюся в них воду, которая позволяет сохранять высокую физиологическую активность фруктов. Метаболические процессы в плодах протекают и после созревания, и после сбора урожая, и при хранении (Tucker, 1993).

Яблоки относят к скоропортящимся фруктам, созревание которых сопряжено с газообменными процессами и различным уровнем выделения этилена в плодах. По длительности хранения сорта различаются: некоторые сорта требуют немедленного помещения в камеры после сбора, так как особенно быстро теряют свои товарные

качества, в то время как другие способны к длительному хранению без особых условий.

Сбор урожая на стадиях до полного созревания, молочной спелости и хранения в контролируемых условиях позволяет продлевать сроки хранения яблок. Хотя яблоки и могут храниться в контролируемых условиях дольше других фруктов, способность к хранению у сортов различна. Так, яблоки сорта Golden Delicious способны храниться при 2 °С 4 месяца, а в регулируемой среде (РС) – 8 месяцев, Granny Smith – при 0 °С – 4, а в РС – 7 месяцев, Jonathan – при 4 °С – 3, а в РС – 5 месяцев (Mercantila ..., 1989). Генотипы яблони, проявляющие способность к длительному хранению, активно используются в селекционных программах для создания новых конкурентоспособных сортов. Знание генетической основы данного признака в создаваемом селекционном материале позволит получить сорта с высоким качеством плодовой продукции.

Этилен является ключевым регулирующим созревание яблок фактором, и подавление биосинтеза этилена и его действия является основным механизмом продления сроков хра-

нения в контролируемых условиях. Показано, что биосинтез этилена в плодах яблони различных сортов варьирует в больших пределах и установлено влияние этого варьирования на лежкость плодов.

Ключевыми ферментами в биосинтезе этилена являются индуцибельные синтаза 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК-синтаза, ACS) и оксидаза 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК-оксидаза, ACO) (Dong *et al.*, 1991, 1992).

На начальном этапе биосинтеза этилена фермент АЦК-синтаза преобразует S-аденозил-L-метионин в 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоту (АЦК), являющуюся предшественником этилена, далее в присутствии кислорода АЦК под воздействием АЦК-оксидазы разлагается с образованием этилена, аммиака, муравьиной кислоты и CO<sub>2</sub> (Adams, Yang, 1979; Kende, 1993). Данные ферменты кодируются серией генов *Md-ACS* и *Md-ACO*, экспрессирующихся в разных тканях и на разных этапах созревания плодов (Sunako *et al.*, 1999; Wiersma *et al.*, 2007).

Гены *Md-ACS1* и *Md-ACO1* в значительной степени детерминируют уровень синтеза этилена в плодах во время созревания, а также при хранении, что определяет их значительное влияние на степень лежкости плодов (Zhu, Barritt, 2008). Две аллельные формы, *Md-ACS1-1* и *Md-ACS1-2*, обуславливают различный уровень синтеза этилена в плодах при хранении. Гомозиготность по аллелю *Md-ACS1-1* (*Md-ACS1-1/1*) приводит к высокому уровню синтеза этилена в плодах, в то время как для гетерозиготных генотипов (*Md-ACS1-1/2*) и образцов, гомозиготных по аллелю 2 (*Md-ACS1-2/2*), характерны средний и пониженный уровни его синтеза соответственно. Ген *Md-ACO1* также влияет на синтез и накопление этилена в созревших плодах: гомозиготность по аллелю *Md-ACO1-1* в сочетании с аллельным вариантом *Md-ACS1-2/2* по гену АЦК-синтазы приводит к значительному снижению синтеза этилена в плодах. Например, плоды сорта яблони Fuji, несущего аллельный набор по генам *Md-ACS1-2/2* и *Md-ACO1-1/1*, сохраняют структуру и плотность без существенных изменений в течение 8 мес. хранения при температуре 2–4 °С (Fan *et al.*, 1999).

Аллельные различия гена *Md-ACS1* обусловлены инсерцией фрагмента ретротранспо-

зона длиной 166 пар оснований в промоторной области гена, приводящей к снижению уровня экспрессии гена (Sunako *et al.*, 1999). Для гена *Md-ACO1* аллельные различия обусловлены наличием InDel (Insertion/Deletion) сайта в третьем интроне с размером инсерции в 62 пары оснований, вероятно, приводящей к низкому уровню транскрипции данного гена (Costa *et al.*, 2005). На основании указанного структурного полиморфизма для генов *Md-ACS1* и *Md-ACO1* созданы эффективные ДНК-маркеры, позволяющие идентифицировать их аллельные варианты. Их наличие дает возможность выполнять ДНК-маркерный скрининг генофонда для выявления генотипов, несущих наиболее ценные сочетания аллелей, а также проводить их идентификацию в селекционном материале для создания сортов, обладающих повышенной лежкостью плодов.

В задачи наших исследований входили оценка аллельного разнообразия генов *Md-ACS1* и *Md-ACO1* и идентификация их аллельного набора у сортов яблони отечественной селекции.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований послужили 48 сортов яблони отечественной селекции.

Экстракцию ДНК проводили из молодых листьев с использованием метода ЦТАБ (Murphy, Thompson, 1980). ПЦР проводили в общем объеме 25 мкл при следующих концентрациях компонентов реакционной смеси: 1,5 мМ дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 0,3 мкМ каждого праймера, 2,5 мкл ПЦР-буфера, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (ООО «СибЭнзим»), 50 нг ДНК. Амплификацию проводили по следующей программе: 2 мин при 94 °С; следующие 35 циклов: 45 с при 94 °С, 45 с при 58 °С для *Md-ACS1* и 65 °С для *Md-ACO1*, 2 мин синтез при 72 °С; финальный цикл синтеза 5 мин при 72 °С.

Для электрофоретического анализа амплифицированных фрагментов использовали 2 %-й агарозный гель на основе трис-боратного буфера.

Праймеры для амплификации целевых фрагментов гена *Md-ACS1* были взяты в соответствии с данными, представленными в работе Narada с соавт. (2000), и для гена *Md-ACO1* в соответствии с данными, представленными в

работе Costa с соавт. (2005). Размер целевых амплифицируемых фрагментов для изучаемых генов следующий: аллель *ACSI-1* – 489 пар оснований, аллель *ACSI-2* – 655 пар оснований; аллели *ACO1-1* и *ACO1-2* – 525 и 587 пар оснований соответственно.

В качестве сортов-стандартов использовали сорта яблони зарубежной селекции Fuji, GoldRush и Granny Smith, для которых идентифицирован аллельный набор по целевым генам: Fuji (*Md-ACSI-2/2*, *Md-ACO1-1/1*), GoldRush (*Md-ACSI-2/2*, *Md-ACO1-1/2*) и Granny Smith (*Md-ACSI-1/2*, *Md-ACO1-1/2*) (Zhu, Barritt, 2008).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование в ходе исследований сортов-стандартов, несущих различные аллельные комбинации генов *Md-ACSI* и *Md-ACO1*, дало возможность максимально четко интерпретировать полученные результаты. При этом как для сортов-стандартов, так и для изученных сортов отечественной селекции не возникало затруднений при идентификации аллельного набора искомым генов. На рис. 1, 2 продемонстрированы результаты электрофоретического разделения продуктов ПЦР ряда сортов отечественной селекции.

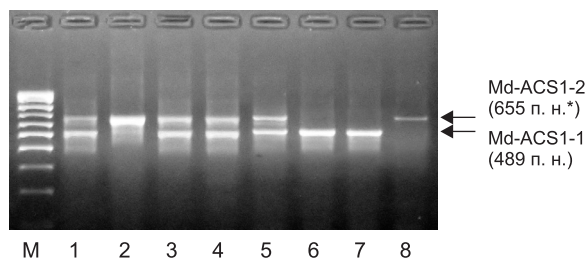
При анализе отечественных сортов яблони по локусу *Md-ACSI* были идентифицированы все три аллельных варианта: гетерозиготные образцы, а также образцы, гомозиготные как по первому, так и по второму аллелям. Так, из сортов, результаты анализа которых представлены на рис. 1, сорта Тайна, Ноктюрн и Талисман гете-

розиготны, в то время как сорта Зефир и Талида гомозиготны по *Md-ACSI-1*, а сорт Любава – по аллелю *Md-ACSI-2*. Всего в изученной выборке сортов было выявлено 19 образцов, гетерозиготных по данному локусу, 17 и 8 сортов гомозиготны по аллелям 1 и 2 соответственно.

В то же время анализ аллельного полиморфизма гена *Md-ACO1* выявил, что все изученные сорта несут оба аллеля данного гена, т. е. гетерозиготны по данному локусу. В табл. представлены обобщенные результаты анализа аллельного полиморфизма целевых генов у отечественных сортов яблони.

В соответствии с полученными данными все сорта, несущие аллельный вариант 2/2 по гену *Md-ACSI*, обуславливающий низкий уровень синтеза этилена, имеют зимний, осенний и позднеосенний срок созревания и обладают высокой степенью лежкости плодов при хранении. Сорта, гетерозиготные по данному локусу, относятся к различным группам по срокам созревания (летние, позднелетние, осенние, зимние). Полученная информация согласуется с мировыми научными данными об уровне синтеза этилена, степени лежкости плодов и сроках созревания сортов с различными аллельными вариантами данного гена (Harada *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2005; Zhu, Barritt, 2008).

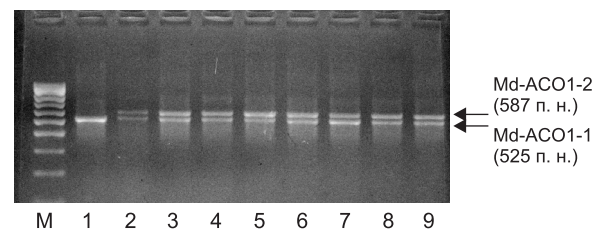
Сопоставление результатов исследования с данными, полученными при исследовании генофонда яблони из других регионов мира, показывает их соответствие выявленному уровню распространения аллельных вариантов изученных генов. Для гена *Md-ACO1* наиболее распространенными комбинациями аллелей являются комбинации 1/2 и 2/2 с преимущест-



**Рис. 1.** ПЦР-идентификация аллелей гена *Md-ACSI*.

М – маркер молекулярной массы ДНК, 1–8 сорта яблони: 1 – Granny Smith; 2 – Fuji; 3 – Тайна; 4 – Ноктюрн; 5 – Талисман; 6 – Зефир; 7 – Талида; 8 – Любава.

\* п.н. – пар нуклеотидов.



**Рис. 2.** ПЦР-идентификация аллелей гена *Md-ACO1*.

М – маркер молекулярной массы ДНК, 1–8 сорта яблони: 1 – Fuji; 2 – Granny Smith; 3 – Тайна; 4 – Ноктюрн; 5 – Талисман; 6 – Зефир; 7 – Талида; 8 – Любава; 9 – Фея.

Таблица

Аллельные комбинации генов *Md-ACSI* и *Md-ACO1* у российских сортов яблоны

Сорт	<i>Md-ACSI</i>	<i>Md-ACO1</i>	Сорт	<i>Md-ACSI</i>	<i>Md-ACO1</i>
Granny Smith	1/2	1/2	Ноктюрн	1/2	1/2
Fuji	2/2	1/1	Ночка	1/2	1/2
GoldRush	2/2	1/2	Орловское полесье	1/2	1/2
12/1-21-69	1/1	1/2	Персиковое	1/2	1/2
Бархат осени	1/1	1/2	Ренет Кубани	1/2	1/2
Зефир	1/1	1/2	Ренет Симиренко	1/2	1/2
Кальвиль снежный	1/1	1/2	Союз	1/2	1/2
Курнаковское	1/1	1/2	Старт	1/2	1/2
Либерти	1/1	1/2	Тайна	1/2	1/2
Марго	1/1	1/2	Талисман	1/2	1/2
Орловский пионер	1/1	1/2	Фея	1/2	1/2
Орфей	1/1	1/2	Фламенко	1/2	1/2
Память есаулу	1/1	1/2	Флорина	1/2	1/2
Первинка	1/1	1/2	Апорт Ас	2/2	1/2
Рассвет	1/1	1/2	Болотовское	2/2	1/2
Слава победителям	1/1	1/2	Василиса	2/2	1/2
Солнышко	1/1	1/2	Екатеринодарское	2/2	1/2
Талида	1/1	1/2	Зори Кубани	2/2	1/2
Юбилей Москвы	1/1	1/2	Клео	2/2	1/2
Юбиляр	1/1	1/2	Любава	2/2	1/2
Альпинист румяный	1/2	1/2	Щит	2/2	1/2
Афродита	1/2	1/2	Веньяминовское*		1/2
Визит	1/2	1/2	Родничок*		1/2
Золотая корона	1/2	1/2	Свежесть*		1/2
Золотое летнее	1/2	1/2	Строевское*		1/2
Кубанское багряное	1/2	1/2			

\* Анализ был выполнен только по локусу *Md-ACO1*.

вом 1/2. Сочетание гомозиготности по аллелю 2 гена *Md-ACSI* (*Md-ACSI-2/2*) в комбинации с гомозиготностью по аллелю 1 гена *Md-ACO1* (*Md-ACO1-1/1*) является редким в мировом генофонде. Наиболее известный сорт, имеющий данный набор аллелей, – сорт японской селекции Fuji – обладает очень продолжительным периодом хранения плодов без потери потребительских качеств (Oraguzie *et al.*, 2004; Zhu, Barritt, 2008; Nybom *et al.*, 2013).

Анализ результатов, полученных нами в ходе выполнения работы, свидетельствует о том, что сочетание аллелей *Md-ACSI* 2/2 + *Md-ACO1* 1/1, обуславливающее наиболее низкий уровень синтеза этилена в созревших плодах, не встре-

чается ни у одного из изученных российских сортов яблоны.

С учетом полученных данных в СКЗНИИСиВ приступили к реализации селекционной программы по созданию форм яблоны, несущих сочетание аллелей *Md-ACSI* 2/2 + *Md-ACO1* 1/1 с применением ДНК-маркерного отбора. Это даст возможность в дальнейшем получить сорта, обладающие высокой степенью лежкости плодов, что позволит значительно повысить их конкурентоспособность на мировом рынке.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 12-04-31947 мол\_а.



## ЛИТЕРАТУРА

- Adams D.O., Yang S.F. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 170–174.
- Costa F., Sara S., Van de Weg W.E. *et al.* Role of the genes *Md-ACO1* and *Md-ACS1* in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh) // Euphytica. 2005. V. 141. P. 181–190.
- Dong J.G., Kim W.T., Yip W.K. *et al.* Cloning of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and expression of its mRNA in ripening apple fruit // Planta. 1991. V. 185. P. 38–45.
- Dong J.G., Olson D., Silverstone A., Yang S.F. Sequence of a cDNA coding for a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog from apple fruit // Plant Physiol. 1992. V. 98. P. 1530–1531.
- Fan X., Blankenship S.M., Mattheis J.P. 1-methylcyclopropane inhibits apple ripening // J. Am. Soc. Hortic. Sci. 1999. V. 124. P. 690–695.
- Harada T., Sunako T., Wakasa Y. *et al.* An allele of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (*Md-ACS1*) accounts for the low ethylene production in climacteric fruits of some apple cultivars // Theor. Appl. Genet. 2000. V. 101. P. 742–746.
- Kende H. Ethylene biosynthesis // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1993. V. 44. P. 283–307.
- Mercantila F. Guide to Food Transport: Fruit and Vegetables. Copenhagen: Mercantila Publishers, 1989. 247 p.
- Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucl. Acids Res. 1980. V. 10. P. 4321–4325.
- Nybom H., Ahmadi-Afzadi M., Sehic J., Hertog M. DNA marker-assisted evaluation of fruit firmness at harvest and post-harvest fruit softening in a diverse apple germplasm // Tree Genetics and Genomes. 2013. V. 9. P. 279–290.
- Oraguzie N.C., Iwanami H., Soejima J. *et al.* A. Inheritance of *Md-ACS1* gene and its relationship to fruit softening in apple (*Malus × domestica* Borkh.) // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 108. P. 1526–1533.
- Sunako T., Sakuraba W., Senda M. *et al.* An allele of the ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene (*ACS1*) in apple fruit with a long storage life // Plant Physiol. 1999. V. 119. P. 1297–1304.
- Tucker G.A. Introduction // Biochemistry of Fruit Ripening / Eds G.B. Seymour, J.E. Taylor, G.A. Tucker. London: Chapman and Hall, 1993. P. 3–51.
- Wiersma P.A., Zhang H., Lu C. *et al.* Survey of the expression of genes for ethylene synthesis and perception during maturation and ripening of «Sunrise» and «Golden Delicious» apple fruit // Postharvest Biol. Technol. 2007. V. 44. No. 3. P. 204–211.
- Zhu Y., Barrit B.H. *Md-ACS1* and *Md-ACO1* genotyping of apple (*Malus × domestica* Borkh.) breeding parents and suitability for marker-assisted selection // Tree Genetics and Genomes. 2008. V. 4. P. 555–562.

## ALLELIC DIVERSITY OF ETHYLENE BIOSYNTHESIS-RELATED *Md-ACS1* AND *Md-ACO1* GENES IN RUSSIAN APPLE GERMPLASM

I.I. Suprun, S.V. Tokmakov

North-Caucasian Zonal Research and Development Institute of Horticulture and Viticulture,  
Krasnodar, Russia, e-mail: supruni@mail.ru

### Summary

The allelic diversity of the *Md-ACS1* and *Md-ACO1* genes, involved in ethylene biosynthesis, was studied by DNA marker analysis of 48 apple varieties bred in Russia. Different allelic combinations of these genes were identified. We found that the prevalence of the allelic combinations associated with long shelf life of apple fruit in the Russian germplasm corresponded to the occurrence of these alleles in the worldwide gene pool. With regard to these data, a marker-assisted breeding program was launched to develop forms carrying the *Md-ACS1-2/2 + Md-ACO1-1/1* allele combination for long fruit shelf life.

**Key words:** apple, DNA marker analysis, marker-assisted selection, allelic diversity, ethylene biosynthesis genes, *Md-ACS1*, *Md-ACO1*, fruit storability.

УДК 633.14: 631.572-026.565: 543.429.23: 547.992.3

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СТЕБЛЯ РЖИ (*SECALE CEREALE* L.) СО СТЕКЛОВИДНОЙ СОЛОМИНОЙ

© 2013 г. А.А. Коновалов<sup>1</sup>, И.К. Шундрин<sup>2</sup>, Е.В. Карпова<sup>2</sup>, В.И. Маматюк<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 9 апреля 2013 г. Принята к публикации 17 мая 2013 г.

При проведении генетического анализа ржи по признаку «стекловидная соломина» получены сестринские растения с нормальной и стекловидной соломиной. Стебли растений изучены по химическому составу, спектроскопическим показателям и механической прочности. Обнаружены различия между растениями с разными типами соломины по ряду показателей, таких, как содержание ароматических мономеров лигнина и соотношение различных типов химических связей.

Соломины нормальной и стекловидной ржи при одинаковом диаметре различаются по модулю упругости и пределу упругой деформации. Установлено, что стебли мутантных растений при боковой нагрузке разрушаются по хрупкому механизму, а нормальные – по пластическому. При этом пределы упругой деформации и прочность существенно выше для нормальных растений.

Методами ядерного магнитного резонанса обнаружены различия в химической структуре лигнинов: по содержанию альдегидных и метоксильных групп, общей ароматичности, по количеству простых эфирных связей, которыми лигниновые блоки связаны с полисахаридными фрагментами клеточных стенок.

Более высокое содержание лигнина у мутанта не приводит к увеличению механической прочности соломины. Напротив, наблюдаются снижение пределов упругой деформации и увеличение ломкости побегов. Вероятно, мутация *bs*, кроме прямого действия (стекловидность соломины), вызывает разбалансированность метаболических процессов при формировании вторичных клеточных стенок и приводит к отклонению от оптимального соотношения углеводных и лигниновых компонентов. Обнаруженные различия по ряду показателей могут быть использованы в селекционных исследованиях, связанных с хозяйственно значимыми признаками стеблей злаков.

**Ключевые слова:** рожь, стекловидная соломина, механические свойства, лигнин, химическая структура, протонный магнитный резонанс, ядерный магнитный резонанс.

### ВВЕДЕНИЕ

Свойства стеблей (соломин) злаков, в первую очередь их длина и прочность, являются объектами селекции по ряду признаков. Оба эти показателя определяют устойчивость злаковых культур к полеганию. Некоторые другие показатели, такие, как толщина стенок, диаметр, длина междоузлий, состав и структура тканей соломины, подвергаются косвенному отбору в

связи с селекцией на продуктивность, неполегаемость, а также устойчивость к ряду грибных инфекций, известных под общим названием «ржавчина».

Механические свойства стеблей злаков обусловлены химическим составом и структурой биополимеров, из которых формируются стенки тканей соломины. Соотношение основных компонентов клеточных стенок – целлюлозы, гемицеллюлоз и лигнина – не является един-

ственным фактором, определяющим физические свойства тканей. Большое значение имеют структура биополимеров, тип химических связей составляющих их мономеров и особенности связей между разными компонентами (Бардинская, 1964; Лигнины ..., 1975; Запрометов, 1993; Далимова, Абдуазимов, 1994; Калабин и др., 2000; Рабинович и др., 2001; Шарова, 2004; Горшкова, 2007).

Описан ряд генов, оказывающих прямое или косвенное влияние на состав и структуру тканей, формирующих цветonoсный побег.

Наиболее существенное влияние оказывают гены, вызывающие ломкость (хрупкость) стебля, описанные у ряда видов злаков: кукурузы (Sindhu *et al.*, 2007), ячменя (Kokubo *et al.*, 1989; Burton *et al.*, 2010), риса (Doat, Marie, 1977; Monties *et al.*, 1981; Sharma *et al.*, 1986), диплоидной пшеницы *Triticum monococcum* (Ansari *et al.*, 2012).

У ржи неоднократно обнаруживали растения с ломкой («стекловидной») соломиной (Davison *et al.*, 1924; Антропов, Антропова, 1929; Sybenga, Prakken, 1962; Суриков, Романова, 1982; Vries, Sybenga, 1984; Смирнов, Соснихина, 1984; Культурная флора СССР, 1989). Данный признак обозначали *b* или *br* (brittle), а также *bs* (brittle straw). В книге «Генетика ржи» (Смирнов, Соснихина, 1984) приведено обозначение *fr* (fragile) как ломкость стебля и колоса. Признак наследуется как рецессивный и моногенный (Davison *et al.*, 1924; Sybenga, Prakken, 1962; Суриков, Романова, 1982; Vries, Sybenga, 1984; Смирнов, Соснихина, 1984). Ген *b* (*br* или *bs*) находится на коротком плече хромосомы 5R (Schlegel, Melz, 1993). Мутанты из разных источников на аллелизм не проверялись.

Ранее мы установили взаимное расположение генов в хромосоме 5 ржи (Коновалов и др., 2008, 2010). Ген стекловидности соломины *bs* сцеплен с двумя ферментными локусами ароматической алкогольдегидрогеназы (*Aadh1*) и шикиматдегидрогеназы (*Skdh*) и не сцеплен с основным геном яровости–озимости *Vrn1*, расположенным на дистальном конце длинного плеча той же хромосомы 5. Стекловидность наследовалась как моногенный рецессивный признак.

Использование мутантных генотипов по тем или иным метаболическим реакциям является

в настоящее время классическим подходом в изучении биосинтетических путей в живых организмах, в частности при изучении влияния процесса лигнификации на состав, структуру и свойства вторичных клеточных стенок растений (Горшкова, 2007).

В настоящее время в литературе имеется мало физико-химических данных для объяснения прочности стеблей злаковых культур. У злаков ломкость стебля исследована с генетической точки зрения на примере кукурузы, риса и ячменя. Показано, что существует корреляция между концентрацией лигнина и целлюлозы и механическими свойствами стебля (Nagao, Takahashi, 1963; Doat, Marie, 1977; Morrison, 1980; Monties *et al.*, 1981; Sharma *et al.*, 1986).

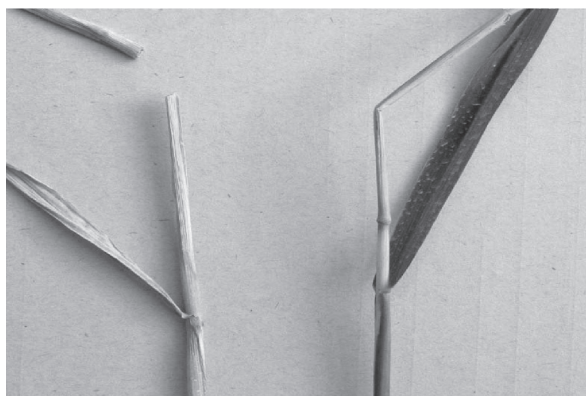
Ранее мы провели детальный анализ пяти показателей прочности соломины (модуль упругости, предел упругой деформации, величина упругой деформации, предельная нагрузка и величина необратимой деформации) и обнаружили существенные различия между нормальными и мутантными растениями (Коновалов и др., 2013). Кроме того, были обнаружены различия по коррелятивным связям между динамическими параметрами у мутантных и нормальных растений.

В этом исследовании механические показатели были сопоставлены с данными о химической природе лигнина и его состава в тканях нормальных и мутантных растений, определенными с помощью методов протонного и ядерного резонанса, а также с помощью инфракрасной спектроскопии и гистохимического окрашивания срезов тканей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили яровые растения ржи со стекловидной и нормальной соломиной (рис. 1). Мутантная форма со стекловидной соломиной (brittle stem) была получена из потомств F<sub>2</sub> озимой ржи к-11511 *bs bs* (образец ВИР от профессора В.Д. Кобылянского) скрещиванием с нормальными растениями ++ из ярового сорта Онохойская.

Содержание лигнина Класона в стеблях ржи определяли сернокислотным методом (Оболенская и др., 1965). Препараты лигнинов выделяли из предварительно обессмоленной



**Рис. 1.** Ломкостебельная (стекловидная) рожь *brittle stem* (слева) и норма (справа).

соломы путем обработки в течение 2 ч водным диоксаном в присутствии HCl (0,7 %) при температуре кипения (Чудаков, 1996).

Элементный анализ выполнен на CHN-анализаторе Evgovector EA 3000. Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  препаратов лигнина в растворе ДМСО- $d_6$  регистрировали на спектрометре DRX-500 (Bruker) с рабочей частотой 500 МГц при 52 °С. Отнесение отдельных диапазонов химических сдвигов в спектрах проведено в соответствии с (Калабин и др., 2000). Диаграммы нагрузки–деформации для соломин (3-го и 4-го междоузлий) регистрировались на динамическом механическом анализаторе DMA 242C Netzsh (Германия) в режиме развертки по деформации. Используемый вид деформации – трехточечный изгиб, частота – 1Гц.

Микрофотографии поперечных срезов стеблей получали на сканирующем электронном микроскопе TM-1000 (Hitachi) и оптическом конфокальном микроскопе BX51M (Olympus). Для идентификации (визуализации распределения) лигнина в растительных тканях проводили обработку срезов реагентом Визнера (Уайз, 1959).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Механические свойства – это совокупность показателей, характеризующих сопротивление материала воздействующей на них нагрузке. Из полученных диаграмм нагрузки–деформации были определены такие важные физико-механические показатели, как: предел упругости–максимальная нагрузка, при которой материал испытывает только упругую деформацию

( $F_{\text{упр}}$ ), и предел прочности–максимальная нагрузка, которую выдерживает образец до разрушения ( $F_p$ ).

На рис. 2 показаны типичные диаграммы нагрузки–деформации для нескольких образцов ломкой и неломкой ржи. Механические свойства определяли для третьего и четвертого междоузлий, которые испытывают максимальный изгибающий момент при деформации стебля. Диаметры стеблей нормальной и мутантной ржи соответственно равны  $1,81 \pm 0,46$  и  $1,84 \pm 0,38$  и достоверно не различаются. При сравнении диаграмм для ломкой и неломкой ржи видно, что для прогиба соломин неломкой ржи на ту же величину деформации требуются более высокие значения силы. Кроме того, вид зависимостей нагрузки–деформации позволяет определить, по какому механизму, хрупкому или пластическому, происходит разрушение материала. Диаграммы нагрузки–деформации для ломкой ржи соответствуют хрупкому разрушению образца, при котором наблюдаются только упругие деформации (зависимость между нагрузкой и деформацией носит линейный характер до начала разрушения). Для стеблей ржи-нормы разрушение носит пластический характер.

На рис. 3 приведены средние значения предела упругой деформации ( $F_{\text{упр}}$ ) и предела прочности ( $F_p$ ). По величинам этих показателей рожь-норма значительно превосходит рожь bs.

В ряде работ низкие показатели механических свойств для мутантов злаковых культур с ломким стеблем связывают со структурой клеточных стенок, их химическим составом и длиной волокон (Doat, Marie, 1977; Morrison, 1980; Monties *et al.*, 1981; Sharma *et al.*, 1986). Для того чтобы понять механизм, который контролирует механическую прочность стеблей, был проведен морфологический и гистохимический анализы поперечных срезов стеблей с реагентом Визнера, дающим с лигнином красное окрашивание. Интенсивность окраски примерно отражает общее содержание лигнина. На микрофотографиях срезов нормальной и ломкой ржи видны отличия в строении ткани стебля (рис. 4). Толщина клеточной стенки склеренхимы нормальной соломины составила  $4,364 \pm 0,809$  мкм, стекловидной соломины –  $0,762 \pm 0,098$  мкм.



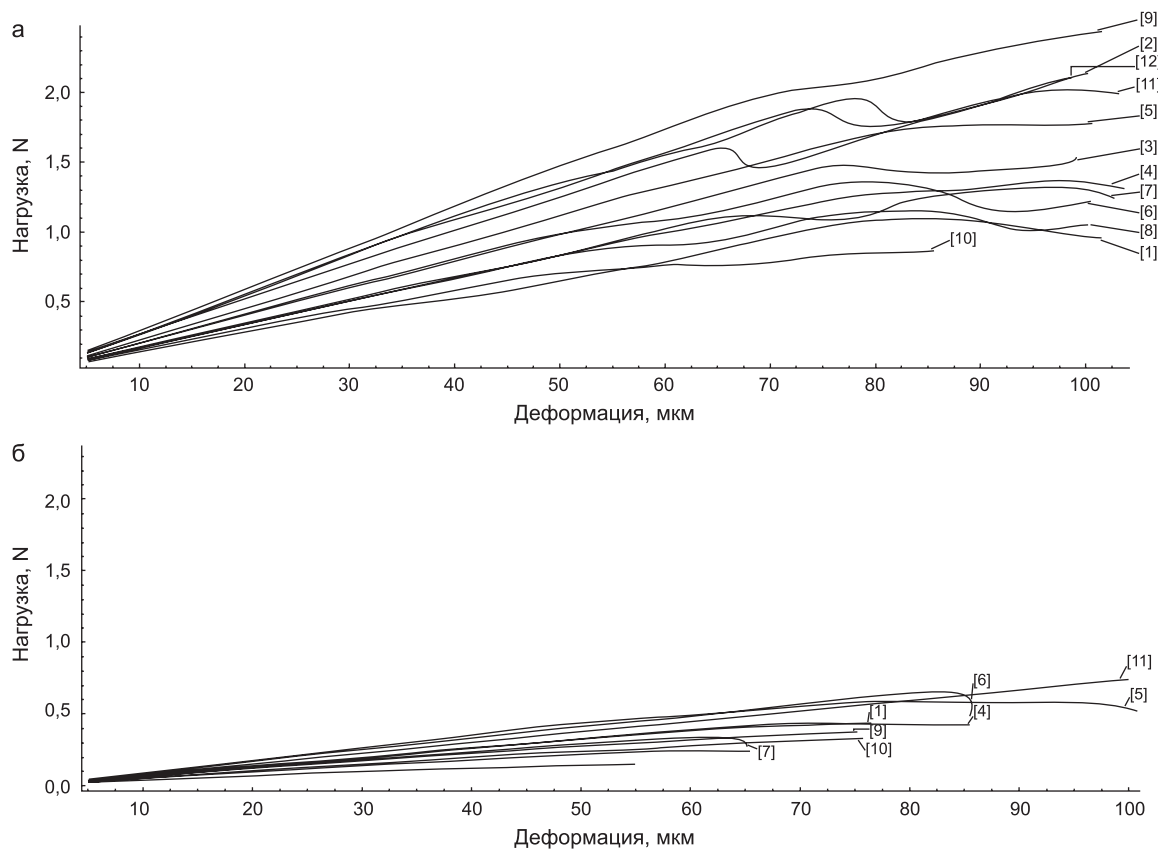


Рис. 2. Диаграммы нагрузки–деформации 3-го междоузлия стеблей ржи.

а – рожь-норма; б – рожь ломкая.

Уменьшение толщины клеточной стенки склеренхимы для мутантов с ломким стеблем по сравнению с нормальными растениями отмечалось в ряде работ на примере таких злаков, как рис, рожь, ячмень. При этом существенных отличий в значениях внутреннего и внешнего диаметров стебля для ломких и нормальных растений выявлено не было. На микрофотографиях также прослеживаются отличия в локализации лигнина в срезах стеблей нормальной и мутантной форм ржи. Большая интенсивность и площадь окрашивания в красный цвет тканей стекловидной ржи указывает на большее

в ней процентное содержание лигнина, чем в нормальной ржи. В стеблях ржи-нормы лигнин в основном сосредоточен в межклеточном веществе, первичной и третичной клеточных стенках. Морфологические особенности внедрения лигнина в полисахаридный каркас клеточной стенки в нормальных и мутантных растениях могут быть связаны с различиями в процессах биосинтеза самого лигнина и целлюлозы.

Нарушение процесса биосинтеза лигнина в мутантных растениях по сравнению с нормой может приводить к изменению как его количественного содержания в тканях, так и его хими-

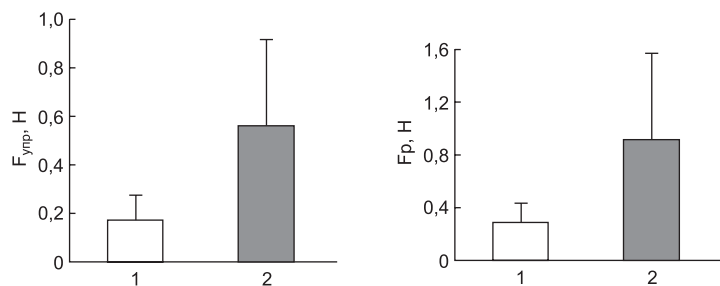
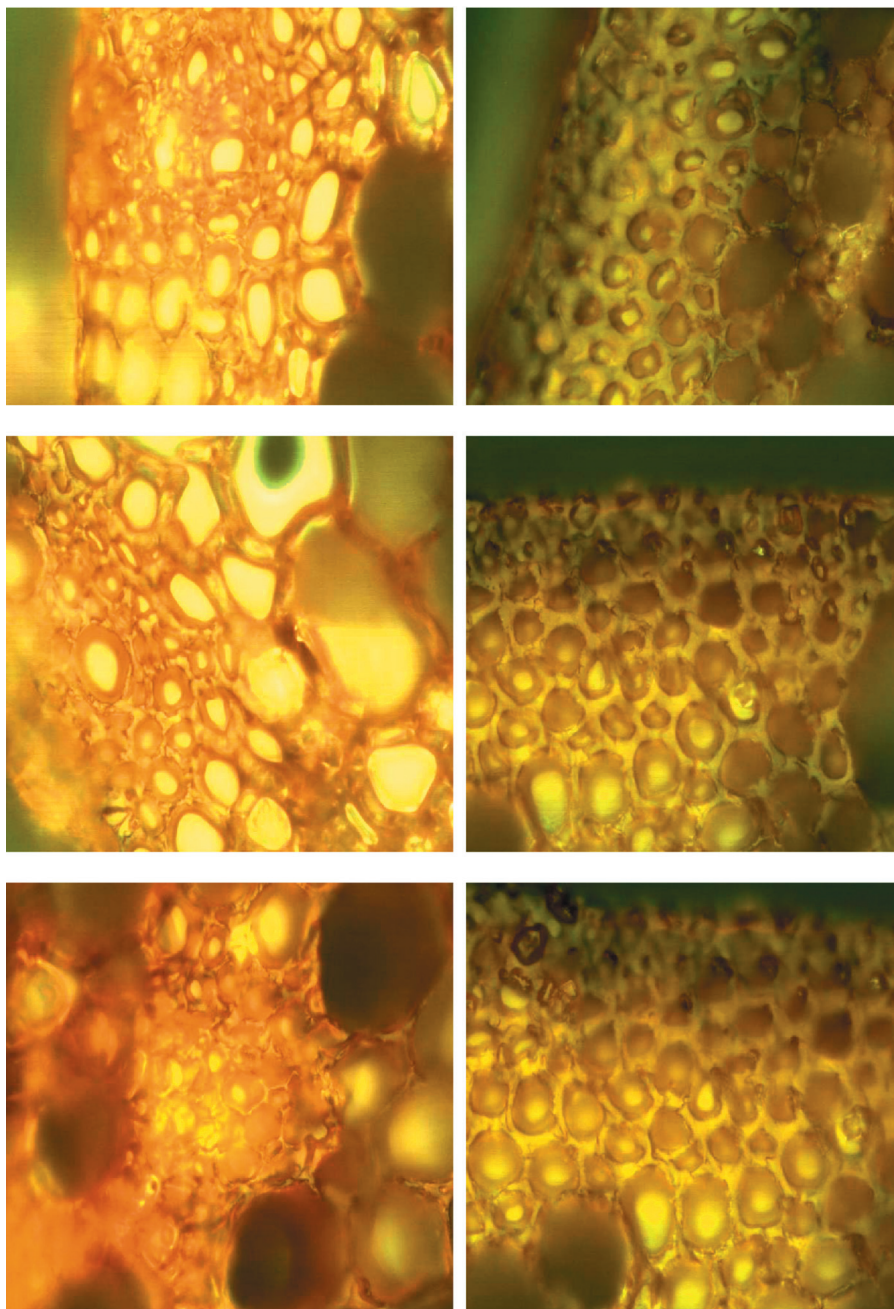


Рис. 3. Предел упругой деформации  $F_{упр}$  и предел прочности  $F_p$  для соломинок ржи мутанта (1) и нормы (2).



**Рис. 4.** Срезы стекловидной и нормальной соломин ржи, окрашенные реактивом Визнера.

Слева *bs bs*, справа – норма. Толщина срезов 30 мкм.

ческого состава. Содержание лигнина Класона в стеблях сравниваемых растений составило 21,2 % для нормы и 30,9 % для мутантной формы, что соответствует гистохимическому анализу поперечных срезов с пробой Визнера. Ломкие мутанты диплоидной пшеницы также имели повышенное содержание лигнина (Ansaří *et al.*, 2012). В работе Девисона с соавторами отмечено пониженное содержание лигнина у

ломких растений ржи, однако точное количественное определение не проводилось, вывод сделан на основе окраски срезов (Davison *et al.*, 1924). Возможно, мутанты, использованные в этой работе и в настоящем исследовании, неаллельны.

Для проведения химического анализа из растений были выделены препараты диоксанлигнина (ДЛ), структура которых практически

**Таблица 1**  
Элементный состав  
препаратов диоксан-лигнина (%)

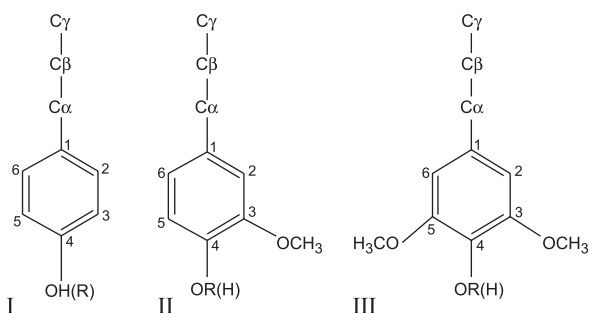
Химические элементы	Норма	<i>bs bs</i>
C	58,05	58,13
H	5,58	5,56
N	0,64	0,66
O	35,73	35,65

не меняется в процессе выделения. Препараты диоксан-лигнинов из нормальных (ДЛНР) и мутантных растений (ДЛМР) практически не отличались по элементному составу (табл. 1).

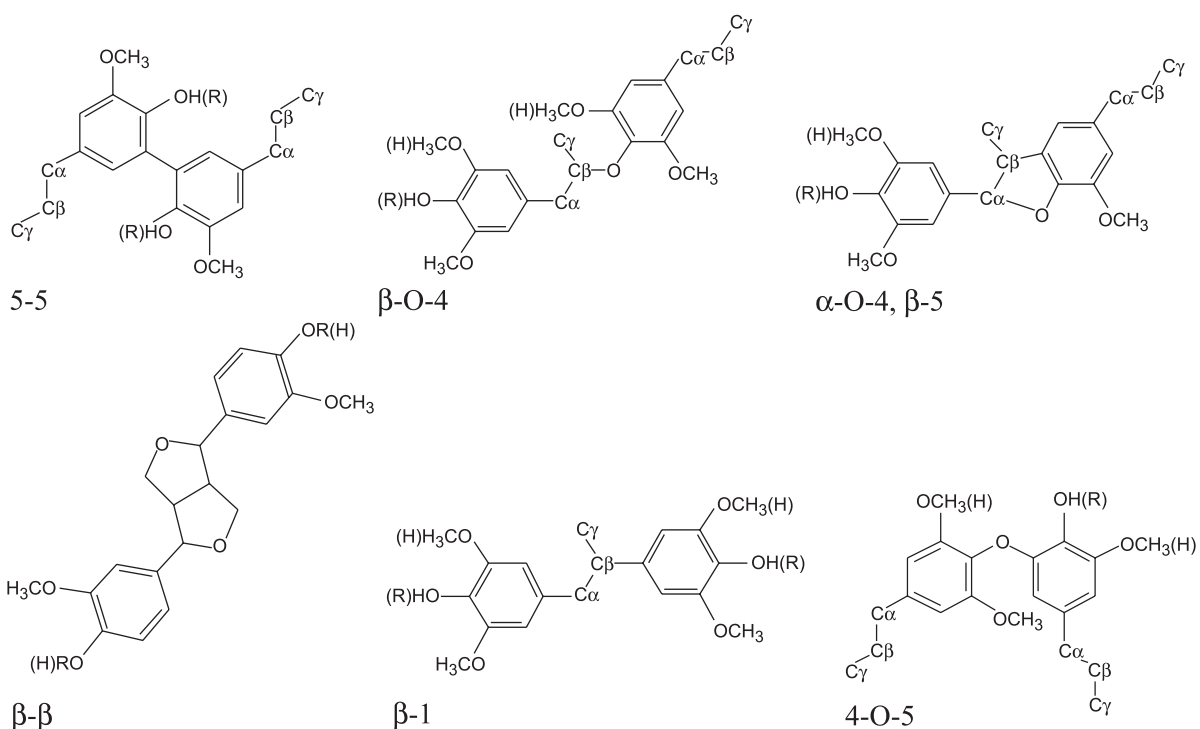
Различия в химической структуре диоксан-лигнинов были исследованы спектральными методами анализа.

Лигнин представляет собой полифенольный разветвленный полимер, не имеющий регулярного чередования повторяющихся единиц в отличие от целлюлозы. Это значительно затрудняет исследование его структуры и определение точного химического состава.

В структуре лигнина выделяют оксифенильные (I), гваяцильные (II) и сиригильные фрагменты (III) (Рабинович и др., 2001):



Биосинтез в растениях п-гидроксикоричных спиртов (п-кумарового, кониферилового, синяпового), которые, соответственно, и образуют в структуре лигнина фрагменты I–III, контролируется целым рядом ферментов, от активности которых зависит химический состав лигнина. Установлено, что фенолпропановые звенья на первой стадии полимеризации образуют между собой следующие структурные фрагменты лигнина (дилигнолы), дальнейшая полимеризация которых приводит к образованию разветвленного полимера:



Сравнение структуры лигнинов проводят по содержанию функциональных групп, соотношению фенолпропановых единиц, типам и частоте связей между структурными единицами и т. д.

Сам процесс полимеризации является спонтанным (неферментативным), однако происходит при участии так называемых «дирижирующих белков» (dirigent proteins), которые определяют структуру химических связей между мономера-

ми (Davin, Lewis, 2000; Burlat *et al.*, 2001). Эти белки – гликопротеиды – открыты сравнительно недавно и механизм их действия до конца не изучен.

Структурные фрагменты лигнина и их относительное содержание определялись по спектрам ПМР и  $^{13}\text{C}$  ЯМР в растворе ДМСО- $d_6$  (табл. 2, 3). Результаты анализа приведены в виде относительного содержания атомов углерода определяемого структурного элемента  $p_x = I_x / I_{\text{общ}}$  для  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектров и в виде доли атомов водорода в определяемой функциональной группе  $(-(\text{C}=\text{O})\text{OH}, -(\text{C}=\text{O})\text{H}, -\text{C}-\text{OH})$   $q_x = I_x / I_{\text{общ}}$  для ПМР-спектров, а также в пересчете на одно ароматическое кольцо  $n_x = p_x \times 6 / f_a$ , где  $f_a = I_{\text{ар}} / I_{\text{общ}}$  – ароматичность препарата лигнина, рассчитанная с учетом интенсивностей сигналов олефиновых фрагментов в диапазоне 162–103 м.д., 6 – число атомов углерода в ароматическом кольце).

Анализ данных, приведенных в табл. 2, 3, показывает, что лигнины растений с ломким и нормальным стеблем имеют существенные различия в своей структуре. ДЛНР (табл. 2) содержит больше свободных карбоксильных, альдегидных групп и свободных гидроксильных групп при С-4-углеродном атоме аромати-

ческого кольца всех типов. Низкая доля атомов водорода ОН-групп, дающих резонансные сигналы в области 9,3–8,4 м.д., может быть следствием замещения этого типа атомов в результате образования простых эфирных связей в сирингильных и связанных гваяцильных звеньях. Атом углерода в  $\gamma$ -положении к ароматическому кольцу в ДЛМР не окислен, т. е. находится преимущественно в форме СН-, СН<sub>2</sub>-групп, тогда как в ДЛНР этот атом углерода находится в форме карбонильной С=О и карбоксильной СООН групп. Отличия в типах связей алифатической части лигнина отмечены в диапазоне 2–4 м.д. ПМР-спектров.

Содержание ароматических фрагментов в сравниваемых препаратах ДЛ (табл. 3) существенно отличаются – общая ароматичность ( $f_a$ , %, доля атомов углерода, входящих в ароматические фрагменты макромолекулы) для ДЛЛР составляет ~ 50 %, у нормальной ~ 23 %. Различия в ароматичности возможны из-за разной длины боковой цепи в лигнинах, определяющейся как сумма алифатических и олефиновых атомов углерода, а также карбонильных и карбоксильных групп. Свой вклад в уменьшение общей ароматичности ДЛНР вносит высокое содержание связанных углеводов – 36 % (в ДЛЛР ~ 3,4 %)

Таблица 2

Распределение атомов водорода по функциональным группам и структурным фрагментам макромолекулы лигнина соломы ржи по спектрам ПМР

Диапазон $\delta$ $^1\text{H}$ (м.д.)	Отнесение	$q_x$ bs bs	$q_x$ норма
14,0–12,0	$\text{H}_{(\text{C}=\text{O})\text{OH}}$ – ОН карбоксильных групп	0,0236	0,0259
9,7–9	$\text{H}_{(\text{C}=\text{O})\text{H}}$ – Н альдегидных групп	0,0052	0,0069
12,4–9,3	$\text{H}_{\text{ОНфен}}$ – ОН при С-4 в гваяцильных и гидроксифенильных фрагментах	0,0305	0,0399
9,3–8,4	$\text{H}_{\text{ОНфен}}$ – ОН при С-4 в сирингильных звеньях, гваяцильных звеньях с 5–5 и $\beta$ -5 связями	0,0003	0,0035
8,4–6,3	$\text{H}_{\text{ар}}$ – атомы водорода ароматических колец	0,1832	0,1780
6,3–2,9	$\text{H}_{\text{О-ал}}$ – СН-, СНО-, СН <sub>2</sub> О-, СН <sub>3</sub> О – группы в $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ -положениях к ароматическому кольцу, СНО углеводов	0,6832	0,6925
2,3–0,3	$\text{H}_{\alpha,\beta,\gamma}$ – СН-, СН <sub>2</sub> -, СН <sub>3</sub> – группы в $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ -положениях к ароматическому кольцу, СНО углеводов	0,1816	0,1930
4,0–3,37	$\text{H}-\text{CH}_3\text{O}$ , $\text{C}_{\beta,\gamma}\text{H}-\text{OH}$ $\text{CH}_3\text{O}$ – группы в ароматическом кольце, СН-, СН <sub>2</sub> -, СН <sub>3</sub> - в $\beta$ и $\gamma$ -положениях к ароматическому кольцу, СНО углеводов	0,3376	0,3893
3,37–2,9	$\text{C}_\gamma\text{H}-\text{OH}$ – СН-, СН <sub>2</sub> - в $\gamma$ -положениях к ароматическому кольцу, СНО углеводов	0,1621	0,1314



Таблица 3

Параметры фрагментарного состава диоксанлигнинов из ЯМР-спектров  $^{13}\text{C}$

Диапазон	Отнесение	$p_x$ bs bs	$p_x$ норма	$n_x$ bs bs	$n_x$ норма
220–190	C=O кетонов	0,028	0,198	0,336	5,193
210–185	(C=O)H альдегидов	0,032	0,168	0,384	4,392
185–163,5	C=O(O) карбоксильные и сложноэфирные	0,025	0,137	0,299	3,593
163,6–156	C-4 в гидроксифенильных фрагментах, C-2/C-4, C-6 в 2,4,6-тригидроксифенилпропановых звеньях	0,010	0,044	0,124	1,157
156–120	CH=CH в связях Ar-CH=CH-R	0,205	0,146	2,436	3,822
117–112,8	C-5 в гваяцильных, C-3/C-5 в гидроксифенильных звеньях	0,100	0,002	1,194	0,065
112,8–108	C-2 в гваяцильных звеньях	0,036	0,019	0,423	0,509
108–104	C-2/C-6 в сиригильных звеньях (в том числе при кето-группе в $\alpha$ -положении к АК)	0,080	0,004	0,950	0,108
104–102,5	C-2/C-6 в сиригильных звеньях	0,054	0,001	0,647	0,038
90–78	$C_{\alpha,\beta}$ при $\alpha$ -O-4, $\beta$ -O-4	0,013	0,063	0,160	1,655
80–67	$C_{\alpha,\beta}$ -ОН	0,036	0,063	0,434	1,653
74–64	$C_\gamma$ в $\text{CH}_2$ -O-R, $\text{CH}_2$ -ОН	0,036	0,047	0,429	1,225
58–54	метоксильные группы	0,218	0,028	2,597	0,724
54–52	$C_\beta$ в $\beta$ - $\beta$	0,001	0,011	0,014	0,276
54–50	$C_\beta$ в $\beta$ -5	0,013	0,024	0,157	0,626
35–5	CH, $\text{CH}_2$ , $\text{CH}_3$ алифатические	0,208	0,144	2,479	3,779
102,6–95	углеводы	0,005	0,050		
93–80	$\alpha$ -O-4, $\beta$ -O-4	0,004	0,076	0,043	1,981
220–186	C=O альдегиды и кетоны	0,029	0,225	0,346	5,901
	ароматичность (степень ароматичности лигнина) $f_a$	0,505	0,229		

в пересчете на ксиланы (по резонансным сигналам в области 102,6–95 м.д.), что говорит о более прочных и многочисленных лигно-углеводных связях в соломе ржи-нормы.

В макромолекуле ДЛНР высоко содержание карбонильных, карбоксильных и сложноэфирных групп, дающих резонансные сигналы в области 220–163,5 м.д. (примерно в 10 раз выше, чем у ржи ломкой). Нормальные растения содержат больше альдегид-содержащих фрагментов в структуре лигнина. Повышенное содержание альдегидных групп во фрагментах лигнина наблюдалось в трансгенных растениях с пониженной активностью фермента CAD (дегидрогеназа коричневого спирта), которая контролирует конечную стадию образования монолигнолов – восстановление ароматических альдегидов до соответствующих спиртов (Halpin *et al.*, 1994).

Содержание метоксильных групп выше в препарате ДЛНР – 2,6 на АК, в препарате ДЛНР – ~0,7, что косвенно указывает на большее содержание сиригильных фрагментов в лигнине ржи ломкой. Содержание олефиновых фрагментов в боковой цепи в препаратах примерно одинаково.

Меньшее количество фрагментов  $C_{\alpha,\beta}$ -ОН,  $C_{\alpha,\beta}$  при  $\alpha$ -O-4-,  $\beta$ -O-4-связывании,  $C_\beta$  в  $\beta$ - $\beta$ - и в  $\beta$ -5-связывании в ДЛНР говорит о том, что в этом лигнине углеродные атомы в  $\alpha$ - и  $\beta$ -положениях к ароматическому кольцу находятся в составе кето-групп или  $\text{CH}_2$ -групп.

C-атомы в  $\gamma$ -положениях к ароматическому кольцу в ДЛНР преимущественно окислены до карбонильных и карбоксильных групп, в ДЛНР – в виде  $\text{CH}_2$ -O-групп, что подтверждают спектры ПМР.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы попытались исследовать причины хрупкости стеблей двух генотипов ржи. Установлено, что стебли мутантных растений при изгибе разрушаются по хрупкому механизму, а нормальные – по пластическому. При этом пределы упругой деформации и прочность существенно выше для нормальных растений. Низкие показатели механических свойств у мутанта могут коррелировать с уменьшенной толщиной клеточной стенки склеренхимы и повышенным содержанием лигнина. Полученные нами выводы подтверждаются и результатами других авторов, что указывает на общий механизм контроля механических свойств стеблей злаков.

Различия резонансного сигнала по атому водорода у четвертого углеродного атома ароматического кольца свидетельствуют о разном количестве простых эфирных связей, которыми лигниновые блоки связаны с полисахаридными фрагментами клеточных стенок. Различия по содержанию связанных углеводов свидетельствуют о том же – уменьшении количества лигнин-углеводных связей у стекловидного мутанта, что, вероятно, сказывается на механической прочности.

Лигнин мутантных растений содержит больше метоксильных групп, что свидетельствует о более высоком содержании сиригинильных компонентов лигнина.

При одинаковом диаметре соломины нормальной и мутантной ржи различаются по модулю упругости и пределу упругой деформации.

Спектральные исследования лигнинов, выделенных из нормальных и мутантных растений, позволили выявить существенные различия в их структуре, связанные с содержанием функциональных групп и структурных фрагментов. Более высокое содержание лигнина у мутанта не приводит к увеличению механической прочности соломины. Напротив, наблюдается снижение пределов упругой деформации и увеличение ломкости побегов. Вероятно, мутация *bs* кроме прямого действия (стекловидность соломины) вызывает разбалансированность метаболических процессов при формировании вторичных клеточных стенок и приводит к отклонению от оптимального соотношения углеводных и ароматических компонентов.

Различия в структуре лигнинов могут быть связаны с особенностями протекания биосинтеза лигнина у нормальных и мутантных растений и активностью ферментов, контролирующих этот процесс. Высокое содержание связанных углеводов в структуре лигнина из нормальных растений указывает на формирование более прочных и многочисленных лигно-углеводных связей, которые также могут вносить свой вклад в снижение хрупкости стеблей. Прочность стеблей злаков, как следует из наших результатов и из сопоставления их с данными по другим видам, определяется не столько соотношением углеводных и ароматических компонентов клеточных стенок, сколько их составом, структурой химических связей и распределением компонентов в различных типах тканей, образующих стебель. Вероятно, к хрупкости тканей стебля могут приводить мутации в разных локусах, что подтверждается данными по другим видам злаков.

Обнаруженные различия по ряду показателей могут быть использованы в селекционных исследованиях, связанных с хозяйственно значимыми признаками стеблей злаков.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность Н.П. Гончарову за помощь при проведении исследований и оформлении рукописи.

## ЛИТЕРАТУРА

- Антропов В.И., Антропова В.Ф. Рожь СССР и сопредельных стран. Л., 1929. 189 с.
- Бардинская М.С. Растительные клеточные стенки и их образование. М.: Наука, 1964. 160 с.
- Горшкова Т.А. Растительная клеточная стенка как динамичная система. М.: Наука, 2007. 430 с.
- Далимова Г.Н., Абдуазимов Х.А. Лигнины травянистых растений // Химия природных соединений. 1994. № 2. С. 160–177.
- Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993. 272 с.
- Калабин Г.А., Каницкая Л.В., Кушнарев Д.Ф. Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки. М.: Химия, 2000. 408 с.
- Коновалов А.А., Моисеева Е.А., Гончаров Н.П. Анализ наследования и сцепления некоторых признаков в хромосоме 5R у ржи *Secale cereale* L. // Селекция 21 века: новейшие технологии, достижения и перспективы. Харьков, 2008. С. 106–112.

- Коновалов А.А., Моисеева Е.А., Гончаров Н.П., Кондраченко Е.Я. Порядок расположения генов *bs*, *Skdh* и *Aadh1* в хромосоме 5R ржи *Secale cereale* L. // Генетика. 2010. Т. 46. № 6. С. 758–763.
- Коновалов А.А., Шундрин И.К., Маматюк В.И., Гончаров Н.П. Изучение прочности соломины у ржи *Secale cereale* L. методом динамического механического анализа // Докл. РАСХН. 2013. № 5. (В печати).
- Культурная флора СССР. Т. 2. Ч. 1. Рожь / Под ред. В.Д. Кобылянского. Л.: Агропромиздат, 1989. 368 с.
- Лигнины. (Структура, свойства и реакции) / Под ред. К. Сарканена и Людвиг. М.: Лесн. пром-сть, 1975. 630 с. (Lignins. Occurrence, formation, structure and reactions / Eds K.V. Sarkanen, C.H. Ludwig. Wiley Interscience. N.Y. a.o., 1971).
- Оболенская А.В., Щеголев В.П., Аким Г.Л. и др. Практические работы по химии древесины и целлюлозы. М.: Лесн. пром-сть, 1965. С. 85.
- Рабинович М.Л., Болотова А.В., Кондраченко В.И. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. Кн. 1. Древесина и разрушающие ее грибы. М.: Наука, 2001. 264 с.
- Смирнов В.Г., Соснигина С.П. Генетика ржи. Л.: Изд-во ЛГУ, 1984. 264 с.
- Суриков И.М., Романова Н.П. Тесное сцепление гена стекловидной соломины с геном самонесовместимости у ржи // Бюл. ВИР. 1982. Вып. 122. С. 67–71.
- Уайз Л.Э., Джан Э.С. Химия древесины / Под ред. Б.Д. Богомоллова. Пер. с англ. М.; Л., 1959. Т. 1. С. 351.
- Чудаков М.И. Исследование процессов конденсации и окислительно-гидролитического расщепления гидролизного лигнина // Тр. ВНИИГС. 1966. Вып. 15. С. 285–290.
- Шарова Е.И. Клеточная стенка растений. СПб.: Изд-во СПбУ, 2004. 156 с.
- Ansari M.J., Kumar R., Singh K., Dhaliwal H.S. Characterization and molecular mapping of EMS-induced brittle culm mutants of diploid wheat (*Triticum monococcum* L.) // Euphytica. 2012. V. 186. P. 165–176.
- Burlat V., Kwon M., Davin L.B., Lewis N.G. Dirigent proteins and dirigent sites in lignifying tissues // Phytochemistry. 2001. V. 57. No. 6. P. 883–897.
- Burton R.A., Ma G., Baumann U. *et al.* A customized gene expression microarray reveals that the brittle stem phenotype fs2 of barley is attributable to a retroelement in the HvCesA4 cellulose synthase gene1 // Plant Physiol. 2010. V. 153. P. 1716–1728.
- Davin B.L., Lewis N.G. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis // Plant Physiol. 2000. V. 123. No. 2. P. 453–462.
- Davison F.R., Brewbacer H.E., Thompson N.A. Brittle straw and other abnormalities in rye // J. Agric. Res. 1924. V. 28. No. 2. P. 169–172.
- Doat J., Marie R. Analyse d'un mutant a tige cassante radio-induit chez le Riz, *Oryza sativa* L. // Ann. Amelior. Plantes. 1977. V. 27. P. 705–715.
- Halpin C., Knight M.E., Foxon G.A. *et al.* Manipulation of lignin quality by downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase // Plant J. 1994. V. 6. No. 3. P. 339–350.
- Kokubo A., Kuraishi S., Sakurai N. Culm strength of barley1 correlation among maximum bending stress, cell wall dimensions, and cellulose content // Plant Physiol. 1989. V. 91. P. 876–882.
- Morrison I.M. Changes in the lignin and hemicellulose concentrations of ten varieties of temperate grasses with increasing maturity // Grass Forage Sci. 1980. V. 35. P. 287–293.
- Monties B., Mestres C., Baghdadi K. Chemical and physical properties of a brittle culm lignin rich mutant of rice // Intern. Symp. On Wood and Pulping Chemistry. Stockholm, 1981. V. 5. P. 40–43.
- Nagao S., Takahashi M. Trial construction of twelve linkage groups in Japanese rice. Genetical studies on rice plant // J. Fac. Agr., Hokkaido Univ. Sapporo, 1963. V. 53. P. 72–130.
- Schlegel R., Melz G. Genetic linkage map of rye (*Secale cereale* L.) // Genetic maps. 6 ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, 1993. P. 6.235–6.255.
- Sharma U., Brillouet J.-M., Scalbert A., Monties B. Studies on a brittle stem mutant of rice, *Oryza sativa* L.; characterization of lignin fractions, associated phenolic acids and polysaccharides from rice stem // Agronomie. 1986. V. 6. P. 265–271.
- Sindhu A., Langewisch T., Olek A. *et al.* Maize *Brittle stalk2* encodes a COBRA-like protein expressed in early organ development but required for tissue flexibility at maturity // Plant Physiol. 2007. V. 145. No. 4. P. 1444–1459.
- Sybenga J., Prakken R. Gene analysis in rye // Genetica. 1962. V. 33. No. 2. P. 95–105.
- Vries J.N. de, Sybenga J. Chromosomal location of 17 monogenically inherited morphological markers in rye (*Secale cereale* L.) using the translocation tester set // J. Plant Breed. 1984. V. 92. No. 2. P. 117–139.

**PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF CULMS  
IN RYE (*SECALE CEREALE* L.) WITH A BRITTLE STEM**

**A.A. Konovalov<sup>1</sup>, I.K. Shundrina<sup>2</sup>, E.V. Karpova<sup>2</sup>, V.I. Mamatyuk<sup>2</sup>**

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

<sup>2</sup> Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, Novosibirsk, Russia

**Summary**

Test crosses of rye for the brittle stem character yielded sibs plants with normal and brittle culms. The stems were studied with regard to chemical composition, spectroscopic features and mechanical strength. The normal and fragile culms differed in the content of aromatic lignin monomers and the ratio of various types of chemical bonds.

At equal thicknesses, the normal and mutant rye plants differed in the modulus of elasticity and proportional limit. It was found that lateral load breaks stems of mutant plants by the brittle fracture mechanism, and normal plants, by ductile fracture. The normal plants had much higher proportional limits and mechanical strength values.

By means of NMR method differences were found in the lignin chemical structure, such as the content of aldehyde and methohyl groups, total aromaticity and the number of ether bonds, by which lignin blocks are linked to carbohydrate fragments of cellular walls.

The higher lignin content in the mutant does not improve culm mechanical strength. On the contrary, a decrease in proportional limit and increase in shoot brittleness are observed. Possibly, the *bs* mutation, in addition to its direct action (culm brittleness) unbalances metabolic processes when forming secondary cellular walls and leads to a deviation from the optimum ratio of carbohydrate and aromatic components. The differences in a number of indicators can be used in breeding programs concerning agricultural traits of stems in cereals.

**Key words:** rye, brittle stem, mechanical properties, lignin, chemical structure, proton magnetic resonance, nuclear magnetic resonance.



УДК 577.11 : 633.11

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ, ИНТРОГРЕССИИ И ПИРАМИДИРОВАНИЯ ГЕНОВ

© 2013 г. **И.Н. Леонова**

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

Поступила в редакцию 8 апреля 2013 г. Принята к публикации 7 мая 2013 г.

За последние десятилетия накоплен большой теоретический и практический опыт использования ДНК-маркеров для изучения генетического разнообразия, построения молекулярно-генетических карт, картирования генов и локусов количественных признаков и применения технологий молекулярного маркирования для создания коммерческих сортов и селекционных линий зерновых культур. На сегодняшний день молекулярные маркеры используются в основном для генотипирования растительного материала, интрогрессии и пирамидирования геномных районов, содержащих локусы хозяйственно важных признаков, контролируемых главными генами. Вклад новых технологий в селекцию признаков с мультигенным наследованием пока остается небольшим. Несмотря на значительный прогресс методов молекулярной генетики и геномики растений и интерес к этим методам со стороны специалистов-практиков, имеется большое число лимитирующих факторов, влияющих на внедрение новых технологий в практическую селекцию. В данной статье рассматриваются возможные области применения ДНК-маркеров в селекции зерновых культур и преимущества и ограничения практического использования молекулярных методов в сравнении с методами фенотипической селекции.

**Ключевые слова:** молекулярные маркеры, маркер-вспомогательная селекция, валидация.

### ВВЕДЕНИЕ

Зерновые культуры, в число которых входят пшеница, ячмень, кукуруза, рис, по продуктивному и кормовым качествам относятся к наиболее ценным сельскохозяйственным культурам и являются основным продуктом питания во многих регионах мира. В настоящее время стало очевидно, что рост населения земного шара значительно опережает производство зерна, и по прогнозам Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН к 2050 г. производство сельскохозяйственной продукции в мировом масштабе должно быть увеличено не менее чем на 70 % (Tester, Langridge, 2010; Pardey, 2011; <http://faostat.fao.org>). Возрастающие потребности в зерне, включая потребности в сырье для производства биотоп-

лива, можно удовлетворить за счет повышения урожайности, интенсивности земледелия и внедрения новых технологий. Сокращение генетического разнообразия современных сортов, снижение иммунитета к болезням и насекомым, загрязнение окружающей среды в связи с применением пестицидов, а также ухудшение качества и деградация земельных ресурсов – все эти факторы приводят к тому, что урожайность зерновых культур увеличивается более медленными темпами, чем рост населения. Внедрение в селекционные программы современных биотехнологических подходов, основанных на использовании молекулярных маркеров, может способствовать решению этих проблем. Одним из таких подходов, получившим развитие в последнее десятилетие, является маркер-вспомогательная селекция (MAS,

marker-assisted selection), которая используется в селекционных программах экономически развитых стран в качестве методического приема для интенсификации селекционных процессов (Varshney *et al.*, 2005; Collard, Mackill, 2008). Большое число генов и локусов, контролирующих устойчивость различных видов злаков к биотическим и абиотическим стрессам, признаки урожайности и качества зерна, было идентифицировано и картировано с помощью ДНК-маркеров (Somers, 2004; Landjeva *et al.*, 2007). Ряд селекционных схем, в которых были использованы маркеры, получил теоретическое и практическое обоснование (Frisch *et al.*, 1999; Kuchel *et al.*, 2007; Herzog, Frisch, 2011). Однако, несмотря на огромный потенциал MAS как методического приема, используемого для «непрямой» селекции хозяйственно важных признаков, внедрение новых технологий в практику идет медленными темпами. В данной статье рассматриваются современное состояние проблемы применения ДНК-маркеров в селекции и факторы, лимитирующие их практическое использование для создания коммерческих сортов и селекционных линий.

#### **ДНК-МАРКЕРЫ И «МАРКЕР-ВСПОМОГАТЕЛЬНАЯ СЕЛЕКЦИЯ»**

Молекулярные маркеры с момента их разработки в 1980-х гг. определили бурное развитие молекулярной генетики и селекции растений. К молекулярным маркерам принято относить ДНК-маркеры, хотя широко востребованные ранее изоферменты и другие маркерные системы, основанные на полиморфизме белков, также считаются молекулярными маркерами. Подробную информацию о классификации и описании различных классов ДНК-маркеров, преимуществах и недостатках их использования для анализа генома растений можно найти в обзорных статьях (Somers, 2004; Mohler, Schwarz, 2005; Varshney *et al.*, 2007; Хлесткина, 2011). В настоящее время с помощью молекулярных маркеров решается большое число задач функциональной и структурной генетики и геномики растений, часть из которых нашли свое применение в практических областях.

Применение молекулярных маркеров в практической селекции обозначается терми-

ном MAS (marker-assisted selection), который в русскоязычной литературе имеет несколько вариантов перевода, таких, например, как «маркер-вспомогательная селекция», «молекулярная селекция» либо «селекция с использованием молекулярных маркеров». Основным принципом MAS заключается в идентификации тесного сцепления между маркером и геном, контролирующим признак, и использовании ассоциаций маркер–признак в практических целях для создания новых сортов и селекционных линий. После того как ассоциации маркер–признак установлены, создание новых генотипов может идти с привлечением традиционных методов селекции (скрещивание, беккроссирование, самоопыление и отбор).

MAS как методический подход используется в селекции для решения следующих задач:

I. Оценка чистоты/идентичности сортового материала и оценка генетического разнообразия современных сортов. Для этой цели обычно используют набор маркеров, выявляющих в геноме наибольшее число аллелей (Huang *et al.*, 2002). Например, австралийская компания CSIRO Plant Industry использует различные ID наборы молекулярных маркеров, пригодные для идентификации сортов пшеницы и ячменя (<http://www.csiro.au>).

II. Хромосомная локализация и картирование генов и локусов количественных признаков (QTL) и выявление маркеров, тесно сцепленных с признаками. Наличие молекулярно-генетических карт хромосом различных видов злаков, насыщенных маркерами различного типа, облегчает поиск ассоциаций «ген-маркер» для конкретной картирующей популяции (Sourdille *et al.*, 2004; Salina *et al.*, 2006; Ganal, Röder, 2007; Marone *et al.*, 2012). Большой объем информации о хромосомной локализации генов и QTLs, контролирующих морфологические, адаптивные признаки, устойчивость к различным видам стрессов, опубликованы в Каталоге генных символов и интернет-сайтах баз данных (McIntosh *et al.* 2010, 2011, 2012; <http://wheat.pw.usda.gov/>; <http://www.maizegdb.org/>; <http://www.gramene.org/>; <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/>; <http://www.ars.usda.gov/>).

III. Контроль различных типов скрещивания. Используется во всех ныне существующих схемах MAS (в сочетании с фенотипической

селекцией) для выявления родительских форм, обладающих лучшими характеристиками. С помощью маркеров можно получить информацию о протяженности фрагмента, содержащего «целевой» locus; числе генов, контролирующих признак; содержании генома рекуррентного родителя. Молекулярные маркеры эффективны для анализа потомства при сложных скрещиваниях, когда используются несколько родительских форм, например 3W (tree way crossing) или 4W (four way crossing), либо контроля процессов инбридинга и получения двойных гаплоидов (Xu, 2003; Collard, Mackill, 2008; Basu *et al.*, 2011).

IV. Интрогрессия генов/QTLs в различных схемах MAS. В сравнении с методами традиционной селекции позволяет уменьшить число этапов (например, беккроссов), необходимых для интрогрессии локуса, сократить размер выборки и контролировать длину чужеродного фрагмента (Herzog, Frisch, 2011; Timonova *et al.*, 2013).

V. Пирамидирование генов. Пирамидированием называется процесс объединения в одном генотипе нескольких генов, контролирующих один и тот же признак. Использование маркеров для пирамидирования генов является одним из важных преимуществ MAS по сравнению с методами традиционной селекции. Например, для признаков устойчивости к грибным патогенам достаточно сложно на основании фенотипических данных идентифицировать растения, имеющие более одного гена устойчивости. Применение маркеров позволяет выявлять генотипы, содержащие комбинации генов, на более ранних стадиях, например в популяциях F<sub>2</sub> (Sivasamy *et al.*, 2009; Беспалова и др., 2012).

VI. Селекция признаков с количественным наследованием. Использование молекулярных маркеров в сочетании со статистическими компьютерными программами для картирования QTLs позволяет локализовать «минорные» локусы, которые трудно выявляются методами фенотипической селекции вследствие эпистатических взаимодействий или влияния окружающей среды (Narain, 2010; Xu *et al.*, 2012). Так, экспрессия большинства генов устойчивости зависит от окружающей среды (состав инокулюма, температурные условия, влажность). То же относится к более сложным признакам, определяющим урожайность и качество зерна.

В сочетании с методами классической селекции MAS существенно сокращает время, необходимое для создания новых генотипов. В качестве примера можно привести данные Kuchel с соавт. (2008), которые использовали стратегию MAS для интрогрессии признака устойчивости к ржавчине в элитный сорт мягкой пшеницы Stylet. Для создания устойчивого сорта понадобилось 5 лет, что оказалось на 7 лет меньше, чем при получении сорта с помощью традиционных методов селекции. Кроме сокращения времени, MAS имеет ряд дополнительных преимуществ по сравнению с фенотипической селекцией.

1. Анализ ДНК-маркерами можно проводить в лабораторных условиях на любой стадии развития (от семян до взрослого растения). Отсутствует необходимость проведения фенотипической оценки в полевых условиях в определенное время года, в определенном регионе. Существенное снижение материальных затрат из-за сокращения числа анализируемых образцов (анализ может быть проведен на нескольких растениях). В случае создания устойчивых сортов нет необходимости иметь и постоянно поддерживать расы патогенов и тестерные линии с генами резистентности.

2. «Непрямая» селекция (i) признаков, которые трудно фенотипируются, либо стоимость фенотипического анализа высока; (ii) признаков, на проявление которых существенно влияет окружающая среда; (iii) признаков с мультигенным контролем. Например, для генов устойчивости к патогенам могут существовать ограничения по карантину либо отсутствует набор рас патогена для проведения фенотипической оценки. В некоторых случаях фенотипическая оценка может приводить к гибели растений.

3. Контроль интрогрессии генетического материала донора и протяженности фрагмента донорского генома, выявление и поддержание в популяции рецессивных аллелей генов.

### СЕЛЕКЦИОННЫЕ СТАДИИ, В КОТОРЫХ ИСПОЛЬЗУЕТСЯ MAS

В селекционных программах с привлечением технологий MAS наиболее оптимальными являются три стадии, когда наиболее выгодно использовать ДНК-маркеры. Это селекция «целевого»

локуса», или «foreground selection», рекомбинантная селекция и анализ генома рекуррентного родителя, или «background selection» (Collard, Mackill, 2008). На первом этапе у линии-донора признака определяют хромосомную локализацию фрагмента, содержащего «целевой» locus (рис. 1). Это особенно важно для признаков, которые сложно фенотипируются, либо для признаков с рецессивным наследованием, которые в классических схемах проходят несколько этапов самоопыления потомства. Стадия рекомбинантной селекции включает оценку рекомбинационных событий вокруг фрагмента донорского генома и выявление фланкирующих маркеров, сцепленных с локусом. Целью данного этапа также является редукция протяженности фрагмента, содержащего «целевой» locus. На 3-й стадии определяют содержание генома рекуррентного родителя с использованием маркеров, локализованных по всему

геному и несцепленных с донорским фрагментом. Эти три стадии в том или ином сочетании используются в беккроссных селекционных программах для интрогрессии и пирамидирования генов. Беккроссирование является одним из основных методических приемов, который широко применяется в классической селекции с начала прошлого века для интрогрессии одного или нескольких генов. Однако использование ДНК-маркеров, как уже было упомянуто выше, в беккроссных программах в сочетании с фенотипической селекцией значительно ускоряет получение селекционного материала. Известно, что для интрогрессии одного доминантного гена необходимо провести минимум 6 беккроссов, чтобы в итоге содержание генома рекуррентного родителя составило 99 % (Frisch, Melchinger, 2005). При этом считается, что уже после первого беккросса содержание генома рекуррентного родителя составляет в среднем 75 %. На практи-



**Рис. 1.** Схематическое изображение этапов, необходимых для разработки и валидации молекулярных маркеров.



ке же получается, что только небольшое число потомков имеет такой показатель и выявить эти генотипы на ранних стадиях можно только ДНК-маркерами (Salina *et al.*, 2003; Randhawa *et al.*, 2009). Теоретически и экспериментально доказано, что даже после большого числа беккроссов (> 10) процент содержания в потомстве генома рекуррентного родителя может не превышать 90 % (Hospital, 2002). Использование полиморфных маркеров позволяет сократить число необходимых беккроссов до 2–4 и уменьшить величину генетического материала, переносимого вместе с «целевым» локусом (Falke *et al.*, 2009; Timonova *et al.*, 2013).

В ряде работ проведено компьютерное моделирование с последующим практическим подтверждением различных стратегий MAS, учитывающее число интрогрессированных генов, их доминантное или рецессивное состояние (Frisch *et al.*, 1999; Kuchel *et al.*, 2007; Prigge *et al.*, 2009; Herzog, Frisch, 2011). Эти работы фокусируются в основном на оптимизации дизайна стратегий, включающих число беккроссов, оптимальный размер анализируемой популяции и число используемых в анализе маркеров. В последние годы беккроссные стратегии MAS используются для создания библиотек изогенных и интрогрессивных линий и интрогрессии признаков с мультигенным контролем (Falke *et al.*, 2009; Falke, Frisch, 2011; Timonova *et al.*, 2013). Примеры успешного использования MAS для интрогрессии, пирамидирования генов и создания библиотек изогенных линий злаков приведены в табл. 1.

### **ВАЛИДАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ИХ ДАЛЬНЕЙШЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПРАКТИЧЕСКОЙ СЕЛЕКЦИИ**

Прежде чем молекулярный маркер будет использован в практических целях для детекции признака, он должен пройти путь от выявления ассоциаций маркер–признак до валидации (рис. 1). Валидация означает тестирование способности ДНК-маркеров предсказывать фенотип на широком наборе сортов, изогенных линий, популяций, в различном генетическом окружении и в различных условиях окружающей среды. По данным Y. Xu (2003),

несколько ключевых компонентов необходимы для результативного использования маркеров в программах MAS, а именно надежные генетические маркеры, насыщенные молекулярные карты и наличие установленных ассоциаций «маркер–признак».

В целом идеальный маркер должен обладать определенными характеристиками, чтобы его можно было использовать для «непрямой» селекции генов/QTLs:

- широкий полиморфизм, распространенность по всему геному, нейтральность по отношению к условиям окружающей среды;
- кодоминантное наследование (способность выявлять генотипы в гомо- и гетерозиготном состоянии);
- доступность маркера, его невысокая стоимость, простота, надежность и воспроизводимость метода и промежуток времени, необходимый для проведения анализа.

К идеальным маркерам можно отнести так называемые функциональные маркеры, разработанные на основании нуклеотидных последовательностей гена, которые позволяют не только выявлять наличие данной последовательности в генотипе, но и различать его аллельные варианты (Varshney *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2012). Диагностическая ценность остальных классов ДНК-маркеров, разработанных из генетически нейтральных участков генома, зависит от ряда факторов, поэтому только часть маркеров, разработанных для диагностики генов в конкретных картирующих популяциях, широко применяется в практической селекции. Это убедительно продемонстрировано экспериментами, проведенными на базе нескольких научных лабораторий Западной Европы, по оценке диагностической ценности маркеров, сцепленных с эффективными генами устойчивости к бурой ржавчине (Chelkowski *et al.*, 2003; Blaszczyk *et al.*, 2004, 2008; Vida *et al.*, 2009). Данные, полученные с использованием изогенных линий и сортов пшеницы, содержащих различные *Lr* гены устойчивости к бурой ржавчине, показали, что некоторые маркеры не подходят для скрининга популяций в селекционных программах (табл. 2).

Методы выявления ассоциаций «маркер–признак» основаны на построении молекулярно-генетических карт для картирующих (расщеп-

Таблица 1

Примеры использования ДНК-маркеров в схемах MAS для создания селекционных линий

Признак, вид растения	Ген/QTL	Тип маркера	Конечный результат/стадии применения ДНК-маркеров	Литературный источник
Бактериальный ожог, рис	<i>xa5, xa13</i> и <i>Xa21</i>	STS	Пирамидирование трех генов <i>Xa</i> в коммерческом сорте риса/ BC <sub>1-2</sub> F <sub>1-2</sub>	Singh <i>et al.</i> , 2001
Урожайность, ячмень	QTLs на хромосомах 2HL и 3HL ячменя	RFLP	Интрогрессия двух QTLs/BC <sub>1-2</sub> F <sub>1</sub>	Schmierer <i>et al.</i> , 2004
Бурая и желтая ржавчины, гены карликовости, гютенины, пшеница	<i>Lr34/Yr18, Lr46/Yr29, Lr24/Sr24, Rht, Glu-D1, Glu-A3</i>	SSR, RFLP	Практическая отработка стратегии MAS для получения беккроссных потомков и дигаплоидов пшеницы с различными комбинациями генов/ BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> и дигаплоиды	Kuchel <i>et al.</i> , 2007
Бурая и стеблевая ржавчины, мучнистая роса, пшеница	<i>Lr19/Sr25, Sr36/Pm6</i>	SSR, SCAR	Пирамидирование генов в сорта пшеницы и валидация маркеров/BC <sub>2-3</sub> F <sub>3</sub>	Sivasamy <i>et al.</i> , 2009
Бурая ржавчина, пшеница	<i>Lr1, Lr9, Lr24, Lr47</i>	STS, SCAR, CAPS	Интрогрессия генов в коммерческие сорта мягкой пшеницы/ BC <sub>1</sub> F <sub>1-2</sub>	Nocente <i>et al.</i> , 2007
Стеблевая ржавчина, пшеница	<i>QYrtm.pau-2A, QYrtb.pau-5A</i>	SSR	Интрогрессия QTLs в мягкую пшеницу и валидация маркеров/BC <sub>1</sub> F <sub>3</sub>	Chhuneja <i>et al.</i> , 2008
Предуборочное прорастание зерна, пшеница	QTLs	SSR, EST	Библиотека интрогрессивных линий пшеницы, содержащих локусы, контролирующие прорастание на корню/BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub>	Torada <i>et al.</i> , 2008
Хлебопекарные качества, рожь	Различные фрагменты хромосом	AFLP, SSR	Библиотека интрогрессивных линий ржи/BC <sub>1-2</sub> S <sub>3</sub>	Falke <i>et al.</i> , 2008
Бурая ржавчина, пшеница	<i>Lr9, Lr24, Lr25, Lr29, Lr35, Lr37</i>	STS, SCAR, RAPD	Интрогрессия генов в озимые сорта пшеницы и валидация маркеров/ BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> и дигаплоиды	Vida <i>et al.</i> , 2009
Фузариоз, пшеница	<i>Fhb</i> и <i>Qfhs.ifa-5A</i>	SSR	Интрогрессия двух QTLs/BC <sub>2</sub> F <sub>3</sub>	Salameh <i>et al.</i> , 2011
Урожайность и хлебопекарные качества, пшеница	Множественные QTLs	SSR, Glu-B3	Библиотека из 82 интрогрессивных линий пшеницы с различными сочетаниями QTLs/BC <sub>5</sub> F <sub>2-6</sub>	Li <i>et al.</i> , 2012
Содержание лизина и амилопектина в эндосперме, кукуруза	Гены <i>waxy</i> и <i>opaque-16</i>	SSR	Интрогрессия генов в геном кукурузы/F <sub>1-2</sub> и BC <sub>1-2</sub> F <sub>1-2</sub>	Yang <i>et al.</i> , 2013
Бурая ржавчина, пшеница	QTL, <i>QLr.icg5B, QLr.icg2A, QLr.icg1A</i>	SSR	Создание библиотеки интрогрессивных линий пшеницы, содержащих комбинации QTLs/BC <sub>2</sub> F <sub>2-3</sub>	Timonova <i>et al.</i> , 2013

ляющихся) популяций, полученных на основе скрещивания родительских форм, контрастных по изучаемому признаку. Для этой цели обычно используют разные популяции, такие, как F<sub>2</sub>, BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>, DH (двойные гаплоиды), RIL (рекомби-

нантные инбредные линии), каждая из которых обладает как преимуществами, так и недостатками (van den Berg *et al.*, 1997; Xu, 2010). Эффективность MAS главным образом зависит от того: а) насколько тесно сцеплен маркер с признаком

Таблица 2

Амплификация маркеров, разработанных для *Lr* генов, у изогенных линий Тэтчер и сортов пшеницы, содержащих различные гены устойчивости к бурой ржавчине

Изогенные линии сорта Тэтчер и сорта с генами <i>Lr</i>	Наименование сцепленного с геном ДНК-маркера (наличие (+)/отсутствие (-) амплификации фрагмента)										
	pTAG621 (ген <i>Lr1</i> )	J13 и SCS5 (ген <i>Lr9</i> )	FL2245 (ген <i>Lr10</i> )	Gb и STS265 (ген <i>Lr19</i> )	J9 (ген <i>Lr24</i> )	SCS73 (ген <i>Lr24</i> )	Lr28-01 (ген <i>Lr28</i> )	SCS421 (ген <i>Lr28</i> )	csVrga13 (ген <i>Lr37</i> )	PS10 (ген <i>Lr47</i> )	
<i>Lr1</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Lr3</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
<i>Lr9</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	
<i>Lr10</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	
<i>Lr11, 12, 13, 14, 15, 22, 23, 42</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
<i>Lr16, 17, 18</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
<i>Lr19</i>	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	
<i>Lr20</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
<i>Lr21</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
<i>Lr24, Lr25</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	
<i>Lr28</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
<i>Lr29</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
<i>Lr30</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Lr37</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
<i>Lr44</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
<i>LrB</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
<i>Lr47</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Сорт Тэтчер	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Примечание. В таблице суммированы результаты, приведенные в статьях Chelkowski *et al.*, 2003; Blaszczyk *et al.*, 2004, 2008; Vida *et al.*, 2009.

и б) насколько насыщенным являются молекулярно-генетические карты. Известно, что минимум три маркера необходимы для выявления ассоциаций «маркер–признак»: один должен cosegregировать с признаком и используется в основном на стадии «foreground selection», два других маркера должны фланкировать фрагмент донорского генома и быть эффективными для этапа рекомбинантной селекции (Xu, 2010). Выявление сцепления «маркер–признак» на конкретной картирующей популяции не означает, что данный маркер будет эффективен для предсказания фенотипа в другом селекционном материале. Во многих случаях результаты картирования, полученные для специфических скрещиваний, не переносятся автоматически на другие скрещивания, особенно если признак

имеет количественное наследование. Это можно объяснить следующими причинами:

а) рекомбинационными событиями, происходящими в процессе переноса гена от донора к реципиенту, которые зависят от генетической дистанции между геном и маркером и от генетического сходства родительских форм. Известно, например, что фрагмент, перенесенный из генома *Agropyrum elongatum*, содержащий ген устойчивости к бурой ржавчине *Lr19*, практически не рекомбинирует с гомеологичными хромосомами пшеницы. Тем не менее W. Zhang с соавт. были получены рекомбинантные линии, содержащие укороченный фрагмент с геном *Lr19*, в котором отсутствовал один из диагностических маркеров (Zhang *et al.*, 2005). В другой работе было показано, что кластер из 8 диа-

гностических ДНК-маркеров косегрегировал с фрагментом, содержащим гены *Lr20-Pm1-Sr15*, только в двух из трех картирующих популяций (Neu *et al.*, 2002);

б) отсутствие маркерной последовательности в другом генетическом окружении. Например, маркер, разработанный для гена *Lr21*, амплифицировал специфические фрагменты только в линиях пшеницы, использованных для его разработки, и не амплифицировал их в изогенных линиях Тэтчер, также содержащих ген *Lr21* (Blaszczuk *et al.*, 2008);

в) аллельная гомоплазия (идентичность фрагментов по длине, но не идентичность по нуклеотидной последовательности). Это убедительно продемонстрировано на примере маркера *Xgwm533*, разработанного и валидированного для гена устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr2* (Spielmeier *et al.*, 2003; Hayden *et al.*, 2004).

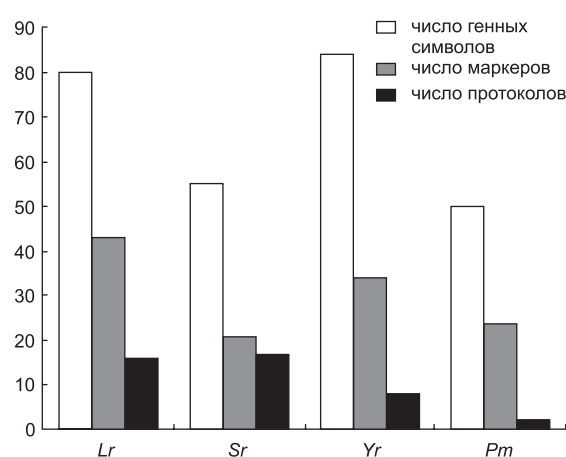
Прежде чем молекулярные маркеры будут использованы в реальных схемах MAS, необходима проверка ассоциаций «маркер–признак» на выборке, состоящей из картирующих популяций, селекционных и изогенных линий, и желательно в различных условиях окружающей среды. По данным каталога генных символов, до настоящего времени опубликовано около 80 генов устойчивости пшеницы к бурой ржавчине (гены *Lr*) с постоянными и временными символами (McIntosh *et al.*, 2010, Supplement 2011, 2012). При этом для 50 % генов определены ДНК-маркеры, сцепленные с геном, и только для 15 % маркеры валидированы для использования в схемах MAS (рис. 2). Для других генов устойчивости к грибным патогенам эти соотношения еще меньше. Информация о маркерах, валидированных для MAS пшеницы, представлена на сайте <http://maswheat.ucdavis.edu>. Этот сайт содержит описание протоколов ПЦР для различных признаков, данные по картирующим популяциям и родительским образцам, а также различные обучающие материалы и литературные ссылки. Список признаков, к которым разработаны протоколы, включает гены устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам, гены, определяющие качество зерна и ряд других хозяйственно важных признаков.

Эффективность валидированных ДНК-маркеров для выявления генов устойчивости к патогенам была исследована в ряде зарубежных

и отечественных работ (Урбанович и др., 2006; Гайнуллин и др., 2007; Blaszczuk *et al.*, 2008; Kolmer *et al.*, 2008; Тырышкин, 2010; Liu *et al.*, 2010; Serfling *et al.*, 2011). Эти авторы на примере большого набора сортов и изогенных линий, содержащих единичные гены и их комбинации, показали, что молекулярные маркеры во многих случаях обладают большей эффективностью по сравнению с фитопатологическими тестами и анализом родословных.

### ОГРАНИЧЕНИЯ ДЛЯ ВНЕДРЕНИЯ НОВЫХ ДНК-ТЕХНОЛОГИЙ В ПРАКТИЧЕСКУЮ СЕЛЕКЦИЮ

Несмотря на постоянное совершенствование методов маркирования ДНК и огромный потенциал MAS, практическое применение молекулярных маркеров для создания коммерческих сортов пшеницы до сих пор имеет ограниченный характер. К одной из главных причин можно отнести высокую стоимость MAS. Стоимость технологий молекулярного маркирования с течением времени снижается, однако затраты для проведения некоторых этапов MAS требуют значительных денежных инвестиций. Здесь, несомненно, важна финансовая поддержка со стороны государственного сектора экономики, особенно в развивающихся странах. Экономическая сторона внедрения ДНК-технологий в практическую селекцию



**Рис. 2.** Диаграмма, иллюстрирующая количество известных генов устойчивости к бурой (*Lr*), стеблевой (*Sr*) и желтой (*Yr*) ржавчине и мучнистой росе (*Pm*), число ДНК-маркеров, сцепленных с генами, и число протоколов, разработанных для MAS.



описана в ряде зарубежных публикаций (Brennan, Martin, 2007; Delannay *et al.*, 2012). Кроме финансовых затрат на интеграцию современных и классических методов селекции влияют дополнительные факторы:

а) точность картирования генов/QTLs и отсутствие тесного сцепления ген-признак, что приводит к необходимости перепроверять ассоциации «маркер–признак» на нескольких картирующих популяциях;

б) необходимость валидации маркера для доказательства его надежности при выявлении генов/QTLs у широкого круга образцов и в различном генетическом окружении;

в) отсутствие достаточного количества полиморфных и кодоминантных маркеров для тестирования селекционного материала, что является важным как в скрещиваниях между близкородственными сортами, так и для отдаленной гибридизации;

г) трудности интрогрессии «минорных» QTLs для признаков с мультигенным контролем, подверженных влиянию окружающей среды и эпистатическим взаимодействиям;

д) человеческий фактор: наличие в институтах и компаниях, занимающихся практической селекцией, квалифицированного персонала, владеющего современными молекулярными методами анализа генома растений и статистическими программами для картирования генов/QTLs. С другой стороны, методические основы фенотипической селекции не всегда знакомы специалистам, работающим в области молекулярной биологии.

В настоящее время в литературе мало доступной информации о практических результатах использования MAS в создании новых сортов и селекционных линий. В ряде стран (Австралия, США, Мексика, Канада, Индия, Аргентина, Великобритания, Франция, Чехия, Китай) технологии MAS были опробованы в крупных программах, которые финансировались на государственном уровне и частными селекционными компаниями. В Австралии начиная с 1996 г. ряд программ был опробован для создания сортов ячменя и пшеницы с помощью ДНК-маркеров. В качестве положительного результата можно отметить, что в одной из программ для пшеницы (West Australian Wheat Breeding Programm) за 5 лет были разработаны маркеры для 42 признаков/

генов, внедрены мультиплексные технологии, созданы фенотипические и маркерные базы данных по признакам и логистические программы, интенсифицирующие взаимодействие молекулярных биологов и селекционеров (Cakir *et al.*, 2008). В Индии и Непале технологии MAS были использованы в программе для создания селекционных линий с генетическими локусами, контролирующими засухоустойчивость риса (<http://teca.fao.org>). В США финансовую поддержку со стороны государства получили крупные проекты (2001–2009 гг.), участниками которых были как научно-исследовательские лаборатории, так и селекционные компании. Список созданных в ходе выполнения этих проектов селекционных линий и список опубликованных результатов представлены на сайте <http://maswheat.ucdavis.edu/achievements/>. В последние годы появилась информация о базах данных и компьютерных программах, которые могут оказать помощь селекционерам при выполнении селекционных задач с использованием различных схем MAS. Например, программа OptiMAS на основании данных по маркерам, расположенным в области локализации «целевого» локуса, помогает выбирать оптимальные стратегии MAS, родительские пары для проведения скрещиваний и отслеживать в потомстве «ценные» аллели QTL (<http://moulon.inra.fr/optimas/>). Базы данных Panzea, PlantDB, CERELAB предназначены для сбора информации по фенотипическим и геномным данным различных видов и сортов пшеницы, ячменя, риса, кукурузы, тритикале, для выбора родительских образцов и маркеров, сцепленных с хозяйственными признаками (Zhao *et al.*, 2006; Canaran *et al.*, 2008; Exner *et al.*, 2008; Milc *et al.*, 2011). Ряд примеров успешного применения технологий MAS на практике и перечень проектов и программ MAS можно также найти в обзорных статьях и на сайтах некоторых компаний (Monsanto, Pioneer, TraitGenetics, KWS Lochow и др.) (Eathington *et al.*, 2007; William *et al.*, 2007; Xu, Crouch, 2008; Gupta *et al.*, 2010).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время ДНК-маркеры разработаны и стали доступными для маркирования хозяйственно важных признаков различных видов зерновых культур. Наблюдается значи-

тельный прогресс по внедрению современных методов и технологий молекулярного маркирования в практику для создания новых сортов и селекционных линий. Наиболее успешными способами применения новых технологий являются интрогрессия и пирамидирование главных генов/QTLs, контролирующей устойчивость к различным видам стрессов. Интродукция количественных признаков, имеющих полигенную природу, пока остается на этапе научных исследований. В настоящее время стало очевидным, что ДНК-технологии постепенно начинают занимать ведущие позиции в селекции растений, и ряд примеров успешного практического применения новых технологий можно найти в литературе. Несмотря на ограничения, тормозящие применение ДНК-маркеров в практической селекции даже в развитых странах, не возникает сомнений, что технологии MAS имеют высокий потенциал, который будет успешно реализован в ближайшие годы. Xu и Crouch справедливо полагают, что в течение следующего десятилетия технологии MAS станут значительно дешевле и проще и их можно будет использовать в больших масштабах, а знания, полученные на основе геномных исследований и опубликованные в научных работах, будут быстрее претворяться в жизнь (Xu, Crouch, 2008).

### БЛАГОДАРНОСТИ

Статья подготовлена при финансовой поддержке программы «Динамика и сохранение генофондов» (проект № 30.39) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 12-04-90010).

### ЛИТЕРАТУРА

- Беспалова Л.А., Васильев А.В., Аблова И.Б. и др. Применение молекулярных маркеров в селекции пшеницы в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012. Т. 16. № 1. С. 37–43.
- Гайнуллин Н.Р., Лапочкина И.Ф., Жемчужина А.И. и др. Использование фитопатологического и молекулярно-генетического методов для идентификации генов устойчивости к бурой ржавчине у образцов мягкой пшеницы с чужеродным генетическим материалом // Генетика. 2007. Т. 43. С. 1058–1064.
- Тырышкин Л.Г. Наличие ДНК-маркеров как критерий постуляции *Lr*-генов устойчивости пшеницы *Triticum aestivum* L. к листовой ржавчине *Puccinia triticina* Erikss.: критический взгляд // С.-х. биология. 2010. № 3. С. 76–81.
- Урбанович О.Ю., Мальшев С.В., Долматович Т.В., Картель Н.А. Определение генов устойчивости к бурой ржавчине в сортах пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с использованием молекулярных маркеров // Генетика. 2006. Т. 42. С. 675–683.
- Хлесткина Е.А. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2011. Т. 15. № 1. С. 757–768.
- Basu S.K., Datta M., Sharma M., Kumar A. Haploid production technology in wheat and some selected higher plants // Austr. J. Crop Sci. 2011. V. 5. P. 1087–1093.
- Blaszczyk L., Chelkowski J., Korzun V. *et al.* Verification of STS markers for leaf rust resistance genes of wheat by seven European laboratories // Cell Mol. Biol. Lett. 2004. V. 9. P. 805–817.
- Blaszczyk L., Kramer I., Ordon I. *et al.* Validity of selected DNA markers for breeding leaf rust resistant wheat // Cereal Res. Commun. 2008. V. 36. P. 201–213.
- Brennan J.P., Martin P.J. Returns to investment in new breeding technologies // Euphytica. 2007. V. 157. P. 337–349.
- Cakir M., Drake-Brockman F., Ma J. *et al.* Application and challenges of marker-assisted selection in the Western Australian Wheat Breeding Program. 2008. Available at: <http://ses.library.usyd.au/bitstream/2123/3338/1/P279.pdf>.
- Canaran P., Buckler E.S., Glaubitz J.C. *et al.* Panzea: an update on new content and features // Nucl. Acids Res. 2008. V. 36 (Database issue): D1041-3.
- Chelkowski J., Golka L., Stepień L. Application of STS markers for leaf rust resistance genes in near-isogenic lines of spring wheat cv. Thatcher // J. Appl. Genet. 2003. V. 44. P. 323–338.
- Chhuneja P., Kaur S., Garg T. Mapping of adult plant stripe rust resistance genes in diploid A genome wheat species and their transfer to bread wheat // Theor. Appl. Genet. 2008. V. 116. P. 313–324.
- Collard B.C.Y., Mackill D.J. Marker assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century // Philos. Trans. R. Soc. B. 2008. V. 363. P. 557–572.
- Delannay X., McLaren G., Ribaut J.-M. Fostering molecular breeding in developing countries // Mol. Breed. 2012. V. 29. P. 857–873.
- Eathington S.R., Crosbie T.M., Edwards M.D. *et al.* Molecular markers in a commercial breeding program // Crop Sci. 2007. V. 47. P. S154–S163.
- Exner V., Hirsch-Hoffmann M., Gruissem W., Hennig L. PlantDB – a versatile database for managing plant research // Plant Methods. 2008. V. 4. P. 1.
- Falke K.C., Frisch M. Power and false positive rate in QTL detection with near-isogenic line libraries // Heredity. 2011. V. 106. P. 576–584.
- Falke K.C., Sušić Z., Hackauf B. *et al.* Establishment of introgression libraries in hybrid rye (*Secale cereale* L.) from an Iranian primitive accession as a new tool for rye breeding and genomics // Theor. Appl. Genet. 2008. V. 117. P. 641–652.
- Falke K.C., Miedaner T., Frisch M. Selection strategies for the development of rye introgression libraries // Theor. Appl. Genet. 2009. V. 119. P. 595–603.

- Frisch M., Bohn M., Melchinger A.E. Comparison of selection strategies for marker assisted backcrossing of a gene // *Crop Sci.* 1999. V. 39. P. 1295–1301.
- Frisch M., Melchinger A.E. Selection theory for marker-assisted backcrossing // *Genetics.* 2005. V. 170. P. 909–917.
- Ganal M.W., Röder M.S. Microsatellite and SNP markers in wheat breeding // *Genomics-assisted crop improvement* / Eds R.K. Varshney, R. Tuberosa. N.Y.: Springer, 2007. P. 1–24.
- Gupta P.K., Langridge P., Mir R.R. Marker-assisted wheat breeding: present status and future possibilities // *Mol. Breed.* 2010. V. 26. P. 145–161.
- Hayden M.J., Kuchel H., Chalmers K.J. Sequence tagged microsatellites for the *Xgwm533* locus provide new diagnostic markers to select for the presence of stem rust resistance gene *Sr2* in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 2004. V. 109. P. 1641–1647.
- Herzog E., Frisch M. Selection strategies for marker-assisted backcrossing with high-throughput marker systems // *Theor. Appl. Genet.* 2011. V. 123. P. 251–260.
- Hospital F. Marker-assisted backcross breeding: a case-study in genotype building theory // *Quantitative genetics, genomics, and plant breeding* / Ed. M.S. Kang. Wallingford, UK, CABI Publishing, 2002. P. 135–142.
- Huang X.Q., Börner A., Röder M.S., Ganal M.W. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers // *Theor. Appl. Genet.* 2002. V. 105. P. 699–707.
- Kolmer J.A., Singh R.P., Garvin D.F. *et al.* Analysis of the *Lr34/Yr18* rust resistance region in wheat germplasm // *Crop Sci.* 2008. V. 48. P. 1841–1852.
- Kuchel H., Fox R., Reinheimer J. *et al.* The successful application of a marker-assisted wheat breeding strategy // *Mol. Breed.* 2007. V. 20. P. 295–308.
- Kuchel H., Fox R., Hollamby G. *et al.* The challenges of integrating new technologies into a wheat breeding programme. 2008. Available at <http://ses.library.usyd.edu.au/bitstream/2123/3400/1/O54.pdf>.
- Landjeva S., Korzun V., Börner A. Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding // *Euphytica.* 2007. V. 156. P. 271–296.
- Li Y., Zhou R., Wang J. *et al.* Novel and favorable QTL allele clusters for end-use quality revealed by introgression lines derived from synthetic wheat // *Mol. Breed.* 2012. V. 29. P. 627–643.
- Liu S., Yu L.-Xi, Singh R.P. *et al.* Diagnostic and co-dominant PCR markers for wheat stem rust resistance genes *Sr25* and *Sr26* // *Theor. Appl. Genet.* 2010. V. 120. P. 691–697.
- Liu Y., He Z., Appels R., Xia X. Functional markers in wheat: current status and future prospects // *Theor. Appl. Genet.* 2012. V. 125. P. 1–10.
- Marone D., Laido G., Gadaleta A. *et al.* A high-density consensus map of A and B wheat genomes // *Theor. Appl. Genet.* 2012. V. 125. P. 1619–1638.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J. *et al.* Catalogue of Gene Symbols for Wheat. 2010. Supplement 2011, 2012. Available at: <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/>.
- Milc J., Sala A., Bergamaschi S., Pecchioni N. A genotypic and phenotypic information source for marker-assisted selection of cereals: the CEREALAB database // *Database.* 2011. Article ID baq038, doi:10.1093/database/baq038.
- Mohler V., Schwarz G. Genotyping tools in plant breeding: from restriction fragment length polymorphisms to single nucleotide polymorphisms // *Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement* / Eds H. Lörtz, G. Wenzel. 2005. V. 55. P. 23–38.
- Narain P. Quantitative genetics: past and present // *Mol. Breed.* 2010. V. 26. P. 135–143.
- Neu C., Stein N., Keller B. Genetic mapping of the *Lr20-Pm1* resistance locus reveals suppressed recombination on chromosome arm 7AL in hexaploid wheat // *Genome.* 2002. V. 45. P. 737–744.
- Nocente F., Gazza L., Pasquini M. Evaluation of leaf rust resistance genes *Lr1*, *Lr9*, *Lr24*, *Lr47* and their introgression into common wheat cultivars by marker-assisted selection // *Euphytica.* 2007. V. 155. P. 329–336.
- Randhawa H.S., Mutti J.S., Kidwell K. *et al.* Rapid and targeted introgression of genes into popular wheat cultivars using marker-assisted background selection // *PLoS One.* 2009. V. 4. P. e5752.
- Pardey P.G. A strategic look at global wheat production, productivity and R&D developments // *Czech. J. Genet. Plant Breed.* 2011. V. 47. P. S9–S19.
- Prigge V., Melchinger A.E., Dhillon B.S., Frisch M. Efficiency gain of marker-assisted backcrossing by sequentially increasing marker densities over generations // *Theor. Appl. Genet.* 2009. V. 119. P. 23–32.
- Salameh A., Buerstmayr M., Steiner B. *et al.* Effects of introgression of two QTL for fusarium head blight resistance from Asian spring wheat by marker-assisted backcrossing into European winter wheat on fusarium head blight resistance, yield and quality traits // *Mol. Breed.* 2011. V. 28. P. 485–494.
- Salina E., Dobrovolskaya O., Efremova T. *et al.* Microsatellite monitoring of recombination around the *Vrn-B1* locus of wheat during early backcross breeding // *Plant Breed.* 2003. V. 122. P. 116–119.
- Salina E.A., Leonova I.N., Efremova T.T., Röder M.S. Wheat genome structure: translocations during the course of polyploidization // *Funct. Integr. Genomics.* 2006. V. 6. P. 71–80.
- Schmierer D.A., Kandemir N., Kudrna D.A. *et al.* Molecular marker-assisted selection for enhanced yield in malting barley // *Mol. Breed.* 2004. V. 14. P. 463–473.
- Serfling A., Krämer I., Lind V. *et al.* Diagnostic value of molecular markers for *Lr* genes and characterization of leaf rust resistance of German winter wheat cultivars with regard to the stability of vertical resistance // *Eur. J. Plant Pathol.* 2011. V. 130. P. 559–575.
- Singh S., Sidhu J.S., Huang N. *et al.* Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106 // *Theor. Appl. Genet.* 2001. V. 102. P. 1011–1015.
- Sivasamy M., Vinod, Tiwari S. *et al.* Introgression of useful linked genes for resistance to stem rust, leaf rust and powdery mildew and their molecular validation in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Indian J. Genet.* 2009. V. 69. P. 17–27.
- Somers D.J. Molecular marker systems and their evaluation for cereal genetics // *Cereal Genomics* / Eds P.K. Gupta, R.K. Varshney. Netherlands: Kluwer Acad. Publ., 2004.

- P. 19–34.
- Sourdille P., Singh S., Cadalen T. *et al.* Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Func. Integr. Genomics*. 2004. V. 4. P. 12–25.
- Spielmeyer W., Sharp P.J., Lagudah E.S. Identification and validation of markers linked to broad-spectrum stem rust resistance gene *Sr2* in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Crop Sci*. 2003. V. 43. P. 333–336.
- Tester M., Langridge P. Breeding technologies to increase crop production in a changing world // *Science*. 2010. V. 237. P. 818–822.
- Timonova E.M., Leonova I.N., Röder M.S., Salina E.A. Marker-assisted development and characterization of a set of *Triticum aestivum* lines carrying different introgressions from the *T. timopheevii* genome // *Mol. Breed*. 2013. V. 31. P. 123–136.
- Torada A., Koike M., Ikeguchi S., Tsutsui I. Mapping of a major locus controlling seed dormancy using backcrossed progenies in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Genome*. 2008. V. 51. P. 426–432.
- van den Berg J.H., Chasalow S.D., Waugh R. RFLP mapping of plant nuclear genomes: planning of experiments, linkage map construction, and QTL mapping // *Plant molecular biology – a laboratory manual*. Berlin: Springer-Verlag, 1997. P. 334–396.
- Varshney R.K., Graner A., Sorrells M.E. Genomics-assisted breeding for crop improvement // *Trends Plant Sci*. 2005. V. 10. P. 621–630.
- Varshney R.K., Mahendar T., Aggarwal R.K., Börner A. Genic molecular markers in plants: development and applications // *Genomics-Assisted Crop Improvement* / Eds R.K. Varshney, R. Tuberosa. 2007. V. 1. P. 13–29.
- Vida G., Gal M., Uhrin A. *et al.* Molecular markers for the identification of resistance genes and marker-assisted selection in breeding wheat for leaf rust resistance // *Euphytica*. 2009. V. 170. P. 67–76.
- William H.M., Trethowan R., Crosby-Galvan E.M. Wheat breeding assisted by markers: CIMMYT's experience // *Euphytica*. 2007. V. 157. P. 307–319.
- Xu Y. Developing marker-assisted selection strategies for breeding hybrid rice // *Plant Breed. Rev*. 2003. V. 23. P. 73–174.
- Xu Y. *Molecular plant breeding*. Wallington, UK: CAB-international, 2010. 752 p.
- Xu Y., Crouch J.H. Marker-assisted selection in plant breeding: from publication to practice // *Crop Sci*. 2008. V. 48. P. 391–407.
- Xu Y., Lu Y., Xie C. *et al.* Whole-genome strategies for marker-assisted plant breeding. *Mol. Breed*. 2012. V. 29. P. 833–854.
- Yang L., Wang W., Yang W., Wang M. Marker-assisted selection for pyramiding the waxy and opaque-16 genes in maize using cross and backcross schemes // *Mol. Breed*. 2013. V. 31. P. 767–775.
- Zhao W., Canaran P., Jurkuta R. *et al.* Panzea: a database and resource for molecular and functional diversity in the maize genome // *Nucl. Acids Res*. 2006. V. 34. (Database issue). P. D752–D757.
- Zhang W., Lukaszewski A.J., Kolmer J. *et al.* Molecular characterization of durum and common wheat recombinant lines carrying leaf rust resistance (*Lr19*) and yellow pigment (*Y*) genes from *Lophopyrum ponticum* // *Theor. Appl. Genet*. 2005. V. 111. P. 573–582.

## MOLECULAR MARKERS: IMPLEMENTATION IN CROP PLANT BREEDING FOR IDENTIFICATION, INTROGRESSION, AND GENE PYRAMIDING

I.N. Leonova

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

### Summary

Over the past decades, wide theoretical and practical experience has been obtained in application of DNA markers for investigation of plant genetic diversity, construction of molecular genetic maps, mapping of genes and quantitative trait loci, and employment of molecular marker technologies in the development of commercial cultivars and breeding of crop lines. To date, the main practical application of molecular markers is related to germplasm characterization, introgression and pyramiding of genome fragments associated with agronomically important traits controlled by major genes. The contribution of new technologies to the selection of traits with multigenic inheritance is still insignificant. Despite the considerable progress in plant molecular genetics and genomics methods and great interest in new technologies among breeders, there is a large number of constraints affecting the implementation of new technologies in practical selection. This article considers the potential application of DNA markers in breeding of crop plants and the benefits and limitations of use of marker-assisted technologies in comparison with conventional plant breeding methods.

**Key words:** molecular markers, marker-assisted selection, validation.



УДК 577.112:578.76:632.4

## PR-БЕЛКИ С РИБОНУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ И УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К ПАТОГЕННЫМ ГРИБАМ

© 2013 г. **Е.А. Филипенко<sup>1</sup>, А.В. Кочетов<sup>1,2</sup>, Y. Kanayama<sup>3</sup>, В.И. Малиновский<sup>4</sup>, В.К. Шумный<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: filipenko@bionet.nsc.ru;

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

<sup>3</sup> Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Aobaku, Sendai 981-8555, Japan;

<sup>4</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

Поступила в редакцию 28 мая 2013 г. Принята к публикации 6 июня 2013 г.

PR-белки (pathogenesis-related proteins) принимают участие в комплексной системе защиты растений от патогенов. Известно, что представители двух семейств PR-белков (PR4 и PR10) в ряде случаев обладают нуклеазной активностью. Установлено, что эти белки способны ингибировать рост патогенных грибов и РНКазная активность необходима для проявления этого эффекта. В обзоре обсуждаются современные данные о молекулярных механизмах фунгицидного действия рибонуклеаз, связанных как с непосредственным цитотоксическим воздействием на клетки патогена, так и с участием в индукции апоптоза и развитии гиперчувствительной реакции.

**Ключевые слова:** РНКазы, PR-белки, фитопатоген, апоптоз.

При взаимодействии с фитопатогенами у растений включается комплекс защитных механизмов, к числу которых относится синтез PR-белков (pathogenesis-related proteins). На основе структурных особенностей и биологической активности эти белки разделяют на 17 семейств, к которым относятся бета-1,3-глюканазы, хитиназы, пероксидазы, ингибиторы протеаз и т. д. (van Loon, van Strien, 1999; van Loon *et al.*, 2006; Малиновский, 2009). Считалось, что некоторые PR-белки ингибируют рост грибов за счет специфической гидролазной активности, разрушающей их клеточные стенки. В последнее время было найдено, что PR-белки, принадлежащие к семействам 4 и 10, также обладают рибонуклеазной активностью, причем эта активность связана с их фунгицидными свойствами. Механизмы, лежащие в основе этого феномена, пока не ясны: согласно некоторым данным, РНКазная активность может быть важна как для непосредственного воздействия (за счет разрушения пула

мРНК гриба при проникновении молекул нуклеазы внутрь клеток патогена), так и для индукции апоптоза собственных клеток растения в месте инвазии (гиперчувствительная реакция) (Kim *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2012; He *et al.*, 2013). Следует отметить, что белки с неспецифической рибонуклеазной активностью не могут в свободной активной форме присутствовать в цитоплазме, поскольку они разрушают РНК и клетка погибает. Однако это свойство делает РНКазы удобным инструментом для использования в контроле процессов развития, требующих направленной элиминации определенных клеточных структур (например, участие S-РНКаз в механизме самонесовместимости у высших растений) (Сангаев и др., 2010). По-видимому, использование рибонуклеаз для борьбы с фитопатогенами требует либо определенной субклеточной локализации этих белков (апопласт, вакуоли), либо строгого контроля ферментативной активности за счет посттрансляционных модификаций. При этом

механизмы, с помощью которых молекулы нуклеаз могут проникать внутрь клеток патогенного гриба, пока остаются неизвестными. Кроме этого, в последнее время появляются данные о существовании пула экстраклеточных нуклеиновых кислот, выполняющих определенные функции в системе иммунитета растений, что также говорит в пользу возможной функциональной значимости нуклеаз, принадлежащих к семейству PR-белков (Wen *et al.*, 2009; Hawes *et al.*, 2011). В статье рассмотрены литературные данные о функциях PR-белков с нуклеазной активностью.

### PR10

PR10 – семейство внутриклеточных кислых белков с молекулярной массой 16–19 кДа, расположенных в вакуолях и (единственный класс PR-белков) цитоплазме (Somssich *et al.*, 1988; Warner *et al.*, 1992; van Loon *et al.*, 1994). Эти белки были найдены у многих видов двудольных растений, включая горох (Fristensky *et al.*, 1988), фасоль (Walter *et al.*, 1996), сою (Crowell *et al.*, 1992), люцерну (Breda *et al.*, 1996; Bahramnejad *et al.*, 2010), картофель (Matton, Brisson, 1989), хлопчатник (Zhou *et al.*, 2002), перец (Park *et al.*, 2004), а также у некоторых представителей однодольных – лилии (Huang *et al.*, 1997), риса (Midoh, Iwata, 1996).

PR10 кодируются небольшим числом генов, например, у *Lupinus luteus* найдено 9 генов. Анализ аминокислотных последовательностей соответствующих полипептидов показал, что по особенностям структурной организации их можно разделить на две группы – PR10.1 и PR10.2 (Pasternak *et al.*, 2005). Было найдено, что гены этих субсемейств существенно различаются по паттерну экспрессии: например ген *LIPR10.B* конститутивно экспрессируется в листьях и черешках, в то время как активность гена *LIPR10.A* в этих органах появляется только в ответ на инокуляцию *Pseudomonas syringae*, а также при старении листьев (Sikorski *et al.*, 1999). Похожие семейства генов найдены у винограда, березы, яблони и персика; у *Vitis vinifera* анализ 17 генов, расположенных в виде tandemного повтора на хромосоме 5, выявил различные паттерны их экспрессии. Интересно, что у арабидопсиса *PR10* гены не экспрессируются (Lebel *et al.*, 2010).

Белки семейства PR10 активно изучаются по нескольким причинам. Во-первых, они являются аллергенами (например, Bet v1 березы, Mal d 1 яблони, Pru ar 1 абрикоса, Pru v1 вишни, Dau s 1 моркови и т. п.) (Bufe *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1997; Neudecker *et al.*, 2001; Puehringer *et al.*, 2003). Во-вторых, их синтез существенно повышается в ответ на инфекцию, что говорит о возможной роли в защите от патогенов; наконец, некоторые из этих белков синтезируются в разных органах и тканях конститутивно или в ответ на абиотические стрессы различной природы, что может быть связано с участием PR10 в разнообразных клеточных процессах (рост, развитие, молекулярные механизмы стрессоустойчивости (Chen *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011 и др.)).

По-видимому, одна из биологических функций этих белков заключается в том, что они способны связывать фитогормоны и некоторые другие биологически активные вещества (Srivastava *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2008). Цитокинины регулируют рост и развитие растений, а также могут выполнять определенные функции в контроле стрессового ответа (Chung *et al.*, 2008). Показано, что повышенная экспрессия гена *PR10* гороха (*ABR-17*) в растениях арабидопсиса приводит к увеличению содержания цитокининов, а также уровня экспрессии генов, регулируемых этим фитогормоном (Krishnaswamy *et al.*, 2008, 2011). Многие представители этого семейства проявляют рибонуклеазную активность, выявленную в тестах *in vitro*, например, у березы (Bufe *et al.*, 1996), желтого люпина (Bantignies *et al.*, 2000), хлопчатника (Zhou *et al.*, 2002), перца (Park *et al.*, 2004), риса (Kim *et al.*, 2008), возможно, связанную с наличием в структуре белка Р-петли (GXGGXGXK) (Bantignies *et al.*, 2000).

Считается, что гены белков семейства PR10 экспрессируются конститутивно в корнях и индуцируются во всех частях растения в ответ на биотические/абиотические стрессы и повреждение тканей. Индукция экспрессии генов *PR10* при взаимодействии с патогенами была выявлена у ряда растений, включая шпинат (в ответ на *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea*; Somssich *et al.*, 1986), картофель (*Phytophthora infestans*; Matton, Brisson, 1989), рис (*Magnaporthe grisea* и *Acidovorax avenae*;

McGee *et al.*, 2001), виноград (*P. syringae* *pv.* *pisi*; Robert *et al.*, 2001), люцерну (*P. syringae* *pv.* *pisi*, Borsics, Lados, 2002), *Capsicum annuum* (вирус табачной мозаики; Park *et al.*, 2004), *Pinus monticola* (*Cronartium ribicola*; Liu *et al.*, 2003). PR10 также индуцируется некоторыми абиотическими факторами: NaCl, высокими и низкими температурами, осмотическим стрессом (Borsics, Lados, 2002), ультрафиолетом (Rakwal *et al.*, 1999), озоном (Agrawal *et al.*, 2002). В некоторых случаях было показано, что транскрипционная активность генов семейства PR10 возрастает при обработке растений жасмоновой кислотой, кинетином (Rakwal *et al.*, 1999; McGee *et al.*, 2001; Borsics, Lados, 2002), салициловой кислотой (McGee *et al.*, 2001), этиленом (Poupard *et al.*, 2003), абсцисовой кислотой (Borsics, Lados, 2002).

В ряде случаев было показано, что рекомбинантные варианты белков этого семейства подавляют рост фитопатогенных грибов *in vitro*. Например, PR10 арахиса проникает в клетки патогенов и, являясь РНКазой, проявляет фунгицидную активность *in vitro*, в то время как его мутантные варианты, лишённые РНКазной активности, теряют фунгицидные свойства. Характерно, что способность проникать внутрь клеток патогенных грибов (и фунгицидная активность) была избирательной и наблюдалась для *Fusarium oxysporum* и *Rhizostonia solani*, но не для *Sclerotium rolfsii*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* и *P. infestans* (Chadha, Das, 2006). Синтез CaPR-10 *C. annuum* происходит в корне (конститутивно) и индуцируется в листьях в ответ на инвазию патогена, обработку салициловой и жасмоновой кислотами, этиленом и NaCl. Рекомбинантный белок обладает РНКазной активностью и подавляет рост *Phytophthora capsici in vitro*. При добавлении к инокуляту вируса табачной мозаики белка CaPR-10 размножение вируса резко подавляется, причем денатурированный белок такого действия не проявляет (Park *et al.*, 2004).

У кукурузы ген *ZmPR10.1* экспрессируется конститутивно в корне и малоактивен в остальных тканях растения, его активность индуцируется в ответ на салициловую кислоту, соли тяжелых металлов, перекись водорода, холод, повреждение тканей и инфекцию (*Erwinia stewartii* и *A. flavus*). Ген кодирует белок с РНКазной

активностью, ингибирующий рост *P. syringae in vivo* и *A. flavus in vitro* (Xie *et al.*, 2010). Кукуруза восприимчива к *A. flavus*, и заражение афлатоксинами является одной из важных проблем этой хозяйственно важной культуры. Сравнительный анализ протеомов устойчивого и восприимчивого фенотипов позволил выявить различия в содержании некоторых белков, в том числе PR10. Исследование трансгенных растений с ингибированной экспрессией гена *PR10* показало, что они являются гораздо более восприимчивыми к патогену, а также характеризуются повышенной чувствительностью к тепловому шоку (Chen *et al.*, 2010).

Недавно было показано, что PR10 используется растением не только для подавления роста фитопатогенных грибов, но и для контроля развития эндосимбионтов, например *Lolium perenne* – для контроля *Neotyphodium lolii*. В этом случае уровень экспрессии *PR*-гена был значительно ниже, чем в ответ на воздействие патогена, что свидетельствует об эволюционной коадаптации взаимодействующих организмов (Zhang *et al.*, 2011).

**Рибонуклеазная активность белков PR10 может быть важна для их фунгицидных свойств и индукции апоптоза в гиперчувствительном ответе.** Поскольку PR10 локализован в цитоплазме, то наличие рибонуклеазной активности делает этот белок опасным для клетки, а значит должны существовать механизмы, контролирующие его активность. Детальный анализ CaPR-10 *C. annuum* показал, что синтез этого белка индуцируется в ответ на вирусную инфекцию, причем также происходит его фосфорилирование, существенно увеличивающее рибонуклеазную активность (Park *et al.*, 2004). Было обнаружено, что Ca-PR10 взаимодействует с рецептором LRR1 (Leucine-rich repeat protein) (Choi *et al.*, 2012): LRR1 *C. annuum* распознает присутствие патогена и взаимодействует с белком HIR1, активирующим апоптоз при гиперчувствительном ответе на авирулентный штамм *Xanthomonas campestris*. Взаимодействие LRR1 и Ca-PR10 происходит в цитоплазме и приводит к следующим последствиям: во-первых, PR10 фосфорилируется, вследствие чего увеличивается его рибонуклеазная активность, во-вторых, в сайте инокуляции патогена в результате апоптоза гибнут клетки растения; в-третьих,

часть комплексов LRR1-Ca-PR10 переходит в апопласт, по-видимому, в составе внутриклеточного содержимого в результате разрушения клеток. Показано, что выключение экспрессии гена *Ca-PR10* приводит к потере устойчивости растений к авирулентному штамму *X. campestris*, тогда как экспрессия *LRR1* и *Ca-PR10* в клетках арабидопсиса, наоборот, придает устойчивость к *P. syringae* и *Hyaloperonospora arabidopsidis*. Авторы предполагают, что РНКазная активность PR10 может служить в качестве одного из инструментов апоптоза (Choi *et al.*, 2012).

У риса один из белков семейства PR10 (PBZ1) также участвует в процессе апоптоза (Kim *et al.*, 2011). Отметим, что добавление рекомбинантного белка индуцирует программируемую клеточную гибель в культуре клеток риса и табака, а также в клетках листьев табака и арабидопсиса, причем РНКазная активность необходима для проявления этого эффекта. Анализ паттерна экспрессии гена *PBZ1* показал, что он быстро активируется в ответ на инфекцию, на некоторые абиотические стрессы (холод, абсцизовую кислоту) (Rakwal *et al.*, 2001) и на соответствующие фитогормоны (жасмоновую кислоту, салициловую кислоту) (Rakwal *et al.*, 2001; Hwang *et al.*, 2008).

У винограда патоген *Plasmopara viticola* вызывает серьезный ущерб. Был проведен сравнительный анализ экспрессии генов *PR10.2* у восприимчивого вида *V. vinifera* и устойчивого вида *V. pseudoreticulata*. Показано, что у устойчивого вида экспрессия генов семейства PR10 индуцируется в значительно большей степени. Рекомбинантный белок, обладающий ДНКазной и РНКазной активностью, ингибировал рост фитопатогенного гриба *Alternaria alternata in vitro*, а увеличенная экспрессия трансгена *VpPR10.2* в трансгенных растениях *V. vinifera* повышала их устойчивость к *P. viticola*. Интересно, что белок был найден не только в клетках, но и в экстраклеточном пространстве, а также в гаусториях патогена *P. viticola*; присутствие белка в ядрах растительных клеток коррелировало с их апоптозом на 10-й день после инокуляции. В целом *VpPR10.2* может играть важную роль в защите растений винограда от этой инфекции (He *et al.*, 2013).

Таким образом, согласно имеющимся данным, белки семейства PR10 могут функциони-

ровать в качестве фунгицидов, причем эта их способность, связанная с нуклеазной активностью, может проявляться как при прямом воздействии на патоген – проникновении внутрь клетки и разрушении клеточных РНК (He *et al.*, 2013), так и за счет участия в апоптозе – создания барьера из мертвых клеток (гиперчувствительная реакция) (Kim *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2012). В то же время существует ряд нерешенных вопросов: например, для чего гены *PR10* индуцируются при абиотических стрессах, какие механизмы опосредуют проникновение молекул этих белков в клетки патогенов (часто специфическое) (Chadha, Das, 2006).

#### PR4

Белки этого семейства (размером 13–16 кДа) содержат консервативный С-концевой домен BARWIN, включающий шесть остатков цистеина, которые формируют три внутримолекулярные дисульфидные связи (Ludvigsen, Poulsen, 1992). По структуре N-конца молекулы PR4 разделяют на два подкласса: в структуре белков класса I содержится консервативный N-концевой цистеин-богатый хитин-связывающий домен (hevein-подобный домен), у молекул класса II такого домена нет (Broekaert *et al.*, 1990). Большинство белков содержат N-концевой сигнальный пептид, некоторые представители этого семейства также содержат на С-конце сигнал, направляющий их в вакуоли (Neuhaus *et al.*, 1991). Гены, кодирующие PR4, были впервые найдены у картофеля (тандемно расположенные *WIN 1* и *WIN 2*) (Stanford *et al.*, 1989) и впоследствии были определены у ряда других растений – томата, арабидопсиса, капусты, пшеницы, кукурузы, перца и др. (Linthorst *et al.*, 1991; Caruso *et al.*, 1993; Potter *et al.*, 1993; Bravo *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005; Guevara-Morato *et al.*, 2010). PR4 были первоначально классифицированы как эндохитиназы, однако у них данная ферментативная активность выражена слабо и не является основной. Гены *PR4* обычно формируют небольшие семейства, например, у риса найдено пять генов, расположенных в виде тандемного повтора и характеризующихся различиями в паттернах экспрессии (Wang *et al.*, 2011).

Основным индуктором синтеза белков семейства PR4 является инвазия патогена, однако



в ряде случаев их синтез активируется при других воздействиях. У кукурузы ген *ZmPR4* индуцируется при повреждении тканей в месте инвазии патогена и при обработке клеток метилжасмонатом или абсцизовой кислотой (Bravo *et al.*, 2003). У арабидопсиса и персика содержание PR4 увеличивается при обработке этиленом (Gu *et al.*, 2002; Ruperti *et al.*, 2002) или озоном (Rao *et al.*, 2002). У риса экспрессия всех генов семейства PR индуцировалась в ответ на инокуляцию *M. grisea*, кроме этого, разные гены индуцировались в условиях абиотических стрессов (засуха, засоление, холод, повреждение тканей, тепловой шок, ультрафиолет, воздействие абсцизовой или жасмоновой кислоты). Повышенная экспрессия *OsPR4a* в трансгенных растениях риса увеличивала их устойчивость к засухе как у проростков, так и у взрослых растений. Таким образом, спектр функций белков этого семейства также может быть шире, чем это предполагается в настоящее время (Wang *et al.*, 2011).

У пшеницы PR4-белок Wheatwin1 обладает РНКазной активностью и проявляет фунгицидные свойства *in vitro* (Caporale *et al.*, 2004), которые также связаны именно с рибонуклеазным действием (Bertini *et al.*, 2009). Показано, что присутствие PR4-рибонуклеаз в нектаре акации защищает ее от развития грибов (Gonzalez-Teuber *et al.*, 2009). Представители белков семейства FaPR4 *Ficus awkeotsang* обладают в разной степени выраженности рибонуклеазной и хитиназной активностью; показано, что фунгицидные свойства FaPR4-С коррелируют с его способностью гидролизовать РНК (Lu *et al.*, 2012).

У *Capsicum chinense* устойчивость к табачному вирусу PMMoV-S включает гиперчувствительную реакцию с формированием локальных некрозов и ограничением распространения вируса в местах первичной инокуляции. Найдено, что при гиперчувствительной реакции индуцируется синтез PR4, обладающего РНКазной и ДНКазной активностью (Guevara-Morato *et al.*, 2010). У яблони ген *MdPR-4* экспрессируется в цветках и листьях, индукция экспрессии наблюдается при взаимодействии с *Botryosphaeria dothidea*, обработке салициловой кислотой или метилжасмонатом. Рекомбинантный белок MdPR-4 обладает рибонуклеазной активно-

стью против одноцепочечных матриц *in vitro* и угнетает рост патогенных для яблони грибов *B. dothidea*, *Valsa ceratosperma* и *Glomerella cingulata*, причем субстрат-специфическое ингибирование РНКазной активности снижает фунгицидный эффект (Bai *et al.*, 2013).

Был проведен углубленный анализ структурной организации вакуолярного белка PR4 *Arabidopsis thaliana*, ориентированный на выявление функций N-концевого гевеин-подобного домена и С-концевого BARWIN-домена. Было найдено, что оба домена обладают фунгицидной активностью и не способны гидролизовать хитин. N-концевой домен связывает хитин и взаимодействует с лектином патогенных грибов, нуклеазная активность характерна для С-концевого домена. Авторы предположили, что N-концевой домен отвечает за связывание с поверхностью фитопатогенных грибов и перенос белка внутрь клетки, в то время как за собственно цитотоксический эффект отвечает рибонуклеазный домен (Bertini *et al.*, 2012).

Таким образом, на примере PR-белков семейств PR4 и PR10 можно видеть, что в ходе эволюции они приобрели рибонуклеазную активность, которая используется как для цитотоксического воздействия на клетки патогенных грибов, так и в механизмах апоптоза собственно клеток растений в ходе гиперчувствительной реакции. Помимо вышеописанных PR-белков у растений обнаружено несколько других рибонуклеаз, локализованных в экстраклеточном пространстве, которые также могут участвовать в механизмах защиты от фитопатогенных вирусов и грибов (Трифорова и др., 2000; Сангаев и др., 2010). В частности, это касается S-подобных РНКаз, по структуре относящихся к семейству T2 (MacIntosh *et al.*, 2010). Так, *RNS1 A. thaliana* индуцируется при инвазии патогена и локально (в месте повреждения тканей), и системно (LeBrasseur *et al.*, 2002). У табака увеличение суммарной РНКазной активности в ответ на инокуляцию *Phytophthora parasitica* по времени совпадает с индукцией гена, кодирующего S-подобную экстраклеточную рибонуклеазу NE, которая проявляет фунгицидную активность против *P. parasitica* и *F. oxysporum in vitro*, а также при введении в апопласт. Ферментативно неактивная форма рекомбинантного белка, полученная

с помощью направленного мутагенеза, теряет такую способность (Hugot *et al.*, 2002). В нектаре *Petunia hybrida* были найдены S-подобные РНКазы, также обладающие фунгицидными свойствами (Hillwig *et al.*, 2010).

Молекулярные механизмы фунгицидной активности экстраклеточных S-подобных РНКаз в настоящее время не известны. Существует предположение, что РНКазы могут проникать в цитоплазму грибов и останавливать трансляцию, разрушая мРНК (Hugot *et al.*, 2002). Однако предложенный механизм подразумевает перенос РНКазы из экстраклеточного пространства в цитоплазму гриба. Другая возможность связана с тем, что РНКазы могут изменять проницаемость клеточных мембран грибов: ранее было показано, что у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* супрессия гена экстраклеточной РНКазы из семейства T2 приводит к увеличению размеров дрожжевой клетки, причем этот эффект может быть снят при добавлении к культуральной жидкости других РНКаз (MacIntosh *et al.*, 2001). Высказано предположение об участии неких (в настоящий момент неизвестных) молекул РНК в формировании пор в мембране клеток дрожжей, что может объяснять эффект рибонуклеаз на их проницаемость.

Логично предположить, что фитопатогены также могут использовать белки с РНКазной активностью в процессе взаимодействия с клетками растения, однако по этой теме информации пока очень мало (Hadwiger, Polashock, 2013). В некоторых работах было показано, что ДНК является одним из элементов слизи, защищающей от фитопатогенов кончик корня, который в силу своей функции механически уязвим и часто подвергается опасности заражения. Клетки корня выделяют в окружающую среду более 100 белков, а также ДНК. Удаление экстраклеточной ДНК с помощью обработки ДНКазой привело к потере устойчивости кончика корня к фитопатогенам (Wen *et al.*, 2009; Hawes *et al.*, 2011). Считается, что фитопатогены могут связываться с экстраклеточной ДНК, что каким-то образом делает их уязвимыми для других защитных белков, однако в целом этот механизм пока не изучен. По всей видимости, содержимое апопласта растений, представляющее собой сложный комплекс белков и метаболитов, играет важную роль в процессе взаимодействия

с фитопатогенами. Дальнейшие исследования, возможно, покажут, каким образом белки с нуклеазной активностью могут использоваться в качестве эффекторов, опосредующих взаимодействие клеток растений и грибов.

Работа частично поддержана интеграционным проектом СО РАН – ДВО РАН, программой РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» и грантом РФФИ (12-04-01478).

## ЛИТЕРАТУРА

- Малиновский В.И. PR-белки и фитовирусы // Усп. соврем. биологии. 2009. Т. 129. № 3. С. 1–9.
- Сангаев С.С., Кочетов А.В., Ибрагимов С.С. и др. Роль экстраклеточных рибонуклеаз в физиологических процессах высших растений // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 1. С. 232–242.
- Трифорова Е.А., Кочетов А.В., Шумный В.К. Роль нуклеаз в физиологических процессах высших растений // Усп. соврем. биологии. 2000. Т. 120. № 4. С. 395–405.
- Agrawal G.K., Rakwal R., Tamogami S. *et al.* Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings // Plant Physiol. Biochem. 2002. V. 40. P. 1061–1069.
- Bai S., Dong C., Li B., Dai H. A PR-4 gene identified from *Malus domestica* is involved in the defense responses against *Botryosphaeria dothidea* // Plant Physiol. Biochem. 2013. V. 62. P. 23–32.
- Bantignies B., Se'guin J., Muzac I. *et al.* Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like protein from white lupin roots // Plant Mol. Biol. 2000. V. 42. P. 871–881.
- Bahramnejad B., Goodwin P.H., Zhang J. *et al.* A comparison of two class 10 pathogenesis-related genes from alfalfa and their activation by multiple stresses and stress-related signaling molecules // Plant Cell Rep. 2010. V. 29. P. 1235–1250.
- Bertini L., Caporale C., Testa M. *et al.* Structural basis of the antifungal activity of wheat PR4 proteins // FEBS Letters. 2009. V. 583. P. 2865–2871.
- Bertini L., Proietti S., Aleandri M.P. *et al.* Modular structure of HEL protein from Arabidopsis reveals new potential functions for PR-4 proteins // Biol. Chem. 2012. V. 393. No. 12. P. 1533–1546.
- Borsics T., Lados M. Dodder infection induces the expression of a pathogenesis-related gene of the family PR-10 in alfalfa // J. Exp. Bot. 2002. V. 53. P. 1831–1832.
- Bravo J.M., Campo S., Murillo I. *et al.* B. Fungus- and wound-induced accumulation of mRNA containing a class II chitinase of the pathogenesis-related protein 4 (PR-4) family of maize // Plant Mol. Biol. 2003. V. 52. P. 745–759.
- Breda C., Sallaud C., El-Turk J. *et al.* Defense reaction in *Medicago sativa*: a gene encoding a class 10 PR protein is expressed in vascular bundles // Mol. Plant Microbe Interact. 1996. V. 9. P. 713–719.
- Broekaert W., Lee H.H., Kush A. *et al.* Wound-induced ac-

- cumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 7633–7637.
- Bufe A., Spangfort M.D., Kahlert H. *et al.* The major birch pollen allergen, bet v1, shows ribonuclease activity // Planta. 1996. V. 199. P. 413–415.
- Caporale C., Di Bernardino I., Leonardi L. *et al.* Wheat pathogenesis-related proteins of class 4 have ribonuclease activity // FEBS Letters. 2004. V. 575. P. 71–76.
- Caruso C., Caporale C., Poerio C. *et al.* The amino acid sequence of a protein from wheat kernels closely related to proteins involved in the mechanism of plant defense // J. Protein Chem. 1993. V. 12. P. 379–386.
- Chadha P., Das R.H. A pathogenesis related protein, AhPR10, from peanut: an insight of its mode of antifungal activity // Planta. 2006. V. 225. P. 213–222.
- Chen Z.Y., Brown R.L., Damann K.E., Cleveland T.E. PR10 expression in maize and its effect on host resistance against *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production // Mol. Plant Pathol. 2010. V. 11. No. 1. P. 69–81.
- Choi D.S., Hwang I.S., Hwang B.K. Requirement of the cytosolic interaction between PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN10 and LEUCINE-RICH REPEAT PROTEIN1 for cell death and defense signaling in pepper // Plant Cell. 2012. V. 24. No. 4. P. 1675–1690.
- Chung K.M., Igari K., Uchida N., Tasaka M. New perspectives on plants defense responses through modulation of developmental pathways // Mol. Cells. 2008. V. 26. P. 107–112.
- Crowell D., John M.E., Russell D., Amasino R.M. Characterization of a stress-induced developmentally regulated gene family from soybean // Plant Mol. Biol. 1992. V. 18. P. 459–466.
- Fernandes H., Pasternak O., Bujacz G. *et al.* *Lupinus luteus* pathogenesis-related protein as a reservoir for cytokinin // J. Mol. Biol. 2008. V. 378. P. 1040–1051.
- Fristensky B., Horovitz D., Hadwiger L.A. cDNA sequences for pea disease response genes // Plant Mol. Biol. 1988. V. 11. P. 713–715.
- Gonzalez-Teuber M., Eilmus S., Muck A. *et al.* Pathogenesis-related proteins protect extrafloral nectar from microbial infestation // Plant J. 2009. V. 58. P. 464–473.
- Gu Y.Q., Wildermuth M.C., Chakravarthy S. *et al.* Tomato transcription factors Pti4, Pti5, and Pti6 activate defense responses when expressed in Arabidopsis // Plant Cell. 2002. V. 14. P. 817–831.
- Guevara-Morato M.A., de Lacoba M.G., García-Luque I., Serra M.T. Characterization of a pathogenesis-related protein 4 (PR-4) induced in *Capsicum chinense* L3 plants with dual RNase and DNase activities // J. Exp. Bot. 2010. V. 61. No. 12. P. 3259–3271.
- Hadwiger L.A., Polashock J. Fungal mitochondrial DNases: effectors with the potential to activate plant defenses in nonhost resistance // Phytopathology. 2013. V. 103. No. 1. P. 81–90.
- Hawes M.C., Curlango-Rivera G., Wen F. *et al.* Extracellular DNA: the tip of root defenses? // Plant Sci. 2011. V. 180. No. 6. P. 741–745.
- He M., Xu Y., Cao J. *et al.* Subcellular localization and functional analyses of a PR10 protein gene from *Vitis pseudoreticulata* in response to *Plasmopara viticola* infection // Protoplasma. 2013. V. 250. No. 1. P. 129–1240.
- Hillwig M.S., Liu X., Liu G. *et al.* Petunia nectar proteins have ribonuclease activity // J. Exp. Bot. 2010. V. 61. No. 11. P. 2951–2965.
- Huang J.C., Chang F.C., Wang C.S. Characterization of a lily tapetal transcript that shares sequence similarity with a class of intracellular pathogenesis-related (IPR) proteins // Plant Mol. Biol. 1997. V. 34. P. 681–686.
- Hugot K., Ponchet M., Marais A. *et al.* A tobacco S-like RNase inhibits hyphal elongation of plant pathogens // Mol. Plant Microbe Interact. 2002. V. 15. No. 3. P. 243–250.
- Hwang S.H., Lee I.A., Yie S.W., Hwang D.J. Identification of an OsPR10a promoter region responsive to salicylic acid // Planta. 2008. V. 227. P. 1141–1150.
- Kim S.T., Yu S., Kang Y.H. *et al.* The rice pathogen-related protein 10 (JIOsPR10) is induced by abiotic and biotic stresses and exhibits ribonuclease activity // Plant Cell Rep. 2008. V. 27. P. 593–603.
- Kim S.G., Kim S.T., Wang Y. *et al.* The RNase activity of rice probenazole-induced protein1 (PBZ1) plays a key role in cell death in plants // Mol. Cells. 2011. V. 31. No. 1. P. 25–31.
- Krishnaswamy S., Baral P.K., James M.N., Kav N.N. Site-directed mutagenesis of histidine 69 and glutamic acid 148 alters the ribonuclease activity of pea ABR17 (PR10.4) // Plant Physiol. Biochem. 2011. V. 49. No. 9. P. 958–962.
- Krishnaswamy S.S., Srivastava S., Mohammadi M. *et al.* Transcriptional profiling of pea ABR17 mediated changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana* // BMC Plant Biol. 2008. DOI: 10.1186/1471-2229-8-91.
- Lebel S., Schellenbaum P., Walter B., Maillot P. Characterisation of the *Vitis vinifera* PR10 multigene family // BMC Plant Biol. 2010. DOI: 10.1186/1471-2229-10-184.
- LeBrasseur N.D., MacIntosh G.C., Pérez-Amador M.A. *et al.* Local and systemic wound-induction of RNase and nuclease activities in Arabidopsis: RNS1 as a marker for a JA-independent systemic signaling pathway // Plant J. 2002. V. 29. No. 4. P. 393–403.
- Linthorst H.J.M., Danhash N., Brederode F.T. *et al.* Tobacco and tomato PR proteins homologous to win and pro-hevein lack the «hevein» domain // Mol. Plant Microbe Interact. 1991. V. 4. P. 586–592.
- Liu J.-J., Ekramoddoullah A.K.M., Yu X. Differential expression of multiple PR10 proteins in western white pine following wounding, fungal infection and cold-hardening // Physiol. Plant. 2003. V. 119. P. 544–553.
- Ludvigsen S., Poulsen F.M. Three-dimensional structure in solution of Barwin, a protein from barley seed // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 8783–8789.
- Lu H.C., Lin J.H., Chua A.C. *et al.* Cloning and expression of pathogenesis-related protein 4 from jelly fig (*Ficus awkeotsang* Makino) achenes associated with ribonuclease, chitinase and anti-fungal activities // Plant Physiol. Biochem. 2012. V. 56. P. 1–13.
- McGee J.D., Hamer J.E., Hodges T.K. Characterization of a PR-10 pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea* // Mol. Plant Microbe Interact. 2001. V. 14. P. 877–886.
- MacIntosh G.C., Bariola P.A., Newbigin E., Green P.J. Characterization of Rny1, the *Saccharomyces cerevisiae* member of the T2 RNase family of RNases: Unexpected functions for ancient enzymes? // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 1018–1023.



- MacIntosh G.C., Hillwig M.S., Meyer A., Fligel L. RNase T2 genes from rice and the evolution of secretory ribonucleases in plants // *Mol. Genet. Genomics*. 2010. V. 283. No. 4. P. 381–396.
- Matton D.P., Brisson N. Cloning, expression and sequence conservation of pathogenesis-related gene transcripts of potato // *Mol. Plant Microbe Interact.* 1989. V. 2. P. 325–331.
- Midoh N., Iwata M. Cloning and characterization of a probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis related protein in rice // *Plant Cell Physiol.* 1996. V. 37. P. 9–18.
- Neuhaus J.M., Sticher L., Meins F.Jr., Boller T. A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 10362–10366.
- Neudecker P., Schweimer K., Nerkamp J. *et al.* Allergic Cross-reactivity made visible solution structure of the major cherry allergen Pru av 1 // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 22756–22763.
- Park C.-J., Kim K.-J., Shin R. *et al.* Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway // *Plant J.* 2004. V. 37. P. 186–198.
- Park Y.S., Jeon M.H., Lee S.H. *et al.* Activation of defense responses in chinese cabbage by a nonhost pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. tomato // *J. Biochem. Mol. Biol.* 2005. V. 538. P. 748–754.
- Pasternak O., Biesiadka J., Dolot R. *et al.* Structure of a yellow lupin pathogenesis-related PR-10 protein belonging to novel subclass // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2005. V. 61. P. 99–107.
- Potter S., Uknes S., Lawton K. *et al.* Regulation of a hevein-like gene in *Arabidopsis* // *Mol. Plant Microbe Interact.* 1993. V. 6. P. 680–685.
- Poupard P., Parisi L., Campion C. *et al.* A wound- and ethphon-inducible PR-10 gene subclass from apple is differentially expressed during infection with a compatible and an incompatible race of *Venturia inaequalis* // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2003. V. 62. P. 3–12.
- Puehringer H., Zinoecker I., Mazban G. *et al.* MdAP, a novel protein in apple, is associated with the major allergen Mal d 1 // *Gene*. 2003. V. 321. P. 173–183.
- Rakwal R., Agrawal G.K., Yonekura M. Separation of proteins from stressed rice *Oryza sativa* L. leaf tissues by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, induction of pathogenesis-related and cellular protectant proteins by jasmonic acid, UV irradiation and copper chloride // *Electrophoresis*. 1999. V. 20. P. 3472–3478.
- Rakwal R., Agrawal G.K., Yonekura M. Lightdependent induction of OsPR10 in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by the global stress signaling molecule jasmonic acid and protein phosphatase 2A inhibitors // *Plant Sci.* 2001. V. 61. P. 469–479.
- Rao M.V., Lee H., Davis K.R. Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death // *Plant Cell*. 2002. V. 32. P. 447–456.
- Robert N., Ferran J., Breda C. *et al.* Molecular characterization of the incompatible interaction of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein // *Eur. J. Plant. Pathol.* 2001. V. 7. P. 249–261.
- Rupert B., Cattivelli L., Pagni S., Ramina A. Ethylene response genes are differentially regulated during abscission, organ senescence and wounding in peach (*Prunus persica*) // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53. P. 429–437.
- Sikorski M.M., Biesiadka J., Kasperska A.E. *et al.* Expression of genes encoding PR10 class pathogenesis-related proteins is inhibited in yellow lupine root nodules // *Plant Sci.* 1999. V. 149. P. 125–137.
- Somssich I.E., Schmelzer E., Bollmann J., Hahlbrock K. Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding «pathogenesis-related» proteins in cultured parsley cells // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. No. 8. P. 2427–2430.
- Somssich I.E., Schmelzer E., Kawalleck P., Hahlbrock K. Gene structure and *in situ* transcript localization of pathogenesis-related protein 1 in parsley // *Mol. Gen. Genet.* 1988. V. 213. No. 1. P. 93–98.
- Srivastava S., Emery R.J.N., Kurepin L.V. *et al.* Pea PR 10.1 is a ribonuclease and its transgenic expression elevates cytokinin levels // *Plant Growth Regul.* 2006. V. 49. P. 17–25.
- Stanford A., Bevan M., Northcote D. Differential expression within a family of novel wound-induced genes in potato // *Mol. Gen. Genet.* 1989. V. 215. P. 200–208.
- van Loon L.C., Pierpoint W.S., Boller T., Conejero V. Recommendation for naming plant pathogenesis-related proteins // *Plant Mol. Biol. Rep.* 1994. V. 12. P. 245–264.
- van Loon L.C., van Strien E.A. The family of pathogenesis related proteins // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1999. V. 55. P. 85–97.
- van Loon L.C., Rep M., Pietersen C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006. V. 44. P. 135–162.
- Walter M.H., Liu J.W. *et al.* Bean ribonuclease-like pathogenesis-related protein genes (Ypr10) display complex patterns of developmental, dark-induced and exogenous-stimulus-dependent expression // *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 239. P. 281–293.
- Wang N., Xiao B., Xiong L. Identification of a cluster of PR4-like genes involved in stress responses in rice // *J. Plant Physiol.* 2011. V. 168. P. 2212–2224.
- Warner S.A.J., Scott R., Draper J. Characterization of a wound-induced transcript from the monocot asparagus that shares similarity with a class of intracellular pathogenesis-related (PR) proteins // *Plant Mol. Biol.* 1992. V. 19. P. 555–561.
- Wen F., White G.J., VanEtten H.D. *et al.* Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection // *Plant Physiol.* 2009. V. 151. No. 2. P. 820–829.
- Xie Y.R., Chen Z.Y., Brown R.L., Bhatnagar D. Expression and functional characterization of two pathogenesis-related protein 10 genes from *Zea mays* // *J. Plant Physiol.* 2010. V. 167. P. 121–130.
- Yamamoto M., Torikai S., Oeda K. A major root protein of carrots with high homology to intracellular pathogenesis-related (PR) proteins and pollen allergens // *Plant Cell Physiol.* 1997. V. 38. P. 1080–1086.
- Zhang N., Zhang S., Borchert S. *et al.* High levels of a fungal superoxide dismutase and increased concentration of a PR-10 plant protein in associations between the endophytic fungus *Neotyphodium lolii* and ryegrass // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2011. V. 24. No. 8. P. 984–992.
- Zhou X.J., Lu S., Xu Y.H. *et al.* A cotton cDNA (GaPR-10) encoding a pathogenesis-related 10 protein with *in vitro* ribonuclease activity // *Plant Sci.* 2002. V. 162. No. 4. P. 629–636.



## ASSOCIATION BETWEEN PR PROTEINS WITH RIBONUCLEASE ACTIVITY AND PLANT RESISTANCE AGAINST PATHOGENIC FUNGI

E.A. Filipenko<sup>1</sup>, A.V. Kochetov<sup>1,2</sup>, Y.Kanayama<sup>3</sup>, V.I. Malinovsky<sup>4</sup>, V.K. Shumny<sup>1,2</sup>

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

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

<sup>3</sup> Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Aobaku, Sendai 981-8555, Japan;

<sup>4</sup> Institute of Biology and Soil Science, Far East Branch, Russian Academy of Sciences,  
Vladivostok, Russia

### Summary

Pathogenesis-related (PR) proteins participate in complex plant defense response to pathogens. It is known that members of two PR-proteins families (PR-4 and PR-10) exhibit ribonuclease activity in some cases. These proteins were found to be able to inhibit the growth of pathogenic fungi, and the ribonuclease activity is necessary for manifestation of this effect. This paper presents current data on molecular mechanisms governing the antifungal activity of PR-ribonucleases connected both with their direct cytotoxic impact on pathogen cells and with possible participation in induction of plant cell apoptosis and development of the hypersensitive reaction (HR).

**Key words:** RNase, PR proteins, PR-10, PR-4, plant pathogen, apoptosis.

УДК 575.852

## О ПРОИСХОЖДЕНИИ БЕЛКОВ СИНАПТОНОМНОГО КОМПЛЕКСА. ПОИСК РОДСТВЕННЫХ БЕЛКОВ В ПРОТЕОМАХ ВОДОРΟΣЛЕЙ, НИЗШИХ ГРИБОВ, МХОВ И ПРОСТЕЙШИХ ЖИВОТНЫХ

Т.М. Гришаева, Ю.Ф. Богданов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия,  
e-mail: tmgrishaeva@rambler.ru

Поступила в редакцию 10 февраля 2013 г. Принята к публикации 3 апреля 2013 г.

Методами биоинформатики проведен поиск в протеомах водорослей, мхов, низших грибов и простейших животных белков, сходных с известными белками синаптонемных комплексов (СК) 7 видов высших эукариот от почкующихся дрожжей до мыши, которые широко используются как модели для изучения мейоза. Установлено, что в протеомах зеленых и бурых водорослей, мхов, ряда низших грибов, а также эвгленовых простейших, споровиков и некоторых других одноклеточных эукариот наибольшее сходство с белками СК модельных организмов имеют те белки, которые содержат домен NORMA. Они близки к белкам латеральных элементов СК высших эукариот, также несущим домен NORMA. Этот домен узнает состояние хроматина и рекрутирует другие белки для построения СК.

**Ключевые слова:** водоросли, низшие грибы, одноклеточные, мейоз, синаптонемный комплекс, белки, анализ *in silico*.

### ВВЕДЕНИЕ

Вопрос о происхождении и эволюции механизмов мейоза, в том числе у белков, участвующих в мейотических процессах, важен для теории эволюции генетических систем и, кроме того, является в настоящее время одним из актуальных в клеточной биологии (Maguire, 1992; Li, Zheng, 2002; Богданов, 2003, 2008; Egel, Penny, 2007). Принципиальным отличием хромосом в клетках, делящихся путем мейоза, от хромосом в соматическом митозе является формирование в мейозе синаптонемных комплексов. Синаптонемный комплекс (СК) – это белковая структура, формирующаяся в профазе I деления мейоза между синаптирующими гомологичными хромосомами (и только на время их синапсиса) у подавляющего большинства эукариот (Heyting, 1996; Пенкина и др., 2002; Page, Hawley, 2004; Anuradha, Muniyappa, 2005). На основе осевых

элементов хромосом, соединяющих сестринские хроматиды и состоящих в основном из когезиновых белков, в профазе I мейоза строятся латеральные элементы СК, которые затем соединяются в единую структуру с помощью застежки-молнии из поперечных фибрилл, пронизывающих центральное пространство СК. В середине центрального пространства перекрывающиеся «головки» поперечных фибрилл формируют центральный элемент СК.

Структурные элементы синаптонемных комплексов состоят из мейоз-специфичных белков. Мажорные белки латеральных элементов синаптонемных комплексов (ЛЭ СК) у позвоночных (SYCP2, SYCP3) не имеют гомологии с белками ЛЭ СК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Hop1 и Red1), растения *Arabidopsis thaliana* (ASY1 и ASY2) и нематоды *Caenorhabditis elegans* (HIM-3). Но эти компоненты СК у дрожжей, арабидопсиса и нематоды несут общий функцио-

Таблица 1

Белки синаптонемного комплекса (СК), их функциональные домены

Белки центрального пространства СК (в скобках – функциональные домены)	Белки латеральных элементов СК и другие белки (в скобках – функциональные домены)
Zip1 Sc* (SMC бактериальный, Smc, AAA_13)	Hop1 Sc ( <b>HORMA</b> )
C(3)G Dm (2 бактериальных домена SMC)	Hop1 Sp – белок линейного элемента хромосом (RING-finger)
CORONA Dm	Red1 Sc (Rec10/Red1)
SYP-1 Ce (Smc)	Rec10 Sp – белок мейотической рекомбинации (Rec10/Red1)
SYP-2 Ce	C(2)M Dm (Rad21_Rec8_N – когезиновый)
SYP-3 Ce (SGNH_plant_lipase_like)	HIM-3 Ce ( <b>HORMA</b> )
SYP-4 Ce	ASY1 At ( <b>HORMA</b> , SWIRM)
ZYP1a At (2 бактериальных домена SMC)	ASY2 At ( <b>HORMA</b> )
ZYP1b At (2 бактериальных домена SMC, PRK00409)	SYCP2 Dr
SYCP1 Dr (SCP-1)	SYCP2 Mm (бактериальный COG4399)
SYCP1 Mm (SCP-1)	SYCP3-like Dr (Cor1)
SYCE1-like Dr	SYCP3 Mm (Cor1)
SYCE1 Mm (SMC бактериальный)	SC65 Dr – белок синаптонемного комплекса (proC2_суп, бактериальный)
SYCE2 Dr	SC65 Mm
SYCE2 Mm	FKBP6 Mm – пептидилпролил цистрансизомераза (FKBP_C, TPR)
SYCE3 Mm	
TEX12 Af	
TEX12 Mm	

\* Sc – дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, Sp – дрожжи *Schizosaccharomyces pombe*, Dm – насекомое *Drosophila melanogaster*, At – растение *Arabidopsis thaliana*, Ce – нематода *Caenorhabditis elegans*, Dr, Af – рыбы *Danio rerio* и *Anoplopoma fimbria*, Mm – млекопитающее *Mus musculus*. Домен **HORMA** узнает состояние хроматина и способствует взаимодействию разных белков. Домены SMC, Smc, SCP-1, Cor1, Rad21/Rec8 характерны для белков, структурирующих хромосомы. PRK00409 участвует в рекомбинации. Цистрансизомеразы катализируют изомеризацию молекул при наличии в них двойных связей. Остальные домены не имеют отношения к мейозу.

нальный домен (табл. 1). Белки центральных элементов СК у разных организмов также не гомологичны между собой, однако имеют сходную вторичную структуру (Heyting, 1996; Пенкина и др., 2002; Page, Hawley, 2004; Anuradha, Muniyappa, 2005; Bogdanov *et al.*, 2007).

Ранее мы показали, что некоторые структурные белки мейоза по своему происхождению тяготеют к бактериальным белкам, тогда как другие – к архейным. Однако в целом сходство белков СК с прокариотическими белками весьма низкое, часто на уровне такового для случайных аминокислотных последовательностей (Захаров и др., 2010). На основании этих данных нами был сделан вывод о том, что белки СК появились в ходе эволюции относительно поздно, лишь в процессе развития первичных эукариот.

Задачей настоящего исследования явился поиск в протеомах водорослей, мхов, грибов и Protozoa белков, сходных с известными белками синаптонемных комплексов высших эукариот.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего нами было исследовано компьютерными методами около 1,5 млн белков из протеомов водорослей, мхов, низших грибов, простейших животных и некоторых других групп эукариот. Мы использовали тот вариант таксономии объектов исследования, который содержится в базе данных NCBI. Объектами для сравнения с указанными выше белками были белки синаптонемных комплексов (СК) 7 модельных видов эукариот от дрожжей до мыши (табл. 1). Белки человека в анализ не брали, так как они очень похожи на соответствующие белки мыши.

Аминокислотные последовательности белков СК искали в базах данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и UniProtKB/TrEMBL (<http://www.uniprot.org/uniprot/>). Функциональные домены этих белков определяли с помощью программы CDART (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?>). В

качестве контроля (для оценки степени сходства белков) использовали случайные аминокислотные последовательности, генерированные из оригинальных белков программой RandSeq (ExPASy Proteomics Server, <http://au.expasy.org/tools/randseq.htm>). С помощью программы NCBI Protein BLAST ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST\\_PROGRAMS=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&SHOW\\_DEFAULTS=on&LINK\\_LOC=blasthome#](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome#)) вели поиск сходных последовательностей в протеомах водорослей, мхов, грибов,

простейших животных и некоторых других групп эукариот (изученные таксоны указаны в табл. 2, 3). Некоторые таксоны, для которых в базе данных имелось малое количество белков, были объединены в группы. Из таксонов, указанных в табл. 3, многоклеточными на некоторых стадиях развития являются только Muxosporea и Pelagophyceae.

Параметры поиска программы PROTEIN BLAST: Max. target sequences – 1000 или 5000, Expect threshold – 100, остальные – по умолчанию. Достоверность сходства характеризуется

Таблица 2

Белки синаптонемных комплексов (СК), показавшие максимальное сходство с белками из протеомов водорослей, мхов и низших грибов

Таксоны эукариот	Количество белков в базе данных NCBI <sup>a</sup>	Белки центрального пространства СК	Белки латеральных элементов и другие белки СК
Chlorophyta (зеленые водоросли)	156803	SYCP1 Mm (50)	HIM-3 Ce (54), FKBP6 Mm (87), Hop1 Sc (99), <b>ASY2 At (117), ASY1 At (163)</b>
Phaeophyceae (бурые водоросли)	27435	SYCP1 Mm (53)	ASY2 At (65), Hop1 Sc (71), FKBP6 Mm (85), <b>ASY1 At (124)</b> ; найден гомолог Hop1 у <i>Ectocarpus siliculosus</i>
Cryptophyta (криптофитовые водоросли)	4591	Очень низкое сходство	FKBP6 Mm (97)
Diatoms (диатомовые водоросли, они же Bacillariophyta)	48555	Очень низкое сходство	FKBP6 Mm (97)
Rhodophyta (красные водоросли)	21815	Очень низкое сходство	Очень низкое сходство
Euglenophytes (эвгленовые), Chrysophytes (золотистые), Charophytes (харовые), Xantophyceae (желто-зеленые), Dinoflagellates (динофлагелляты)	7517	Очень низкое сходство	Очень низкое сходство
Microsporidia (одноклеточные низшие грибы)	20596	Очень низкое сходство	Hop1 Sp (50), ASY1 At (52), Hop1 Sc (55)
Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Fungi insertae sedis (Zygomycota) (низшие грибы)	12709	Очень низкое сходство	ASY2 At (87), <b>FKBP6 Mm (102), Hop1 Sc (106), ASY1 At (126)</b>
Bryophyta, Anthocerotophyta, Marchantiophyta (мхи)	95921	Очень низкое сходство	Hop1 Sc (86), <b>FKBP6 (104), ASY2 At (183), ASY1 At (278)</b>

Примечание. Максимальные показатели сходства даны в скобках. Обозначения модельных организмов (At, Mm, Sc, Ce) те же, что в табл. 1

<sup>a</sup> На момент начала исследования. Жирным шрифтом выделены белки с высокими показателями сходства – более 100, курсивом – с показателем от 60 до 100.



Таблица 3

Белки синаптонемных комплексов (СК), показавшие максимальное сходство с белками из протеомов разных групп одноклеточных и примитивных многоклеточных эукариот (в скобках даны максимальные показатели сходства)

Таксоны эукариот	Количество белков в базе данных NCBI <sup>a</sup>	Белки центрального пространства СК	Белки латеральных элементов и другие белки СК
Oomycetes (оомицеты), Labyrinthulida (сетчатые слизевики) одноклеточные	96280	SYCP1 Mm (57)	<b>FKBP6 Mm (120)</b>
Rhizaria (лучевники, солнечники и др.), Мухосporеа (слизистые споровики)	3469	Очень низкое сходство	<i>FKBP6 Mm (60)</i>
Parabasalia+Fornicata+Heterolobosea (примитивные одноклеточные эукариоты)	174018	ZYP1a At (50)	SYCP2 Mm (51), HIM-3 Ce (55), <b>Hop1 Sc (104)</b> , <b>ASY2 At (107)</b> , <b>ASY1 At (194)</b>
Pelagophyceae (водоросли) + Perkinsea (Alveolata)	59645	Низкое сходство	<b>FKBP6 Mm (115)</b>
Aricomplexa (споровики из группы Alveolata)	241035	SYP-1 Ce (57), SYCP1 Dr (49), ZYP1b At (59), ZYP1a At (60), SYCP1 Mm (67) <sup>b</sup>	<i>Hop1 Sc (99)</i> , <b>ASY2 At (107)</b> , <b>FKBP6 Mm (133)</b> , <b>ASY1 At (148)</b>
Ciliophora (Инфузории, Alveolata)	144165	ZYP1b At (51), SYCP1 Dr (60)	<b>FKBP6 Mm (114)</b>
Amoebozoa (амебодные простейшие)	119387	Очень низкое сходство	<b>FKBP6 Mm (122)</b>
Euglenozoa (эвгленовые простейшие)	187312	SYCP1 Mm (56)	HIM-3 Ce (52), <i>FKBP6 Mm (78)</i> , <i>ASY2 At (91)</i> , <i>Hop1 Sc (94)</i> , <b>ASY1 At (115)</b>
Choanoflagellata (хоанофлагелляты)	30401	Zip1 Sc (52), ZYP1a At (52), C(3)G Dm (57), ZYP1b At (61), SYCP1 Mm (65)	SYCP2 Mm (53), Hop1 Sc (56), <i>FKBP6 Mm (76)</i> , <i>ASY1 At (78)</i>

Примечание. В скобках даны максимальные показатели сходства.

<sup>a</sup> На момент начала исследования; <sup>b</sup> эти значения Score для белков СК мало отличаются от Score для контрольных последовательностей – случайных аналогов белков СК. Остальные обозначения см. в табл. 2.

показателем E-value, означающим количество сходных белков, которые могут быть подобраны программой BLAST случайно. Показатель сходства Score (результат работы программы BLAST) учитывает три параметра: число совпадений аминокислот, число аминокислот одного типа и число так называемых gaps, т. е. тех случаев, когда в одном белке на данном месте есть аминокислота, а в другом она отсутствует. При анализе каждого белка СК сравнивали показатели сходства (Score) этого белка и его «случайного» аналога с белками из протеомов изучаемой группы эукариот. В таблицах указа-

ны максимальные значения Score. Белки СК, имеющие Score менее 50, в таблицу не заносили. В случае близких показателей сходства для оригинального и «случайного» белков сравнивали средние значения их Score, для чего брали по 10 лучших результатов поиска. Сравнение проводили с помощью t-теста Стьюдента (t-test independent by variables) программы STATISTICA (STATISTICA software v.7, www.statsoft.com).

Значения Score зависят от длины молекулы, поэтому сравнивать эти показатели для белков разной величины не очень корректно. Однако сравнение их «по вертикали», т. е. для разных

групп эукариот, вполне уместно. Понятно также, что если показатели сходства низкие, на уровне таковых для «случайных» последовательностей, то абсолютные значения Score не так важны.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В протеомах большинства водорослей (табл. 2) не были выявлены белки, обладающие сколько-нибудь заметным сходством с известными белками СК (показатели сходства были либо на уровне таковых для случайных последовательностей, либо слегка превышали их). Исключение составляет лишь фермент FKBP6 мышцы. Это касается криптофитовых водорослей (Cryptophyta), диатомовых (Diatoms или Bacillariophyta), красных водорослей (Rhodophyta), а также группы из 5 таксонов, объединенных по причине малого количества секвенированных геномов и, соответственно, малого количества белков в базе данных. Эта группа состоит из Euglenophytes, Chrysophytes, Charophytes, Xanthophyceae, Pyrophyta (или Dinoflagellates). Лишь у двух групп водорослей – зеленых (Chlorophyta) и бурых (Phaeophyceae) – выявлены белки, обладающие существенным сходством с белками СК, а именно: с Hop1 дрожжей, HIM-3 нематоды, ASY1 и ASY2 арабидопсиса. Максимальный показатель сходства составлял 163 (табл. 2). Найденные белки из протеомов водорослей и белки СК имеют домен NORMA. У зеленой водоросли *Ectocarpus siliculosus* мы обнаружили белок, аннотированный как гомолог белка HOP1.

При анализе белков центрального пространства СК показатели сходства, превышающие таковые для «случайных» аналогов этих белков, получены только для компонентов центрального элемента СК – белков C(3)G дрозофилы, ZYP1a арабидопсиса (эти белки несут прокариотические домены SMC), SYCP1 мышцы и рыбы (домен SCP-1). Максимальные показатели сходства равны 50 (для зеленых водорослей) и 53 (для бурых), у остальных менее 50, поэтому в таблицу не внесены.

Были исследованы также протеомы двух групп низших грибов (табл. 2). Для Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Kickxellomycotina, Zoopagomycotina, Entomophthoro-

mycotina, Mucoromycotina, Nephridiophagidae и Olpidiaceae найдены белки с доменом NORMA, сходные с компонентами СК – Hop1, ASY1 и ASY2 (максимальные показатели сходства от 87 до 126). В протеомах низших грибов Microsporidia также обнаружены белки с доменом NORMA, сходные с Hop1, ASY1 и ASY2, однако максимальные показатели Score в этом случае невысоки (от 50 до 55). В протеомах разных групп мхов (табл. 2) выявлены белки, родственные белкам ЛЭ СК с доменом NORMA с очень высокими для неконсервативных белков показателями сходства (278 для ASY1 арабидопсиса при длине белка 596 аминокислотных остатков, а.к.). Сравнительно высокое сходство с белками ряда низших грибов и мхов выявлено нами для фермента FKBP6, который входит в состав латерального элемента СК мышцы. Максимальный показатель достигал 104 при длине молекулы этого белка 327 а.к.

Для других групп исследованных эукариот (табл. 3) в первую очередь отметим высокое сходство их белков с ферментом FKBP6 мышцы (Score до 133 у споровиков). Для белков центрального пространства СК показатели сходства чуть выше, чем у водорослей и низших грибов, однако все равно невелики (до 65 у хоанофлагеллят). Компоненты латеральных элементов СК (Hop1 дрожжей, ASY1 и ASY2 арабидопсиса) наиболее близки белкам из протеомов споровиков и группы парабазалииформикаты-гетеролобозеа (максимальный Score = 194 для белка ASY1 арабидопсиса, имеющего длину 596 а.к.).

При анализе сходства компонентов центрального пространства СК (ЦП СК) с белками споровиков обнаружены высокие показатели сходства не только для оригинальных белков, но и для полученных на их основе специальной программой случайных аминокислотных последовательностей, содержащих аминокислоты в тех же пропорциях, что и оригинальные белки, и имеющих ту же длину, хотя «случайный» Score обычно не превышает 40, а во многих случаях и 30. Белки SYCP1 и ZYP1 формируют центральный элемент СК. Не имея гомологии первичной структуры, они имеют сходство вторичной структуры, т. е. образуют протяженную альфа-спираль в центральной части молекулы (Heiting, 1996; Page, Hawley, 2004). Этой же

особенностью обладают и сходные белки из протеомов споровиков. Они имеют длину свыше 5000 аминокислотных остатков, а сходный с белками СК С-концевой фрагмент также образует альфа-спираль (данные получены с помощью программы CDART, а также «COILS – Prediction of Coiled Coil Regions in Proteins», [http://www.ch.embnet.org/software/COILS\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Многие консервативные ферменты мейотической рекомбинации достались эукариотам от прокариот, причем как от архей, так и от бактерий (Захаров и др., 2010). Происхождение белков СК загадочно, ибо эти белки не имеют гомологии при сравнении их у представителей цветковых растений, дрожжей, нематод, насекомых и млекопитающих (Bogdanov *et al.*, 2007). Мы предприняли попытку найти методами компьютерной биологии возможных предшественников ключевых структурных белков мейоза – белков синаптонемных комплексов – в протеомах мало изученных в плане мейоза низших растений, низших грибов и простейших. Предварительные исследования показали, что белки СК не были унаследованы высшими растениями и животными от прокариот, а возникли *de novo* уже в процессе развития первых эукариот, скорее всего, вместе с механизмом мейоза (Захаров и др., 2010). Но механизм мейоза более или менее консервативен, тогда как белки СК – нет (Loidl, 2006; Bogdanov *et al.*, 2007). В лучшем случае они имеют общие домены (Heyting, 1996; Пенкина и др., 2002; Page, Hawley, 2004; Anuradha, Muniyappa, 2005; Bogdanov *et al.*, 2007).

Откуда пришли структурные белки синаптонемного комплекса? Для выяснения этого вопроса мы разбили наши исследования на несколько этапов. На первом этапе были проанализированы протеомы водорослей, мхов, низших грибов, простейших животных и некоторых других групп эукариот (табл. 2, 3). Результаты этого анализа изложены в данной статье.

Прежде всего, обращает на себя внимание тот факт, что почти во всех исследованных протеомах имеются белки, в той или иной степени схожие с белками СК, несущими домен NORMA

(табл. 2, 3). Этот функциональный домен встречается в белках, принимающих участие в формировании структуры хромосомы и рекрутирующих другие белки (данные программы CDART). Белки, родственные белкам СК, также несут этот домен. Более того, у представителя бурых водорослей *Ectocarpus siliculosus* найден белок CBN75586.1, аннотированный в базе данных NCBI как гомолог Hnr1 дрожжей *S. cerevisiae* (табл. 2). Степень его сходства с известными белками СК такова: с Hnr1 Score = 72 (при длине молекулы Hnr1 605 а.к.), при сравнении с белками растения *A. thaliana* ASY2 (1399 а.к.) и ASY1 (605 а.к.) Score составляет 66 и 124 соответственно. Для первых двух белков сходство можно считать невысоким. Тем не менее его оказалось достаточно, чтобы в базе данных NSBI белок CBN75586.1 был аннотирован в качестве гомолога белка Hnr1.

Для сравнения приведем некоторые другие показатели из этого ряда. Высоко консервативный фермент мейотической рекомбинации DMC1 мыши (длина 340 а.к.) дает следующие максимальные показатели сходства: при сравнении с белками *Danio rerio* – 622, *Caenorhabditis elegans* – 307, *Arabidopsis thaliana* – 391, *Drosophila melanogaster* – 310, *Saccharomyces cerevisiae* – 372. Аналогичные показатели для гораздо менее консервативного структурного белка СК – SYCP1 мыши (длина 993 а.к.) – следующие: 320, 49, 38, 42, 33. Поэтому полученные нами показатели сходства для многих белков из протеомов ряда исследованных таксонов эукариот можно считать достаточным основанием, чтобы говорить об их родстве с белками СК, хотя мы не можем говорить об их гомологии.

Белки СК, несущие домен NORMA, входят в состав латеральных элементов СК. Поскольку последние формируются на основе когезиновых осей хромосом (Revenkova, Jessberger, 2006), а когезины присутствуют даже у прокариот (Hirano, 2005; Grishaeva, Zakharov, 2012), мы можем предположить, что хромосомные оси появились раньше синаптонемного комплекса. Поэтому не вызывает удивления появление и широкое распространение именно белков с доменом NORMA у водорослей и низших грибов, а тем более у Protozoa.

Что касается других белков СК, как несущих какие-либо функциональные домены, так и ли-

шенных их, то их сходство с белками из протеомов изученных в этой работе эукариот можно считать невысоким либо вообще отсутствующим. Однако необходимо отметить некоторые интересные результаты. Так, выявлено невысокое, но достоверное сходство белка SYCP2 мыши с белками из протеомов хоанофлагеллят (E-value =  $e^{-07}$ ) и ряда других одноклеточных эукариот (E-value =  $e^{-05}$ ) (табл. 3). Интересно также, что среди всех белков центрального пространства СК ощутимым сходством с белками изученных нами эукариот обладают только белки, формирующие центральный элемент СК и отличающиеся специфической вторичной структурой – протяженным участком альфа-спирали. Это белки SYCP1 *Mus musculus* и *Danio rerio*, ZYP1a и ZYP1b *Arabidopsis thaliana*, SYP-1 *Caenorhabditis elegans*, C(3)G *Drosophila melanogaster* и Zip1 *Saccharomyces cerevisiae*. Максимальные показатели сходства не превышают 65, но они достоверно выше таковых, полученных для «случайных» аналогов известных белков СК.

При анализе сходства компонентов центрального пространства СК (ЦП СК) с белками споривиков (Arisomplexa) обнаружены высокие показатели сходства не только оригинальных белков, но и полученных на их основе специальной программой случайных аминокислотных последовательностей, содержащих аминокислоты в тех же пропорциях, что и оригинальные белки, и имеющих ту же длину. Видимо, сочетание аминокислот в «случайных» аналогах за счет повторов, характерных для альфа-спиралей оригинальных белков СК, оказалось похожим на сами белки СК. В литературе ранее отмечалось, что все альфа-спирали имеют около 20 % сходства между собой за счет повторяющихся «реперных» гидрофобных аминокислот (Meuwissen *et al.*, 1992).

Интересен также обнаруженный нами факт, что в протеомах Choanoflagellata, считающихся среди одноклеточных ближайшими родственниками многоклеточных животных (King *et al.*, 2008), нет белков, имеющих высокую степень сходства с каким-либо известным белком СК.

Нам неизвестно, имеют ли СК в своем мейозе все объекты, изученные нами, ибо, например, такие низшие грибы, как *Aspergillus nidulans*, обходятся в мейозе без СК (Цит. по: Пенкина

и др., 2002). Но мы констатируем, что в протеомах многих низших грибов, бурых и зеленых водорослей, простейших животных и мхов есть белки, содержащие домен NORMA, который необходим для построения латеральных элементов СК у таких модельных организмов, как цветковое растение *A. thaliana*, сумчатый гриб *S. cerevisiae*, нематода *C. elegans*.

В итоге нашего исследования мы констатируем, что получены новые подтверждения высказанного ранее предположения о том, что для построения синаптонемных комплексов в разных таксонах эукариот используются разные белки, общим свойством которых является присутствие доменов с определенной конформацией (Богданов, 2004; Богданов и др., 2007; Bogdanov *et al.*, 2007).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 13-04-02071а.

## ЛИТЕРАТУРА

- Богданов Ю.Ф. Изменчивость и эволюция мейоза // Генетика. 2003. Т. 39. № 4. С. 453–473.
- Богданов Ю.Ф. Сходство доменной организации белков у филогенетически далеких организмов как основа консерватизма мейоза // Онтогенез. 2004. Т. 35. № 6. С. 415–423.
- Богданов Ю.Ф. Эволюция мейоза одноклеточных и многоклеточных эукариот. Ароморфоз на клеточном уровне // Журн. общ. биологии. 2008. Т. 69. № 2. С. 4102–117.
- Богданов Ю.Ф., Гришаева Т.М., Карпова О.И., Пенкина М.В. Роль специфических белков в эволюции мейоза // Современные проблемы биологической эволюции: Тр. конф. К 100-летию Гос. Дарвиновского музея. 17–20 сентября 2007, Москва. М.: Изд-во ГДМ, 2008. С. 7–30.
- Захаров И.А., Дадашев С.Я., Гришаева Т.М. Ортологи белков мейоза в протеомах прокариот // Докл. АН. 2010. Т. 435. № 5. С. 696–698.
- Пенкина М.В., Карпова О.И., Богданов Ю.Ф. Белки синаптонемного комплекса – специфические белки мейотических хромосом // Молекуляр. биология. 2002. Т. 36. № 3. С. 1–11.
- Anuradha S., Muniyappa K. Molecular aspects of meiotic chromosome synapsis and recombination // Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 2005. V. 79. P. 49–132.
- Bogdanov Y.F., Grishaeva T.M., Dadashev S.Y. Similarity of the domain structure of proteins as a basis for the conservation of meiosis // Intern. Rev. Cytol. 2007. V. 257. P. 83–142.
- Egel R., Penny D. On the origin of meiosis in eukaryotic evolution: coevolution of meiosis and mitosis from feeble beginnings // Genome Dynamics and Stability. V. 3. Recombination and Meiosis / Eds R. Egel, D.-H. Lankenau. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2007. P. 249–288.



- Grishaeva T.M., Zakharov I.A. Comparison of eukaryotic nuclear proteins with prokaryotic proteins: implications for eukaryogenesis // *Curr. Topics in Genet.* 2012. V. 5. P. 31–36.
- Heyting C. Synaptonemal complex: structure and function // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1996. V. 8. P. 389–396.
- Hirano T. SMC proteins and chromosome mechanics: from bacteria to humans // *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2005. V. 360. P. 507–514.
- Li W., Zheng G-Ch. A resurgent Phoenix – a hypothesis for the origin of meiosis // *Life.* 2002. V. 54. P. 9–12.
- Loidl J. *S. pombe* linear elements: the modest cousins of synaptonemal complexes // *Chromosoma.* 2006. V. 115. P. 260–271.
- King N., Westbrook M.J., Young S.L. *et al.* The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans // *Nature.* 2008. V. 451. P. 783–788.
- Maguire M. P. Evolution of meiosis // *J. Theor. Biol.* 1992. V. 154. P. 43–55.
- Meuwissen R.L.J., Offenbergh H.H., Dietrich A.J.J. *et al.* A coiled-coil related protein specific for the synapsed regions of meiotic prophase chromosomes // *EMBO J.* 1992. V. 11. P. 5091–5100.
- Page S.L., Hawley R.S. The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004. V. 20. P. 525–558.
- Revenkova E, Jessberger R. Shaping meiotic prophase chromosomes: cohesins and synaptonemal complex proteins // *Chromosoma.* 2006. V. 115. P. 235–240.

## THE ORIGIN OF SYNAPTONEMAL COMPLEX PROTEINS. SEARCH FOR RELATED PROTEINS IN PROTEOMES OF ALGAE, LOWER FUNGI, MOSSES, AND PROTOZOANS

**T.M. Grishaeva, Yu.F. Bogdanov**

Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia,  
e-mail: tmgrishaeva@rambler.ru

### Summary

Proteins similar to known proteins of the synaptonemal complexes (SCs) of seven species of higher eukaryotes, from budding yeast to mouse, which are used as models for studying meiosis, have been sought by bioinformatical methods. In the proteomes of green and brown algae, mosses, a number of lowest fungi, Euglenozoa, Apicomplexa, and some other unicellular eukaryotes, proteins containing the HORMA domain show the greatest similarity to SC proteins of the model organisms. They are close to proteins of lateral SC elements of higher eukaryotes, also bearing the HORMA domain. This domain recognizes the chromatin state and recruits other proteins for SC formation.

**Key words:** algae, lower fungi, unicellular organisms, meiosis, synaptonemal complex, proteins, *in silico* analysis.

УДК 57.085.2

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОИСХОЖДЕНИЯ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ ЛЬНА

© 2013 г. А.И. Сорока<sup>1</sup>, В.А. Лях<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт масличных культур Национальной академии аграрных наук Украины,  
Запорожье, Украина, e-mail: bvryffy@hotmail.com;

<sup>2</sup> Запорожский национальный университет, Запорожье, Украина,  
e-mail: genetika@znu.edu.ua

Поступила в редакцию 27 марта 2013 г. Принята к публикации 14 июня 2013 г.

Изучали возможность прогнозирования плоидности клеток, являющихся источниками растений-регенерантов в культуре пыльников *in vitro*. На примере льна масличного показано, что таким способом может быть проведение анализа популяции растений-регенерантов на наличие расщепления по маркерному признаку с простым генетическим контролем. Если источником происхождения регенерантов являются микроспоры, то в их потомстве наблюдается расщепление по маркерному признаку, совпадающее с расщеплением по этому признаку на уровне гамет. В случае если источником происхождения растений-регенерантов являются спорофитные ткани, то расщепление не наблюдается. Предлагаемый подход может быть применим при культивировании не только пыльников, но и семян, а также на любом виде растений, у которых эти структуры используются для получения удвоенных гаплоидов.

**Ключевые слова:** плоидность, культура пыльников, удвоенный гаплоид, расщепление, маркерный признак, лен масличный.

### ВВЕДЕНИЕ

Такой биотехнологический прием, как культура пыльников, уже давно и успешно используется для получения константного генетического материала (Ницше, Венцель, 1980). При этом создание линий на базе гибридов  $F_1$  с применением биотехнологии достигается в течение одного поколения, тогда как при традиционной селекции на это уходит обычно 4–6 лет. Культура пыльников нашла применение и для получения удвоенных гаплоидов льна, который является важной культурой во многих странах с умеренным климатом и возделывается как для получения натуральных волокон, так и для производства льняного масла (Bergmann, Friedt, 1997; Поляков, 1998).

При получении дигаплоидных линий в культуре пыльников, независимо от изучаемого объекта, важно знать плоидность клеток, являющихся источником их происхождения. Появляющиеся на пыльниках новообразования либо

в виде каллуса, либо в виде эмбриоидов могут образовываться как из гаметофитной ткани, так и из спорофитной (Ницше, Венцель, 1980; Rajender, Vaidyanath, 1999). Новообразования, полученные из спорофитной ткани, не представляют практического интереса в плане создания дигаплоидных линий, поскольку повторяют генетические свойства исходного родителя. При получении регенерантов в культуре пыльников важны растения, ведущие происхождение от гаплоидных структур (микроспор), поскольку именно они являются генетически уникальными и в случае удвоения набора хромосом обладают полной гомозиготностью.

В настоящее время путей определения плоидности растений, получаемых при культивировании пыльников, значительно больше, чем способов выявления плоидности клеток, являющихся источником новообразований и получаемых из них растений. Для установления плоидности растений-регенерантов используют как прямые, так и косвенные методы. В первом

случае непосредственно подсчитывают количество хромосом на метафазных пластинках (Ницше, Венцель, 1980; Паушева, 1988) или определяют количество ДНК в клетках на соответствующем оборудовании (Bohanec, 2003; Claveria *et al.*, 2005), а во втором – используют различные характеристики клеток, тканей и растения в целом, тесно коррелирующие с плоидностью растительного организма. К таковым относят количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и в клетках основных тканей (Qin, Rotino, 1995; Давыдова, 2008), размер клеток тканей, а также их количество на единицу площади (Котлярова, 2010; Сорока, 2013), морфологию цветка и целого растения (Муравлев, Кривошеева, 1999; Малецкая и др., 2009), размер семян и зародышей (Bouvier *et al.*, 1992; Kita *et al.*, 2001), флотацию в растворе соляной кислоты или в культуральной среде (Aalders, 1958; Lotfi, Salehi, 2008).

Отчасти вышеперечисленные методы оценки плоидности растений-регенерантов могут быть использованы и для выяснения природы клеток, из которых эти растения были получены. Однако однозначный ответ может быть дан лишь в случае гаплоидности растения-регенеранта. Когда же растения, полученные в культуре пыльников, имеют удвоенный набор хромосом, даже метод подсчета количества хромосом в клетках тканей не позволяет выяснить плоидность клетки, давшей начало новообразованию. Это объясняется тем, что часто растения, источником происхождения которых были гаплоидные микроспоры, на момент проведения цитологического анализа уже имеют удвоенный набор хромосом за счет спонтанного удвоения их количества в условиях *in vitro*, и эти растения с помощью такого анализа уже невозможно отличить от растений-регенерантов, инициированных из спорофитных тканей. Например, при культивировании пыльников рапса в определенных условиях лишь 10–15 % растений-регенерантов являются гаплоидами, остальные же растения – уже спонтанные удвоенные гаплоиды (Муравлев, Кривошеева, 1999). Использование же цитологического анализа на самых ранних этапах формирования новообразований ограничено высокой вероятностью их повреждения или гибели из-за малого размера этих структур.

Ограниченность подходов, позволяющих определять плоидность клеток, являющихся источниками растений-регенерантов в культуре пыльников, предполагает поиск других путей решения этого вопроса. Одним из таких путей, по нашему мнению, мог бы быть анализ популяции растений-регенерантов на наличие расщепления по какому-либо маркерному признаку с простым генетическим контролем. Этот подход основывается на том, что регенеранты, развившиеся из спорофитной ткани пыльника, представленной диплоидными клетками, фенотипически не отличаются по маркерному признаку от растения-донора пыльников. В отличие от диплоидной клетки спорофитной ткани микроспора имеет гаплоидный набор хромосом, получая в процессе мейоза лишь по одной из каждой пары гомологичных хромосом. Это приводит к тому, что из разных по генотипу микроспор образуются и разные по генотипу растения-регенеранты. Вследствие этого среди растений-регенерантов наблюдается расщепление по маркерному признаку на несколько классов – два класса растений выявляют в случае детерминирования данного признака одной парой генов, четыре класса – двумя парами генов (при их независимом наследовании) и т. д. Таким образом, если источником происхождения популяции растений-регенерантов являются гаплоидные структуры (микроспоры), то среди данных растений наблюдается расщепление по маркерному признаку, совпадающее с расщеплением по этому признаку на уровне гамет, а в случае если источником происхождения растений-регенерантов являются спорофитные ткани, расщепления не наблюдается.

Целью данной работы являлось изучение возможностей установления плоидности клеток, являющихся источниками растений-регенерантов в культуре пыльников *in vitro*, по анализу расщепления по маркерному признаку в образующейся популяции удвоенных гаплоидов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для выяснения плоидности клеток, являющихся источниками новообразований в культуре пыльников, использовали гибриды F<sub>1</sub> льна масличного (*Linum humile* Mill.) двух комбинаций скрещивания –

MP485 × Авангард и M12 × M24. Родители гибрида MP485 × Авангард отличались окраской цветка: один из них (линия MP485) характеризовался цветками синей окраски, а другой (линейный сорт Авангард) – белой, рецессивной по отношению к синей. Обе родительские линии гибрида M12 × M24 имели цветки белой окраски. Однако одна и та же окраска этих линий детерминировалась разными (неаллельными) генами с комплементарным типом взаимодействия (Лях, Сорока, 2008).

С целью получения растений-регенерантов пыльники данных гибридов культивировали на искусственной питательной среде LMA-1, модифицированной нами путем увеличения в ней количества сахарозы (Поляков, Пролетова, 1998; Лях, Сорока, 2008). При культивировании пыльников проводили учет новообразований относительно места их появления. Новообразования из нити и связника пыльника доращивали отдельно от новообразований, сформированных из самого пыльника. Соответственно этому образующиеся растения-регенеранты высаживали в почву в виде двух отдельных популяций (популяции № 1 и № 2) по каждому гибриду.

Для определения источника происхождения новообразований (такими источниками могут быть микроспоры или спорофитные ткани пыльника) в культуре *in vitro* пыльников гибридов F<sub>1</sub> использовали анализ генетической структуры популяции полученных растений льна по морфологическому признаку окраски цветка. Этот признак использовался как маркерный, поскольку легко визуально идентифицировался на соответствующей стадии развития растения. Вывод об источнике происхождения новообразований делали на основании наличия или отсутствия расщепления среди растений-регенерантов по изучаемому маркерному признаку.

Для выяснения соответствия расщепления в популяции растений-регенерантов предполагаемому расщеплению на уровне гамет использовали метод  $\chi^2$  (Griffiths, 1996).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При культивировании пыльников обоих гибридов было получено по две популяции (№ 1 и № 2) растений-регенерантов. Популяция № 1 была представлена растениями, развившимися

из новообразований, сформированных из самого пыльника. Популяция № 2 состояла из растений, полученных из новообразований, возникших на месте связника или тычиночной нити.

Одна из родительских линий гибрида F<sub>1</sub> MP485 × Авангард имела белую окраску цветка, тогда как другая характеризовалась синими цветками. Признак белоцветковости, присущий линейному сорту Авангард, был рецессивным и наследовался моногенно в скрещиваниях с синецетковыми генотипами. В силу этого гибридные растения имели синюю окраску цветка, но продуцировали гаметы как с геном синей, так и белой окраски цветка в равном соотношении.

В популяции № 1, полученной при культивировании пыльников данного гибрида, было 24 растения-регенеранта. Эта популяция состояла из 13 синецетковых и 11 белоцветковых растений, т. е. наблюдалось расщепление, близкое к 1 : 1 с высокой вероятностью (табл.). Такое расщепление у гибрида должно происходить и на уровне гамет. Это свидетельствовало о том, что растения проанализированной популяции образованы именно из гаплоидных микроспор, а не из диплоидных клеток спорофитных тканей пыльника.

Результаты анализа всех четырех популяций растений-регенерантов, полученных при культивировании пыльников гибридов F<sub>1</sub> MP485 × Авангард и M12 × M24, приведены в табл.

Популяция растений № 2, полученная в культуре пыльников гибрида MP485 × Авангард, состояла лишь из 17 синецетковых растений, тогда как белоцветковые полностью отсутствовали (табл.). Отсутствие расщепления по признаку окраски цветка свидетельствовало о том, что данная популяция растений-регенерантов была образована из клеток, имеющих спорофитную, то есть диплоидную природу.

Гибрид F<sub>1</sub> M12 × M24 был получен от скрещивания двух мутантных линий с белой окраской цветка. В данном случае окраску цветка контролировали два неаллельных гена (обозначенных *A* и *B*) с комплементарным типом взаимодействия (Лях, Сорока, 2008). Гибридные растения (*AaBb*), полученные от скрещивания этих двух белоцветковых линий (*AAbb* и *aaBB*), характеризовались синей окраской цветка и продуцировали четыре класса гамет в соотношении 1 часть *AB*



Таблица

Расщепление по окраске цветка в популяциях растений-регенерантов льна масличного, полученных при культивировании пыльников гибридов F<sub>1</sub>

Номер популяции	Фенотип родителей		Фенотип гибридов F <sub>1</sub> , у которых взяты пыльники	Соотношение растений-регенерантов по окраске цветка		Модель расщепления
	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>		синий	белый	
MP485 × Авангард						
1	Синий	Белый	Синий	13	11	1 : 1*
2	Синий	Белый	Синий	17	0	–
M12 × M24						
1	Белый	Белый	Синий	11	27	1 : 3**
2	Белый	Белый	Синий	14	0	–

Примечание.  $\chi^2_{05}$  (df = 1) = 3,84; \* отличия от расщепления 1 : 1 не существенны ( $\chi^2 = 0,17$ ;  $p = 0,68$ ); \*\* отличия от расщепления 1 : 3 не существенны ( $\chi^2 = 0,32$ ;  $p = 0,57$ ).

(растения с синим цветком), 1 часть *Ab* (белый цветок), 1 часть *aB* (белый цветок) и 1 часть *ab* (белый цветок). Схема образования растений-регенерантов из клеток разной ploidy при культивировании пыльников в случае комплементарного взаимодействия генов, детерминирующих маркерный признак, показана на рис. 1 и 2 на примере гибрида F<sub>1</sub> M12 × M24.

Популяция № 1, полученная в результате культивирования пыльников, была представлена 38 растениями-регенерантами, среди

которых было 11 растений с окрашенным цветком и 27 – с белым, т. е. в соотношении, близком к 1 синий : 3 белый. Такое соотношение совпадало с теоретическим расщеплением на уровне гамет. Наличие двух классов фенотипов по окраске цветка в популяции № 1, а также соответствующее соотношение этих фенотипов указывало на то, что источником происхождения растений были именно гаплоидные микроспоры, а не диплоидные клетки спорофитной ткани (табл., рис. 1).

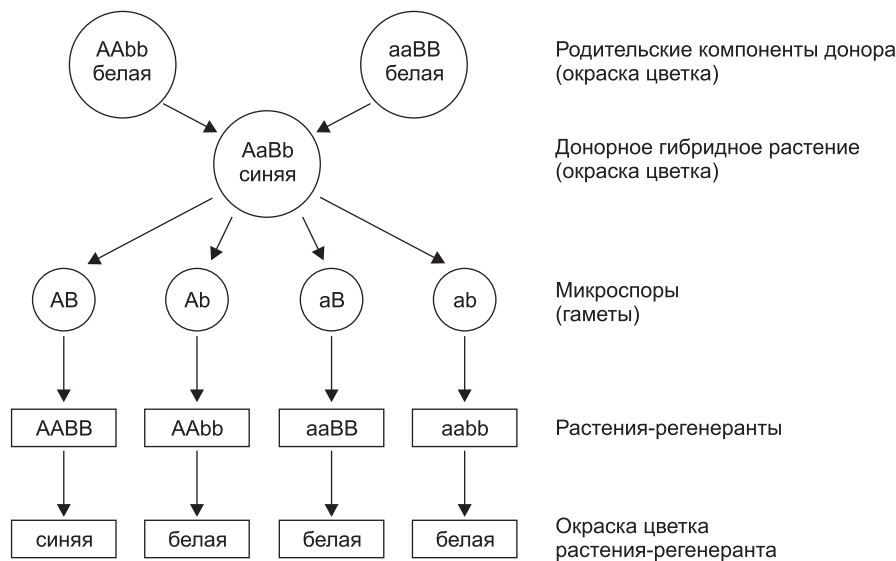
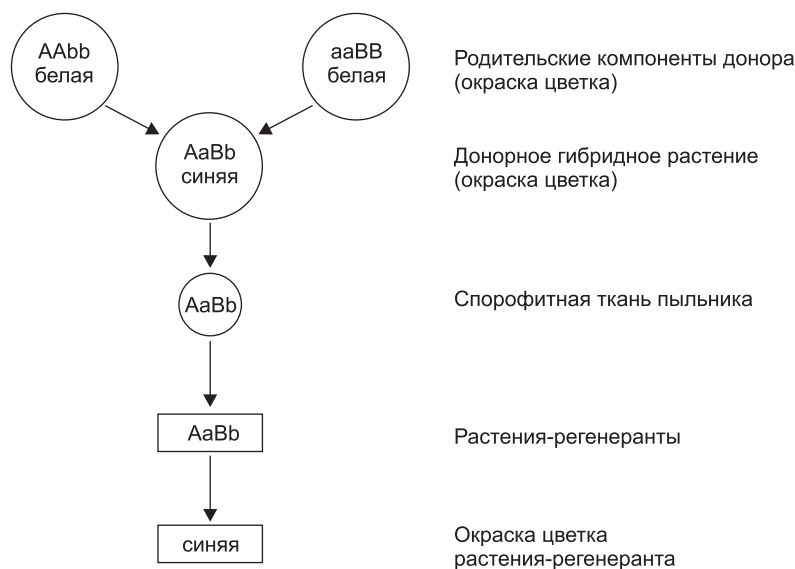


Рис. 1. Схема образования растений-регенерантов из гаплоидных клеток при культивировании пыльников гибрида льна M12 × M24.



**Рис. 2.** Схема образования растений-регенерантов из диплоидных клеток при культивировании пыльников гибрида льна M12 × M24.

Популяция № 2 состояла лишь из синецветковых растений, как это видно из таблицы. Отсутствие расщепления по окраске цветка среди растений-регенерантов говорило о том, что источником их происхождения были диплоидные клетки пыльников (рис. 2).

Необходимо отметить, что часть растений-регенерантов в популяциях № 1 обоих гибридов имела синюю окраску цветка, т. е. была фенотипически схожей с растениями из популяций № 2. Это может наводить на мысль, что данные растения образовались из диплоидных, а не гаплоидных клеток пыльников гибридов. Однако, если в отношении синецветковых растений вероятность их диплоидного происхождения нельзя полностью отрицать, то что касается растений с белой окраской цветка, природа клеток, из которых они инициированы, не вызывает сомнений. В нашем случае в популяциях № 1 гибридов МР485 × Авангард и М12 × М24 соответственно 50 и 75 % растений однозначно происходят из микроспор, а не диплоидных клеток тканей пыльника.

В том случае, если плоидность клетки, давшей начало растению-регенеранту, вызывает сомнение, в нашем примере это синецветковые растения, окончательный вывод может быть сделан по анализу расщепления по маркерному признаку среди потомков этого растения в следующем поколении. При наличии расщепления

растения имеют диплоидную природу происхождения, а при его отсутствии – гаплоидную.

Таким образом, предлагаемый нами подход позволяет с достаточно высокой вероятностью диагностировать происхождение растений-регенерантов в культуре *in vitro*. Очевидно, он может быть применим при культивировании не только пыльников, но и семян, а также на любом виде растений, у которых эти структуры используются для получения удвоенных гаплоидов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Давыдова Н.Н. Усовершенствование метода культуры пыльников для использования в селекционном процессе капусты (*Brassica oleracea* L.): Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. М.: Всерос. науч.-исслед. ин-т овощеводства Россельхозакадемии, 2008. 25 с.
- Котлярова О.В. Усовершенствование элементов технологии получения регенерантов для создания удвоенных гаплоидов моркови (*Daucus carota* L.): Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. М.: Всерос. науч.-исслед. ин-т овощеводства Россельхозакадемии, 2010. 26 с.
- Лях В.А., Сорока А.И. Ботанические и цитогенетические особенности видов рода *Linum* L. и биотехнологические пути работы с ними. Запорожье: ЗНУ, 2008. 182 с.
- Малецкая Е.И., Юданова С.С., Малецкий С.И. Гаплоидия в апозиготических семенных потомствах сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Докл. АН. 2009. Т. 426. № 5. С. 710–713.
- Муравлев А.А., Кривошеева О.Г. Методические рекомендации по получению андроклиновых растений ярового рапса. М.: Россельхозакадемия, 1999. 23 с.

- Ницше В., Венцель Г. Гаплоиды в селекции растений. М.: Колос, 1980. 128 с.
- Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат, 1988. 271 с.
- Поляков А.В. Усовершенствование селекционного процесса льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) на основе использования биотехнологических методов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М.: Московская ордена Ленина и ордена Трудового Красного Знамени с.-х. академия им. К.А. Тимирязева, 1998. 50 с.
- Поляков А.В., Пролетова Н.В. Питательная среда для культивирования пыльников льна. Пат. № 2120741. Россия: Всерос. НИИ льна. Бюл. № 30. 1998.
- Сорока А.И. Дифференциация гаплоидных и дигаплоидных растений рапса на цитологическом и морфологическом уровнях // Цитология и генетика. 2013. № 2. С. 34–39.
- Aalders L.E. Monoploidy in cucumbers // J. Hered. 1958. V. 49. P. 41–44.
- Bergmann R., Friedt W. Haploidy and related biotechnological methods in linseed (*Linum usitatissimum* L.) // *In vitro* Haploid Production in Higher Plants / Eds S.M. Jain, S.K. Sopory, R.E. Veilleux. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Acad. Publ., 1997. P. 1–16.
- Bohanec B. Ploidy determination using flow cytometry // *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual* / Eds M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Acad. Publ., 2003. P. 397–403.
- Bouvier L., Chavagnat A., Zhang Y.X., Lespinasse Y. Using radiography to attempt to screen for haploid embryos in apple // *Sci. Hortic.* 1992. V. 52. P. 215–221.
- Claveria E., Garcia-Mas J., Dolcet-Sanjuan R. Optimization of cucumber doubled haploid. Line production using *in vitro* rescue of *in vivo* induced parthenogenic embryos // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 2005. V. 130. No. 4. P. 555–560.
- Griffiths A.J.F., Miller J.H., Suzuki D.T. *et al.* An Introduction to Genetic Analysis. 6th ed. N.Y.: W.H. Freeman and Co., 1996. 916 p.
- Kita K., Shigematsu Y., Yakushiji H. Triploid and haploid seedlings obtained from small seeds of lemon // *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 2001. V. 70. P. 121.
- Lotfi M., Salehi S. Detection of cucumber parthenogenic haploid embryos by floating the immature seeds in liquid medium // *Proc. of the IXth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae* / Ed. M. Pitrat. Avignon, France: INRA, 2008. P. 375–379.
- Qin X., Rotino G.L. Chloroplast number in guard cells as ploidy indicator of *in vitro*-grown androgenic pepper plantlets // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 1995. V. 41. No. 2. P. 145–149.
- Rajender Rao K., Vaidyanath K. Biotechnology and improvement of sesamum // *Plant Tissue Culture and Biotechnology – Emerging Trends* / Ed. P.B. Kavi Kishor. Hyderabad, India: University Press/Orient Logman Ltd, 1999. P. 37–46.

## DETERMINATION OF THE ORIGIN OF REGENERATED FLAX PLANTS IN ANTHER CULTURE

A.I. Soroka<sup>1</sup>, V.A. Lyakh<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Oilseed Crops, National Academy of Agricultural Sciences of Ukraine, Zaporozhye, Ukraine, e-mail: bvryffy@hotmail.com;

<sup>2</sup> Zaporozhye National University, Zaporozhye, Ukraine, e-mail: genetika@znu.edu.ua

### Summary

The possibility to diagnose the ploidy of cells producing regenerated plants *in vitro* in anther culture has been studied. It is shown by the example of oil flax that population analysis of regenerated plants for segregation on the basis of a marker trait with a simple genetic control can serve as such a method. When microspores are the source of regenerants, segregation of regenerants for a marker that coincides with the segregation at the gamete level is observed. If sporophytic tissues are the source for regenerated plants, there is no segregation. The proposed approach can be applied not only to anther cultures but also to ovule cultures, as well as to any plant species where relevant structures are used to obtain doubled haploids.

**Key words:** ploidy, anther culture, doubled haploid, segregation, marker trait, oil flax.

УДК 58(470.57)

## ПИОНЫ. ДОСТИЖЕНИЯ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ СЕЛЕКЦИОНЕРОВ

© 2013 г. Л.Н. Миронова, А.А. Реут

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический сад-институт  
Уфимского научного центра Российской академии наук,  
Республика Башкортостан, Уфа, Россия, e-mail: cvetok.79@mail.ru

Поступила в редакцию 4 апреля 2013 г. Принята к публикации 28 апреля 2013 г.

В статье приводятся достижения отечественных селекционеров-пионоводов. Описываются основные этапы селекции. Даются краткие результаты селекционной работы с пионами в Ботаническом саду Уфимского научного центра РАН за 60 лет. Приводятся характеристики сортов пиона гибридного.

**Ключевые слова:** пион гибридный, свободное опыление, искусственная гибридизация, история селекции, новые сорта.

В России пион всегда пользовался неизменной популярностью, и сейчас на территории РФ выращивается более 1 тыс. сортов. Известно, что до середины прошлого века селекционная работа с пионами в России не проводилась. Началась она только в послевоенное время, когда осуществился сбор коллекций лучших зарубежных сортов (Дрягина, Кудрявец, 1986).

Отечественных сортов пиона очень мало. К началу XXI в. в регистре пионов их насчитывалось не более 200 (Павлова, 2010). С одной стороны, это объясняется биологическими особенностями пионов (долгий период прорастания семян, цветение сеянцев начинается только на 5–8-й год жизни). С другой стороны, местные селекционеры недостаточно занимались выведением новых сортов этих замечательных растений (Малышева, 1975).

Первые древовидные пионы были завезены в Россию в 1863 г. в Ботанический сад Санкт-Петербурга, где в течение 80 лет их выращивали в горшечной культуре в холодных оранжереях, и только в 1939 г. перенесли в открытый грунт (Каталог ..., 2010). Именно в это время в парке Ботанического института им. В.Л. Комарова А.А. Князевым были начаты опыты по проращиванию семян пиона полукустарникового, собранных с маточных растений местной репродукции. После войны А.А. Князев получил

первые сорта: Белые ночи, Юность, Андрей Князев. Данные культивары отличались морозостойкостью, так что укрытие на зиму не требовалось (Павлова, 2010).

В Ботаническом саду МГУ работа с древовидными пионами была начата в начале 1950-х годов под руководством А.А. Сосновец и В.Ф. Фомичевой, в результате чего было получено несколько перспективных сеянцев (Успенская, 1992). Основными методами селекционной работы с древовидными пионами были следующие: использование диких видов, несущих ген устойчивости к холоду; посев семян от свободно опыляемых интродуцированных растений для получения неоднородной культурной популяции. Слабые больные сеянцы первого поколения выбраковывали. Семена, полученные от жизнеспособных сеянцев, подвергали воздействию различных доз облучения и обрабатывали химическими мутагенами. Сеянцы второго поколения тщательно отбирали по нескольким параметрам: устойчивости к холоду, засухе, грибным заболеваниям, а также по декоративным качествам (Каталог ..., 2010). В настоящее время работу с пионами продолжает М.С. Успенская, создавшая ряд интересных сортов пиона древовидного с цветками различной формы (простые, полумахровые, махровые) и разнообразной окраски (от чисто-белой до



пурпурно-красной): Август, Ирина, Марианна, Стефан, Анастасия Сосновец, Петр Великий, Любовь и др. В результате за 30 лет ею было выделено 17 гибридов, которые занесены в Каталог сортов, допущенных к использованию в Российской Федерации (Успенская, 2000). В 2010–2011 гг. еще на 13 сортов пиона древовидного (Баттерфляй, Бригантина, ЗБС 100, Владимир Маяковский, Дмитрий Капинос, Ломоносов и др.) были получены патенты и авторские свидетельства.

В Никитском ботаническом саду с 1958 г. также проводились работы по изучению сеянцев древовидных пионов, полученных от внутривидовых и межвидовых скрещиваний. Исходными формами служили пионы полукустарниковый и желтый. Всего получено более 200 сеянцев. В результате были отобраны ценные сорта (Героям Аджимушкая, Ялтинская весна, Лебединое озеро) и формы, заслуживающие внимания садоводов (Клименко, 1972).

Кроме селекционной работы с древовидными пионами, в нашей стране велись исследования с использованием травянистых пионов. Так, с 1949 г. в Главном ботаническом саду РАН Н.С. Красновой были начаты работы по отдаленной гибридизации травянистых пионов. Основными задачами данного селекционного процесса являлись: получение куста компактной формы с крепкими, прямостоячими стеблями и высокодекоративными качествами самого цветка, создание срезочных сортов с длиной цветоноса 35–40 см и получение пионов как ранних, так и поздних сроков цветения (Дьякова, 2012). В дальнейшем эти работы продолжены Е.С. Голубинской. В результате были получены 33 сорта: Алеша Попович, Аркадий Гайдар, Памяти академика Цицина, Варенька, Вальс, Первенец, Снегурочка, Первый букет, Весенний, Мираж, Москвич, Памяти Гагарина и др.

В Ботаническом саду Московского государственного университета с 1951 г. А.А. Сосновец и В.Ф. Фомичевой проводилась селекционная работа по выведению новых отечественных сортов с длительным периодом цветения и оригинальной окраской цветков, приспособленных к почвенно-климатическим условиям Москвы (Фомичева, 1968, 1973; Малышева, 1975). В своей работе с пионами они использовали свободное опыление, межсортовое и

межвидовое скрещивание наиболее декоративных сортов и видов. Итогом работы стали 23 сорта А.А. Сосновец (среди них Айсберг, Академик Курчатов, Арктика, Белый парус, Богатырь, Вечерняя Москва, Весна, Золушка, Крейсер Аврора, Космос, Яблочкина) и 6 сортов В. Ф. Фомичевой (Факел, Орленок, Памяти космонавтов, Находка, Марсианин, Сольвейг) (Капинос, 1987). Продолжила селекционную работу с травянистым пионом в Ботаническом саду МГУ М.С. Успенская. Так, в 1996 г. ею был создан сорт Иван Горожанкин, в 2006 г. – сорта Зарница, Звездочка, Китайский фонарик, Нежность и Огонек, в 2008 г. – сорта Александра, Михаил Ломоносов, Очарование Ольги.

В ГНУ НИИ садоводства Сибири имени М.А. Лисавенко селекцией пионов занималась З.И. Лучник. Ей удалось получить гибриды от скрещивания пиона молочнокветкового и пиона марьин корень. В результате она вывела 3 сорта пиона: Алтайский ранний, Привет Алтая и Новость Алтая. Последний сорт признан гордостью отечественной селекции (Павлова, 2010). В 2001 г. на базе данного института были получены еще 6 новых сортов пиона: Алтайская зорька, Вдохновение, Верочка, Очарование, Памяти Влада и Утренний рассвет.

В ФГУП Новосибирская зональная станция садоводства РАСХН селекционная работа с пионом травянистым ведется с 1976 г. Селекция направлена на получение высокопродуктивных форм с ярким, чистым по тону цветком, хорошо раскрывающимся бутонем, неполегающим стеблем, раннего и позднего сроков цветения. Т.М. Назаровой и Г.А. Разумовой получены сорта: Белый новосибирский, Красный шар, Мечта, Глобус, Памяти Назаровой, Сиреневый туман, Сибирский сувенир и др. (Разумова, 2003).

В Ботаническом саду-институте Дальневосточного отделения РАН также уделяют большое внимание интродукции и селекции пионов. Начало коллекции травянистых пионов было положено старейшим сотрудником сада А.С. Прошиной. Получая многочисленные сорта из ботанических садов Советского Союза, она апробировала их в условиях муссонного климата. Дальнейшие исследования по интродукции травянистых пионов там же проводила Н.В. Македонская. С 1981 г. интродукцией и селекцией травянистых пионов занимается Л.Н. Миронова

(Миронова, 2006). Ею получены сорта Шахтерский огонек и Японские мотивы.

В нашей стране по-прежнему популярны сорта оригинаторов из учреждений стран ближнего зарубежья. В Центральном республиканском ботаническом саду Украины была создана целая коллекция новых перспективных сортов селекционерами Е.Д. Харченко (21 сорт – Антарктида, Буревестник, Парковый, Дар Победе, Казачок, Любимец парков, Находка, Талисман и др.) и В.Ф. Горобцом (10 сортов – Антей, Дукат, Офелия, Свиточ, Ясочка и др.) (Капинос, 1987). В Ботаническом саду Института ботаники АН Литвы селекционную работу с пионами вела О.И. Скейвене. Ею созданы такие сорта, как Виргилиус, Профессор К. Грибаускас, Дариус Геренас и др. (Успенская, 2002). В Ботаническом саду Киргизской Республики также получены высокодекоративные сорта – Рубин, Асель, Рассвет и др. (Кривошеева, 1983).

Немало интересных сортов травянистых пионов было выведено пионоводами-любителями: С.Д. Куполяном (Галина Уланова, Победа), Т.И. Фоминой (Пена, Снежный шар, Белоснежка, Жемчужина, Черноморская чайка), А.Г. Марковым (Бабочки, Память о Георгии), Н.М. Виноградовым (Премьера), А.К. Колпаковым (МЭИ), Н.Д. Ерохиным и др. (Ерохин, 1972; Капинос, 1987; Успенская, 2002). Большой вклад внес также М.И. Акимов – селекционер-любитель. Он создал более 60 сортов (Амур, Бородино, Игрушка, Муза, Садко, Слава, Снежок, Лада, Лагуна, Россия, Надежда, Дядя Ваня, Валентина Терешкова и др.). В Казахстане пионовод-любитель А.А. Скакодуб создал более десятка интересных сортов (Адмирал, Сахалин, Светлана Седова, Алма-Ата и др.). К сожалению, они у нас практически неизвестны. С 1958 г. и по сей день над созданием сортов работает замечательный талантливый селекционер-любитель В.М. Дубров. Многие его сорта пользуются популярностью у цветоводов, отмечены в различных номинациях на московских выставках пионов (Курильские острова, Светлана Удинцева, Мамино сердечко, Акварель, Вечно живые и др.) (Павлова, 2010).

Необходимо отметить, что отечественные сорта ничем не уступают представителям зарубежной селекции: они более устойчивы к болезням и неблагоприятным погодным условиям, быстрее растут и развиваются.

В Башкирии с 1955 г. селекцией пионов занималась О.А. Кравченко. Целью ее работы являлось создание отечественных сортов, более приспособленных к местным условиям, с крупными махровыми цветками оригинальной формы и окраски. Для этого была собрана большая коллекция видов и сортов с различной формой и окраской цветка (18 видов дикорастущих и 32 сорта культурных пионов). Для О.А. Кравченко очень важно было установить особенности каждого используемого для селекции образца, поэтому у всех исходных форм тщательно изучалась их биология, велись наблюдения за их ростом и развитием, оценивались декоративные качества, семенная продуктивность и особенности репродуктивных органов (Кравченко, 1969; Башкирский ботанический сад ..., 2002).

С использованием методов свободного опыления и искусственной гибридизации (межвидовой и межсортовой) ею создан большой гибридный фонд (более 800 сеянцев), из которого в 1965 г. республиканской экспертной комиссией было выделено 25 гибридов – кандидатов в новые сорта. В 1969 г. было отобрано еще 25 перспективных гибридных сеянцев. В 1970–1972 гг. часть гибридов передана на Государственное сортоиспытание (Кравченко, 1967).

О.А. Кравченко были изучены некоторые особенности наследования основных признаков дикорастущих и сортовых пионов. Выявлено, что наибольший интерес для дальнейшей селекционной работы представляет скрещивание лучших сортов пиона китайского или их гибридных сеянцев первого поколения с дикорастущими видами (Кравченко, 1978). В 1970 г. в связи с уходом О.А. Кравченко на пенсию коллекция была передана Л.С. Новиковой. Ею была продолжена работа по пополнению и изучению гибридного фонда пионов, а также по размножению и передаче на сортоиспытание сеянцев – кандидатов в сорта (Выращивание ..., 1978).

В 1974 г. 11 гибридных сеянцев были представлены Государственной экспертной комиссии ВДНХ СССР, из которых 4 получили высокую оценку и переданы на Госсортоиспытание. Сеянцам «Аппассионата» и «Юбилей революции» был присвоен статус сорта. С 1986 г. они районированы по РСФСР. В 1988 г. еще 5 гибридов пиона получили высокую первичную оценку на ВДНХ СССР и в 1992 г. переданы на

Государственное испытание. В 1998 г. статус сорта был присвоен сеянцам «Южный Урал», «Утро родины», «Надежда» и «Ветеран» (Миронова и др., 2006).

В 1999 г. селекционная работа по пионам была продолжена Л.Н. Мироновой и Л.А. Тухватуллиной, а с 2003 г. – А.А. Реут. Для пополнения фонда гибридных сеянцев были собраны и высеяны в открытый грунт семена от свободного опыления 12 сортов: Адольф Руссо, Атросамгиома, Мэри Вудбери Шейлор, Розеа Элеганс, Карл Розенфилд, Мсье Жюль Эли, Феликс Красс, Дюшесс де Немур, Фестива Максима, Нигриканс, Жанна д'Арк, Юбилей революции, а также от принудительного опыления 8 сортов: Мэри Вудбери Шейлор, Франсуа Ортега, Аппассионата, Аваланш, Жанна д'Арк, Феликс Красс, Юбилей революции, Мсье Жюль Эли. В результате было выращено традиционным методом (посев семян в открытый грунт) 507 сеянцев от принудительного опыления и 586 – от свободного опыления (Реут, Миронова, 2012б). В 2005–2007 гг. они достигли генеративной фазы развития и были оценены по 57 признакам, согласно методике проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность, разработанной Государственной комиссией РФ по испытанию и охране селекционных достижений (Методика проведения испытаний ..., 2003). В настоящее время выделено 219 гибридов с крупными и средними по размеру цветками розовидной, корончатой, шаровидной, анемоновидной и японской формами; красной, розовой, кремовой и белой окраской, а также промежуточных тонов. 17 особенно интересных сеянцев, выделяющихся по декоративным признакам, были переданы для дальнейшего изучения в Государственную комиссию РФ по испытанию и охране селекционных достижений. В 2008 г. они получили статус сорта и были занесены в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию (Миронова, Реут, 2012). Это сорта Аврора, Аркаим, Ирмель, Людмила Миронова, Мечта С.П. Королева, Мустай Карим, Ольга Кравченко, Песня Курая, Полярник-8, Рудольф Нуреев, Сабантуй, Сашенька, Торнадо, Урал Батыр, Уфимец, Чак-Чак, Чингиз-Хан. В 2011 г. еще 8 сортов были переданы на Госсортоиспытание (Июнь, Утро туманное, Башкирский, Сережа, Уралец, Огни Уфы, Розовая дымка, Салават). В

2013 г. на них получены авторские свидетельства и патенты. Все новые сорта устойчивы к неблагоприятным погодным условиям, болезням и вредителям, зимостойки, засухоустойчивы и жаровыносливы. Рекомендуются для выращивания в средней полосе России (Реут, Миронова, 2012а). Ниже приводятся характеристики сортов пиона гибридного селекции Ботанического сада-института УНЦ РАН.

**Аврора** (авторы: Л.Н. Миронова, Л.А. Тухватуллина, А.А. Реут; А.с. № 49818). Куст высотой 55 см, диаметром 50 см, прямостоячий, сомкнутый, со средней облиственностью. Цветоносы длиной 70 см, прямые, прочные, по 4 цветка на цветоносе. Цветки махровые, полушаровидной формы, диаметром 14 см, светло-розовые. Тычиночные нити желтые, рыльце розовое. Аромат средний. Цветок слабо выгорает. Цветение позднего срока, обильное, продолжительностью 12 дней.

**Аппассионата** (авторы: О.А. Кравченко, Л.С. Новикова; А.с. № 4290). Куст высотой 65 см, диаметром 70 см, прямостоячий, полураскидистый, со средней облиственностью. Цветоносы длиной 80 см, прямые, прочные, по 3 цветка на цветоносе. Цветки махровые, розовидной формы, диаметром 15 см, алые. Тычиночные нити желтые, рыльце розовое. Аромат сильный. Цветок слабо выгорает. Цветение среднераннего срока, обильное, продолжительностью 12 дней.

**Аркаим** (авторы: Л.Н. Миронова, Л.А. Тухватуллина, А.А. Реут; А.с. № 49816). Куст высотой 65 см, диаметром 50 см, прямостоячий, компактный, со средней облиственностью. Цветоносы длиной 85 см, прямые, прочные, по 3 цветка на цветоносе. Цветки махровые, полушаровидной формы, диаметром 15 см, розовые. Рыльце малиновое. Аромат средний. Цветок слабо выгорает. Цветение позднего срока, обильное, продолжительностью 11 дней.

**Башкирский** (авторы: О.А. Кравченко, Л.Н. Миронова, Л.С. Новикова, А.А. Реут; А.с. № 57142). Куст высотой 70 см, диаметром 70 см, прямостоячий, полураскидистый, со средней облиственностью. Цветоносы длиной 90 см, прямые, прочные, по 4 цветка на цветоносе. Цветки махровые, розовидной формы, диаметром 14 см, розовые. Аромат средний. Цветок слабо выгорает. Цветение среднепозднего срока, продолжительностью 12 дней.

**Ветеран** (автор: Л.С. Новикова; А.с. №25896). Куст высотой 90 см, диаметром 80 см, прямостоячий, полураскидистый, с сильной облиственностью. Цветоносы длиной 90 см, прямые, средней прочности, по 2 цветка на цветоносе. Цветки махровые, розовидной формы, диаметром 14 см, розовые. Аромат средний. Цветок не выгорает. Цветение среднепозднего срока, обильное, продолжительностью 10 дней.

**Иремель** (авторы: Л.Н. Миронова, Л.А. Тухватуллина, А.А. Реут; А.с. № 49814). Куст высотой 65 см, диаметром 50 см, прямостоячий, полураскидистый, с сильной облиственностью. Цветоносы длиной 75 см, прямые, средней прочности, по 4 цветка на цветоносе. Цветки махровые, шаровидной формы, диаметром 16 см, ярко-розовые. Аромат средний. Цветок слабо выгорает. Цветение позднего срока, обильное, продолжительностью 12 дней.

**Июнь** (авторы: О.А. Кравченко, Л.Н. Миронова, Л.С. Новикова, А.А. Реут; А.с. № 57136). Куст высотой 45 см, диаметром 70 см, прямостоячий, полураскидистый, со средней облиственностью. Цветоносы длиной 60 см, прямые, слабые, по 2 цветка на цветоносе. Цветки махровые, полушаровидной формы, диаметром 16 см, белые. Рыльце белое. Аромат слабый. Цветок не выгорает. Цветение среднего срока, обильное, продолжительностью 13 дней.

**Людмила Миронова** (авторы: Л.Н. Миронова, Л.А. Тухватуллина, А.А. Реут; А.с. № 47876). Куст высотой 65 см, диаметром 80 см, прямостоячий, полураскидистый, со средней облиственностью. Цветоносы длиной 75 см, прямые, средней прочности, по 4 цветка на цветоносе. Цветки махровые, шаровидной формы, диаметром 17 см, темно-карминово-розовые. Тычиночные нити желтые. Аромат средний. Цветок слабо выгорает. Цветение среднего срока, обильное, продолжительностью 14 дней.

**Мечта С.П. Королева** (авторы: О.А. Кравченко, Л.Н. Миронова, А.А. Реут; А.с. № 47872). Куст высотой 60 см, диаметром 100 см, прямостоячий, полураскидистый, с сильной облиственностью. Цветоносы длиной 85 см, прямые, средней прочности, по 2 цветка на цветоносе. Цветки японского типа, двухрядные, диаметром 14 см, вишневые. Рыльце малиновое. Аромат слабый. Цветок не выгорает. Цветение среднего срока, обильное, продолжительностью 13 дней.

**Мустай Карим** (авторы: О.А. Кравченко, Л.Н. Миронова, Л.А. Тухватуллина; А.с. №47874). Куст высотой 70 см, диаметром 85 см, прямостоячий, полураскидистый, со средней облиственностью. Цветоносы длиной 90 см, прямые, средней прочности, по 2 цветка на цветоносе. Цветки махровые, шаровидные, диаметром 15 см, перламутрово-розовые. Тычиночные нити желтые, рыльце розовое. Аромат средний. Цветок слабо выгорает. Цветение среднего срока, обильное, продолжительностью 14 дней.

**Надежда** (автор: Л.С. Новикова; А.с. №25897). Куст высотой 60 см, диаметром 90 см, прямостоячий, полураскидистый, с сильной облиственностью. Цветоносы длиной 75 см, прямые, прочные, по 4 цветка на цветоносе. Цветки махровые, розовидной формы, диаметром 15 см, светло-розовые. Аромат средний. Цветок слабо выгорает. Цветение среднепозднего срока, обильное, продолжительностью 10 дней.

**Огни Уфы** (авторы: О.А. Кравченко, Л.Н. Миронова, Л.С. Новикова, А.А. Реут; А.с. № 57140). Куст высотой 60 см, диаметром 70 см, прямостоячий, сомкнутый, со слабой облиственностью. Цветоносы длиной 80 см, прямые, прочные, по 4 цветка на цветоносе. Цветки махровые, розовидные, диаметром 15 см, сиренево-розовые. Тычиночные нити желтые, рыльце розовое. Аромат средний. Цветок не выгорает. Цветение среднего срока, обильное, продолжительностью 12 дней.

**Ольга Кравченко** (авторы: О.А. Кравченко, Л.Н. Миронова, Л.А. Тухватуллина; А.с. № 47878). Куст высотой 60 см, диаметром 90 см, прямостоячий, полураскидистый, со средней облиственностью. Цветоносы длиной 65 см, прямые, средней прочности, по 3 цветка на цветоносе. Цветки махровые, полушаровидные, диаметром 16 см, кораллово-розовые. Аромат средний. Цветок слабо выгорает. Цветение позднего срока, обильное, продолжительностью 12 дней.

**Песня Курая** (авторы: Л.Н. Миронова, Л.А. Тухватуллина, А.А. Реут; А.с. № 49810). Куст высотой 55 см, диаметром 50 см, прямостоячий, сомкнутый, со средней облиственностью. Цветоносы длиной 70 см, прямые, прочные, по 3 цветка на цветоносе. Цветки махровые, розовидной формы, диаметром 13 см, розовые. Тычиночные нити желтые, рыльце малиновое.



Аромат средний. Цветок слабо выгорает. Цветение позднего срока, обильное, продолжительностью 12 дней.

**Полярник-8** (авторы: О.А. Кравченко, Л.Н. Миронова, А.А. Реут; А.с. № 47864). Куст высотой 70 см, диаметром 110 см, прямостоячий, полураскидистый, с сильной облиственностью. Цветоносы длиной 80 см, прямые, средней прочности с одним цветком. Цветки махровые, шаровидные, диаметром 14 см, белые. Тычиночные нити желтые, рыльце розовое. Аромат слабый. Цветок не выгорает. Цветение среднего срока, обильное, продолжительностью 12 дней.

**Розовая дымка** (авторы: О.А. Кравченко, Л.Н. Миронова, Л.С. Новикова, А.А. Реут; А.с. № 57138). Куст высотой 50 см, диаметром 70 см, прямостоячий, полураскидистый, со слабой облиственностью. Цветоносы длиной 75 см, прямые, средней прочности, по 3 цветка на цветоносе. Цветки махровые, розовидные, диаметром 14 см, белые. Аромат сильный. Цветок не выгорает. Цветение среднепозднего срока, обильное, продолжительностью 13 дней.

**Рудольф Нурев** (авторы: Л.Н. Миронова, Л.А. Тухватуллина, А.А. Реут; А.с. № 49812). Куст высотой 75 см, диаметром 60 см, прямостоячий, полураскидистый, со слабой облиственностью. Цветоносы длиной 95 см, прямые, средней прочности, по 3 цветка на цветоносе. Цветки махровые, шаровидной формы, диаметром 17 см, насыщенно лилово-розовые. Аромат средний. Цветок слабо выгорает. Цветение позднего срока, обильное, продолжительностью 15 дней.

**Сабантуй** (авторы: О.А. Кравченко, Л.Н. Миронова, А.А. Реут; А.с. № 47870). Куст высотой 90 см, диаметром 100 см, прямостоячий, полураскидистый, со слабой облиственностью. Цветоносы длиной 100 см, прямые, прочные, по 3 цветка на цветоносе. Цветки японского типа, двухрядные, диаметром 13 см, розовые. Рыльце розовое. Аромат слабый. Цветок слабо выгорает. Цветение среднего срока, обильное, продолжительностью 12 дней.

**Салават** (авторы: О.А. Кравченко, Л.Н. Миронова, Л.С. Новикова, А.А. Реут; А.с. № 57130). Куст высотой 60 см, диаметром 65 см, прямостоячий, сомкнутый, со слабой облиственностью. Цветоносы длиной 80 см, прямые, очень

прочные, по 3 цветка на цветоносе. Цветки махровые, бомбовидные, диаметром 13 см, бело-розовые. Аромат средний. Цветок не выгорает. Цветение среднего срока, обильное, продолжительностью 11 дней.

**Сашенька** (авторы: Л.Н. Миронова, Л.А. Тухватуллина, А.А. Реут; А.с. № 49808). Куст высотой 75 см, диаметром 55 см, прямостоячий, полураскидистый, со средней облиственностью. Цветоносы длиной 90 см, прямые, слабые, по 2 цветка на цветоносе. Цветки махровые, шаровидной формы, диаметром 15 см, нежно-розовые, к краю лепестка светлее. Аромат средний. Цветок не выгорает. Цветение позднего срока, обильное, продолжительностью 14 дней.

**Сережа** (авторы: О.А. Кравченко, Л.Н. Миронова, Л.С. Новикова, А.А. Реут; А.с. № 57134). Куст высотой 65 см, диаметром 70 см, прямостоячий, сомкнутый, со средней облиственностью. Цветоносы длиной 75 см, прямые, прочные, по 3 цветка на цветоносе. Цветки махровые, розовидные, диаметром 14 см, бело-розовые. Аромат слабый. Цветок не выгорает. Цветение средне-позднего срока, обильное, продолжительностью 12 дней.

**Торнадо** (авторы: О.А. Кравченко, Л.Н. Миронова, А.А. Реут; А.с. № 47860). Куст высотой 65 см, диаметром 60 см, прямостоячий, сомкнутый, со слабой облиственностью. Цветоносы длиной 90 см, прямые, прочные с одним цветком. Цветки махровые, бомбовидные, диаметром 11 см, бордовые. Тычиночные нити желтые, рыльце малиновое. Аромат слабый. Цветок не выгорает. Цветение позднего срока, продолжительностью 10 дней.

**Урал батыр** (авторы: О.А. Кравченко, Л.Н. Миронова, А.А. Реут; А.с. № 47862). Куст высотой 70 см, диаметром 80 см, прямостоячий, полураскидистый, с сильной облиственностью. Цветоносы длиной 80 см, прямые, прочные, по 2 цветка на цветоносе. Цветки махровые, шаровидные, диаметром 13 см, розовые. Рыльце розовое. Аромат средний. Цветок слабо выгорает. Цветение позднего срока, обильное, продолжительностью 12 дней.

**Уралец** (авторы: О.А. Кравченко, Л.Н. Миронова, Л.С. Новикова, А.А. Реут; А.с. № 57132). Куст высотой 50 см, диаметром 60 см, прямостоячий, сомкнутый, с сильной облиственностью. Цветоносы длиной 70 см, прямые, прочные,



Сашенька



Аврора



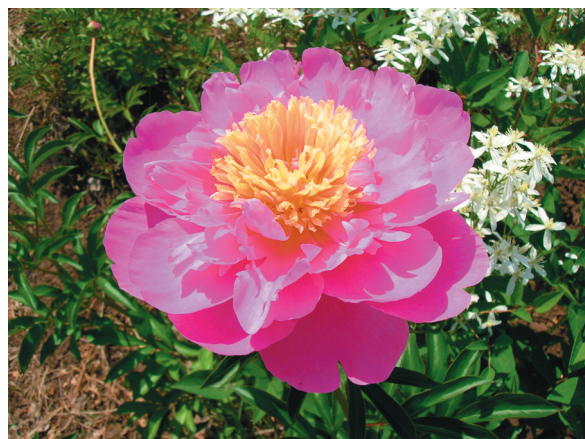
Мечта С.П. Королева



Надежда



Ольга Кравченко



Сабантуй





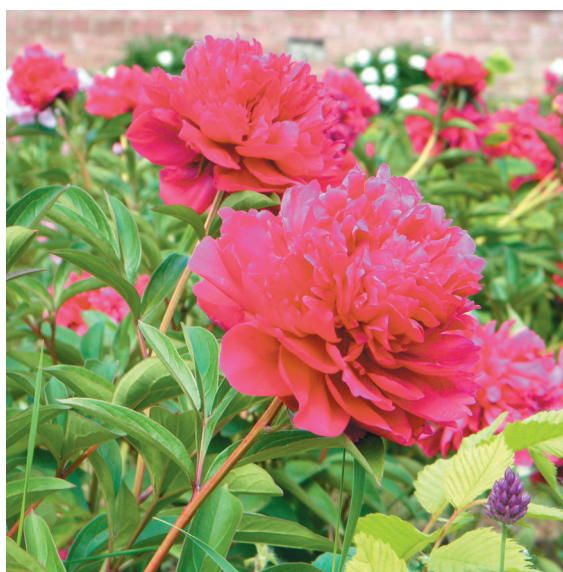
Людмила Миронова



Уфимец



Торнадо



Юбилей революции

по 2 цветка на цветоносе. Цветки махровые, розовидные, диаметром 16 см, серебристо-розовые. Аромат слабый. Цветок слабо выгорает. Цветение средне-позднего срока, обильное, продолжительностью 10 дней.

**Утро родины** (автор: Л.С. Новикова; А.с. № 25898). Куст высотой 65 см, диаметром 95 см, прямостоячий, полураскидистый, со средней облиственностью. Цветоносы длиной 65 см, прямые, средней прочности, по 3 цветка на цветоносе. Цветки махровые, розовидной формы, диаметром 14 см, светло-розовые. Аромат средний. Цветок слабо выгорает. Цветение среднепозднего срока, обильное, продолжительностью 12 дней.

**Утро туманное** (авторы: О.А. Кравченко, Л.Н. Миронова, Л.С. Новикова, А.А. Реут; А.с. № 57128). Куст высотой 55 см, диаметром 90 см, прямостоячий, полураскидистый, с сильной облиственностью. Цветоносы длиной 80 см, прямые, слабые, по 4 цветка на цветоносе. Цветки махровые, шаровидные, диаметром 16 см, бело-розовые. Рыльце розовое. Аромат слабый. Цветок не выгорает. Цветение поздне-среднего срока, обильное, продолжительностью 12 дней.

**Уфимец** (авторы: О.А. Кравченко, Л.Н. Миронова, А.А. Реут; А.с. № 47868). Куст высотой 60 см, диаметром 95 см, прямостоячий, полураскидистый, со слабой облиственностью. Цветоносы длиной 70 см, прямые, прочные с одним цветком. Цветки полумахровые, диаметром 14 см, розовые. Тычиночные нити желтые, рыльце белое. Аромат средний. Цветок слабо выгорает. Цветение среднего срока, обильное, продолжительностью 12 дней.

**Чак-чак** (авторы: О.А. Кравченко, Л.Н. Миронова, А.А. Реут; А.с. № 47880). Куст высотой 60 см, диаметром 70 см, прямостоячий, сомкнутый, со средней облиственностью. Цветоносы длиной 85 см, прямые, прочные, по 2 цветка на цветоносе. Цветки японского типа, двухрядные, диаметром 12 см, розовые, центральные лепестки желтые. Рыльце розовое. Аромат средний. Цветок слабо выгорает. Цветение среднего срока, обильное, продолжительностью 11 дней.

**Чингиз-хан** (авторы: О.А. Кравченко, Л.Н. Миронова, А.А. Реут; А.с. № 47866). Куст высотой 70 см, диаметром 100 см, прямостоячий, сомкнутый, со средней облиственностью.

Цветоносы длиной 85 см, прямые, прочные, по 2 цветка на цветоносе. Цветки полумахровые, диаметром 13,5 см, вишневой окраски. Тычиночные нити желтые, рыльце малиновое. Аромат средний. Цветок не выгорает. Цветение среднего срока, обильное, продолжительностью 11 дней.

**Юбилей революции** (авторы: О.А. Кравченко, Л.С. Новикова; А.с. № 4292). Куст высотой 70 см, диаметром 65 см, прямостоячий, сомкнутый, со средней облиственностью. Цветоносы длиной 80 см, прямые, прочные, по 2 цветка на цветоносе. Цветки махровые, шаровидной формы, диаметром 14 см, темно-вишневые. Тычиночные нити желтые, рыльце малиновое. Аромат средний. Цветок слабо выгорает. Цветение позднего срока, обильное, продолжительностью 12 дней.

**Южный Урал** (автор: Л.С. Новикова; А.с. № 25899). Куст высотой 80 см, диаметром 85 см, полураскидистый, со средней облиственностью. Цветоносы длиной 80 см, прямые, прочные, по 3 цветка на цветоносе. Цветки махровые, розовидной формы, диаметром 13 см, розовые. Рыльце малиновое. Аромат средний. Цветок слабо выгорает. Цветение позднего срока, обильное, продолжительностью 10 дней.

Благодаря вышеперечисленным показателям, новые сорта пиона гибридного можно использовать в городском озеленении для оформления клумб, групповых посадок, массивов, бордюров, рабаток, а также для срезки. При налаженном производстве посадочного материала сорта селекции БСИ займут достойное место среди декоративных травянистых культур, используемых в зеленом строительстве РФ.

## ЛИТЕРАТУРА

- Башкирский ботанический сад: История, коллекции, научные достижения: (К 70-летию образования) / Под ред. З.Х. Шигапова. Уфа: Информреклама, 2002. 128 с.
- Выращивание цветов. Уфа: Башк. кн. изд-во, 1978. С. 84–95.
- Дрягина И.В., Кудрявец Д.Б. Селекция и семеноводство цветочных культур. М.: Агропромиздат, 1986. 256 с.
- Дьякова Г. Отечественные пионы: история поражений и побед // Цветочный клуб. 2012. № 8. С. 20–23.
- Ерохин Н.Д. Приусадебное цветоводство. Ярославль: Верх.-Волж. кн. изд-во, 1972. 256 с.
- Капинос Д.Б. Любимцы греческих богов – пионы // При-



- усадебное хозяйство. 1987. № 3. С. 64–67.
- Каталог декоративных растений ботанического сада биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. М.: Тов-во науч. изданий КМК, 2010. С. 220–223.
- Клименко К.Т. Пионы в Никитском ботаническом саду // Тр. Гос. Никитского ботан. сада. 1972. Т. 59. С. 97–105.
- Кравченко О.А. Выведение отечественных сортов пионов в Ботаническом саду Института биологии // Науч. конф., посвящ. 50-летию Октября: Тез. докл. Уфа: БФАН СССР, 1967. С. 123–124.
- Кравченко О.А. Интродукция дикорастущих видов пиона в Ботаническом саду Башкирского филиала АН СССР // Науч. конф., посвящ. 50-летию Башкирской АССР: Реф. докл. Уфа: БФАН СССР, 1969. С. 135–137.
- Кравченко О.А. Селекция пионов в БФАН СССР // Интродукция и селекция декоративных растений в Башкирии: Сб. статей. Уфа: БФАН СССР, 1978. С. 36–52.
- Кривошеева Л.С. Культура пионов в Киргизии. Фрунзе: Изд-во «Илим», 1983. С. 22.
- Мальшева Р.М. Пионы в Томской области. Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1975. 117 с.
- Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность. Ботанический сад МГУ, 2003. 15 с.
- Миронова Л.Н. Эти роскошные пионы. Владивосток: БСИ ДВО РАН, 2006. 55 с.
- Миронова Л.Н., Воронцова А.А., Шипаева Г.В. Итоги интродукции и селекции декоративных травянистых растений в Республике Башкортостан. М.: Наука, 2006. Ч. 1. 211 с.
- Миронова Л.Н., Реут А.А. Пионы башкирской селекции // Цветоводство. 2012. № 3. С. 2–5.
- Павлова Л.А. Пионы. М.: ЗАО «Фитон+», 2010. 208 с.
- Разумова Г.А. Новые сорта пиона в Сибири // Проблемы устойчивого развития садоводства Сибири: Матер. науч.-практ. конф., посвящ. 70-летию НИИСС им. М.А. Лисавенко. Барнаул, 2003. С. 394–399.
- Реут А.А., Миронова Л.Н. Новые сорта пиона гибридного для средней полосы России // Изв. Уфим. науч. центра РАН. 2012а. № 3. С. 35–41.
- Реут А.А., Миронова Л.Н. Пионы. Биология и размножение. Saarbrücken, Germany: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012б. 200 с.
- Успенская М.С. Перспективы интродукции древовидных пионов // Эколого-ботанические аспекты интродукции растений в условиях Северного Кавказа. Краснодар: Изд-во КГАУ, 1992. С. 141–143.
- Успенская М.С. Пионы. М.: «Фитон +», 2002. 208 с.
- Успенская М.С. Селекция древовидных пионов // Цветоводство. 2000. № 3. С. 14–15.
- Фомичева В.Ф. Пион древовидный в Ботаническом саду Московского университета // Бюл. ГБС. 1968. Вып. 69. С. 102–104.
- Фомичева В.Ф. Гибридизация пионов // Прикладная ботаника и интродукция растений. М.: Наука, 1973. С. 94.

## PEONIES: ACHIEVEMENTS OF RUSSIAN BREEDERS

L.N. Mironova, A.A. Reut

Botanical Garden–Institute, Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Bashkortostan, Russia, e-mail: [cvetok.79@mail.ru](mailto:cvetok.79@mail.ru)

### Summary

Achievements of Russian peony breeders are presented. The main breeding stages are considered. The results of 60-year peony breeding in the Botanical Garden of the Ufa Research Center are outlined. Hybrid peony varieties are characterized.

**Key words:** hybrid peony, open pollination, artificial hybridization, breeding history, new varieties.

УДК 574.1:582.26

## ИССЛЕДОВАНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ПРОЦЕССАХ ПОЛУЧЕНИЯ БИОТОПЛИВА ТРЕТЬЕГО ПОКОЛЕНИЯ

© 2013 г. А.В. Пилигаев<sup>2</sup>, К.Н. Сорокина<sup>1,2</sup>, А.В. Брянская<sup>1</sup>,  
Е.А. Демидов<sup>1</sup>, Р.Г. Кукушкин<sup>2</sup>, Н.А. Колчанов<sup>1</sup>, В.Н. Пармон<sup>2</sup>, С.Е. Пельтек<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 26 сентября 2012 г. Принята к публикации 6 мая 2013 г.

Рассмотрены подходы к поиску новых источников непищевого возобновляемого сырья для получения биотоплива третьего поколения, а именно: штаммов микроводорослей, обитающих в природных экосистемах Западной Сибири. Исследование биоразнообразия данного региона представляет большой интерес в связи с широким ареалом обитания и малой изученностью свойств микроводорослей. В ходе работы был выделен ряд штаммов, один из которых, *Chlorella spp.* A1125, обладал необходимыми характеристиками для культивирования в пилотном фотобиореакторе, в том числе максимальной продуктивностью по липидам – 0,081 г/л (23 % от сухого веса клетки) при росте на минимальных средах. Штамм характеризуется высоким содержанием как насыщенных жирных кислот C16:0 (25 %), так и ненасыщенных C16:2 (16 %) и C18:2 (27 %), что делает его перспективным кандидатом для производства биотоплива третьего поколения.

**Ключевые слова:** микроводоросли, культивирование, возобновляемые ресурсы, липиды.

### ВВЕДЕНИЕ

Последнее десятилетие отмечено возрастанием интереса к разработке технологий, основанных на использовании возобновляемого сырья, в том числе для получения экологически безопасного моторного топлива. В зависимости от типа сырья, применяемого для производства, биотопливо подразделяется на три поколения. Наиболее широко распространенным является биотопливо первого поколения, для которого в качестве сырья используются сельскохозяйственные зерновые культуры. В частности сахарный тростник, кукуруза, пшеница используются для производства биоэтанола, в то время как масличные культуры, такие, как соя, рапс, масличная пальма, подсолнечник и другие используются для производства биодизельного топлива. На

сегодняшний день мировыми лидерами по производству биоэтанола являются Бразилия и США, а основная доля производимого биодизельного топлива сосредоточена в странах ЕС. Основным недостатком этих видов биотоплива является их возрастающая конкуренция с сельским хозяйством за источники растительного сырья и земельные ресурсы.

В производстве биотоплива второго поколения основную часть сырьевой базы составляет непищевая биомасса, а именно древесная масса (целлюлоза, лигнин), отходы деревопереработки и непищевые остатки культивируемых растений сельского хозяйства, а также менее ценное сырье (солома). Однако ввиду высокой энергозатратности процесса производства и низкого выхода целевого продукта в настоящее время в мире существует лишь несколько

предприятий, которые успешно производят биотопливо второго поколения.

Использование превосходящих по энергетической выгоде и более дешевых микроводорослей в качестве сырья для производства биотоплива положило начало созданию третьего поколения биотоплива. По сравнению с производством биотоплива первого и второго поколений производство микроводорослей является менее энергозатратным, а также не предполагает использования сельскохозяйственных земель. Кроме того, важными показателями эффективности использования микроводорослей являются их высокая скорость роста (в том числе круглогодичного), а также высокое содержание липидов в клетках (до 80 %), что превышает аналогичные показатели отдельных маслических культур (до 40 % у рапса), являющихся исходным сырьем для получения биодизельного топлива и бионефти. Таким образом, считается, что именно микроводоросли обладают значительным потенциалом для замены ископаемого энергетического сырья в будущем.

В связи с этим актуальным является поиск штаммов микроводорослей, являющихся источником биомассы, характеризующихся одновременно высокой продуктивностью, а также низкой ресурсо- и энергозатратностью при культивировании и переработке, с широким спектром получаемых продуктов. Особое внимание привлекает возможность изучения природного биоразнообразия фототрофных микроорганизмов, в том числе обитающих в экстремальных сообществах, например в условиях высоких или низких температур, повышенной солености. Метаболические особенности отдельных штаммов также позволят найти микроводоросли, не только обладающие необходимыми характеристиками (высокой продуктивностью по липидам и высокой скоростью роста), но также и требуемым составом липидов, например, содержащих пониженное количество ненасыщенных жирных кислот, что позволит получать на их основе биотопливо более высокого качества с высоким цетановым числом и сниженной способностью к окислению. Отдельные штаммы микроводорослей, помимо производства моторных топлив, также целесообразно применять в процессах получения пигментов, сахаров, витаминов и антибиотиков (Becker, 2004).

В настоящее время в мире существует более 50 тыс. видов микроводорослей, широко распространенных не только в водной, но и наземной среде обитания (Richmond, 2004). К настоящему времени идентифицировано лишь около 4000 видов, среди которых относительно легко выделяются в культуры лишь диатомовые и зеленые водоросли (Khan *et al.*, 2009). Западная Сибирь, обладая значительными водными ресурсами, представляет интерес для исследования биоразнообразия микроводорослей и поиска перспективных штаммов. Так, например, из 12 тыс. озер региона для большинства водоемов изучение флоры либо проводилось эпизодически, либо не проводилось вообще (Ткачев, 2001), в некоторых из них недавно были обнаружены новые и редкие виды и формы водорослей, например синезеленые (цианопрокариоты) (Романов, 2008). Т.А. Сафоновой с соавт. (Сафонова, Ермолаев, 1983; Сафонова, 1996а, б; Сафонова, Шауло, 2006) были выявлены и уточнены таксономический состав, особенности пространственно-временной неоднородности сообществ планктонных гидробионтов различных озер Западной Сибири. Соленые озера Кулундинской степи представляют значительный интерес для изучения в связи с разнообразием условий обитания экстремальных микроорганизмов и малой изученностью их свойств. Показано, что в основном в течение весенне-летнего периода доминировали синезеленые водоросли, уступая место зеленым нитчатым водорослям поздним летом и осенью (Веснина и др., 2005). В содовых озерах наряду с синезелеными велика доля в численности и биомассе зеленых водорослей независимо от сезона года.

К настоящему времени накоплен существенный объем данных относительно содержания масла у некоторых перспективных видов микроводорослей в расчете на сухую массу клеток. Выявлено, что содержание масла в штаммах-продуцентах липидов составляет от 20 до 80 % в расчете на сухую массу клеток (Rosenberg, 2008). Наиболее перспективными из них являются виды *Chlorella sp.* (20–50 % липидов), *Neochloris oleoabundans* (35–54 %), *Nannochloropsis sp.* (31–68 %), *Botryococcus braunii* (25–85 %). Однако на практике столь высокие выходы по липидам не достижимы в условиях реального производства, при котором культивирование

осуществляют в фотобиореакторах различной конструкции, в том числе панельных, тубулярных, эрлифтных, пластиковых пакетах и др. (Wang *et al.*, 2012), а также в открытых бассейнах или прудах. Наибольшее количество работ посвящено исследованию свойств отдельных штаммов микроводоросли *Chlorella* в панельных фотобиореакторах, для которой в целом удается достичь продуктивности по липидам на уровне 20–50 % в пилотном биореакторе. Показано, что продуктивность сильно варьирует в зависимости от используемого способа культивирования: миксотрофного, гетеротрофного или на сточных водах (Andersen, 2005). Кроме того, в литературе имеется мало источников, посвященных исследованию процессов культивирования отдельных штаммов в фотобиореакторах большого объема с целью получения готовой биомассы с высоким содержанием липидов.

В данной работе было проведено выделение микроводорослей из природных образцов, отобранных на территориях Западной Сибири. Штаммы были выделены из акватории Новосибирского водохранилища, а также из соленых озер Кулундинской степи, отличающихся разнообразием флоры зеленых водорослей. В ходе исследований был выделен штамм *Chlorella* spp. A1125, обладавший высокой скоростью роста и стабильностью поддержания в культуре. Исследована продуктивность выделенного штамма по биомассе и липидам при культивировании в пилотном фотобиореакторе и определен его жирнокислотный состав.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Выделение чистых культур микроводорослей с использованием проточной цитофлюориметрии

Образцы почв Западной Сибири помещали в стерильную элективную среду BBM, состоящую из следующих компонентов (мг/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (175),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (25),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (75),  $\text{NaNO}_3$  (250),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (75),  $\text{NaCl}$  (25),  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (10),  $\text{KOH}$  (0,62),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (4,98),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,001),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (8,05) и 1 мл стокового раствора микроэлементов (г/л), состоящего из  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (2,86),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1,81),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,22),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,39),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,08),

$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,05) в 1 л дистиллированной воды, pH доводили до 6,8 с помощью  $\text{HCl}$  или  $\text{NaOH}$ . Образцы культивировали в течение одного месяца. После проводили сортировку полученных накопительных культур с использованием проточного цитофлюориметра BD FACSAria. Для возбуждения флюоресценции хлорофилла использовали аргоновый лазер с длиной волны 488 нм. Измерение спектра флюоресценции осуществляли с использованием дихроичного фильтра на длинноволновую часть спектра (655LP) и интерференционного полосового фильтра на 695/40 нм. После этого проводили посев полученной клеточной суспензии на плотную агаризованную среду BBM и через три недели культивирования при 30 °C и фотопериоде 18 ч день/6 ч ночь отмечали отдельные колонии микроводорослей, не содержащие сопутствующей микрофлоры. Два последующих пересева изолированных колоний на аналогичную среду позволили получить ряд чистых культур микроводорослей.

### Анализ нуклеотидной последовательности гена *18s* рРНК

ПЦР-амплификацию фрагмента гена *18s* рРНК проводили в присутствии 20 нг ДНК в общем объеме 50 мкл, содержащем 0,2 мМ смеси четырех дезокситрифосфатов, 1,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 мкМ праймеров, буфера для Taq ДНК-полимеразы, и 0,05 е.а./мкл Taq ДНК-полимеразы (все производства «Сибэнзим», Россия). Для амплификации фрагмента гена *18s* рРНК использовали следующие пары праймеров: 5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3' и 5'-CCGTCAATTCTMTTTRAGTTT-3'; 5'-CTTAAAGGAATTGACGGAA-3' и 5'-GCTGCGTTCTTCATGGATGC-3'. ПЦР-амплификацию проводили в амплификаторе MyCycler (производства BioRad): 95 °C – 3 мин, 40 циклов 95 °C – 30 с, 54 °C – 20 с, 72 °C – 1 мин 30 с; 72 °C – 10 мин. Реакцию амплификации фрагмента гена *18s* рРНК методом ПЦР для определения нуклеотидной последовательности проводили с использованием набора *BigDye*® Terminator v3.1 Sequencing Standard Kit (Applied Biosystems) согласно протоколу. Определение нуклеотидной последовательности проводили в ЦКП СО РАН «Секвенирование ДНК».



Для культивирования штамма микроводоросли *Chlorella spp.* A1125 был сконструирован пилотный панельный фотобиореактор. Внутри фотобиореактора перемешивание происходило методом барботажки смеси газов через пластиковую трубку, обеспечивающую равномерное распределение газа в виде мелких пузырьков. Объем фотобиореактора составил 125 л, рабочий объем – 110 л, размеры камеры – 1500 мм × 1000 мм × 200 мм. Поддержание постоянной температуры осуществлялось с использованием встроенного термостата от температуры окружающей среды до 32 °С. Блок двустороннего освещения фотобиореактора состоял из 8 ламп холодного дневного света со спектральным диапазоном излучения 530–610 нм, расположенных на расстоянии 10 см от поверхности фотобиореактора. Было установлено освещение 120 мкмоль м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup> и фотопериод 18 ч день/6 ч ночь. Культивирование проводили при начальной посевной концентрации культуры, составляющей 5 × 10<sup>4</sup> клеток мл<sup>-1</sup>, и температуре 25 °С в течение 20 сут. После осаждения клеток раствор сливали, осадок отделяли от остатков жидкости путем сепарации. Полученную пасту использовали в экспериментах.

#### **Экстракция липидов из биомассы микроводорослей**

Липиды экстрагировали по методу Фолча. Для этого пасту микроводорослей (1 г) интенсивно перемешивали в присутствии метанол-хлороформенной смеси (1 : 2). После экстракту добавляли 0,9 %-й раствор KCl из расчета 0,25 части от полученного объема экстракта и интенсивно перемешивали. После расслоения фаз органическую фазу (в ней и содержатся липиды) отделяли. Растворитель отгоняли на роторном вакуумном испарителе при температуре 37–40 °С. После окончания жидкость выпаривали и взвешивали осадок.

#### **Анализ жирнокислотного состава липидов микроводорослей методом газовой хроматомасс-спектрометрии**

Перед началом анализа предварительно проводили переэтерификацию липидного экстракта с целью получения метиловых эфиров жирных

кислот. Навеску липидов (5 мг) растворяли в смеси толуола (1 мл), после добавляли раствор 1 %-й серной кислоты в метаноле (2 мл), интенсивно перемешивали. Смесь кипятили в течение 2 часов, после добавляли 5 мл 5 %-го раствора NaCl. Полученные метиловые эфиры жирных кислот двукратно экстрагировали 5 мл гексана. Гексановый слой промывали раствором 2 % NaHCO<sub>3</sub> и сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Раствор фильтровали для удаления сушильного агента и растворитель удаляли в токе азота.

Состав метиловых эфиров жирных кислот анализировали на газовом хроматомасс-спектрометре Agilent 7000В с ионизацией электронным ударом (70 эВ), оснащенный капиллярной колонкой DB-5-MS, с температурным градиентом от 80 до 290 °С, повышавшимся со скоростью 4 °С/мин. Температура инжектора и детектора была установлена на 250 и 230 °С соответственно. Поток газа-носителя составил 1,2 мл/мин. Идентификацию соединений производили путем сравнения получаемых данных с библиотекой спектров известных соединений.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ**

С целью получения природных изолятов микроводорослей проводили выделение их чистых культур. Для этого в летний период 2011 г. были отобраны природные образцы почвы и воды из соленых озер, расположенных в Баганском и Карасукском районах Новосибирской области (оз. Круглое, Долгое), и из пресноводных экосистем, в том числе из южной оконечности Новосибирского водохранилища. Образцы отбирались по стандартной для гидробиологических работ схеме (Вассер и др., 1989). Всего было отобрано 53 образца почв и воды.

Разделение ассоциаций микроорганизмов проводили с использованием метода проточной цитофлюориметрии, позволяющего проводить эффективное отделение сопутствующей микрофлоры (бактерий и грибов) по различию в сигнале от объектов в области эмиссии хлорофилла. Выделение чистых культур проводили с целью поиска новых штаммов микроводорослей, характеризующихся высокой скоростью роста и содержанием липидов, пригодных для массового культивирования для последующего производства липидосодержащей биомассы

в пилотном фотобиореакторе. Процедура выделения чистых культур микроводорослей включала следующие стадии: оценку состава природного микробиологического сообщества, получение накопительных культур микроводорослей, визуальное исследование состава накопительных культур, выделение чистых культур микроводорослей с использованием проточной цитофлюориметрии.

Сбор и анализ полевого материала показали, что доминирующими в сообществах исследованных природных источников являются представители цианобактерий, нитчатых зеленых водорослей и диатомей. Наиболее перспективными для выделения микроводорослей были культуры, полученные из природных проб соленых озер, в которых в период исследований наблюдалось развитие колониальных и одноклеточных цианобактерий, диатомовых и зеленых водорослей.

Из-за присутствия в образцах посторонней микрофлоры (бактерии, дрожжи, грибы) эффективность разделения значительно варьировала для разных образцов. Всего из отобранных в природе образцов на первоначальном этапе удалось эффективно выделить 75 культур, из которых многократным пересевом на агаризованных средах в наших лабораторных условиях стабильно поддерживаются 10 культур, относящихся к отделу Chlorophyta. Сводные результаты приведены в табл. 1.

Для оценки применимости отдельных культур в качестве источника биомассы предварительно проводили культивирование полученных изолятов в конических колбах в объеме 200 мл при непрерывном барботаже культуры сжатым воздухом в течение 10 дней с начальной концентрацией  $5 \times 10^4$  клеток мл<sup>-1</sup>. Было показано, что

большинство протестированных изолятов не обладали способностью к росту в суспензионной культуре (ряд штаммов имели сезонный характер роста) или достаточной скоростью роста. В результате для дальнейших исследований был взят изолят A1125, обладавший наилучшими характеристиками, выделенный из образцов, отобранных в литоральной зоне Новосибирского водохранилища. Исследование видовой принадлежности изолята по 18s рРНК показало высокую степень родства штамма *Chlorella spp.* A1125 с штаммом *Chlorella sp.* NMX37N (GI: 346721045). Чистая культура выделенной микроводоросли состояла преимущественно из одиночных шаровидных или эллипсоидных клеток с тонкой и гладкой оболочкой, одиночным хлоропластом. Ядро клеток без окраски незаметно, размер клеток варьировался от 1,5 до 10 мкм в диаметре, размножение происходит автоспорами. Морфологически штамм соответствовал типичному описанию рода *Chlorella* (Царенко, 1990).

В качестве сред для культивирования штамма *Chlorella spp.* A1125 в фотобиореакторе использовали среды с различным содержанием азота – с повышенным BBM-3N и с пониженными BBM и Chu-13. Была проведена оценка влияния различных параметров на рост биомассы: температуры, CO<sub>2</sub> и лимитирования культуры по источнику азота. Оценка влияния температуры на накопление биомассы в фотобиореакторе в среде BBM-3N позволила получить данные о том, что при 23 °С специфическая скорость роста составила  $\mu_{\max} = 0,123 \text{ сут}^{-1}$ , время удвоения культуры – 5,6 сут. При повышении температуры до 26 °С  $\mu_{\max} = 0,13 \text{ сут}^{-1}$ , время удвоения – 5,3 сут. Таким образом, при разнице температуры в 3 °С параметры роста культуры практически не

Таблица 1

Результаты выделения микроводорослей из природных образцов в Новосибирской области методом проточной цитофлюориметрии

Источник образцов	Количество отобранных образцов	Количество выделенных культур микроводорослей	Количество стабильно поддерживаемых культур микроводорослей
Южная оконечность Новосибирского водохранилища, (почва и вода)	43	64	9
Оз. Долгое	5	7	1
Оз. Круглое	5	4	0

изменились. Для оценки влияния  $\text{CO}_2$  на рост биомассы *Chlorella spp.* A1125 проводили подачу 1,5 % газовой смеси в среде ВВМ-3М и при температуре 26 °С. При этом специфическая скорость роста культуры составила  $\mu_{\text{max}} = 0,52 \text{ сут}^{-1}$  и время удвоения 1,32 сут. Таким образом, подача 1,5 %  $\text{CO}_2$  в культивационную среду оказала значительное влияние на специфическую скорость роста, которая увеличилась в 4 раза. Исследование влияния состава среды на выход биомассы штамма *Chlorella spp.* A1125 в среде с пониженным содержанием азота (0,371 г/л) показало, что наблюдаемые параметры культивирования составляют:  $\mu_{\text{max}} = 0,11 \text{ сут}^{-1}$ , время удвоения – 6,2 сут. Таким образом, содержание азота в культивационной жидкости оказывало существенное влияние на рост биомассы. При дополнительной подпитке культуры  $\text{CO}_2$  в среде значительный эффект на рост биомассы достигался только при наличии доступных источников азота.

Исследование динамики накопления липидов микроводорослью *Chlorella spp.* A1125 проводили при культивировании на среде Chu-13. Накопление липидов количественно определяли путем гравиметрического анализа экстрагированной из биомассы липофильной фракции на протяжении всего срока культивирования. Как показано в табл. 2, в течение всего срока культивирования наблюдается равномерное увеличение биомассы. В то же время накопление липидов имеет двухфазный характер: до 13-го дня содержание липидов возрастает и достигает максимума накопления – 0,081 г/л (23 % липидов по сухому весу), после наблюдается резкое уменьшение продукции липидов и на 18-е сутки составляет 0,053 г/л (10 % липидов по сухому весу).

Исследование накопления липидов при культивировании изолированного штамма *Chlorella spp.* A1125 показало, что в течение культиви-

рования наблюдается максимум накопления (80 мг/л на 13-й день культивирования), который уменьшается до 50 мг/л при выходе накопления липидов на плато. Стоит отметить, что несмотря на двухфазный характер метаболизма липидов, рост биомассы остается неизменным и составляет 30 мг л<sup>-1</sup> сутки<sup>-1</sup>.

На протяжении всего срока культивирования проводили анализ жирнокислотного состава липидной фракции микроводоросли *Chlorella spp.* A1125 методом газовой хроматомасс-спектрометрии. Результаты измерений приведены в табл. 3.

Как видно из представленных данных, в липидном экстракте присутствовали насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты (ЖК), наибольшую массовую долю из которых составляли С16:2, С16:0, С18:1 и С18:2.

В течение всего срока культивирования наблюдалась тенденция к разнонаправленному изменению в составе жирных кислот. Так, количество ненасыщенных жирных кислот было минимальным, а насыщенных – максимальным лишь в начале культивирования (лаг-фаза). Следует отметить, что количество коротких жирных кислот (С14:0) было максимальным в начале культивирования. Кроме того, количество триненасыщенных жирных кислот достоверно снижалось в течение всего культивирования. Так, содержание С14:0 было максимальным в начале культивирования (8 %), однако уже на 13-е сутки содержание составило лишь 2 %. Изолированный штамм *Chlorella spp.* A1125 также выгодно отличался высоким и стабильным содержанием насыщенных ЖК в течение всего периода культивирования: для С16:0 значения составляли 22–26 %, для С18:0 – 2–5 %. Для ненасыщенных ЖК количество С16:1 имело достоверное повышение от 3 до 5 %, а С18:1 равномерно повышалось начиная с

Таблица 2

Накопление липидов и биомассы при культивировании *Chlorella spp.* A1125 в пилотном фотобиореакторе

Признак	Сутки						
	1	6	8	11	13	18	20
Липиды, г/л	0,018	0,034	0,058	0,0735	0,081	0,0555	0,0535
Биомасса, г/л	0,0942	0,1992	0,2986	0,4242	0,4322	0,598	0,6056

Таблица 3

GC-MS анализ состава жирных кислот липидной фракции биомассы микроводоросли *Chlorella spp.* A1125 при разных сроках культивирования

Жирная кислота	Сутки				
	1	8	13	18	20
C14:0	8 ± 3,7	5 ± 4,1	2 ± 0,1	1 ± 0,2	2 ± 0,2
C16:0	26 ± 9,3	22 ± 4,2	25 ± 2,7	23 ± 4,0	26 ± 2,5
C16:1	3 ± 0,4	3 ± 0,4	4 ± 1,2	5 ± 1,2	5 ± 1,4
C16:2	7 ± 0,7	16 ± 2,0	16 ± 0,2	15 ± 0,5	14 ± 0,5
C16:3	10 ± 0,7	7 ± 1,2	7 ± 1,9	5 ± 0,5	2 ± 2,6
C18:0	5 ± 6,4	4 ± 0,0	2 ± 1,9	5 ± 3,9	2 ± 0,3
C18:1	10 ± 1,0	6 ± 0,3	11 ± 2,0	12 ± 2,6	14 ± 2,9
C18:2	20 ± 0,4	27 ± 0,3	27 ± 2,2	26 ± 5,2	28 ± 1,8
C18:3	12 ± 0,8	9 ± 2,0	8 ± 1,9	7 ± 1,6	6 ± 2,0

экспоненциальной фазы роста от 6 до 14 %. Количество диненасыщенных ЖК оставалось постоянным начиная с экспоненциальной фазы и составляло для C16:2 – 14–16 %, для C18:2 – 26–28 %. Три ненасыщенные ЖК показывали обозначенную тенденцию к понижению содержания: C16:3 от 10 до 2 %, C18:3 от 12 до 6 %.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то что существует большой объем знаний об уровне накопления липидов отдельными штаммами микроводорослей на лабораторном уровне, открытым остается вопрос о выборе штаммов микроводорослей, сохраняющих высокое содержание липидов при культивировании в больших объемах в биореакторах. Помимо высоких выходов липидов, получаемое сырье должно быть определенного состава, в том числе иметь низкое содержание ненасыщенных жирных кислот для соблюдения требований, предъявляемых к качеству биотоплива, например стандарту ASTM D-6751. Таким образом, исследования, направленные на изучение возможности повышения продукции липидов и обеспечения определенного качества сырья, несомненно, позволят найти подходы к решению проблемы получения альтернативного биотоплива третьего поколения.

В нашей работе был использован штамм микроводоросли *Chlorella spp.* A1125, выделенный из образцов, отобранных в Новосибир-

ском водохранилище. Выделение проводили методом очистки накопительной культуры от побочной микрофлоры с использованием проточной цитофлуориметрии. Для выделения были использованы фильтры, обеспечивающие эффективное отделение по поглощению в области хлорофилла а. Данный метод является широко применяемым для подобных целей (Cellamare *et al.*, 2010) и зарекомендовал свою эффективность. Выделенный штамм характеризовался устойчивым ростом, отсутствием сезонности в размножении и не приводил к обрастанию поверхности культуральных сосудов, что является важным для его успешного культивирования.

Сравнение эффективности накопления биомассы выделенным штаммом *Chlorella spp.* A1125 в панельном фотобиореакторе с результатами, полученными в других исследованиях, в частности для штамма микроводоросли *Chlorella zofingiensis* (Feng *et al.*, 2011), показало, что у исследуемого штамма наблюдается более низкая специфическая скорость роста. Так, при культивировании в наружном фотобиореакторе объемом 60 л штамма *Chlorella zofingiensis* специфическая скорость роста составила 0,447 г/л/сут, а время удвоения – 1,54 сут. Для культивирования использовали среду BG-11, освещенность составила 100–200 мкмоль/м<sup>2</sup>/с, что несколько выше, чем у исследованной *Chlorella*, что может быть связано с большей освещенностью фотобиореактора.



В аналогичных работах по исследованию микроводорослей р. *Chlorella* динамика накопления липидов в основном характеризуется экспоненциальным ростом в течение 4–5 сут с последующим выходом на плато. Однако в данном эксперименте было отмечено, что в клетках этого штамма только на 13-й день культивирования достигается явный максимум накопления липидов, который сменяется стационарной фазой. В целом продукция липидов на протяжении культивирования оказалась меньше, чем в работе Lv с соавт. (2011), у которых продукция липидов составляла  $40 \text{ мг л}^{-1}\text{сутки}^{-1}$  при подпитке  $1,0\% \text{ CO}_2$  в 5-литровом лабораторном фотобиореакторе при освещенности  $60 \text{ мкмоль м}^{-2}\text{с}^{-1}$ . Это может быть связано с использованием для культивирования как более богатой питательной среды, так и более эффективного освещения культуры. Накопление липидов было сравнимо с внешним панельным фотобиореактором объемом 60 л, где продукция липидов составляла  $6,3 \text{ мг л}^{-1}\text{сут}^{-1}$  при максимальном содержании  $54,5\%$  от сухого веса (Feng *et al.*, 2011).

Наиболее подробно вопрос об изменениях, происходящих в составе липидов при культивировании микроодоросли *Chlorella*, рассмотрен в работе Guarnieri с соавт. (2011). Показано, что в процессе культивирования в условиях недостатка источников азота у исследованного штамма *Chlorella vulgaris* возрастает содержание исключительно С18:1 ЖК, в то время как остальные (С18:3, С18:2, С16:1 и С16:0) метаболизируются. У исследованного в данной работе штамма *Chlorella spp.* A1125 также наблюдается увеличение содержания С18:1, однако метаболизму подвергаются только С14:0, С16:3, С18:3. Для других видов микроводорослей, накапливающих липиды, например для штамма *Nannochloropsis sp.*, показано возрастание содержания другого ряда ЖК: С14:0, С16:0, С16:1, С18:1.

Таким образом, для выделенного штамма *Chlorella spp.* A1125 отмечена относительно высокая продуктивность по липидам  $0,081 \text{ г/л}$  (23%) при росте на минимальных средах в пилотном фотобиореакторе. Штамм характеризуется высоким содержанием как насыщенных С16:0 (25%), так и ненасыщенных жирных кислот С16:2 (16%) и С18:2 (27%). Таким образом, результаты этого исследования показали, что

выделенный штамм *Chlorella spp.* A1125 является перспективным кандидатом для производства биотоплива третьего поколения с использованием традиционных каталитических подходов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 16.512.11.2180 от 01.03.2011).

## ЛИТЕРАТУРА

- Вассер С.П., Кондратьева Н.В., Масюк Н.П. и др. Водоросли. Справочник. Киев: Наук. думка, 1989. 608 с.
- Веснина Л.В., Митрофанова Е.Ю., Лисицина Т.О. Планктон соленых озер территории замкнутого стока (юг Западной Сибири, Россия) // Сиб. экол. журнал. 2005. № 2. С. 221–233.
- Романов Р.Е. Новые находки редких видов водорослей в равнинных водотоках и водоемах юга Западной Сибири // Сиб. ботан. вестник: электрон. журнал. 2008. Т. 3. № 1/2. С. 3–10.
- Сафонова Т.А. Водоросли реки Катунь (Горный Алтай, Россия). Разнообразие, таксономическая структура // Альгология. Киев, 1996а. Т. 6. № 1. С. 42–48.
- Сафонова Т.А., Ермолаев В.И. Водоросли водоемов системы озера Чаны. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1983. 152 с.
- Сафонова Т.А. Материалы к альгофлоре водоемов системы р. Иртыш (Западная Сибирь, Россия). Центральный сибирский ботанический сад СО РАН. Новосибирск, 1996б. 26 с. Деп. В ВИНТИ 23.12.96. № 3745-В96.
- Сафонова Т.А., Шауло С.П. Новые и редкие виды водорослей для Западной Сибири // Turczaninowia. Барнаул, 2006. № 3. С. 102–108.
- Ткачев Б.П. Бессточные области юга Западной Сибири. Структура и динамика // Ишимский гос. пед. ин-т. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2001. 162 с.
- Царенко П.М. Краткий определитель хлорококковых водорослей Украинской ССР / Отв. ред. Г.М. Паламарь-Мордвинцева. Ин-т ботаники им. Н.Г. Холодного АН УССР. Киев: Наук. думка, 1990. 208 с.
- Andersen R.A. Algal Culturing Techniques. Elsevier: Academic Press, 2005. P. 596.
- Becker E.W. Microalgae for aquaculture. The nutritional value of microalgae for aquaculture. Handbook of Microalgal Culture. Oxford: Blackwell, 2004. P. 380–391.
- Cellamare M., Rolland A., Jacquet S. Flow cytometry sorting of freshwater phytoplankton // J. Appl. Phycol. 2010. V. 22. No. 1. P. 87–100.
- Feng P., Deng Z., Hu Z., Fan L. Lipid accumulation and growth of *Chlorella zofingiensis* in flat plate photobioreactors outdoors // Bioresour. Technol. 2011. V. 102. No. 22. P. 10577–10584.
- Guarnieri M.T., Nag A., Smolinski S.L. *et al.* Examination of triacylglycerol biosynthetic pathways *via de novo* transcriptomic and proteomic analyses in an unsequenced microalga // PLoS One. 2011. V. 6. No. 10. e25851.

- Khan S.A., Rashmi Hussain M.Z., Prasad S., Banerjee U.C. Prospects of biodiesel production from microalgae in India // *Renew. Sustain. Energy. Rev.* 2009. V. 13. P. 2361–2372.
- Ly J.M., Cheng L.H., Xu X.H. *et al.* Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions // *Bioresour. Technol.* 2010. V. 101. No. 17. P. 6797–6804.
- Richmond A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Science Ltd., 2004. P. 159–160.
- Rosenberg J.N., Oyler A.G., Wilkinson L., Betenbaugh M.J. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2008. V. 19. P. 430–436.
- Wang B., Lan C.Q., Horsman M. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses // *Biotechnol. Adv.* 2012. V. 30. No. 4. P. 904–912.

## STUDY OF MICROSCOPIC ALGA DIVERSITY IN WEST SIBERIA IN THE CONTEXT OF THIRD GENERATION BIOFUEL PRODUCTION

A.V. Piligaev<sup>2</sup>, K.N. Sorokina<sup>1,2</sup>, A.V. Bryanskaya<sup>1</sup>, E.A. Demidov<sup>1</sup>, R.G. Kukushkin<sup>2</sup>,  
N.A. Kolchanov<sup>1</sup>, V.N. Parmon<sup>2</sup>, S.E. Peltek<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Boreskov Institute of Catalysis, Novosibirsk, Russia

### Summary

The prospects of new alga strains as a source of non-food renewable biomass suitable for third generation biofuel production are discussed. West Siberia is of special interest, as it has a broad range of habitats and weakly studied microalga biodiversity. During this study, a number of strains were isolated. Of them, *Chlorella spp.* A1125 met the requirements for cultivation in a pilot-scale photobioreactor: high biomass productivity and high lipid content (0,081 g/l, or 23 % dry weight). The strain had high contents of saturated C16:0 (25 %) and unsaturated fatty acids: C16:2 (16 %) and C18:2 (27 %), thus being promising for catalytic production of third generation biofuel.

**Key words:** microalgae, culture, renewable resources, lipids.

УДК 631.523:631.527(092)

## МЕЙСТЕР ГЕОРГИЙ КАРЛОВИЧ (1873–1938)

© 2013 г. Р.Г. Сайфуллин, А.И. Прянишников, Ю.С. Свистунов

ГНУ НИИСХ Юго-Востока Россельхозакадемии, Саратов, Россия,  
e-mail: raiser\_saratov@mail.ru

Поступила 4 марта 2013 г. Принята к публикации 22 марта 2013 г.

В 2013 г. исполняется 140 лет со дня рождения одного из основоположников Саратовской селекционной школы академика ВАСХНИЛ, ее вице-президента и и.о. президента Георгия Карловича Мейстера. В статье рассмотрена роль Г.К. Мейстера в развитии селекции зерновых культур, технологии их возделывания, организации опытного и семенного дела Поволжья.

**Ключевые слова:** Георгий Карлович Мейстер, история селекции и генетики.



Георгий Карлович Мейстер родился в Москве 15 апреля (по новому стилю) 1873 г. в семье выходца из Германии, мастера портняжного дела Карла Егоровича Мейстера (1838–1900). В семье было 11 детей и из них только два сына: Александр (1865–1938) и Георгий (1873–1938). Брат

Г.К. Мейстера – Александр Карлович – геолог, петрограф и минералог в начале XX в. был виднейшим деятелем российского Геологического комитета. Его капитальный труд по региональной геологии Енисейского края, изданный в 1910 г., не потерял своего значения и сегодня (Мейстер А.К., 1910). Имя А.К. Мейстера входит в золотой фонд российской геологической науки наряду с именами В.А. Обручева, А.П. Карпинского и др. (Силаев, 1998).

Г.К. Мейстер по окончании Московского реального училища в 1893 г. поступает в Ново-Александринский институт сельского хозяйства и лесоводства. В 1897 г., окончив его, получает звание «ученый агроном». Он работает статистом сначала в Московской городской управе, затем во Владимирском губернском земстве. В 1903–1907 гг. работает земским агрономом Балашовского уезда Саратовской губернии. В 1904–1905 гг. – участник русско-японской войны. По отбытии воинской повинности возвращается на прежнюю работу. В 1908 г. добился разрешения на организацию Балашовского опытного поля (после реорганизации Балашовская опытная сельскохозяйственная станция) и до 1918 г. работает его директором.

В 1914 г. по рекомендации директора Саратовской областной сельскохозяйственной опытной станции (СХОС) А.И. Стебута Георгий Карлович избирается заведующим отделом

селекции станции, но его призывают в армию, и лишь после демобилизации в 1918 г. он возвращается к научной работе. С 1918 г. по 1934 г. он заведовал селекционным отделом на Саратовской областной СХОС. В 1920–1925 гг. и с 1934 г. по 1937 г. одновременно являлся и ее директором. Кроме того, с 1922 г. по назначению Наркомпроса – профессор Саратовского СХИ; с 1924 г. по 1927 г. – директор Саратовской «Госсемкультуры». В 1934 г. Мейстеру присвоена степень доктора биологических наук без защиты диссертации, а в 1935 г. он утверждается действительным членом Всесоюзной академии сельскохозяйственных наук им. В.И. Ленина (ВАСХНИЛ) и назначается ее вице-президентом. Одновременно Г.К. Мейстер – председатель секции зерновых, зернобобовых, масличных и кормовых культур ВАСХНИЛ, а в 1937 г. – и.о. президента ВАСХНИЛ.

Уже к 1910 г. со всей очевидностью стал проявляться организаторский талант Г.К. Мейстера. В результате усилий небольшого коллектива работников Балашовское опытное поле стало образцовым учреждением. Г.К. Мейстер одним из первых в этой зоне стал пропагандировать среди крестьян и внедрять новые культуры и сорта, а также передовые приемы агротехники. В освоении агроклиматических ресурсов среды региона он убедительно показал перспективность культур кукурузы и сорго, а также создания и внедрения новых сортов пшеницы. В полевых опытах установил существенное преимущество местных сортов над западноевропейскими и американскими. Он подчеркивал важность внедрения и соблюдения севооборотов, экономическую значимость кормовых культур и, соответственно, развития животноводства; совершенствовал технологию возделывания сельскохозяйственных культур; уточнил сроки, нормы и способы посева, приемы обработки почвы, ухода за парами, эффективность применения различных видов удобрений и защиты посевов от сорной растительности. Кроме полевых опытов он планировал закладывать эксперименты в вегетационных сосудах для испытания новых сортов на засухоустойчивость, эффективность использования воды, а также организовать химическую лабораторию для углубления проводимых исследований (Мейстер Г.К., 1913).

С 1909 г. начинается многолетняя деятельность Г.К. Мейстера по селекции зерновых культур. Он ведет работу по яровой и озимой пшенице, ржи, просу, кукурузе и кормовым культурам. В короткий срок методом индивидуальных отборов из сортов народной селекции создает ряд ценных сортов озимой пшеницы: особо зимостойкий сорт Лютесценс 329, продуктивный Гостианум 237, а также Лютесценс 1060/10. Первые два были районированы по всему Советскому Союзу и длительный период имели большое производственное значение, кроме того, на многих станциях они составили основу исходного материала для скрещиваний. Сорт яровой пшеницы Лютесценс 91 селекции Мейстера очень скоро и с успехом стал использовать А.П. Шехурдин в Саратове в качестве одного из компонентов при гибридизации. На Балашовском опытном поле Мейстер вывел также путем отбора сорта кукурузы Спассовская и чечевицы Спассовская улучшенная.

Подытоживая пять лет работы станции, Георгий Карлович показал, что сорта народной селекции имеют высокую внутрисортную изменчивость и что отборы из них эффективны для создания новых сортов (Мейстер Г.К., 1913). В качестве хозяйственно ценных признаков у растений он выделял засухоустойчивость, качество продукции и устойчивость к болезням.

Такая высокая результативность и в такой короткий срок не могла быть незамеченной. В октябре 1914 г. основоположник саратовской селекции Александр Иванович Стебут обратился в Совет Саратовской областной сельскохозяйственной опытной станции с просьбой на оставляемую им должность заведующего отделом пригласить Г.К. Мейстера. С 1918 г. Мейстер работает на Саратовской станции.

В Саратове Г.К. Мейстер начал работу с ознакомления с результатами по всем культурам. По яровой пшенице вскоре он принимает решение о развертывании нового этапа по межвидовым скрещиваниям между чистыми линиями твердой и мягкой пшеницы. Работа было поставлена очень широко, буквально весь коллектив лаборатории занимался этой проблемой.

По результатам межвидовой гибридизации, проведенной в 1918–1920 гг., Г.К. Мейстером были сделаны многие ценные выводы, а А.П. Шехурдиным выведены сорта безостой твердой пше-



ницы Кандиканс 75/09, Кандикас 76/10, мягкой пшеницы Эритроспермум 78/01, Эритроспермум 82/02 и Велютинум (Мейстер, 1927).

Особое внимание в своей деятельности Георгий Карлович уделял вопросам развития методов селекции. Так, с его приходом на Саратовскую станцию значительное место в селекционных программах наряду с межсортовой гибридизацией отводятся межвидовым и межродовым скрещиваниям мягкой пшеницы с твердой, пшеницы – с рожью, пыреем и житняком. В рамках этой программы исследователями был изучен видовой состав диких злаков окрестностей Саратова и его опорных пунктов, установлены их хромосомные наборы, а также поведение хромосом у полученных гибридов от скрещивания с культурными злаками, в том числе и с яровой мягкой пшеницей. Изучался видовой состав рода *Agropyron* Graerth., прежде всего *Agr. intermedium* (Host) Beauv. (syn. *Thinopyrum intermedium* (Host) Barkworth and DR Dewey), *Agr. elongatum* (Host) Beauv. (syn. *Thinopyrum elongatum* (Host) DR Dewey), *Agr. trichophorum* (Link.) K. Richt. (syn. *Thinopyrum intermedium* (Host) Barkworth and DR Dewey ssp. *barbulatum* (Schur) Barkworth). Организовывались скрещивания сортов яровой мягкой пшеницы с названными видами, проводились цитологические анализы родительских форм и их межродовых гибридов. Большие масштабы этих работ позволили провести фундаментальные исследования формообразовательного процесса у отдаленных гибридов (Заленский, 1923; Цицин, 1931; Верушкин, 1933; Плотников, 1937; Шепелева, 1937; Veruchkine, Shechurdine, 1933). Возлагались большие надежды на метод межродовой гибридизации для селекционного улучшения яровой мягкой пшеницы по засухоустойчивости, устойчивости к болезням, качеству зерна (в том числе по содержанию белка) и хлебопекарным свойствам, выносливости к засолению почв и на выведение многолетних форм и т. д. Однако в то время предпринятые усилия не привели к созданию нового сорта. Лишь много позже, уже вне стен Саратовской опытной станции, при повторном обращении к данному методу академику Н.В. Цицину удалось создать практически значимые формы (Флора 5, Флора 7, Царама и др.) и сорта (Грекум 114, ППГ 2493 и др.).

Значительное внимание Г.К. Мейстер уделил гибридизации озимой пшеницы с рожью. Этот период работы подробно освещен в юбилейном сборнике под его редакцией «XXV лет Саратовской селекционной станции» (XXV лет ..., 1936), в монографии «РПГ в процессе их изучения и использования для селекции» (РПГ ..., 1936). А результатом этого этапа селекции стали сорта Эритроспермум 46/131, Лютесценс 27/36, Лютесценс 434/154, Лютесценс 527/30, а также богатый исходный материал для межрасовой гибридизации.

В 1927 г. Мейстер был командирован на 6 месяцев в заграничную поездку для ознакомления с постановкой генетического и селекционного дела в Северной Америке и Швеции. Он привез в Саратов семена сортов, устойчивых к ржавчине и полеганию. Это послужило А.П. Шехурдину импульсом для развития направления селекции яровой мягкой пшеницы на интенсивность.

Г.К. Мейстер оказывал положительное влияние на процесс селекции во всех направлениях и по всем культурам. Под его руководством была построена теплица, которая позволила ускорить на 3–6 лет проработку материала за счет того, что стало возможным произвести искусственное заражение селекционного материала и отобрать устойчивые формы к листовой ржавчине, размножить пересевом семена гибридов ранних поколений и провести новые скрещивания. С использованием теплицы выведен сорт Саратовская 29. Несмотря на то, что последний отбор при его создании проведен в  $F_{12}$ , тем не менее потребовалось всего 12 лет работы от года скрещивания до передачи в Госсортсеть. В конце 1929 г. он организовал лабораторию по оценке мукомольно-хлебопекарных свойств по малым пробам, оценке содержания сырой и сухой клейковины и белка в зерне. Для оценки твердой пшеницы на макаронные свойства под руководством Мейстера А.И. Марушев сконструировал опытный аппарат. Таким образом, в Саратове впервые в России и одновременно с Америкой стали проводить эти анализы (Ильина, 1997).

С организационной точки зрения, в 1920 г. впервые в Нижнем Поволжье Г.К. Мейстеру удалось собрать в стенах станции коллектив, состоящий из различных специалистов (генетиков,

цитологов, ботаников, физиологов, биохимиков), и наладить их совместную работу по всестороннему изучению селективируемых сельскохозяйственных растений и их диких сородичей. Кооперация разных ученых оказалась продуктивной для получения новых знаний и их применения в селекции. Результатом их деятельности явилось мощное развитие селекции в Саратове.

Значение деятельности Г.К. Мейстера на посту руководителя саратовской станции в течение 20 лет не будет охарактеризовано вполне, если не осветить все то, что он сделал по семеноводству. В организации первичного семеноводства, в частности в закладке питомника, разработки Мейстера сохранились до сих пор, и ими неуклонно руководствуются лаборатории селекции и семеноводства пшеницы НИИСХ Юго-Востока (Ильина, 1997).

Впервые идея о создании особых хозяйств по размножению сортовых семян была высказана Г.К. Мейстером еще в 1918 г. Она была претворена в жизнь саратовскими земельными органами путем организации первого рассадника селекционных семян – семхоза № 1 под Саратовом. Это хозяйство стало отправным пунктом семеноводческой работы в Нижнем Поволжье. За хорошую работу по выращиванию и распространению семян высших репродукций

постановлением краевого исполкома семхозу № 1 было присвоено имя его организатора – Мейстера. За этим последовала необходимость иметь и последующие звенья в размножении семян. В 1924 г. организуется саратовская «Госсемкультура», объединившая 4 хозяйства с площадью около 2000 га. Директором ее назначается Г.К. Мейстер. Ее задача – размножение и распространение семян по Саратовской губернии. Вместе с «Заволжским семенным хозяйством» в Республике Немцев Поволжья их деятельность распространилась далеко за пределы губернии. Саратовская «Госсемкультура» не была первой в стране. Ранее были созданы Шатиловская, Омская и ряд других. Однако она была одной из крупнейших.

Г.К. Мейстер не оставил без внимания и вопрос о сортовом контроле. В 1926 г. впервые в стране он организовал курсы апробации для подготовки агрономов, способных справиться с сортовым контролем. Вместе с Е.М. Плачек он издал «Краткий определитель важнейших хлебных злаков и описание наиболее распространенных аборигенных и селекционных сортов Нижнего Поволжья» (Мейстер, Плачек, 1926), который потом переиздавался 3 раза (1928, 1932, 1936 гг.). Уже к 1928 г., т. е. к моменту организации Нижне-Волжского края, Саратовская



Селекционный корпус ГНУ НИИСХ ЮВ, г. Саратов.

губерния по размаху семеноводческой работы и по сохранению сортового материала в чистоте выдвинулась на одно из первых мест в регионе (Орловский, 1927).

Однако в начале 1930-х гг. сплошная коллективизация крестьянских хозяйств, реорганизация сельскохозяйственного опытного дела в стране и последовавшая ликвидация «Госсемкультуры» привели к развалу налаженного семеноводства. Мастер снова приводил в порядок нарушенные схемы семенного дела.

В 1934 г. Мастер издал работу под названием «Критический очерк основных понятий генетики» (Мастер Г.К., 1934). В ней он рассматривал различные определения, главным образом таких понятий, как изменчивость и наследственность, сделанные рядом ученых-генетиков. Но надо заметить, что вполне удовлетворяющую его представлению генетическую теорию изменчивости и наследственности он не нашел. В выступлении на IV сессии ВАСХНИЛ 19–27 декабря 1936 г. Мастер (1937) выразил то, что волнует саратовских селекционеров, а именно: «... в изучении резко контрастных морфологических признаков генетика не идет навстречу селекции» (С. 406–432).

Г.К. Мастер был сложным человеком, бывали случаи его резкого обращения с подчиненными, хотя это происходило от вспыльчивости характера и на деле не отражалось. Важно, что он умел заинтересовать коллектив той или иной идеей. Он следил за научным ростом сотрудников, давал им темы для исследований, советовал публиковать свои наблюдения, был редактором этих статей. Сам опубликовал около 100 научных работ (Ильина, 1997).

С 1921 г. по 1933 г. Г.К. Мастер заведовал кафедрой селекции и семеноводства Саратовского СХИ, читал лекции студентам, писал много популярных статей, учебных пособий. Его перу принадлежат такие выдающиеся работы, как «Ржано-пшеничные гибриды» (Мастер и др., 1936), «Основы учения о наследственности», «Пособие по селекции» и многие другие работы. Г.К. Мастер принимал участие в редактировании журналов «Селекция и семеноводство», «Сельское и лесное хозяйство», «Журнал опытной агрономии Юго-Востока» и др.

Г.К. Мастер воспитал поколение выдающихся селекционеров. Среди них академик

Н.В. Цицин, доктора сельскохозяйственных наук, лауреаты Государственной и Ленинской премий А.П. Шехурдин и В.Н. Мамонтова, а также Е.М. Плачек, Б.М. Арнольд, Н.Г. Мастер и др.

Ученый вел большую общественную работу: на XVI и XVII Всероссийских съездах Советов избирается членом ВЦИК, а также членом Саратовского горсовета. В 1929 г. ему присвоено звание заслуженного деятеля науки, в 1930 г. он был принят в члены ВКП(б) без прохождения кандидатского стажа. В 1935 г. награжден орденом Ленина, а в 1936 г. – орденом Знак Почета.

В 1937 г. Георгий Карлович Мастер был арестован, а 21 января 1938 г. осужден Военной коллегией Верховного Суда СССР к расстрелу, а 26 декабря 1957 г. тем же органом приговор был отменен, дело прекращено и осужденный посмертно полностью реабилитирован.

Обширное научное наследие Георгия Карловича Мастера является бесценным достоянием отечественной и мировой сельскохозяйственной науки. Многие идеи, практические начинания выдающегося ученого востребованы и успешно применяются до настоящего времени. Среди последователей и продолжателей его дела – коллектив НИИСХ Юго-Востока, деятельность которого базируется на научных и организационных основах, созданных в первой трети прошлого столетия неутомимой энергией и талантом Георгия Карловича Мастера.

## ЛИТЕРАТУРА

- XXV лет Саратовской селекционной станции: Сб. статей / Под ред. Г.К. Мастера. М.: Изд-во ВАСХНИЛ, 1936. 375 с.
- Верушкин С.М. Пшенично-пырейные гибриды / Под ред. Г.К. Мастера; НКЗ СССР; ВАСХНИЛ, Саратов. селекцентр засушливой зоны. М.: Сельхозгиз, 1933. 40 с.
- Заленский В.Р. Цитологические исследования над ржано-пшеничными гибридами: предварит. сообщ. // Мастер Г.К., Мастер Н.Г. Ржано-пшеничные гибриды. М., 1923. С. 40–44.
- Ильина Л.Г. Основоположники саратовской селекции (А.И. Стебут, Г.К. Мастер). Ч. 1 / Сост. Ю.А. Курбагов, Т.В. Токарева. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1997. 32 с.
- Мастер А.К. Горные породы и условия золотонности южной части Енисейского округа. Предварит. отчет о геол. исслед. в золотоносн. обл. Сибири. Енисейский район. 1910. Вып. 5.
- Мастер Г.К. Проект реорганизации Балашовского опытного поля в полеводственно-селекционную станцию.

- Балашов, 1913. 24 с.
- Мейстер Г.К. Проблема межвидовой гибридизации в освещении современного экспериментального метода // Журн. опыт. агрономии Юго-Востока. 1927. Т. 4. Вып. 1. С. 3–86.
- Мейстер Г.К. Критический очерк основных понятий генетики. М.; Л.: Сельхозгиз, 1934. 204 с.
- Мейстер Г.К. Выступление по докладам на IV сессии ВАСХНИЛ, 19–27 дек. 1936 г. // Спорные вопросы генетики и селекции: работы IV сессии ВАСХНИЛ, 19–27 дек. 1936 г. М.; Л., 1937. С. 406–432.
- Мейстер Г.К., Плачек Е.М. Краткий определитель важнейших хлебных злаков и описание наиболее распространенных аборигенных и селекционных сортов Нижнего Поволжья: Пособие для семеноводов и агроработников. Саратов, 1926. 36 с.
- Мейстер Н.Г., Сташкова Л.А., Кох Е.К. и др. Ржано-пшеничные гибриды в процессе их изучения и использования для селекции / Под ред. и с предисл. Г.К. Мейстера. М.: Сельхозгиз, 1936. 358 с.
- Орловский Н.В. Краткий очерк развития семеноводства в Саратовской губернии // Сводка результатов исследований 1924 г. сортового состава яровой пшеницы, проса и подсолнечника в саратовской губернии. Саратов, 1927. С. 5–14.
- Плотников И.Г. Редукционное деление у F<sub>1</sub> гибридов мягких пшениц на житняк // Работы по цитологии культурных растений: Сб. тр. Сарат. селекц. опыт. станции. М.; Л., 1937. С. 90–98.
- Силаев В. Тихий голос чистых истин // Наука в Сибири. 1998. № 5/6 (2141–2142). 13 февраля 1998 г.
- Цицин Н.В. О скрещивании пырея с пшеницей // Соц. зерн. хоз-во. 1931. № 1. С. 34–40.
- Шепелева Е.М. Цитологическое исследование мейозиса у F<sub>1</sub> гибридов *Triticum vulgare* A1. × *Agropyrum elongatum* в связи с различной степенью их фертильности // Работы по цитологии культурных растений: Сб. тр. Сарат. селекц. опыт. станции. М.; Л., 1937. С. 110–118.
- Veruchkine S.M., Shechurdine A.P. Hybrids between Wheat Couch Grass // J. Heredity. 1933. V. 24. No. 9. P. 329–335.

## MEISTER GEORGIY KARLOVICH (1873–1938)

R.G. Saifullin, A.I. Pryanishnikov, Yu.S. Svistunov

Agricultural Research Institute for the South-East Region, Saratov, Russia,  
e-mail: raiser\_saratov@mail.ru

In 2013, we celebrate the 140th anniversary of one of the founders of the Saratov breeding school, Academician of the All-Unian Academy of Agricultural Sciences, its Vice President and Acting President Georgiy K. Meister. The article considers his role in the development of crop breeding, cultivation technology, and the organization of research and seed production in the Volga region.

**Key words:** George K. Meister, history of plant breeding and genetics.



<b>Федеральное государственное унитарное предприятие «ПОЧТА РОССИИ»</b>																	
<b>Бланк заказа периодических изданий</b>						<b>Ф. СП-1</b>											
						АБОНЕМЕНТ на <small>газету</small> <b>4 2 1 5 3</b> <small>журнал</small> <span style="float: right;">(индекс издания)</span>											
						<b>Вавиловский журнал</b> <small>(наименование издания)</small>						Количество Комплектов					
						<b>генетики и селекции</b>											
						<b>на 20</b> <small>год по месяцам</small>											
						1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Куда																	
<small>(почтовый индекс)</small>						<small>(адрес)</small>											
Кому																	
<small>(фамилия, инициалы)</small>																	
----- Линия отреза -----																	
						ДОСТАВОЧНАЯ КАРТОЧКА <b>4 2 1 5 3</b> <small>(индекс издания)</small>											
						<small>ПВ</small>		<small>Место</small>		<small>Литер</small>							
						<small>Газету</small>											
						На Журнал <b>Вавиловский журнал генетики и селекции</b> <small>(наименование издания)</small>											
						Стоимость		подписки		руб.		Кол-во комплектов					
переадресовки		руб.															
<b>на 20</b> <small>год по месяцам</small>																	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12						
<small>город</small>																	
<small>Село</small>																	
<small>почтовый индекс</small>						<small>область</small>											
<small>код улицы</small>						<small>район</small>											
<small>дом</small>						<small>улица</small>											
<small>корпус</small>		<small>квартира</small>															
Фамилия И.О.																	

Отредактировано и подготовлено к печати  
в редакционно-издательском отделе ИЦиГ СО РАН

Редакторы: А.А. Ончукова, И.Ю. Ануфриева  
Дизайн: А.В. Харкевич  
Компьютерная графика: А.В. Харкевич, Т.Б. Коняхина  
Компьютерная верстка: Т.Б. Коняхина, Н.С. Глазкова

Подписано в печать 25.06.2013 г.  
Формат бумаги 60×84 1/8. Усл.-печ. л. 19,2. Уч.-изд. л. 18,4  
Тираж 300. Заказ 176

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН»  
630090, Новосибирск, Морской проспект, 2