
БАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

ОСНОВАН В 1997 г.

Том 17

3

Сентябрь 2013

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

FOUNDED IN 1997

Vol. 17

3

September 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

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>Ф.А. Урусов, Л.Н. Нефедова, А.Р. Лавренов, Н.И. Романова, А.И. Ким</i> ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ КОМПЛЕМЕНТАЦИИ ЛОКУСОВ <i>FLAMENCO</i> И <i>PIWI</i> У <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	381
<i>С.А. Копыл, Л.В. Омелянчук, М.В. Шапошников, А.А. Москалев</i> ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ГЕНОВ ОПУХОЛЕВОЙ СУПРЕССИИ В МЕХАНИЗМАХ СТАРЕНИЯ И ДОЛГОЛЕТИЯ НА МОДЕЛИ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	390
<i>Е.Н. Плюснина, М.В. Шапошников, Е.Н. Андреева, А.А. Москалев, Л.В. Омелянчук</i> ОСОБЕННОСТИ КРИВОЙ ВЫЖИВАНИЯ У <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> СО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА <i>D-GADD45</i>	399
<i>Ю.Ю. Илинский, Р.А. Быков, И.К. Захаров</i> ЦИТОТИПЫ МУТАНТНЫХ ЛИНИЙ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> ФОНДА ЛАБОРАТОРИИ ГЕНЕТИКИ ПОПУЛЯЦИЙ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СО РАН: ГЕНОТИПЫ ЭНДОСИМБИОНТА <i>WOLBACHIA</i> И МИТОТИПЫ ВИДА-ХОЗЯИНА	404
<i>Л.В. Омелянюк, К.К. Сидорова, В.К. Шумный</i> ИЗУЧЕНИЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ – НОДУЛЯЦИИ И АЗОТФИКСАЦИИ – У РАЙОНИРОВАННЫХ СОРТОВ И ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЛИНИЙ ГОРОХА (<i>PISUM SATIVUM</i> L.), ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ РАСТЕНИЙ НА ДВУХ ФОНАХ ПИТАНИЯ АЗОТОМ.....	424
<i>Г.Е. Аветисова, Л.О. Мелконян, А.Х. Чахалян, С.К. Келешян, А. С. Сагиян</i> СЕЛЕКЦИЯ НОВЫХ ВЫСОКОАКТИВНЫХ ШТАММОВ–ПРОДУЦЕНТОВ L–АЛАНИНА У <i>BREVIBACTERIUM FLAVUM</i> И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИХ АЛАНИНСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ	430
<i>В.В. Переверзева, А.А. Примак, Е.А. Дубинин</i> ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ КРАСНОЙ ПОЛЕВКИ <i>MYODES</i> (= <i>CLETHRIONOMYS</i>) <i>RUTILUS</i> <i>PALLAS</i> , 1779 СЕВЕРНОГО ПРИОХОТЬЯ ПО ДАННЫМ ОБ ИЗМЕНЧИВОСТИ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНА ЦИТОХРОМА <i>b</i> МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК.....	435
<i>В.В. Переверзева, А.А. Примак, Е.А. Дубинин</i> ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ ПОПУЛЯЦИЙ КРАСНОЙ ПОЛЕВКИ <i>MYODES</i> (= <i>CLETHRIONOMYS</i>) <i>RUTILUS</i> <i>PALLAS</i> , 1779 СЕВЕРНОГО ПРИОХОТЬЯ И КОЛЫМСКОГО РЕГИОНА	444

<i>В.С. Ланкин</i>	
ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ И МОДИФИКАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПАССИВНО-ОБОРОНИТЕЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ ДОМАШНИХ СВИНЕЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К ЧЕЛОВЕКУ	452
<i>О.И. Федорова</i>	
ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ, ЗАТРАГИВАЮЩИХ ОКРАСКУ, НА СТРУКТУРУ ВОЛОСЯНОГО И КОЖНОГО ПОКРОВА ХОРЬКОВ (<i>MUSTELA PUTORIUS</i>)	469
<i>А.С. Эрст, О.В. Ваулин</i>	
ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА <i>AQUILEGIA</i> СЕВЕРНОЙ АЗИИ ПО РАЗЛИЧНЫМ ДНК-МАРКЕРАМ.....	477
<i>Е.Н. Седов</i>	
ПРОГРАММЫ, МЕТОДЫ, ПРИЕМЫ СЕЛЕКЦИИ ЯБЛОНИ, ИХ РАЗВИТИЕ И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ .	487
<i>Е.Н. Седов, Г.А. Седышева, З.М. Серова, Н.Г. Горбачева, С.А. Мельник</i>	
СЕЛЕКЦИОННАЯ ОЦЕНКА ГЕТЕРОПЛОИДНЫХ СКРЕЩИВАНИЙ ПРИ СОЗДАНИИ ТРИПЛОИДНЫХ СОРТОВ ЯБЛОНИ.....	499
<i>О.Ю. Тимин, О.О. Тимина, П.Ю. Монтвид, А.П. Самовол</i>	
ЦИТОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО МУТАНТА ОВОЩНОГО ПЕРЦА <i>CAPSICUM ANNUUM</i> VAR. <i>ANNUUM</i> L.	509
<i>Х.Н. Рустамов</i>	
МОРФОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СОСТАВ МЯГКИХ ПШЕНИЦ (<i>TRITICUM AESTIVUM</i> L.) АЗЕРБАЙДЖАНА	520
<i>В.А. Крупнов</i>	
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СЛОЖНОСТЬ И КОНТЕКСТ-СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПРИЗНАКОВ УРОЖАЯ ПШЕНИЦЫ В ЗАСУШЛИВЫХ УСЛОВИЯХ.....	524
<i>И.В. Бобошина, С.В. Боронникова</i>	
АЛЛЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ <i>Waxy</i> -ГЕНОВ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ, ВОЗДЕЛЫВАЕМЫХ В ПЕРМСКОМ КРАЕ И В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН.....	535
<i>В.Е. Козлов</i>	
АГРОТЕХНИЧЕСКИЕ И СЕЛЕКЦИОННЫЕ СЛАГАЕМЫЕ УСПЕХА ВНЕДРЕНИЯ МИРОНОВСКИХ СОРТОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ В СССР КАК ОСНОВА ДЛЯ РАБОТЫ ПО ВНЕДРЕНИЮ В СИБИРИ ВНОВЬ СОЗДАННЫХ СОРТОВ, ЗИМОСТОЙКИХ В УСЛОВИЯХ РЕГИОНА	541
<i>И.В. Жирнов, Е.А. Трифонова, А.В. Кочетов</i>	
РОЛЬ АУТО- И ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ РИБОНУКЛЕАЗ СЕМЕЙСТВА III В МЕХАНИЗМАХ УСТОЙЧИВОСТИ К ПАТОГЕНАМ И РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ.....	558
<i>И.А. Захаров-Гезехус</i>	
КЛАССИКИ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ГЕНЕТИКИ В ЗЕРКАЛЕ МИРОВОЙ СТАТИСТИКИ ЦИТИРУЕМОСТИ..	568

Content

- F.A. Urusov, L.N. Nefedova, A.R. Lavrenov, N.I. Romanova, A.I. Kim*
GENETIC AND MOLECULAR ANALYSIS OF COMPLEMENTATION OF THE *FLAMENCO* AND *PIWI* LOCI
IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* 381
- S.A. Kopyl, L.V. Omelyanchuk, M.V. Shaposhnikov, A.A. Moskalev*
ROLE OF HETEROZYGOUS TUMOR SUPPRESSORS IN THE LIFE LONGEVITY OF *DROSOPHILA*
MELANOGASTER 390
- E.N. Plusnina, M.V. Shaposhnikov, E.N. Andreeva, A.A. Moskalev, L.V. Omelyanchuk*
SURVIVAL CURVE ANALYSIS FOR *DROSOPHILA MELANOGASTER* WITH *D-GADD45* OVEREXPRESSION
IN THE NERVOUS SYSTEM 399
- Yu. Yu. Ilinsky, R.A. Bykov, I.K. Zakharov*
CYTOTYPES OF MUTANT *DROSOPHILA MELANOGASTER* STOCKS FROM THE COLLECTION
OF THE GENETICS OF POPULATION LABORATORY OF THE INSTITUTE OF CYTOLOGY
AND GENETICS SB RAS: GENOTYPES OF THE *WOLBACHIA* ENDOSYMBIONT AND HOST MITOTYPES..... 404
- L.V. Omel'yanuk, K.K. Sidorova, V.K. Shumny*
STUDY OF NODULATION AND NITROGEN FIXATION IN INTRODUCED CULTIVARS AND CANDIDATE
LINES OF PEA (*PISUM SATIVUM* L.) GROWN AT TWO NITROGENOUS NUTRITION LEVELS 424
- G.Ye. Avetisova, L.H. Melkonyan, A.Kh. Chakhalyan, S.Gh. Keleshyan, A.S. Saghyan*
DEVELOPMENT OF NEW HIGHLY ACTIVE L-ALANINE PRODUCER STRAINS OF *BREVIBACTERIUM FLAVUM*
AND COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF THEIR ALANINE-SYNTHESIZING ACTIVITY..... 430
- V.V. Pereverzeva, A.A. Primak, E.A. Dubinin*
GENETIC STRUCTURE OF THE RED VOLE *MYODES* (= *CLETHRIONOMYS*) *RUTILUS* PALLAS, 1779
POPULATIONS OF THE NORTHERN PRIOKHOTYE WITH REGARD TO NUCLEOTIDE SEQUENCE
VARIABILITY OF THE MTDNA *cytb* GENE 435
- V.V. Pereverzeva, A.A. Primak, E.A. Dubinin*
PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AMONG POPULATIONS OF THE RED VOLE *MYODES*
(= *CLETHRIONOMYS*) *RUTILUS* PALLAS, 1779 IN THE NORTHERN PRIOKHOTYE AND KOLYMA REGIONS 444

<i>V.S. Lankin</i>	
GENOTYPIC AND MODIFICATIONAL VARIABILITY OF THE PASSIVE DEFENSE RESPONSE TO HUMANS IN DOMESTIC PIGS.....	452
<i>O.I. Fedorova</i>	
EFFECT OF COAT COLOR MUTATIONS ON HAIR AND SKIN STRUCTURE IN POLECATS (<i>MUSTELA PUTORIUS</i>)	469
<i>A.S. Erst, O.V. Vaulin</i>	
PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AMONG SEVERAL NORTH-ASIAN SPECIES OF THE GENUS <i>AQUILEGIA</i> ACCORDING TO VARIOUS MOLECULAR MARKERS	477
<i>E.N. Sedov</i>	
APPLE BREEDING PROGRAMS AND METHODS: THEIR DEVELOPMENT AND IMPROVEMENT	487
<i>E.N. Sedov, G.A. Sedysheva, Z. M. Serova, N.G. Gorbacheva, S.A. Melnik</i>	
BREEDING ASSESSMENT OF HETEROPLOID CROSSES IN THE DEVELOPMENT OF TRIPLOID APPLE VARIETIES	499
<i>O.Yu. Timin, O.O. Timina, P.Yu. Montvid, A.P. Samovol</i>	
CYTOLOGICAL AND GENETIC CHARACTERIZATION OF A NEW MUTANT OF VEGETABLE PEPPER <i>CAPSICUM ANNUUM</i> VAR. <i>ANNUUM</i> L.....	509
<i>Kh.N. Rustamov</i>	
MORPHOBIOLOGICAL STRUCTURE OF BREAD WHEAT (<i>TRITICUM AESTIVUM</i> L.) IN AZERBAIJAN	520
<i>V.A. Krupnov</i>	
GENETIC COMPLEXITY AND CONTEXT SPECIFICITY OF TRAITS IMPROVING WHEAT YIELD UNDER DROUGHT CONDITIONS.....	524
<i>I.V. Boboshina, S.V. Boronnikova</i>	
ALLELIC VARIANTS OF <i>WAXY</i> GENES IN <i>TRITICUM AESTIVUM</i> L. CULTIVARS GROWN IN THE PERM REGION AND BASHKIRIA	535
<i>V.E. Kozlov</i>	
AGRICULTURAL AND BREEDING PREREQUISITES FOR SUCCESSFUL INTRODUCTION OF MIRONOVKA WINTER WHEAT VARIETIES IN THE USSR AS THE BASE FOR INTRODUCING NEW VARIETIES RESISTANT TO SIBERIAN WINTER	541
<i>I.V. Zhirnov, E.A. Trifonova, A.V. Kochetov</i>	
ROLE OF AUTO- AND HETEROLOGOUS RIBONUCLEASE III FAMILY ENZYMES IN THE RESISTANCE TO PATHOGENS AND REGULATION OF GENE EXPRESSION IN HIGHER PLANTS	558
<i>I.A. Zakharov-Gezekhus</i>	
THE CLASSICS OF HOME GENETICS IN THE MIRROR OF WORLD CITATION STATISTICS	568

VI СЪЕЗД ВАВИЛОВСКОГО ОБЩЕСТВА ГЕНЕТИКОВ И СЕЛЕКЦИОНЕРОВ

15–20 июня 2014 г. в Ростове-на-Дону состоится VI съезд ВОГиС. Основными организаторами Съезда являются Вавиловское общество генетиков и селекционеров, Научный совет по генетике и селекции РАН, Институт цитологии и генетики СО РАН, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, кафедра генетики и биотехнологии СПбГУ, кафедра генетики МГУ, кафедра цитологии и генетики НГУ, Институт аридных зон Южного научного центра РАН и Южно-Российский институт – филиал РАНХиГС.

В состав организационного комитета Съезда (председатель – В.К. Шумный, заместители – Н.А. Колчанов, Н.К. Янковский, Д.Г. Матишов, И.А. Тихонович) входят программный комитет (председатель – С.Г. Инге-Вечтомов, заместители – С.В. Шестаков, Н.А. Колчанов, Е.К. Гинтер, И.А. Тихонович) и технический комитет (председатель – Н.А. Колчанов, заместители – Д.Г. Матишов, Е.К. Хлесткина, А.М. Кудрявцев, В.В. Рудой).

Основной задачей запланированного Съезда является интеграция исследователей, работающих в научных учреждениях разных ведомств, и совместное обсуждение приоритетных направлений развития генетики и селекции.

В рамках Съезда состоятся следующие научные симпозиумы:

1. Эволюционная и популяционная генетика.

2. Молекулярные и клеточные механизмы генетических процессов.

3. Геномика, протеомика, биоинформатика и системная биология.

4. Генетика развития и стволовые клетки.

5. Генетика человека, медицинская генетика и генетические модели для биомедицинских исследований.

6. Нейрогенетика и генетика поведения.

7. Генетические основы селекции и биотехнологии.

8. Экологическая генетика.

Кроме того, будут организованы круглые столы:

1. Генетическое образование.

2. Социальные и этические аспекты генетики.

Планируется, что в работе Съезда примут участие не менее 500 участников, ожидается активное участие молодых ученых, аспирантов и студентов. Крайний срок регистрации и подачи тезисов – 1 ноября 2013 г. Рабочим языком Съезда является русский язык.

Ознакомиться с правилами оформления тезисов и зарегистрироваться можно на сайте <http://conf.nsc.ru/vogis2014/ru/>

Приглашаю принять участие в работе Съезда!

Президент ВОГиС академик РАН **В.К. Шумный**

УДК 577.2:595.773.4

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ КОМПЛЕМЕНТАЦИИ ЛОКУСОВ *FLAMENCO* И *PIWI* У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2013 г. **Ф.А. Урусов, Л.Н. Нефедова, А.Р. Лавренов, Н.И. Романова, А.И. Ким**Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, кафедра генетики,
Москва, Россия, e-mail: aikim57@mail.ru

Поступила в редакцию 27 июня 2013 г. Принята к публикации 8 июля 2013 г.

Считается, что гетерохроматиновый локус *flamenco*, контролирующий у *Drosophila melanogaster* транспозиции ретротранспозона/ретровируса *gypsy*, является одним из источников антисмысловых РНК, взаимодействующих с белком Piwi – важнейшим компонентом системы РНК-интерференции. Мутации *piwi* и *flamenco* имеют одинаковое фенотипическое проявление – повышенный уровень транскрипции и частоты транспозиции ретротранспозона/ретровируса *gypsy*. В настоящей работе обсуждаются результаты комплементационного теста, который заключается в скрещивании линий MS и SS, мутантных по локусу *flamenco*, с линией *piwi*³, гетерозиготной по мутации в гене *piwi*, с последующим исследованием уровня транскрипции *gypsy* в яичниках и семенниках гибридов, полученных от данных скрещиваний. Проведен генетический (гибридологический) и молекулярный анализы взаимодействия локусов *flamenco* и *piwi*. Выявлено, что транскрипция *gypsy* по-разному регулируется в тканях семенников и яичников линий SS и MS, что, по-видимому, обусловлено различной активностью кластеров piRNA в этих тканях. Также показано, что гены *piwi* и *flamenco* в тканях семенников взаимодействуют комплементарно.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, *flamenco*, *piwi*, молекулярный анализ.

ВВЕДЕНИЕ

Ретротранспозоны – класс мобильных генетических элементов (МГЭ), перемещение которых осуществляется с помощью обратной транскрипции. Среди них различают ретротранспозоны, фланкированные длинными концевыми повторами (ДКП-ретротранспозоны), и LINE – элементы, не содержащие ДКП. ДКП-ретротранспозоны имеют высокую степень сходства с ретровирусами. В структуре как ретротранспозонов, так и ретровирусов различают 3 открытые рамки считывания (ОРС) – *gag*, *pol*, *env*. Если у ДКП-ретротранспозона все 3 ОРС не повреждены и способны полностью выполнять свои функции, то потенциально такой МГЭ способен не только перемещаться по геному в пределах одной клетки, но и заражать другие клетки и, следовательно, являться ретровирусом. Именно это свойство впервые было

показано у ДКП-ретротранспозона *D. melanogaster gypsy* (Kim *et al.*, 1994a), а затем и у элемента *ZAM* (Leblanc *et al.*, 2000).

Показано, что транспозиции ДКП-ретротранспозона-ретровируса *gypsy* контролирует локус *flamenco*, локализованный в районе 20A1-3 X-хромосомы *D. melanogaster* (Pélisson *et al.*, 1994). В том же районе X-хромосомы локализован локус *SOM*, контролирующей родственной *gypsy* ретротранспозон *ZAM* (Desset *et al.*, 2003). Следует отметить, что и локус *flamenco*, и локус *SOM* картированы только генетически, молекулярные механизмы их функционирования изучены недостаточно.

Существенная часть МГЭ присутствует в виде дефектных копий, накопивших в процессе эволюции мутации и в настоящее время не способных к перемещению. Известно, что такие дефектные последовательности МГЭ могут быть вовлечены в процессы контроля их активных

копий. В настоящее время принято считать, что локус *flamenco* является скоплением множества дефектных копий МГЭ и служит источником антисмыслового РНК-предшественника для системы РНК-интерференции (Brennecke *et al.*, 2007; Pélisson *et al.*, 2007; Malone *et al.*, 2009).

У дрозофилы известно несколько биохимических путей РНК-интерференции. Суть каждого из них заключается в подавлении экспрессии гена на посттранскрипционном уровне с помощью антисмысловых РНК, однако в каждом из путей функционируют разные белки (Lee *et al.*, 2004). Источники антисмысловой РНК тоже отличаются для каждого из них. Локус *flamenco* вовлечен в Piwi-зависимый путь. Данный путь предполагает деградацию смысловой РНК-мишени с участием коротких РНК, взаимодействующих с белком Piwi (piRNA, Piwi-interacting RNA), в соматических фолликулярных клетках (Malone *et al.*, 2009). В тканях яичников действует циклический механизм, обеспечивающий амплификацию пула piRNA, имеющий название «пинг-понг» (Brennecke *et al.*, 2007). Для инициации механизма «пинг-понг» необходимы первичные piRNA, имеющие происхождение от локуса *flamenco* (Brennecke *et al.*, 2007). Кроме того, предполагается, что источниками антисмысловых РНК могут являться и другие кластеры piRNA.

Очевидно, что белок Piwi играет в вышеописанных процессах крайне важную роль, поскольку именно он осуществляет самый ранний этап – образование первичных piRNA. Мутации в гене *piwi* приводят к стерильности и вызывают повышенную частоту транспозиции МГЭ *gypsy* (Sarot *et al.*, 2004) и *copia* (Kalmykova *et al.*, 2005). Также у мутантов наблюдается повышенный уровень транскриптов многих других МГЭ (Lu, Clark, 2011). Относительно *gypsy* нарушения в обоих генах – *piwi* и *flamenco* – приводят к одинаковому фенотипическому проявлению: повышаются уровень транскрипции и частота транспозиции данного элемента.

Описано несколько мутантных по локусу *flamenco* линий *D. melanogaster*, большинство из которых получено путем инсерции Р-элемента в область данного локуса (Robert *et al.*, 2001; Mevel-Ninio *et al.*, 2007). В нашей лаборатории ранее была исследована линия SS *D. melanogaster*, в которой была обнаружена

мутация в локусе *flamenco*. Она не является инсерционным мутантом, и природа мутации *flamenco* в ней неизвестна (Kim *et al.*, 1994b). Из этой линии путем искусственного введения активной копии МГЭ *gypsy* получена линия MS, характеризующаяся повышенной частотой транспозиции *gypsy* (Kim *et al.*, 1994b).

Методом обратной транскрипции (ПЦР) показано, что в линиях SS и MS наблюдался повышенный уровень транскрипции в области локуса *flamenco*, являющегося источником антисмысловых piRNA (Неопубл. данные). Мы предположили, что повышенный уровень транскрипции *flamenco* в линиях SS и MS может быть обусловлен мутацией в генах системы РНК-интерференции, в первую очередь в гене *piwi*, в результате которой РНК-предшественник piRNA накапливается вследствие нарушения его процессинга. Настоящая работа посвящена экспериментальной проверке этого предположения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии *D. melanogaster*

Изогенные линии, мутантные по гену *flamenco*, *w¹*: SS, MS (содержит активный *gypsy*) (Kim *et al.*, 1994b) и линия Д32 с фенотипом *flamenco*⁺ – из коллекции кафедры генетики МГУ. Линия P{PZ}piwi⁰⁶⁸⁴³ cn¹/CyO; ry⁵⁰⁶ (предоставлена А.И. Калмыковой, ИМГ РАН, Москва) характеризуется наличием инсерции Р-элемента в первый экзон гена *piwi* (Lin, Spradling, 1997). В тексте линия P{PZ}piwi⁰⁶⁸⁴³ cn¹/CyO; ry⁵⁰⁶ обозначена символом piwi³, под которым она также фигурирует в базе данных Flybase.

Линии мух культивировали в стандартных условиях: на общепринятой агаризованной питательной среде при температуре 25 °С. Скрещивания осуществлялись в тех же условиях. Для массовых скрещиваний в пробирку диаметром 3 см помещали по 10 особей каждого пола.

Сбор тканей

для последующего выделения РНК

Мух анестезировали с помощью диэтилового эфира и под бинокулярным микроскопом препаровальными иглами производили их вскрытие и отделение яичников или семенников от корпуса.

Для выделения РНК собирали примерно 20 мг тканей. Сбор осуществляли в 1,5 мл пробирки, содержащими 10 мкл деионизованной воды и 40U рибонуклеазного ингибитора Ribolock («Fermentas»). В процессе сбора пробирки с тканями находились в ледяной бане.

Выделение тотальной РНК

Выделение РНК осуществляли с помощью комплекта реагентов «РИБО-золь-А» фирмы «AmpliSens» (Россия). Биоматериал гомогенизировали в буфере, содержащем гуанидинизотиоцианат. Далее экстракцию проводили по протоколу производителя. Качество выделенной РНК оценивали путем электрофореза в 2 %-м агарозном геле, количество – спектрофотометрически (Nanodrop 1000, «Thermo Fisher Scientific»). Затем 1 мкг РНК инкубировали с 1U ДНКазы I («Fermentas») при 37 °С в течение 60 мин. Реакцию останавливали добавлением EDTA до конечной концентрации 2,5 мМ, ДНКазу инактивировали прогреванием при 65 °С в течение 10 мин.

Синтез кДНК

Синтез кДНК осуществляли с помощью набора фирмы «Fermentas» «First Strand cDNA Synthesis Kit» по протоколу производителя, в качестве затравки для синтеза использовали случайные праймеры. Количество матрицы РНК составляло 500 нг на реакцию. Эффективность реакции обратной транскрипции оценивали с помощью серии кратных разведений РНК.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени

Аmplификацию проводили в объеме 25 мкл в течение 40 циклов в амплификаторе Mini-Opticon Real-Time PCR System («Bio-Rad Laboratories»). Была использована реакционная смесь M-428 фирмы «Синтол» (Россия), содержащая флюоресцентный краситель SYBR Green I. Концентрация MgCl₂ – 2,5 мМ, каждого праймера – 0,4 мкМ на реакцию. Параметры цикла: денатурация – 95 °С, 15 с, отжиг праймеров – 55 °С, 45 с, элонгация – 62 °С, 60 с. Для амплификации использовали праймеры к гену *gypsy*:

прямой 5'-gtctgcaccaagcaagta-3', обратный 5'-cacgtcaggaatgcttct-3' и к гену *rp49*: прямой 5'-gtatcgacaacagagtgcgt-3', обратный 5'-gttctgcatgagcaggacct-3'. Эффективность ПЦР оценивали с помощью серии кратных разведений кДНК.

Анализ результатов ПЦР проводили с помощью пакета программ Bio-Rad CFX Manager (версия 1.6.541.1028). Вычисление экспрессии *gypsy* данным программным обеспечением производилось $\Delta\Delta C(t)$ методом. В качестве референсного гена был использован *rp49*.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Молекулярная природа мутации в локусе *flamenco*, контролирующем транспозиции МГЭ *gypsy* в линии MS, изогенной линии SS, до сих пор неизвестна. Поскольку в линии MS уровень транскрипции РНК в области локуса *flamenco* был выше, чем в линии дикого типа, мы предположили, что в линии MS механизм РНК-интерференции не работает эффективно либо в результате нарушения процессинга РНК-предшественника (мутация в гене *piwi*), либо из-за структурных особенностей самого локуса *flamenco*. Чтобы ответить на вопрос, являются ли наблюдаемые особенности процессинга РНК-предшественника следствием нарушения нормального функционирования белка *Piwi*, мы провели функциональный тест на аллелизм, или тест на комплементацию. Его суть сводится к скрещиванию линии MS с линией *piwi*³, гетерозиготной по рецессивной мутации *piwi*, и последующему анализу уровня транскрипции ретротранспозона *gypsy* в яичниках и семенниках (где функционируют *Piwi*-зависимые механизмы подавления МГЭ) потомства относительно родительских линий.

Скрещивания осуществляли в обоих направлениях (прямое – ♀♀MS × ♂♂*piwi*³, обратное – ♀♀*piwi*³ × ♂♂MS). Поскольку гены *flamenco* и *piwi* характеризуются как гены с материнским эффектом (Pélisson *et al.*, 1994; Megosh *et al.*, 2006; Brennecke *et al.*, 2007), прямое и обратное скрещивания, теоретически, могут демонстрировать разные результаты.

Кроме линии MS, аналогичные скрещивания были осуществлены с использованием другой линии – SS (прямое – ♀♀SS × ♂♂*piwi*³, обратное – ♀♀*piwi*³ × ♂♂SS). MS и SS являются

изогенными линиями. В геноме линии SS нет активного *gypsy*, способного к перемещению. Линия MS получена на основе SS путем ее трансформации активной копией *gypsy*. Следовательно, скрещивания с линией SS можно считать контрольными для данного эксперимента.

Схема скрещиваний представлена на рис. 1. Балансрная хромосома *CyO* линии *piwi*³ маркирована доминантной мутацией *Cy* (загнутые крылья), летальной в гомозиготном состоянии. В результате скрещивания появляются потомки двух фенотипических классов: с загнутыми (*Cy*) и нормальными (*N*) крыльями. Исходя из схемы скрещивания получается, что только особи с нормальными крыльями (*N*) наследуют от линии *piwi*³ ту хромосому, в которой аллель данного гена присутствует в нефункциональном мутантном состоянии. Другую хромосому особи *N* наследуют от линий MS или SS; при этом аллельное состояние гена *piwi* в этой хромосоме нам неизвестно.

Следует отметить, что определенные мутации в гене *piwi* в гомозиготе могут приводить к резкому снижению жизнеспособности и стерильности таких особей (Cox *et al.*, 1998). Белок *Piwi* необходим для поддержания герминальных стволовых клеток (Cox *et al.*, 2000). Гомозигот-

ные мухи имеют недоразвитые яичники сильно уменьшенного размера и, как следствие, стерильны. Значит, если в линиях MS и SS имеется летальный аллель гена *piwi*, то при массовом скрещивании MS или SS с линией *piwi*³ мы получим потомство *N*, часть которого унаследует оба нефункциональных аллеля *piwi* (один от MS или SS, другой от линии *piwi*³). Жизнеспособность таких гибридов может оказаться низкой, вследствие чего они не попадут в поле нашего зрения. В такой ситуации результаты теста могут быть интерпретированы неправильно.

Чтобы убедиться в том, что в наших линиях отсутствует летальная мутация в гене *piwi*, нами было поставлено 100 индивидуальных скрещиваний самок линии SS с самцами линии *piwi*³. Очевидно, что из всех трех возможных генотипов (*piwi*⁺/*piwi*⁺, *piwi*⁺/*piwi*, *piwi*/*piwi*) плодовитыми будут только гетерозиготные особи и гомозиготные мухи дикого типа. Если в индивидуальном скрещивании от линии SS будет участвовать гомозиготная особь дикого типа или гетерозиготная по мутантному аллелю, то будет наблюдаться расщепление фенотипических классов *Cy* к *N*, равное 1 : 1, при условии, что мутация в *piwi* не летальна. В случае же ее летальности соотношение изменится в пользу

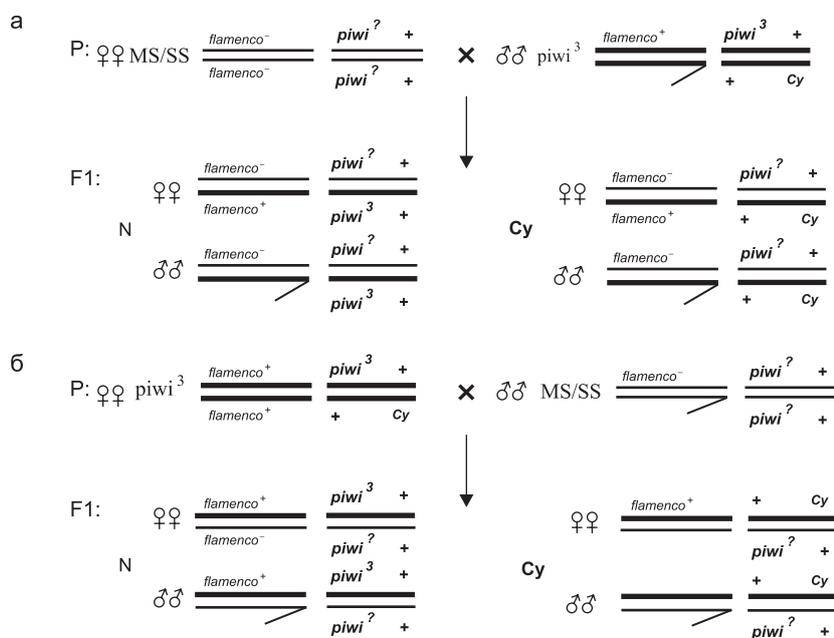


Рис. 1. Схема скрещиваний линий SS и MS с линией *piwi*³.

а – прямое скрещивание; б – обратное. Фенотипические классы: *N* – мухи с прямыми крыльями, *Cy* – мухи с загнутыми крыльями. Объяснения в тексте.

Су, т. е. 2 : 1. В результате проведенного анализа было выявлено, что лишь в одном случае из 100 скрещиваний расщепление 2 : 1 было достоверным, что, безусловно, является случайным событием. Во всех остальных индивидуальных скрещиваниях наблюдалось расщепление 1 : 1. Таким образом, даже если в наших линиях имеется мутация в гене *piwi*, то она не является летальной, а значит, потомство N будет относительно однородным, поскольку не происходит гибели особей с определенным генотипом. В связи с этим дальнейший анализ не будет искажен вышеизложенными факторами.

Еще одно подтверждение того, что серьезных нарушений в гене *piwi* в линиях MS и SS нет, было получено при сборе тканей для последующей экстракции РНК. Было проанализировано не менее 100 гонад каждого генотипа N и обнаружено, что у всех потомков N яичники имели нормальную морфологию.

Тем не менее это не исключает наличия полиморфных вариантов гена *piwi*, которые могут не оказывать существенного влияния на жизнеспособность и плодовитость мух, но при этом они могут быть не способны обеспечивать посттранскрипционный сайленсинг ретро-транспозонов в полной мере. В связи с этим функциональный тест на данном этапе работы являлся актуальным.

Линия SS не содержит активно транскрибируемых копий *gypsy*; линии MS и *piwi*³ содержат активные копии *gypsy*, транскрибируемые на высоком уровне за счет нарушения генетического контроля со стороны локуса *flamenco* (или гена *piwi*?) и гена *piwi* соответственно (рис. 2). Поэтому уровень экспрессии *gypsy* служил индикатором наличия/отсутствия нарушений в гене *piwi* линий SS и MS. При положительном результате теста мы ожидали, что особи N продемонстрируют высокий уровень экспрессии *gypsy*, причем значительно превышающий экспрессию в тканях родительских линий, поскольку ранее было показано, что мутации в гене *piwi* в гомозиготном состоянии могут приводить к 150-кратному увеличению экспрессии *gypsy* в яичниках по сравнению с гетерозиготными особями (Brennecke *et al.*, 2007). При отрицательном же результате особи N должны демонстрировать заниженный уровень экспрессии *gypsy* либо такой же, как и у родительских линий. В результате экспериментов было обнаружено, что в яичниках гибридов фенотипического класса N, полученных как от прямого скрещивания ♀MS × ♂*piwi*³ (рис. 2, а, N_{пр.}), так и от обратного скрещивания ♀*piwi*³ × ♂MS (рис. 2, а, N_{обр.}), наблюдается примерно 17-кратное снижение экспрессии по сравнению с яичниками линии MS и 12-кратное снижение

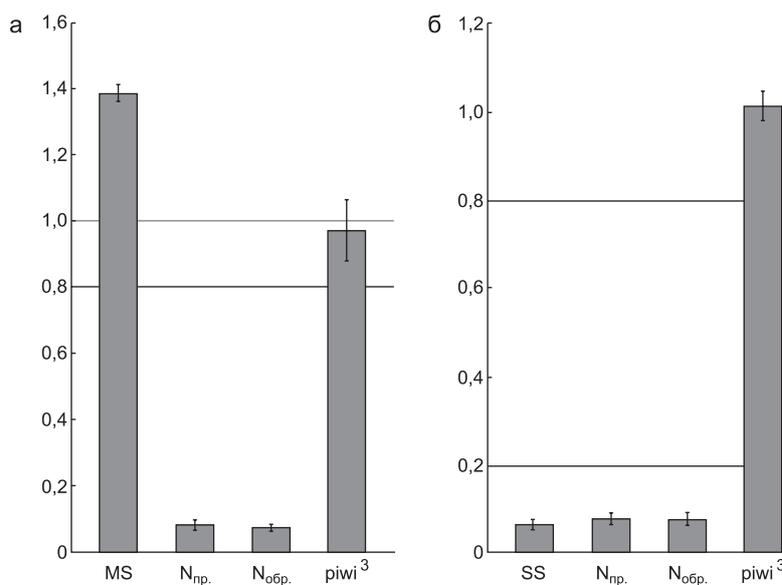


Рис. 2. Уровень транскрипции *gypsy* в яичниках линий MS, *piwi*³ и их гибридов от прямого (N_{пр.}) и обратного (N_{обр.}) скрещиваний (а) и линий SS, *piwi*³ и их гибридов от прямого (N_{пр.}) и обратного (N_{обр.}) скрещиваний (б).

относительно яичников другой родительской линии – $piwi^3$.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что результат теста отрицательный. Мутаций в гене $piwi$, приводящих к нарушению его функции, связанной с контролем ретротранспозиции $gypsy$, в изогенных линиях MS и SS не имеется.

Следует отметить, что для решения поставленной задачи мы учитывали экспрессию $gypsy$ только у потомков с фенотипом N. Гибриды другого фенотипического класса, Су, наследуют хромосому с нормальным аллелем $piwi$ от линии $piwi^3$, в связи с чем это потомство является неполне информативным. Однако в случае отрицательного результата функционального теста данный класс мух можно было использовать в качестве дополнительного контроля, ожидая сходный характер транскрипции $gypsy$ у гибридов N и Су.

Неожиданно было обнаружено, что уровень транскрипции $gypsy$ во всех тканях фенотипического класса Су оказался значительно выше, чем у особей N. При этом ни в одном случае он не превысил значений, по крайней мере, одной из родительских линий – $piwi^3$. Такая закономерность была выявлена во всех исследованных нами тканях, что позволило сделать вывод о достоверности опыта в целом. По-видимому, наблюдаемое различие между классами мух N и Су связано с наличием у мух линии Су соответствующей мутации, представляющей собой перичентрическую инверсию второй хромосомы, которую гибриды Су наследуют вместе с балансерной хромосомой СуО. Аналогичный эффект (когда в фенотипическом классе Су экспрессия $gypsy$ выше, чем в классе N) мы обнаружили после анализа потомков от скрещивания SS и MS с другими лабораторными линиями, также сбалансированными хромосомой СуО (данные не представлены).

Поскольку транскрипция $gypsy$ в линии $piwi^3$ много ниже, чем в линии, гомозиготной по гену $piwi$ (Brennecke *et al.*, 2007), можно сделать вывод о том, что инверсия если и влияет на экспрессию гена $piwi$, то незначительно. Известно, что помимо гена $piwi$ вторая хромосома содержит два крупных кластера piRNA (Brennecke *et al.*, 2007). По-видимому, инверсия может нарушать экспрессию кластеров piRNA в балансерной хромосоме.

В яичниках гибридов N, полученных от другой пары скрещиваний, $\text{♀SS} \times \text{♂}piwi^3$, $\text{♀}piwi^3 \times \text{♂SS}$ – наблюдалась практически та же самая картина экспрессии $gypsy$ (рис. 2, б). Уровень транскрипции $gypsy$ в яичниках гибридов N и яичниках SS оказался одинаковым. Это связано с тем, что в SS отсутствуют активные копии данного МГЭ, способные к перемещению.

В семенниках снижение транскрипции $gypsy$ в гибридах N относительно экспрессии в тканях родительских линий наблюдалось только в обратном скрещивании (рис. 3, а, б N_{обр.}). В прямом же скрещивании было обнаружено, что уровень экспрессии $gypsy$ в таких гибридах оказался незначительно выше, чем в семенниках родительской линии $piwi^3$, и в несколько раз выше, чем в линиях SS и MS (рис. 3, а, б, N_{пр.}). Различное проявление признака (экспрессия $gypsy$) у гибридов прямого и обратного скрещиваний означает, что локус, контролирующий данный признак, сцеплен с X-хромосомой. Действительно, только самцы от прямого скрещивания наследуют свою единственную X-хромосому от линий SS или MS (рис. 1), которая, как предполагается, несет мутантный аллель *flamenco*. Гибридные самцы, полученные от обратного скрещивания, наследуют X-хромосому от линии $piwi^3$ и не демонстрируют повышенной экспрессии $gypsy$.

Обращает на себя внимание тот факт, что в семенниках родительских линий MS и SS уровень транскрипции $gypsy$ различается не в 20 раз, как в яичниках, а только в 2; при этом уровень транскрипции $gypsy$ и в семенниках, и в яичниках мутантов по гену $piwi$ остается примерно одинаковым. По-видимому, в семенниках и яичниках регуляция активности ретротранспозона $gypsy$ осуществляется по-разному. Возникает также вопрос, почему в семенниках SS и MS, которые, как и гибриды N, имеют мутантный аллель *flamenco*, количество РНК ниже, чем в гибридах. Это можно объяснить тем, что у гибридов N повышение транскрипции $gypsy$ происходит за счет нарушенной активности одного из аллелей $piwi$ (чего нет в линии MS) и отсутствия нормального аллеля *flamenco*. Таким образом, в гибридах N мы наблюдаем комплементарное взаимодействие генов $piwi$ и *flamenco* у самцов. Следует учитывать то, что локус *flamenco* – это источник антисмысло-

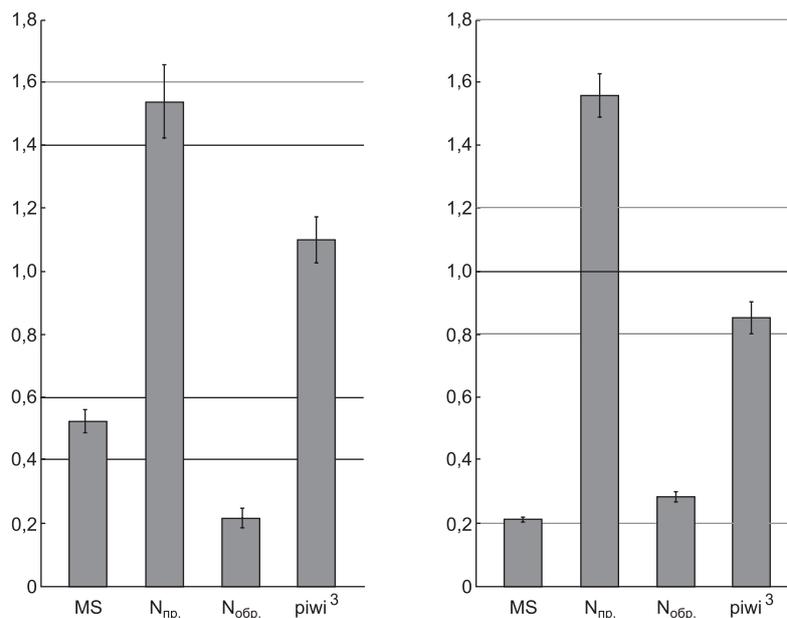


Рис. 3. Уровень транскрипции *gypsy* в семенниках линий MS, *piwi*³ и их гибридов от прямого (N_{пр.}) и обратного (N_{обр.}) скрещиваний (слева) и линий SS, *piwi*³ и их гибридов от прямого (N_{пр.}) и обратного (N_{обр.}) скрещиваний (справа).

вых РНК для гена *piwi*. Поэтому в линии MS транскрипция *gypsy* может быть ослаблена по сравнению с гибридами N за счет других альтернативных источников антисмысловых РНК, которые существуют помимо локуса *flamenco* (Brennecke *et al.*, 2007) и активнее работают в семенниках. При этом очевидно, что локус *flamenco* является основным.

Контрольные эксперименты по измерению уровня транскрипции *gypsy* в семенниках были выполнены на гибридах N пр. и N обр. от скрещивания *piwi*³ с линией Д32, которая охарактеризована как линия с фенотипом *flamenco*⁺. В данных опытах различия в экспрессии *gypsy* между N_{пр.} и N_{обр.} не обнаружены (результаты не представлены). Полученные результаты являются подтверждением того, что ген *piwi* в линиях SS и MS находится в функциональном состоянии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основной целью данной работы являлась экспериментальная проверка линий MS и SS на наличие мутаций в гене *piwi*, продукт которого принимает непосредственное участие в процессинге длинного РНК-предшественника до

коротких piRNA, необходимых для посттранскрипционной регуляции ретротранспозонов. В результате скрещивания мух линий MS и SS с генотипом *flamenco* с мухами линии *piwi*³ и последующего анализа уровня РНК *gypsy* у гибридного потомства было обнаружено, что мутации в гене *piwi* в тестируемых линиях нет. Уровень экспрессии *gypsy* у гибридов не превысил значений у родительских форм почти во всех исследованных нами тканях (кроме семенников прямого скрещивания). Также в пользу отсутствия мутации в гене *piwi* в наших линиях свидетельствуют данные о расщеплении в потомстве индивидуальных скрещиваний SS и *piwi*³ на фенотипические классы N и Су в соотношении 1 : 1 и тот факт, что у всех гибридов яичники имели нормальную морфологию. Тем не менее линии SS и MS можно рассматривать как хорошую модельную систему для изучения фундаментального процесса РНК-интерференции, в особенности вопроса происхождения эндогенных антисмысловых РНК. Следует отметить, что эта проблема изучена недостаточно, поскольку охарактеризованы не все факторы, участвующие в процессинге РНК-предшественника.

Следующий факт, на который стоит обратить внимание, это отсутствие в наших экспери-

ментах материнского эффекта генов *flamenco* и *piwi*. Наличие материнского эффекта для гена *flamenco* было обнаружено с момента его описания. Было показано, что активные транспозиции *gypsy* происходят у потомков, полученных от гомозиготных мутантных самок, даже в том случае, когда они наследуют нормальный аллель *flamenco* от отца (Pélisson *et al.*, 1994). По аналогии в наших экспериментах мы могли бы детектировать высокий уровень транскрипции у потомства, полученного от гомозиготных по *flamenco* самок (рис. 1). В результате оказалось, что у самок N уровень транскрипции был одинаково низким независимо от статуса *flamenco* у самок-родителей (рис. 2, а, б). Однако следует учитывать, что в наших экспериментах «нормальные» по *flamenco* самки были мутантными по *piwi*. Таким образом, самки-родители в прямом и обратном скрещивании имели одинаковый фенотип – повышенный уровень экспрессии *gypsy*, и материнский эффект нивелировался.

Детекция транспозиционных событий – относительно трудоемкая процедура, осложняющая генетический анализ. Один из таких способов – Ovo^D тест, предполагающий анализ инсерций в «горячую точку» транспозиций *gypsy in vivo* – в ген Ovo^D (Prud'homme *et al.*, 1995). Однако он трудоемок, и его не всегда можно применять в полном объеме, так как не всегда удастся создать необходимые комбинации генов (результат зависит от дизайна эксперимента и направления скрещивания), кроме того, он позволяет только зарегистрировать транспозицию МГЭ, но не позволяет изучать молекулярные механизмы ее контроля. Вот почему новый подход, базирующийся на анализе экспрессии *gypsy* в семенниках гибридов, может быть успешно применен для решения вопроса о том, какие же на самом деле механизмы контроля *gypsy* нарушены в линиях MS и SS.

Следует также отметить, что локус *flamenco* имеет высокую степень гетерогенности в своей структуре. В разных линиях и природных популяциях могут существовать разные аллели этого гена. Причина фенотипа *flamenco*⁻ в каждом случае может быть разной. Функционально аллели *flamenco* также могут различаться по их тканеспецифичному контролю ретротранспозонов. Чаще обсуждается контроль ретротранспозонов со стороны этого гена в яичниках

(Pélisson *et al.*, 1994; Mevel-Ninio *et al.*, 2007). Наши результаты показывают, что такие же процессы происходят и в семенниках. В литературе также имеются сведения об участии РНК-интерференции, в частности гена *piwi*, в контроле ретротранспозонов в мужских половых тканях (Kalmykova *et al.*, 2005).

В настоящее время РНК-интерференция и процессы, ею регулируемые, интенсивно изучаются. Идентифицируются новые гены, отвечающие за контроль МГЭ с помощью посттранскрипционного сайленсинга (Handler *et al.*, 2011; Anand, Kai, 2012). Расширяются представления о роли piRNA-пути в регуляции не только активности транспозонов, но и структуры хроматина, фундаментальных процессов, обеспечивающих целостность генома (Mani, Juliano, 2013). По этой причине наши линии можно эффективно использовать для дальнейших исследований генетических механизмов контроля не только ретротранспозона *gypsy*, но и других родственных ему МГЭ.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 11-04-00403-а).

ЛИТЕРАТУРА

- Anand A., Kai T. The tudor domain protein kumo is required to assemble the nuage and to generate germline piRNAs in *Drosophila* // EMBO J. 2012. V. 31. No. 4. P. 870–882.
- Brennecke J., Aravin A.A., Stark A. *et al.* Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila* // Cell. 2007. V. 128. No. 6. P. 1089–1103.
- Cox D.N., Chao A., Baker J. *et al.* Novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal // Genes Dev. 1998. V. 12. No. 23. P. 3715–3727.
- Cox D.N., Chao A., Lin H. *Piwi* encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells // Development. 2000. V. 127. No. 3. P. 503–514.
- Desset S., Meignin C., Dastugue B., Vaury C. COM, a heterochromatic locus governing the control of independent endogenous retroviruses from *Drosophila melanogaster* // Genetics. 2003. V. 164. No. 2. P. 501–509.
- Handler D., Olivieri D., Novatchkova M. *et al.* A systematic analysis of *Drosophila* TUDOR domain-containing proteins identifies Vreteno and the Tdrd12 family as essential primary piRNA pathway factors // EMBO J. 2011. V. 30. No. 19. P. 3977–3993.
- Kalmykova A.I., Klenov M.S., Gvozdev V.A. Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the

- Drosophila* male germline // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. No. 6. P. 2052–2059.
- Kim A., Terzian C., Santamaria P. *et al.* Retroviruses in invertebrates: the *gypsy* retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *Drosophila melanogaster* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994a. V. 91. No. 4. P. 1285–1289.
- Kim A.I., Lyubomirskaya N.V., Belyaeva E.S. *et al.* The introduction of a transpositionally active copy of retrotransposon *gypsy* into the Stable Strain of *Drosophila melanogaster* causes genetic instability // Mol. Gen. Genet. 1994b. V. 242. No. 4. P. 472–477.
- Leblanc P., Desset S., Giorgi F. *et al.* Life cycle of an endogenous retrovirus, ZAM, in *Drosophila melanogaster* // J. Virol. 2000. V. 22. P. 10658–10669.
- Lee Y.S., Nakahara K., Pham J.W. *et al.* Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways // Cell. 2004. V. 117. P. 69–81.
- Lin H., Spradling A.C. A novel group of *pumilio* mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary // Development. 1997. V. 124. No. 12. P. 2463–2476.
- Lu J., Clark A.G. Population dynamics of PIWI-interacting RNAs (piRNAs) and their targets in *Drosophila* // Genome Res. 2010. V. 20. No. 2. P. 212–227.
- Malone C.D., Brennecke J., Dus M. *et al.* Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary // Cell. 2009. V. 137. No. 3. P. 522–535.
- Mani S.R., Juliano C.E. Untangling the web: The diverse functions of the PIWI/piRNA pathway // Mol. Reprod. Dev. 2013. DOI 10.1002/mrd.22195.
- Megosh H.B., Cox D.N., Campbell C., Lin H. The role of PIWI and the miRNA machinery in *Drosophila* germline determination // Curr. Biol. 2006. V. 16. No. 19. P. 1884–1894.
- Mevel-Ninio M., Pelisson A., Kinder J. *et al.* The *flamenco* locus controls the *gypsy* and *ZAM* retroviruses and is required for *Drosophila* oogenesis // Genetics. 2007. V. 175. No. 4. P. 1615–1624.
- Péligsson A., Sarot E., Payen-Groschne G., Bucheton A. A novel repeat-associated small interfering RNA-mediated silencing pathway downregulates complementary sense *gypsy* transcripts in somatic cells of the *Drosophila* ovary // J. Virol. 2007. V. 81. No. 4. P. 1951–1960.
- Péligsson A., Song S.U., Prud'homme N. *et al.* *Gypsy* transposition correlates with the production of a retroviral envelope-like protein under the tissue-specific control of the *Drosophila flamenco* gene // EMBO J. 1994. V. 13. No. 18. P. 4401–4411.
- Prud'homme N., Gans M., Masson M. *et al.* *Flamenco*, a gene controlling the *gypsy* retrovirus of *Drosophila melanogaster* // Genetics. 1995. V. 139. No. 2. P. 697–711.
- Robert V., Prud'homme N., Kim A. *et al.* Characterization of the *flamenco* region of the *Drosophila melanogaster* genome // Genetics. 2001. V. 158. No. 2. P. 701–713.
- Sarot E., Payen-Groschne G., Bucheton A., Péligsson A. Evidence for a *piwi*-dependent RNA silencing of the *gypsy* endogenous retrovirus by the *Drosophila melanogaster flamenco* gene // Genetics. 2004. V. 166. No. 3. P. 1313–1321.

GENETIC AND MOLECULAR ANALYSIS OF COMPLEMENTATION OF THE *FLAMENCO* AND *PIWI* LOCI IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

F.A. Urusov, L.N. Nefedova, A.R. Lavrenov, N.I. Romanova, A.I. Kim

M.V. Lomonosov Moscow State University, Department of Genetics, Moscow, Russia,
e-mail: aikim57@mail.ru

It is believed that the heterochromatic locus *flamenco*, controlling transposition of retrotransposon/retrovirus *gypsy* in *Drosophila melanogaster*, is a source of Piwi-interacting RNA. Piwi is the primary component of the RNA interference machinery. Mutations in *piwi* and *flamenco* have the same phenotype – an enhanced transcription and frequency of transposition of the retrotransposon/retrovirus *gypsy*. This paper discusses the results of the complementation test, which involves crossing strains MS and SS, mutant for the *flamenco* locus, with the *piwi* strain³, heterozygous for a mutation in the *piwi* gene, followed by study of the transcription level of *gypsy* in the ovaries and testes of hybrids derived from these crosses. Genetic (hybridological) and molecular analysis of the interaction of the *flamenco* and *piwi* loci has been conducted. It has been revealed that transcription of *gypsy* is differently regulated in testis and ovaries of strains SS and MS, apparently owing to the different activity of piRNA clusters in these tissues. It has been also shown that the *piwi* and *flamenco* genes interact complementarily in testis tissue.

Key words: *Drosophila melanogaster*, *flamenco*, *piwi*, molecular analysis.

УДК 577.24

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ГЕНОВ ОПУХОЛЕВОЙ СУПРЕССИИ В МЕХАНИЗМАХ СТАРЕНИЯ И ДОЛГОЛЕТИЯ НА МОДЕЛИ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2013 г. С.А. Копыл¹, Л.В. Омелянчук¹,
М.В. Шапошников^{2,3}, А.А. Москалев^{2,3,4}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия, e-mail: ome@mcb.nsc.ru;

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, Россия;

³ ФГБОУ ВПО Сыктывкарский государственный университет, Сыктывкар, Россия;

⁴ Московский физико-технический институт (государственный университет), Москва, Россия

Поступила в редакцию 19 июля 2013 г. Принята к публикации 16 августа 2013 г.

Гены-супрессоры опухолей участвуют в контроле клеточной гибели и клеточного старения, однако их роль в регуляции продолжительности жизни организма изучена недостаточно. Цель настоящей работы состояла в исследовании влияния гетерозиготности по генам онкосупрессоров на показатели продолжительности жизни и старение *Drosophila melanogaster*. Показано, что гетерозиготные мутации в генах *l(3)hem*, *hyd*, *gd*, *ex* и *ft* ведут к снижению средней продолжительности жизни у самок и самцов. Анализ параметров уравнения Гомпертца (обычно используемого для описания кривой выживаемости у дрозофилы) выявил, что мутации *l(3)hem*, *hyd* и *gd* увеличивают возрастную компоненту (α) смертности у самок, в то время как мутация в гене *gd* вызывает увеличение фоновой компоненты смертности (R), а *ex* – возрастную компоненту смертности у самок. Модулирующий эффект мутаций в генах онкосупрессоров на продолжительность жизни согласуется с их участием в контроле старение-ассоциированных сигнальных путей hedgehog (*hyd*), Notch (*gd*) и Hippo (*ex* и *ft*).

Ключевые слова: продолжительность жизни, опухолевые супрессоры, кривая Гомпертца, *Drosophila melanogaster*.

ВВЕДЕНИЕ

Старение обуславливает развитие большого количества возраст-зависимых патологий, которые не только сокращают длительность, но и катастрофически ухудшают качество жизни человека (Harman, 1981). Поэтому поиск эволюционно консервативных генов, способных влиять на скорость старения, является приоритетной задачей биogerонтологии. По данным базы данных «GenAge» (<http://genomics.senescence.info/genes/>), идентифицировано более 1700 генов, регулирующих продолжительность жизни модельных организмов, и их перечень постоянно увеличивается (Tascutu *et al.*, 2013). Продукты «геронтогенов» (генов, конт-

ролирующих старение и продолжительность жизни) могут быть мишенями для процедуры молекулярного моделирования (computer-aided drug design), предназначенной для разработки новых лекарственных средств, направленных на лечение возраст-зависимых патологий.

Гены-супрессоры опухолей участвуют в контроле таких ассоциированных со старением эволюционно консервативных клеточных функций, как регуляция клеточного цикла и апоптоза, дифференцировка и клеточная адгезия, поддержание стабильности генома и репарация повреждений ДНК (Budovsky *et al.*, 2009; Вайсман, 2013). Анализ взаимосвязей между генами/белками, ассоциированными с долгожительством и канцерогенезом, позво-

лил выявить существующую от дрожжей до человека тенденцию: супрессоры опухолевого роста связаны с увеличением продолжительности жизни, тогда как онкогены связаны со снижением продолжительности жизни (Kinzler, Vogelstein, 1997; Вайсман и др., 2012).

Таким образом, функции опухолевых супрессоров тесно связаны с механизмами старения клетки и регуляции продолжительности жизни организма. В связи с этим цель настоящей работы состояла в исследовании влияния гетерозиготности по мутациям генов онкосупрессоров на показатели продолжительности жизни и старение *Drosophila melanogaster*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии *Drosophila melanogaster*

В работе использовались следующие линии. *w* (генотип: *w¹¹¹⁸/w¹¹¹⁸*) – лабораторная линия дикого типа, маркированная аллелем *w¹¹¹⁸*, получена из коллекции Университета штата Индиана (Блумингтон, США).

В экспериментах также использовали линии с мутациями в генах опухолевых супрессоров:

l(3)hem (генотип: *l(3)hem²/TM6B, Tb¹*) – содержит мутацию в гене *l(3)hem* (*lethal (3) hematopoiesis missing*). Мутация в гене *l(3)hem* ведет к нарушениям контроля клеточного деления, что вызывает отсутствие гемопоэза, остановку деления оптических нейробластов и изменения в имагинальных дисках (Gateff, 1994). Линия предоставлена доктором Гатефф (Университет Иоганна Гутенберга, Майнц, Германия).

hyd (генотип: *kni^{ri-1} hyd¹⁵ e¹/TM3, Sb¹*) – содержит мутацию в гене *hyd* (*hyperplastic discs*). Продуктом гена *hyd* является убиквитин-лигаза, которая подавляет экспрессию генов *hedgehog* и *decapentaplegic* (Lee et al., 2002) и участвует в регуляции клеточной пролиферации в имагинальных дисках и клетках зародышевой линии (Mansfield et al., 1994). Мутация в гене *hyd* вызывает гиперпролиферацию клеток имагинальных дисков, злокачественные образования и нарушение сперматогенеза (Pertseva et al., 2010). Получена из коллекции Блумингтоновского центра.

gd (генотип: *y w; l(2)gd^{d7} ptc-lacZ/CyO, y⁺*) – содержит мутацию в гене *l(2)gd* (*lethal (2) giant discs*). Мутация в гене *l(2)gd* ведет к активации

Notch-сигналинга по лиганд-независимому механизму (Jaekel, Klein, 2006). Потеря функции гена *l(2)gd* вызывает гиперпролиферацию клеток имагинальных дисков (Bryant et al., 1993). Данная линия синтезирована в лаборатории клеточного цикла ИМКБ СО РАН на основе аллеля *l(2)gd^{d7}*, предоставленного ранее доктором Бриант (Университет Калифорнии, Ирвин, США).

ex (генотип: *ex^{e1}; Sb/TSTL, Tb*) – содержит мутацию в гене *l(2)ex* (*expanded*). Белок Expanded известен как начальный компонент Hippo-зависимого сигнального пути, ключевого регулятора размера органов у дрозофилы путем контроля баланса между клеточной пролиферацией и апоптозом (Namaratoglu et al., 2006). Ген *l(2)ex* оказывает отрицательную регуляцию на рост тканей имагинальных дисков и индуцирует апоптоз (Blaumueller, Mlodzik, 2000). Данная линия синтезирована в лаборатории клеточного цикла ИМКБ СО РАН на основе аллеля *ex^{e1}*, полученного ранее из коллекции Блумингтоновского центра.

ft (генотип: *y w; l(2)ft^{d4}/CyO, y⁺*) – содержит мутацию в гене *l(2)ft* (*fat*). Продуктом гена *l(2)ft* является атипичный кадгерин (Willecke et al., 2006), функционирующий как поверхностный рецептор зависимого от Hippo-сигнального пути (Silva et al., 2006). Потеря функции гена *fat* ведет к дерегуляции уровня экспрессии *Cyclin E* и *Diap1* и гипертрофии имагинальных дисков (Namaratoglu et al., 2006; Silva et al., 2006). Линия *ft* синтезирована на основе аллеля *l(2)ft^{d4}*, предоставленного доктором Гарсия-Беллидо (Автономный университет Мадрида, Испания).

Анализ продолжительности жизни проводили у гетерозигот – гибридов первого поколения, полученных от скрещиваний самок линии *w* с самцами мутантных линий *l(3)hem*, *hyd*, *gd*, *ex* или *ft*. Контрольных и опытных мух содержали при температуре $25 \pm 0,5$ °C и искусственном режиме освещения 12 ч день : 12 ч ночь. В пробирки объемом 30 мл, содержащие 2 мл сахарно-дрожжевой среды, рассаживали по 20 особей одного пола и возраста (Ashburner, 1989). Мух пересаживали на свежую среду 2 раза в неделю. Продолжительность жизни анализировали ежедневно, отдельно у самцов и самок.

Оценивали среднюю, медианную, максимальную продолжительность жизни и возраст

гибели 90 % особей выборки. Для оценки достоверности различий по медианной продолжительности жизни применяли критерий Ментеля–Кокса. При оценке статистической значимости отличий по максимальной продолжительности жизни использовали критерий Ван-Аллисона (Wang *et al.*, 2004). Статистическую обработку данных проводили с помощью программы R, версия 2.15.1 (The R Foundation for Statistical Computing).

Кривые выживаемости для самцов и самок различных генотипов обрабатывали в специально разработанной программе, написанной в программной среде Mathcad 14 (PTC Inc.), которая позволяет определить параметры кривой Гомпертца. Траектория смертности в модели Гомпертца описывается выражением (Wilson, 1994):

$$F(t, R, \alpha) = \exp((R/\alpha) \times (1 - \exp(\alpha \times t))),$$

где t – возраст, R – скорость гибели при рождении особи (мы называем ее – фоновая компонента смертности), α – скорость смертности в экспоненциальной фазе гибели (мы называем ее – возрастная компонента смертности). Для каждой экспериментальной кривой, заданной набором экспериментальных точек M_i (вероят-

ность гибели особи по достижению возраста i), рассчитывали функцию:

$$Fn(R, \alpha) = \sum (M_i - F(i, R, \alpha))^2,$$

у которой далее находили минимум в координатах (R, α) с использованием программной среды Mathcad 14 с помощью метода наименьших квадратов (LeastSquaresFit) из пакета обновлений для анализа данных (DataAnalysisExtensionPack).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 1 представлены результаты анализа влияния гетерозиготного состояния по генам онкосупрессоров на продолжительность жизни. Установлено, что гетерозиготность по мутациям в генах *l(3)hem*, *hyd*, *gd*, *ex* или *ft* ведет к существенному снижению медианной продолжительности жизни (на 13–46 % и 7–28 %) и возраста гибели 90 % особей выборки (на 11–33 % и 11–22 %) самок и самцов соответственно.

Дополнительно для оценки скорости старения исследуемых линий проводили расчет параметров уравнения Гомпертца. На рис. 1 и 2 приведены кривые выживаемости для самок и самцов, гетерозиготных по мутациям в

Таблица 1

Параметры продолжительности жизни у особей, гетерозиготных по мутациям в генах опухолевых супрессоров

Вариант	Параметры продолжительности жизни					
	Mean ± SE	M	90 %	R	α	n
<i>w</i>	46,8 ± 1,1	52,5	63	0,00246	0,0638	212
<i>w/l(3)hem</i>	41,5 ± 1	42**	56	0,00169	0,072735	245
<i>w/hyd</i>	35,5 ± 1	38,5**	49*	0,00267	0,095139	170
<i>w/gd</i>	34 ± 1	38,5**	56*	0,0107	0,0625	232
<i>w/ex</i>	30,6 ± 0,8	28**	42*	0,00262	0,0928	109
<i>w/ft</i>	44,7 ± 1,1	45,5	70*	0,00246	0,0767	216
<i>w</i>	43,2 ± 1,2	49	63	0,00279	0,0686	185
<i>w/l(3)hem</i>	36,3 ± 0,7	35**	49**	0,00180	0,109	241
<i>w/hyd</i>	36,4 ± 0,9	35**	49**	0,00267	0,095139	181
<i>w/gd</i>	33,9 ± 0,9	35**	49**	0,00369	0,0874	203
<i>w/ex</i>	36,4 ± 1,1	38,5	49**	0,002629	0,09287	130
<i>w/ft</i>	42,1 ± 0,9	45,5*	56**	0,00246	0,0767	210

П р и м е ч а н и е. Mean ± SE – средняя продолжительность жизни и стандартная ошибка; M – медианная; 90 % – возраст смертности 90 % выборки; α и R – параметры уравнения Гомпертца; n – количество особей в выборке. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ – критерий Ментеля–Кокса для медианной продолжительности жизни; критерий Ван-Аллисона для возраста смертности 90 % выборки.

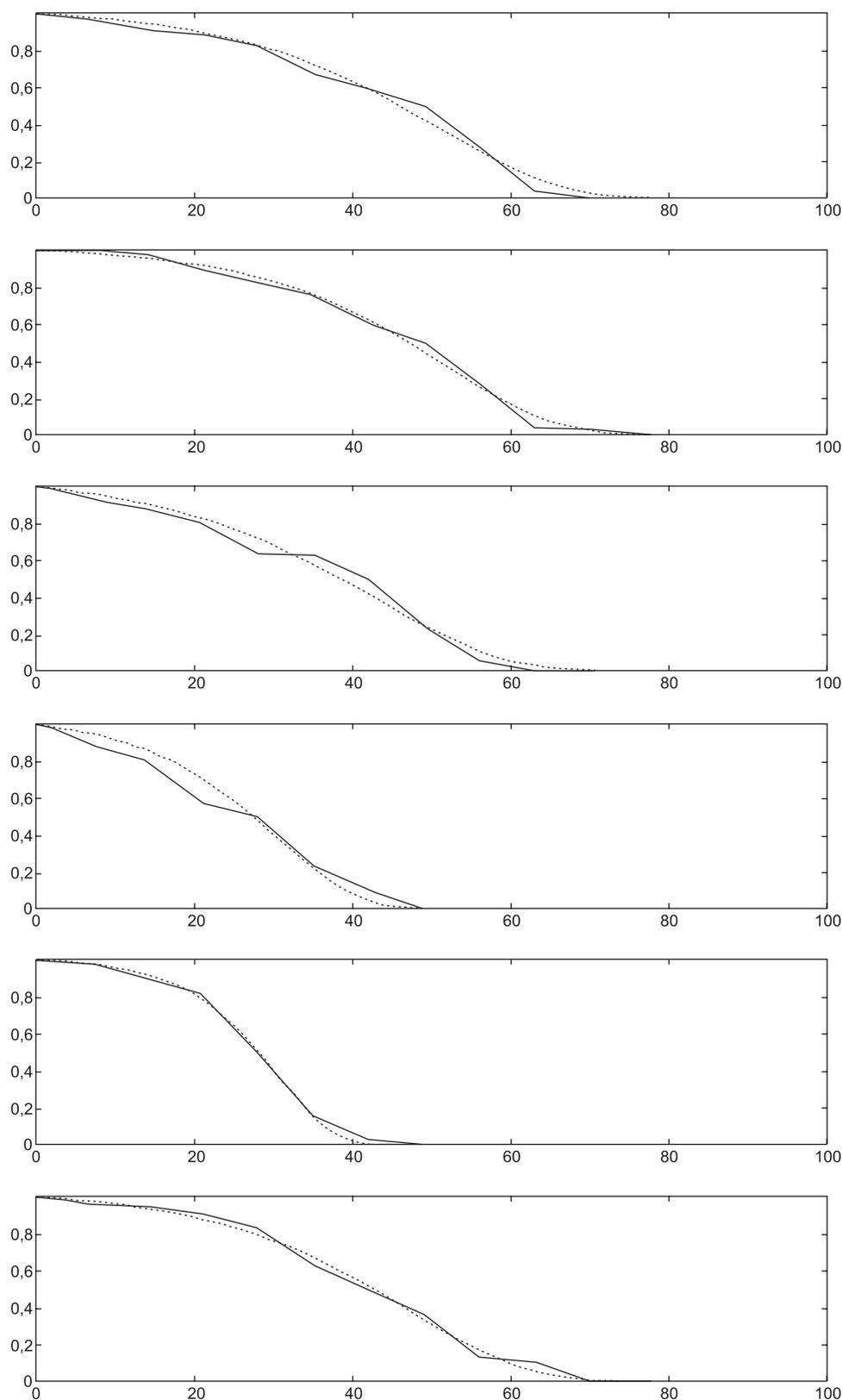


Рис. 1. Экспериментальные (непрерывные линии) и теоретические кривые (пунктирные линии) выживаемости для самок, гетерозиготных по опухолевым супрессорам.

Сверху вниз: контроль *w*, *l(3)hem*, *hyd*, *gd*, *ex*, *ft*. Ось абсцисс – время (дни), ось ординат – доля выживших особей.

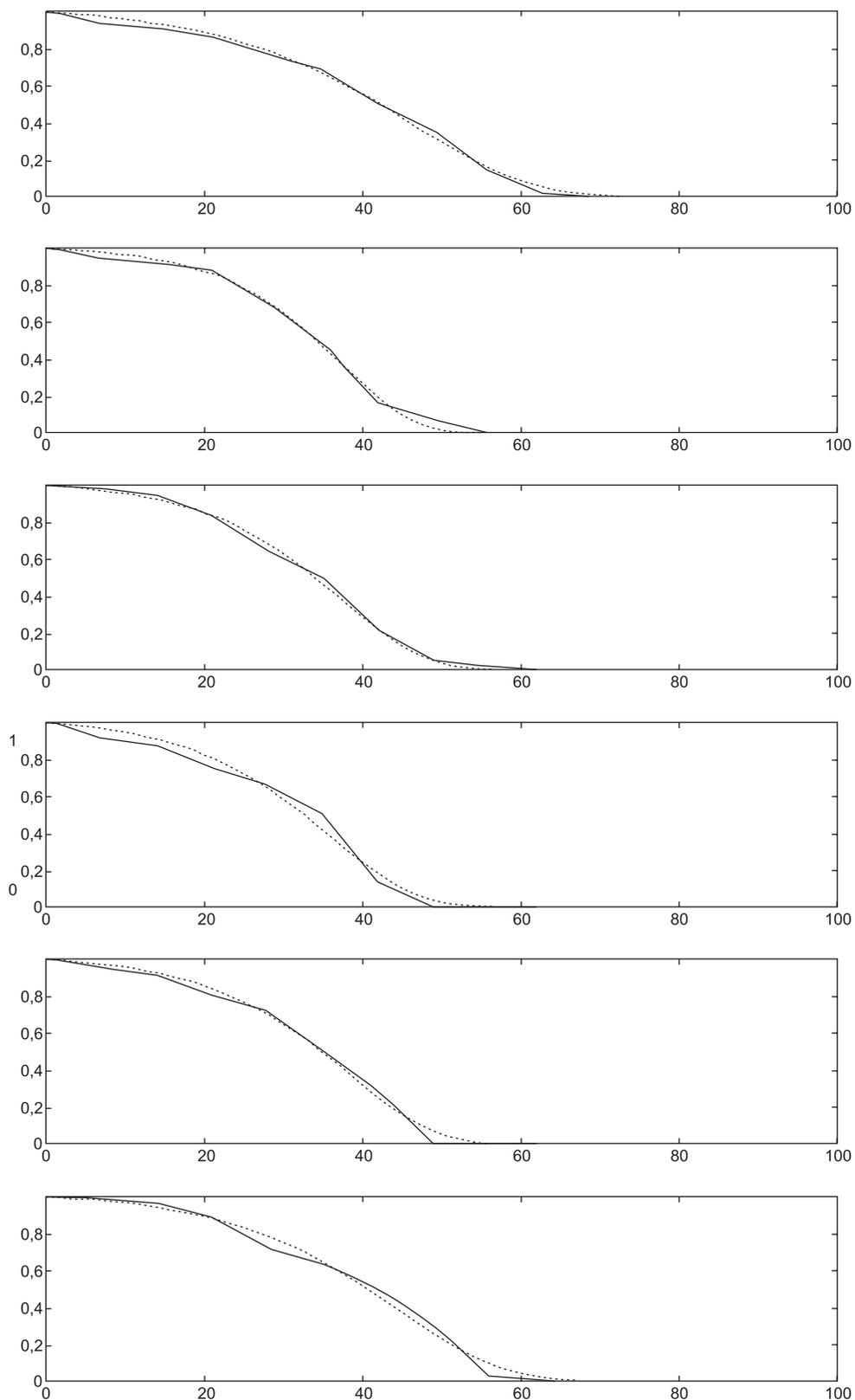


Рис. 2. Экспериментальные (непрерывные линии) и теоретические кривые (пунктирные линии) выживаемости для самцов, гетерозитных по опухолевым супрессорам.

Сверху вниз: контроль *w*, *l(3)hem*, *hyd*, *gd*, *ex*, *ft*. Ось абсцисс – время (дни), ось ординат – доля выживших особей.

генах опухолевых супрессоров *l(3)hem*, *hyd*, *gd*, *ex* и *ft*, и их теоретические аппроксимации в модели Гомпертца. Можно видеть, что как в контроле, так и в опытах оптимальные кривые соответствуют экспериментальным. Это согласуется с данными других авторов, утверждающих, что модель Гомпертца хорошо подходит для описания смертности особей дрозофилы (Гаврилов, Гаврилова, 1991). Каждая теоретическая кривая характеризуется двумя параметрами: R – фоновая компонента смертности и α – возрастная компонента смертности. На рис. 3 и 4 приведены точечные графики, иллюстрирующие значения параметров R и α для различных экспериментов. Визуальный анализ этих диаграмм показывает, что в случае самок опухолевый супрессор *ex* существенно отличается от контроля по параметру α в сторону увеличения, а опухолевые супрессоры *gd* и *hyd* отличаются по значению параметра R в сторону его увеличения. У самцов гетерозиготы по *hem*, *hyd* и *ex* имеют увеличенный параметр α относительно контроля. Гетерозиготы же по опухолевому супрессору *gd* имеют увеличенный параметр R .

Для того чтобы проверить эти наблюдения, провели дополнительное исследование. Для каждого эксперимента (опухолевый супрессор, самцы и самки раздельно) были сформулированы две гипотезы. 1. Контроль и опыт не разли-

чаются по параметру α , но могут иметь разные значения параметра R (α -const). 2. Контроль и опыт не различаются по параметру R , но могут иметь разные значения параметра α (R -const). В первом случае для каждой пары контроль–опыт проводили минимизацию суммарного значения функции F_n для опыта и контроля при варьировании общего для опыта и контроля параметра α и двух параметров R , характеризующих опыт и контроль. Во втором – для каждой пары контроль–опыт проводили минимизацию суммарного значения функции F_n для опыта и контроля при варьировании общего для опыта и контроля параметра R и двух параметров α , характеризующих опыт и контроль. Результаты расчетов приведены в табл. 2.

Анализ данных табл. 2 показывает, что для самок *gd* в сравнении с контролем предпочтительна гипотеза о различных значениях параметра α , а для самок *ex* – противоположная гипотеза. Эти результаты совпадают с ожидаемыми из качественного рассмотрения, проведенного выше. В то же время очевидное из качественного рассмотрения увеличение параметра R для гетерозигот по *hyd* не находит подтверждения при количественном рассмотрении. У самцов для гетерозигот *hem*, *hyd* и *ex* подтверждается гипотеза о различиях в значении параметра α , что хорошо совпадает с результатами визуального анализа.

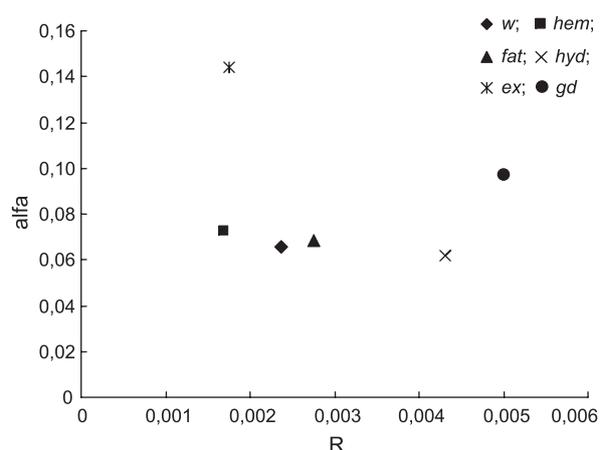


Рис. 3. Значения параметров (R – ось абсцисс и α – ось ординат) модели Гомпертца, аппроксимирующей экспериментальные кривые выживаемости для самок, гетерозиготных по мутациям опухолевых супрессоров.

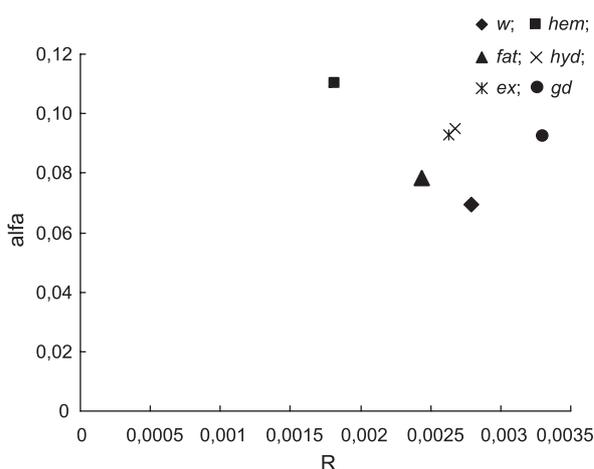


Рис. 4. Значения параметров (R – ось абсцисс и α – ось ординат) модели Гомпертца, аппроксимирующей экспериментальные кривые выживаемости для самцов, гетерозиготных по мутациям опухолевых супрессоров.

Таблица 2
Сравнение гипотез α -const и R-const
для пар контроль–опыт

Вариант	χ^2 (Fn)	
	α -const	R-const
Самки		
<i>w/l(3)hem</i>	0,0269	0,0274
<i>w/hyd</i>	0,03853	0,0452
<i>w/gd</i>	0,02352*	0,0652
<i>w/ex</i>	0,06329	0,0190*
<i>w/ft</i>	0,02483	0,0251
Самцы		
<i>w/l(3)hem</i>	0,0279	0,0129*
<i>w/hyd</i>	0,0179	0,0092*
<i>w/gd</i>	0,0301	0,0236
<i>w/ex</i>	0,0211	0,0134*
<i>w/ft</i>	0,0205	0,0194

* Значения, имеющие лучшее соответствие с экспериментальными данными.

ОБСУЖДЕНИЕ

Нами показано, что мутации в изученных генах супрессоров опухолей (*l(3)hem*, *hyd*, *gd*, *ex* и *ft*) ведут к снижению средней продолжительности жизни. Модулирующий эффект на продолжительность жизни может быть обусловлен вовлеченностью генов онкосупрессоров в старение-ассоциированный внутриклеточный сигналинг. Изученные нами гены опухолевых супрессоров вовлечены в старение-ассоциированные сигнальные пути hedgehog, Notch и Hippo (Carlson *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2010). Кроме того, супрессоры опухолей, включая белки семейства p53/p63/p73, BRCA1, pVHL и WT1, являются ингибиторами транскрипции гена рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 *IGF-1R* (Werner, 2012). Экспериментально установлено, что экспрессия *p53* с доминантно негативным эффектом (*DN-Dmp53-Ct* или *DN-Dmp53-259H*) в нейронах имаго дрозофил ведет к подавлению инсулинового сигналинга и увеличению медианной (на 11–26 %) и максимальной (на 10–16 %) продолжительности жизни (Baueg *et al.*, 2005). Увеличение уровня экспрессии гена опухолевого супрессора Imp-L2 также ведет к подавлению инсулинового сигналинга, увеличе-

нию продолжительности жизни и устойчивости к окислительному стрессу у дрозофилы (Alic *et al.*, 2011). Полученные нами результаты согласуются с ролью супрессоров опухолей как генов, ассоциированных со здоровьем и долголетием (Budovsky *et al.*, 2009).

Проведенный в настоящей работе статистический анализ показал, что детектирование различий параметров возрастной и фоновой компонент смертности для линий дрозофилы с различными генотипами возможно при использовании усовершенствованного нами метода анализа особенностей кривой выживаемости Гомпертца. Мы показали, что в классе генов опухолевых супрессоров имеется ген *gd*, гетерозиготная мутация которого увеличивает фоновую компоненту смертности (R) по сравнению с контролем у самок. У самок также был обнаружен случай противоположного влияния – увеличение возрастной компоненты (*ex*). У самцов были обнаружены только случаи увеличения возрастной компоненты смертности.

Точный биологический смысл параметров R и α уравнения Гомпертца пока еще не выяснен (Olshansky, Carnes, 1997; Sas *et al.*, 2012). Однако в рамках теории отработанной сомы (Kirkwood, 1988) фоновую компоненту смертности R можно интерпретировать как интенсивность гибели особей в начале взрослой жизни, в то время как возрастную компоненту смертности α – как интенсивность лавинообразного накопления молекулярных и клеточных повреждений в стареющем организме (Kirkwood, 2005).

Наше исследование показывает, что гетерозиготные мутации по опухолевым супрессорам могут изменять как первый, так и второй процесс. Отметим, что в нашей выборке мутации, изменяющие возрастную смертность, встречались чаще. Это может говорить о том, что возраст-зависимая гибель более легко может подвергаться модификации как со стороны генетического фона, так и со стороны внешних факторов. Фоновая же компонента более константна; возможно, что мутации, вызывающие увеличение продолжительности жизни, увеличивают именно эту компоненту.

Разделение компонент смертности может быть проведено при помощи стандартных статистических пакетов программ. В этом случае необходимо определить границы варьирования

параметров R и α для опыта и контроля, а затем показать, что опыт и контроль достоверно различаются по первому и второму параметрам. Границы варьирования параметров для опыта и контроля в экспериментах, подобных нашим, всегда велики и достоверность различий показать не удастся. Предложенный способ анализа, в котором сравниваются две альтернативные гипотезы, менее точен: действительно, выбирается только главный параметр, отвечающий за различия. Если при этом значения второго параметра тоже отличаются, то это будет проигнорировано. Однако наш опыт показал, что взамен этого упрощения мы получаем возможность детектирования довольно тонких различий между опытом и контролем.

Таким образом, полученные нами результаты показывают, что задача нахождения генов, преимущественно влияющих на возрастную или фоновую компоненты смертности, является разрешимой при дальнейшем расширении круга изученных мутаций различных генов.

Исследования поддержаны проектом УрО РАН № 12-С-4-1019 и проектом СО РАН № 81.

ЛИТЕРАТУРА

- Вайсман Н.Я. Неожиданные эффекты генов-супрессоров опухоли в онтогенезе дрозофилы // Журн. общ. биологии. 2013. Т. 74. № 2. С. 83–98.
- Вайсман Н.Я., Евгеньев М.Б., Голубовский М.Д. Параллелизм и парадоксальность действия на жизнеспособность и продолжительность жизни мутаций регулятора белков теплового шока *hsf1* и онкосупрессора *l(2)gl* у *Drosophila melanogaster* // Изв. РАН. Сер. биол. 2012. № 1. С. 27–34.
- Гаврилов Л.А., Гаврилова Н.С. Биология продолжительности жизни. М.: Наука, 1991. 280 с.
- Alic N., Hoddinott M.P., Vinti G. *et al.* Lifespan extension by increased expression of the *Drosophila* homologue of the IGF1P7 tumour suppressor // *Aging Cell*. 2011. V. 10. No. 1. P. 137–147.
- Ashburner M. *Drosophila: A Laboratory Handbook*. V. 1. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 1409 p.
- Bauer J.H., Poon P.C., Glatt-Deeley H. *et al.* Neuronal expression of p53 dominant-negative proteins in adult *Drosophila melanogaster* extends life span // *Curr. Biol*. 2005. V. 15. No. 22. P. 2063–2068.
- Blaumueller C.M., Mlodzik M. The *Drosophila* tumor suppressor expanded regulates growth, apoptosis, and patterning during development // *Mech. Dev*. 2000. V. 92. No. 2. P. 251–262.
- Bryant P.J., Watson K.L., Justice R.W. *et al.* Tumor suppressor genes encoding proteins required for cell interactions and signal transduction in *Drosophila* // *Dev. Suppl*. 1993. P. 239–249.
- Budovsky A., Tacutu R., Yanai H. *et al.* Common gene signature of cancer and longevity // *Mech. Ageing Dev*. 2009. V. 130. No. 1/2. P. 33–39.
- Cai J., Zhang N., Zheng Y. *et al.* The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program // *Genes Dev*. 2010. V. 24. No. 21. P. 2383–2388.
- Carlson M.E., Silva H.S., Conboy I.M. Aging of signal transduction pathways, and pathology // *Exp. Cell Res*. 2008. V. 314. No. 9. P. 1951–1961.
- Gateff E. Tumor-suppressor genes, hematopoietic malignancies and other hematopoietic disorders of *Drosophila melanogaster* // *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1994. V. 712. P. 260–279.
- Hamaratoglu F., Willecke M., Kango-Singh M. *et al.* The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis // *Nat. Cell Biol*. 2006. V. 8. No. 1. P. 27–36.
- Harman D. The aging process // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1981. V. 78. No. 11. P. 7124–7128.
- Jaekel R., Klein T. The *Drosophila* Notch inhibitor and tumor suppressor gene lethal (2) giant discs encodes a conserved regulator of endosomal trafficking // *Dev. Cell*. 2006. V. 11. No. 5. P. 655–669.
- Kinzler K.W., Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers // *Nature*. 1997. V. 386. No. 6627. P. 761, 763.
- Kirkwood T.B. The nature and causes of ageing // *Ciba Found Symp*. 1988. V. 134. P. 193–207.
- Kirkwood T.B. Understanding the odd science of aging // *Cell*. 2005. V. 120. No. 4. P. 437–447.
- Lee J.D., Amanai K., Shearn A. *et al.* The ubiquitin ligase Hyperplastic discs negatively regulates hedgehog and decapentaplegic expression by independent mechanisms // *Development*. 2002. V. 129. No. 24. P. 5697–5706.
- Mansfield E., Hersperger E., Biggs J. *et al.* Genetic and molecular analysis of hyperplastic discs, a gene whose product is required for regulation of cell proliferation in *Drosophila melanogaster* imaginal discs and germ cells // *Dev. Biol*. 1994. V. 165. No. 2. P. 507–526.
- Olshansky S.J., Carnes B.A. Ever since Gompertz // *Demography*. 1997. V. 34. No. 1. P. 1–15.
- Pertceva J.A., Dorogova N.V., Bolobolova E.U. *et al.* The role of *Drosophila* hyperplastic discs gene in spermatogenesis // *Cell Biol. Int*. 2010. V. 34. No. 10. P. 991–996.
- Sas A.A., Snieder H., Korf J. Gompertz' survivorship law as an intrinsic principle of aging // *Med. Hypotheses*. 2012. V. 78. No. 5. P. 659–663.
- Silva E., Tsatskis Y., Gardano L. *et al.* The tumor-suppressor gene fat controls tissue growth upstream of expanded in the hippo signaling pathway // *Curr. Biol*. 2006. V. 16. No. 21. P. 2081–2089.
- Tacutu R., Craig T., Budovsky A. *et al.* Human Ageing Genomic Resources: integrated databases and tools for the biology and genetics of ageing // *Nucl. Acids Res*. 2013. V. 41. No. Database issue. P. D1027–1033.
- Wang C., Li Q., Redden D.T. *et al.* Statistical methods for

- testing effects on «maximum lifespan» // *Mech. Ageing Dev.* 2004. V. 125. No. 9. P. 629–632.
- Werner H. Tumor suppressors govern insulin-like growth factor signaling pathways: implications in metabolism and cancer // *Oncogene*. 2012. V. 31. No. 22. P. 2703–2714.
- Willecke M., Hamaratoglu F., Kango-Singh M. *et al.* The fat cadherin acts through the hippo tumor-suppressor pathway to regulate tissue size // *Curr. Biol.* 2006. V. 16. No. 21. P. 2090–2100.
- Wilson D.L. The analysis of survival (mortality) data: fitting Gompertz, Weibull, and logistic functions // *Mech. Ageing Dev.* 1994. V. 74. No. 1/2. P. 15–33.

ROLE OF HETEROZYGOUS TUMOR SUPPRESSORS IN THE LIFE LONGEVITY OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

S.A. Kopyl¹, L.V. Omelyanchuk¹, M.V. Shaposhnikov^{2,3}, A.A. Moskalev^{2,3,4}

¹ Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia,

e-mail: ome@mcb.nsc.ru;

² Institute of Biology, Komi Center of UB RAS, Syktivkar, Russia;

³ Syktivkar State University, Russia;

⁴ Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia

Summary

Role of tumor-suppressor genes in the life longevity has not been studied in detail. The purpose of the current work is to study the influence of heterozygous tumor suppressors on the life span of *Drosophila*. We show that heterozygotes for *l(3)hem*, *hyd*, *gd*, *ex* or *ft*, both females and males, have a shorter life. The analysis of Gompertz curve parameters indicates that the *l(3)hem*, *hyd* or *gd* mutations increase age-related parameter (α) in males, while *gd* mutation increases the death background parameter (R) and the *ex* age-related parameter in females. The effects of the mutations on the life span are probably associated with hedgehog (*hyd*), Notch (*gd*) и Hippo (*ex* и *ft*) signal transduction pathways.

Key words: longevity, tumor suppressors, Gompertz curve, *Drosophila melanogaster*.

УДК 577.24

ОСОБЕННОСТИ КРИВОЙ ВЫЖИВАНИЯ У *DROSOPHILA MELANOGASTER* СО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА *D-GADD45*

© 2013 г. Е.Н. Плюснина^{1,2}, М.В. Шапошников^{1,2}, Е.Н. Андреева³,
А.А. Москалев^{1,2,4}, Л.В. Омелянчук³

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии
Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук,
Сыктывкар, Россия,

e-mail: ome@mcb.nsc.ru;

² ФГБОУ ВПО Сыктывкарский государственный университет, Сыктывкар, Россия;

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, Россия;

⁴ Московский физико-технический институт (государственный университет),
Москва, Россия

Поступила в редакцию 29 июля 2013 г. Принята к публикации 17 августа 2013 г.

Известно, что сверхэкспрессия гена *Gadd45* в нервной системе дрозофилы увеличивает продолжительность жизни. В работе проведена аппроксимация кривых выживания дрозофил в такого рода экспериментах с помощью распределения Гомпертца и показано, что продление жизни достигается за счет изменения параметра R , отражающего интенсивность гибели в начальный момент времени, а не за счет другого параметра распределения Гомпертца, α , отражающего экспоненциально растущую интенсивность гибели. Дополнительно провели анализ кривых выживания для случая радиационного гормезиса (когда облучение малыми дозами радиации вызывает продление жизни особей) и также подтвердили найденную в первом случае закономерность. На этой основе заключили, что поиск геропротекторов перспективно проводить среди веществ, уменьшающих параметр R , который более легко измерим, чем полная кривая выживания.

Ключевые слова: продолжительность жизни, репарация ДНК, *GADD45*, сверхэкспрессия, малые дозы ионизирующей радиации, гормезис, *Drosophila melanogaster*.

ВВЕДЕНИЕ

Белки семейства *GADD45* (growth-arrest and DNA-damage inducible 45) принимают участие в регуляции экспрессии генов, остановке клеточного цикла, репарации ДНК и апоптозе (Moskalev *et al.*, 2012b). У млекопитающих их экспрессия индуцируется в условиях стресса, в том числе окислительного и генотоксического стрессов (Duan *et al.*, 2005). *GADD45* взаимодействует с белками, участвующими в эксцизионной репарации ДНК (Smith *et al.*, 1994), а также с белками, которые участвуют в репарации двухцепочечных разрывов ДНК (Lee *et al.*, 2012). У дрозофилы известен только один гомолог гена

GADD45 – D-GADD45 и его функции менее изучены (Peretz *et al.*, 2007). Тем не менее, ранее мы показали увеличение продолжительности жизни у *Drosophila melanogaster* в результате сверхэкспрессии *D-GADD45* (Plyusnina *et al.*, 2011).

Один из возможных механизмов, объясняющих увеличение продолжительности жизни в связи со сверхэкспрессией *GADD45*, состоит в том, что она увеличивает устойчивость к стрессам. Ранее нами было показано, что мухи со сверхэкспрессией *D-GADD45* более устойчивы к окислительному и генотоксическому стрессам, тепловому шоку и голоданию, чем мухи без сверхэкспрессии (Moskalev *et al.*, 2012a). В то же время большинство изученных стресс-факторов

индуцируют увеличение уровня экспрессии *D-GADD45* у линии дикого типа (Moskalev *et al.*, 2012a).

Существует достаточно доказательств взаимосвязи между стрессоустойчивостью и долголетием. По мере старения организма наблюдается снижение стрессоустойчивости (Settenchenko *et al.*, 2004). Сверхэкспрессия генов, которые повышают устойчивость к стрессу, ведет к увеличению продолжительности жизни (Orr, Sohal, 1994; Giannakou *et al.*, 2004). Кроме того, животные с мутациями, которые приводят к долгожительству, характеризуются повышенной устойчивостью к окислительному стрессу и тепловому шоку (Johnson *et al.*, 2001; Вайсман и др., 2012). Однако короткоживущие мутанты модельных организмов характеризуются пониженной устойчивостью к стрессовым факторам (Vermeulen *et al.*, 2005). Активность генов, способствующих ускорению процесса старения, приводит к эндогенным стрессам (например, P66) (Migliaccio *et al.*, 1999). Селекция животных на устойчивость к одному стрессовому фактору повышает устойчивость к другим стресс-факторам и приводит к увеличению продолжительности жизни (Harshman *et al.*, 1999). Виды, которые имеют различную продолжительность жизни, различаются по устойчивости к стрессу, особенно к окислительному стрессу (например, грызуны, летучие мыши, птицы) (Salmon *et al.*, 2009). Долгоживущий голый землекоп (*Heterocephalus glaber*) имеет повышенную устойчивость к широкому спектру цитотоксинов, в том числе и к тепловому шоку, тяжелым металлам, генотоксикантам и ксенобиотикам (Lewis *et al.*, 2012). У человека мы видим те же самые закономерности, например, долгожители не отличаются приверженностью к здоровому образу жизни (Rajpathak *et al.*, 2011). Их исключительную продолжительность жизни можно объяснить повышенной устойчивостью к стрессам. Умеренный стресс приводит к увеличению продолжительности жизни (Rattan, 2005). Например, ионизирующее излучение в малых дозах приводит к увеличению продолжительности жизни дрозофил (эффект гормезиса) (Moskalev, 2007; Moskalev *et al.*, 2011). Механизмы, участвующие в увеличении продолжительности жизни, включают в себя индукцию защитных систем, таких, как

антиоксидантная защита (Arking *et al.*, 2000), репарацию ДНК (Moskalev *et al.*, 2013), синтез белков теплового шока (Zhao *et al.*, 2005; Вайсман и др., 2012), активацию иммунной системы (Amrit *et al.*, 2010) и гибель ослабленных клеток (Moskalev, 2007).

Увеличение продолжительности жизни сопровождается изменением начальной (в нашей терминологии – фоновой, R) и экспоненциальной (в нашей терминологии – возрастной, α) компонент смертности уравнения Гомпертца. Хотя точный биологический смысл R и α не выявлен (Гаврилов, Гаврилова, 1991), параметр R соответствует возрасту, предшествующему моменту начала экспоненциального роста смертности, и его можно рассматривать как генетически предопределенный, в то время как α – скорость экспоненциальной гибели – как следствие лавинообразного накопления молекулярных и клеточных повреждений в стареющем организме после достижения этого порога (Kirkwood, 2005). Таким образом, математический анализ данных параметров может выявить механизмы, лежащие в основе увеличения продолжительности жизни. Целью данной работы является анализ R и α параметров уравнения Гомпертца у мух с увеличенной продолжительностью жизни в результате сверхэкспрессии гена *D-GADD45* и эффектов радиационного гормезиса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии *Drosophila melanogaster*. В работе использована лабораторная линия *Canton-S*. Линия *UAS-D-GADD45*, содержащая дополнительную копию гена *D-GADD45* под контролем промотора *UAS*, предоставлена Uri Abdu, Университет Бен Гуриона, Израиль. Линия *1407-GAL4*, несущая драйвер *GAL4*, конститутивно индуцирующийся в клетках нервной системы (из Bloomington *Drosophila* Stock Center, США). Линия *ELAV-GS-GAL4*, содержащая мифепристон-индуцибельный нейроспецифический драйвер *GAL4*, предоставлена Dr. Haig Keshishian, Йельский Университет, США.

Активация сверхэкспрессии. Для конститутивной сверхактивации *D-GADD45* в нервной системе проводили скрещивание самок *UAS-D-GADD45* с самцами *1407-GAL4*. Для кондиционной сверхэкспрессии *D-GADD45*

в нейронах проводили скрещивание самок *UAS-D-GADD45* с самцами *ELAV-GS-GAL4* с последующим внесением в корм мифепристона RU486 (Mifepristone, Sigma).

Условия облучения. Экспериментальные линии *Drosophila melanogaster* подвергали хроническому воздействию γ -излучения от источника ^{226}Ra на протяжении предимагинальных стадий развития (эмбрион, личинка первого–третьего возраста, куколка) при мощности экспозиционной дозы 2,5 мГр/ч. Поглощенная доза составила 40 сГр. Имаго в возрасте не более 24 ч подвергали воздействию острого γ -излучения от источника ^{137}Cs в дозе 30 Гр при мощности экспозиционной дозы 75 сГр/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что модель Гомпертца хорошо подходит для описания смертности особей дрозофилы (Гаврилов, Гаврилова, 1991). Каждая теоретическая кривая характеризуется двумя параметрами: R – фоновая компонента смертности, и α – возрастная компонента смертности. Для решения вопроса о том, уменьшение какой из этих компонент смертности отвечает за увеличение общей продолжительности жизни у особей со сверхэкспрессией гена *D-GADD45* в нервной системе, использовали подход с тестированием альтернативных гипотез: 1) контроль и опыт не различаются по параметру α , но могут иметь разные значения параметра R (α -const); 2) контроль и опыт не различаются по параметру R , но могут иметь разные значения параметра

α (R -const). Технически анализ проводили с помощью программы WinModest, которая содержит такую возможность анализа данных по кривым выживания.

Как можно видеть из табл., для кривых выживания как самок, так и самцов *1407-GAL4/UAS-D-GADD45* и *UAS-D-GADD45* наибольшую статистическую поддержку имеет гипотеза о постоянном α и различающихся параметрах R . В случае особей *ELAV-GS-GAL4/UAS-D-GADD45*, у которых сверхэкспрессия проводилась у вылупившихся мух, по самцам наблюдается предпочтительность гипотезы о постоянном α , в то время как у самок нет разницы между гипотезами. Действительно, в работе, демонстрирующей увеличение продолжительности жизни дрозофилы в результате сверхэкспрессии *D-GADD45*, можно было наблюдать, что величина эффекта у особей *ELAV-GS-GAL4/UAS-D-GADD45* ниже, чем в эксперименте *1407-GAL4/UAS-D-GADD45*. Поэтому логично полагать, что отсутствие дифференциации между гипотезами для самок связано именно с низким уровнем эффекта.

Помимо увеличения продолжительности жизни под действием некоторых мутаций и сверхэкспрессии некоторых генов, известен также случай радиационного гормезиса. Этот эффект заключается в увеличении продолжительности жизни после действия малых доз облучения. Для того чтобы понять, влияет ли радиационный гормезис сходным образом в случае сверхэкспрессии гена *D-GADD45*, мы рассмотрели результаты эксперимента, в котором контрольная линия *Canton-S*

Таблица

Результаты тестирования альтернативных гипотез в различных экспериментах

Сравниваемые варианты	Вероятность ошибочности гипотезы α -const
<i>1407-GAL4/UAS-D-GADD45</i> в сравнении с <i>UAS-D-GADD45</i>	Самки 6,99E-05 (0,00123; 0,00018)
	Самцы 1,85E-19 (0,0003; 0,0001)
<i>ELAV-GS-GAL4/UAS-D-GADD45 (RU486-)</i> в сравнении с <i>ELAV-GS-GAL4/UAS-D-GADD45 (RU486+)</i>	Самки, нет разницы между гипотезами
	Самцы 3,26E-04 (0,00267; 0,00125)
<i>Canton-S</i> в сравнении с <i>Canton-S</i> , облучение 40сГр	Самки 3,98E-03 (0,00006; 0,00003)
	Самцы 0 (0,0005; 0,00034)
<i>Canton-S</i> в сравнении с <i>Canton-S</i> , облучение 30 Гр	Самки 6,70E-13 (0,00028; 0,00358)
	Самцы 1,86E-21 (0,00051; 0,00974)

Примечание. Для каждой сравниваемой пары линий в скобках приведены значения параметра R , полученные в рамках тестирования гипотез для первого и второго генотипов соответственно.

сравнивалась по кривой выживания в условиях малодозового рентгеновского облучения (40 сГр). Облучение этой же линии в большой дозе (30 Гр) рассматривалось как отрицательный контроль к этому эксперименту. Из табл. можно видеть, что облучение как в дозе 40 сГр, так и в дозе 30 Гр приводит к тому, что гипотеза о постоянном α и разных R получает статистическое подтверждение. В то же время в случае дозы 30 Гр выявляется заметное увеличение R для облученной линии как для самок, так и для самцов. При облучении в дозе 40 сГр виден обратный эффект – малодозовое облучение приводит к уменьшению параметра R в сравнении с необлученным контролем и для самок, и для самцов. Таким образом, радиационный гормезис – это явление, родственное эффекту сверхэкспрессии *D-GADD45* – облучение вызывает увеличение продолжительности жизни через уменьшение значения параметра R.

Хотя точный биологический смысл параметров R и уравнения Гомпертца еще до конца не понят (Olshansky, Carnes, 1997; Sas *et al.*, 2012), тем не менее, возраст начала экспоненциального роста смертности R можно интерпретировать как генетически предопределенный, в то время как возрастную компоненту смертности α – как результат лавинообразного накопления молекулярных и клеточных повреждений в стареющем организме (Гаврилов, Гаврилова, 1991). Если принять эту точку зрения, то полученные в настоящей работе результаты показывают, что найденный ранее эффект увеличения продолжительности жизни под действием сверхэкспрессии гена *D-GADD45* в нервной системе связан с генетически обусловленным увеличением возраста начала процесса старения и не связан с уменьшением лавинообразного накопления клеточных повреждений в стареющем организме (Plyusnina *et al.*, 2011). Исследованный ранее эффект радиационного гормезиса в старении (Moskalev, 2007; Moskalev *et al.*, 2011), как показали настоящие исследования, также связан с увеличением возраста экспоненциального роста смертности от генетически определенных причин. Полученные нами результаты показывают, что оба изученных феномена продления жизни дрозофилы оказались предопределены генетически. С одной стороны, это поднимает вопрос о том, не является ли эта закономерность универсальной для мутаций

дрозофилы, увеличивающих продолжительность жизни. С другой стороны, найденная закономерность позволяет более точно указать «мишень» действия потенциальных геропротекторов – геропротекторы нужно искать среди веществ, уменьшающих параметр R кривой выживания. Заметим, что для измерения этого параметра необходим только начальный участок кривой выживания, т. е. процедура оценки действия вещества на продолжительность жизни может быть технически существенно упрощена.

Исследования поддержаны совместным проектом УрО РАН №12-С-4-1007 «Структурно-функциональная организация хромосом в клеточном цикле» и проектами СО РАН № 81, 82.

ЛИТЕРАТУРА

- Вайсман Н.Я., Евгеньев М.Б., Голубовский М.Д. Параллелизм и парадоксальность действия на жизнеспособность и продолжительность жизни мутаций регулятора белков теплового шока *hsf1* и онкосупрессора *l(2)gl* у *Drosophila melanogaster* // Изв. РАН. Сер. биол. 2012. № 1. С. 27–34.
- Гаврилов Л.А., Гаврилова Н.С. Биология продолжительности жизни. М.: Наука, 1991. 280 с.
- Amrit F.R., Boehnisch C.M., May R.C. Phenotypic covariance of longevity, immunity and stress resistance in the *Caenorhabditis nematodes* // PLoS ONE. 2010. V. 5. No. 4. P. e9978.
- Arking R., Burde V., Graves K. *et al.* Forward and reverse selection for longevity in *Drosophila* is characterized by alteration of antioxidant gene expression and oxidative damage patterns // Exp. Gerontol. 2000. V. 35. No. 2. P. 167–185.
- Duan J., Zhang Z., Tong T. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening // Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2005. V. 37. No. 7. P. 1407–1420.
- Giannakou M.E., Goss M., Junger M.A. *et al.* Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body // Science. 2004. V. 305. No. 5682. P. 361.
- Harshman L.G., Moore K.M., Sty M.A. *et al.* Stress resistance and longevity in selected lines of *Drosophila melanogaster* // Neurobiol. Aging. 1999. V. 20. No. 5. P. 521–529.
- Johnson T.E., de Castro E., Hegi de Castro S. *et al.* Relationship between increased longevity and stress resistance as assessed through gerontogene mutations in *Caenorhabditis elegans* // Exp. Gerontol. 2001. V. 36. No. 10. P. 1609–1617.
- Kirkwood T.B. Understanding the odd science of aging // Cell. 2005. V. 120. No. 4. P. 437–447.
- Lee B., Morano A., Porcellini A. *et al.* GADD45 α inhibition of DNMT1 dependent DNA methylation during homology directed DNA repair // Nucl. Acids Res. 2012. V. 40. No. 6. P. 2481–2493.
- Lewis K.N., Mele J., Hornsby P.J. *et al.* Stress resistance in

- the naked mole-rat: the bare essentials – a mini-review // *Gerontology*. 2012. V. 58. No. 5. P. 453–462.
- Migliaccio E., Giorgio M., Mele S. *et al.* The p66^{shc} adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals // *Nature*. 1999. V. 402. No. 6759. P. 309–313.
- Moskalev A. Radiation-induced life span alteration of *Drosophila* lines with genotype differences // *Biogerontol.* 2007. V. 8. No. 5. P. 499–504.
- Moskalev A.A., Plyusnina E.N., Shaposhnikov M.V. Radiation hormesis and radioadaptive response in *Drosophila melanogaster* flies with different genetic backgrounds: the role of cellular stress-resistance mechanisms // *Biogerontol.* 2011. V. 12. No. 3. P. 253–263.
- Moskalev A., Plyusnina E., Shaposhnikov M. *et al.* The role of *D-GADD45* in oxidative, thermal and genotoxic stress resistance // *Cell Cycle*. 2012a. V. 11. No. 22. P. 4222–4241.
- Moskalev A.A., Shaposhnikov M.V., Plyusnina E.N. *et al.* The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria // *Ageing Res. Rev.* 2013. V. 12. No. 2. P. 661–84.
- Moskalev A.A., Smit-McBride Z., Shaposhnikov M.V. *et al.* Gadd45 proteins: relevance to aging, longevity and age-related pathologies // *Ageing Res. Rev.* 2012b. V. 11. No. 1. P. 51–66.
- Olshansky S.J., Carnes B.A. Ever since Gompertz // *Demography*. 1997. V. 34. No. 1. P. 1–15.
- Orr W.C., Sohal R.S. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster* // *Science*. 1994. V. 263. No. 5150. P. 1128–1130.
- Peretz G., Bakhrat A., Abdu U. Expression of the *Drosophila melanogaster* GADD45 homolog (CG11086) affects egg asymmetric development that is mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway // *Genetics*. 2007. V. 177. No. 3. P. 1691–1702.
- Plyusnina E.N., Shaposhnikov M.V., Moskalev A.A. Increase of *Drosophila melanogaster* lifespan due to *D-GADD45* overexpression in the nervous system // *Biogerontol.* 2011. V. 12. No. 3. P. 211–226.
- Rajpathak S.N., Liu Y., Ben-David O. *et al.* Lifestyle factors of people with exceptional longevity // *J. Am. Geriatr. Soc.* 2011. V. 59. No. 8. P. 1509–1512.
- Rattan S.I. Hormetic modulation of aging and longevity by mild heat stress // *Dose Response*. 2005. V. 3. No. 4. P. 533–546.
- Salmon A.B., Leonard S., Masamsetti V. *et al.* The long lifespan of two bat species is correlated with resistance to protein oxidation and enhanced protein homeostasis // *FASEB J.* 2009. V. 23. No. 7. P. 2317–2326.
- Sas A.A., Snieder H., Korf J. Gompertz' survivorship law as an intrinsic principle of aging // *Med. Hypotheses*. 2012. V. 78. No. 5. P. 659–663.
- Semenchenko G.V., Khazaeli A.A., Curtsinger J.W. *et al.* Stress resistance declines with age: analysis of data from a survival experiment with *Drosophila melanogaster* // *Biogerontol.* 2004. V. 5. No. 1. P. 17–30.
- Smith M.L., Chen I.T., Zhan Q. *et al.* Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen // *Science*. 1994. V. 266. No. 5189. P. 1376–1380.
- Vermeulen C.J., Van De Zande L., Bijlsma R. Resistance to oxidative stress induced by paraquat correlates well with both decreased and increased lifespan in *Drosophila melanogaster* // *Biogerontol.* 2005. V. 6. No. 6. P. 387–395.
- Zhao Y., Sun H., Lu J. *et al.* Lifespan extension and elevated *hsp* gene expression in *Drosophila* caused by histone deacetylase inhibitors // *J. Exp. Biol.* 2005. V. 208. No. Pt 4. P. 697–705.

SURVIVAL CURVE ANALYSIS FOR *DROSOPHILA MELANOGASTER* WITH *D-GADD45* OVEREXPRESSION IN THE NERVOUS SYSTEM

E.N. Plyusnina^{1,2}, M.V. Shaposhnikov^{1,2}, E.N. Andreeva³,
A.A. Moskalev^{1,2,4}, L.V. Omelyanchuk³

¹ Institute of Biology, Komi Center of UB RAS, Syktivkar, Russia, e-mail: ome@mcb.nsc.ru;

² Syktivkar State University, Russia;

³ Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia;

⁴ Moscow Institute of Physics and Technology, Russia

Summary

Overexpression of the *Gadd45* gene in the nervous system of *Drosophila melanogaster* increases the life span. We have performed the Gompertz approximation of the survival curve and revealed a life span increase as a result of decrease of the R parameter, reflecting the death level at the beginning of adult life, whereas the other Gompertz parameter, α , responsible for final stage of the life, does not change essentially. In addition, we have analyzed the case of radiation hormesis (low doses of radiation increase life span) and found a similar effect. We conclude that it is promising to perform geroprotector screen by testing substances for the ability to decrease R. Its measurement is less labor-consuming than the construction of the complete survival curve.

Key words: longevity, DNA repair, *GADD45*, overexpression, low radiation doses, hormesis, *Drosophila melanogaster*.

УДК 575:597.773.4:576.895.77

ЦИТОТИПЫ МУТАНТНЫХ ЛИНИЙ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ФОНДА ЛАБОРАТОРИИ ГЕНЕТИКИ ПОПУЛЯЦИЙ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СО РАН: ГЕНОТИПЫ ЭНДОСИМБИОНТА *WOLBACHIA* И МИТОТИПЫ ВИДА-ХОЗЯИНА

© 2013 г. Ю.Ю. Илинский^{1,2}, Р.А. Быков¹, И.К. Захаров^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия;

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия, e-mail: paulee@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 3 июня 2013 г. Принята к публикации 15 августа 2013 г.

Матерински наследуемая эндосимбиотическая бактерия *Wolbachia* широко распространена в природных популяциях *Drosophila melanogaster*. При этом следует отметить, что сведений о присутствии бактерии в лабораторных мутантных линиях в современной литературе недостаточно. В данном исследовании демонстрируется широкая распространенность эндосимбионта *Wolbachia* среди 353 мутантных линий фонда лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН. Отмечено, что эндосимбионт поддерживается в течение длительного времени культивирования линий, и в двух случаях, вероятно, произошла утрата *Wolbachia*. Генотипическое разнообразие *Wolbachia* представлено тремя генотипами: wMel, wMelCS, wMelCS2. Поскольку известно, что *Wolbachia* строго сонаследуется с митохондриями, выявление митотипического разнообразия в совокупности с данными по инфицированности позволяет установить цитотипическое разнообразие линий. В линиях фонда лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН выявлено 4 ранее описанных для природных популяций *D. melanogaster* цитотипа: M-MEL, M-w⁻, S-CS, S-w⁻. Паттерны частот цитотипов и частот генотипов значительно отличаются от таковых в природе, что объясняется схемой создания и историей ведения каждой линии.

Ключевые слова: генетические коллекции, *Drosophila melanogaster*, *Wolbachia*, митотип, генотип, цитотип, коэволюция.

ВВЕДЕНИЕ

Генетические коллекции живых модельных объектов, в том числе *Drosophila melanogaster*, создаются и расширяются в результате включения в них мутантных и нормальных линий из мировых фондов и природных популяций, пополняются за счет оригинальных линий, вновь полученных в ходе исследований в лабораториях (Lindsley, Grell, 1968; Lindsley, Zimm, 1985, 1990). После сокращения числа линий коллекции European *Drosophila* Stock Center University of Umea (Швеция) самым большим в мире фондом линий дрозофил остается Bloomington *Drosophila* Stock Center at Indiana Uni-

versity, США (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>). Многие исследовательские группы и кафедры университетов содержат и собственные коллекции живых организмов. Фонд дрозофил лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН имеет полувековую историю и относится к разряду наиболее крупных в России.

Лабораторные линии *Drosophila melanogaster* могут быть использованы для различных научно-исследовательских и образовательных целей.

1. Картирование и идентификация вновь обнаруженных мутаций.

2. Популяционно-генетические исследования, в том числе и с применением молекулярно-генетических методов.

3. Стандартные линии используются для проведения биохимических, генетических, этологических и физиологических экспериментов, в частности как тестерные линии при проведении однотипных исследований для получения количественных характеристик мутабельности, плодовитости, характеристик жизнеспособности.

Мы создаем, что это далеко не полный перечень.

Все это подразумевает расширение знаний о линиях и постоянное изучение их свойств. Резкое повышение интереса к исследованию линий фонда происходит: 1) при вовлечении в обиход принципиально новых методов исследования генома; 2) при выявлении новых генетических феноменов, как это случилось при обнаружении мобильных генетических элементов (Mobile DNA, 1989; Finnegan, 1990) и цитобионтов (Wolstenholme, 1965; Glover *et al.*, 1990; O’Niell, Karr, 1990; O’Niell *et al.*, 1992).

Бактерия рода *Wolbachia* – это наследуемый строго по материнской линии внутриклеточный симбионт членистоногих и нематод, и ее можно рассматривать как факультативный компонент генома эукариот. Биология рода *Wolbachia* крайне разнообразна и не позволяет охарактеризовать его однозначно как паразита, комменсала или мутуалиста. Это связано с очень большим генетическим разнообразием бактерий и исключительным количеством симбиотических ассоциаций с самыми разными видами-хозяевами.

Распространенность *Wolbachia* среди членистоногих оценивается на уровне 40 % видов всего биоразнообразия (Hilgenboecker *et al.*, 2008; Zug, Hammerstein, 2012). Такое широкое распространение связано с горизонтальным переносом *Wolbachia* между видами-хозяевами (Cordaux *et al.*, 2001; Sintupachee *et al.*, 2006; Baldo *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2012; Guidolin, Consoli, 2013). Однако остается загадкой, что может служить вектором подобного переноса. Значительный интерес в исследовании *Wolbachia* представляют вызываемые бактерией у видов-хозяев репродуктивные аномалии: андроксид, феминизация, партеногенез и цитоплазматическая несовместимость (ЦН). Эти аномалии способствуют распространению и поддержанию инфекции в популяции хозяина (Mercot, Charlat,

2004). Для *Drosophila melanogaster* характерно проявление ЦН, которая заключается в гибели потомства от скрещивания неинфицированной самки с инфицированным самцом (O’Neill *et al.*, 1992; Bressac, Rousset, 1993; Werren, 1997; Zabalou *et al.*, 2008; Илинский, Захаров, 2009; Zheng *et al.*, 2011).

Известны факты мутуалистического взаимодействия хозяин–вольбахия. Для филярийных нематод *Wolbachia* является облигатным цитобионтом, необходимым для репродукции червя (Bandi *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2000a, b). Для некоторых видов паразитических ос обнаружено, что *Wolbachia* необходима для нормального протекания оогенеза (*Asobara tabida*), а также то, что она обеспечивает более высокую плодовитость наряду с индукцией партеногенеза (*Eretmocerus mundus*) (De Barro, Hart, 2001; Kremer *et al.*, 2009). У комаров *Aedes albopictus* одновременно с индукцией ЦН бактерия увеличивает плодовитость инфицированных самок (Dobson *et al.*, 2002). Для *Drosophila simulans*, *D. melanogaster*, а также комара *Anopheles stephensi* описано антивирусное действие *Wolbachia* (Hedges *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008; Osborne *et al.*, 2009; Bian *et al.*, 2013).

Установлено, что *Wolbachia* у *D. melanogaster* распространена по всему ареалу существования вида. Частота встречаемости варьирует от единичных инфицированных особей до тотальной зараженности эндосимбионтом, а в среднем доля инфицированных особей составляет 50 % (Solignac *et al.*, 1994; Hoffmann *et al.*, 1994, 1998; Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский, 2008; Nunes *et al.*, 2008; Verspoor, Haddrill, 2011; Richardson *et al.*, 2012; Plinsky, 2013). Общеизвестно, что все наблюдаемое генетическое разнообразие *Wolbachia* произошло монофилетично от потомков одной инфицированной самки из предковой популяции *D. melanogaster*. По молекулярным данным описан только один штамм *Wolbachia* – wMel, который обнаруживает низкое разнообразие по нуклеотидному полиморфизму ДНК (Riegler *et al.*, 2005, 2012; Richardson *et al.*, 2012). Однако значительный полиморфизм выявлен в отношении перестроек генома, инсерций мобильных элементов и вариативности повторов минисателлитных локусов (Riegler *et al.*, 2005, 2012). Описываемые на основании этого полиморфизма изоляты именуется как генотипы

Wolbachia штамма wMel, и всего известно 6 генотипов: wMel, wMel2, wMel3, wMel4, wMelCS и wMelCS2. Повсеместно в популяциях *D. melanogaster* мира обнаружены генотипы wMel и wMelCS (Riegler *et al.*, 2005; Илинский, Захаров, 2007а, б; Nunes *et al.*, 2008; Ilinsky, 2013), при этом среди инфицированных особей более чем в 90 % случаев встречается wMel. Генотип wMel2 обнаружен в популяциях Китая, Японии, Индии и странах Юго-Восточной Азии (Riegler *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2008). Генотип wMel4 описан из сборов популяций *D. melanogaster* полуострова Синай (Ilinsky, 2013). Генотип wMelCS2 распространен в популяциях Восточной Европы, Кавказа, Средней Азии и Алтая (Riegler *et al.*, 2005; Илинский, Захаров 2007а, б; Ilinsky, 2013). Генотип wMel3 был обнаружен только в одной лабораторной линии *D. melanogaster* и, по-видимому, в природе не встречается (Riegler *et al.*, 2005).

По биологическому влиянию на хозяина выделяется штамм wMelPop, который приводит к ранней гибели *D. melanogaster* вследствие активной пролиферации бактерии в клетках соматических тканей и их повреждения (Min, Benzer, 1997; Reynolds *et al.*, 2003; Струнов и др., 2013). По протоколу генотипирования этот штамм определяется как wMelCS-генотип (Ilinsky, 2013), однако по фенотипическому действию только изолят wMelPop оказывает влияние на продолжительность жизни хозяина.

Если данные по инфицированности природных популяций *D. melanogaster* достаточно обширны (Hoffmann *et al.*, 1994, 1998; Solignac *et al.*, 1994; Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский, 2008; Nunes *et al.*, 2008; Verspoor, Haddrill, 2011; Richardson *et al.*, 2012; Ilinsky, 2013), то сведения об инфицированности мутантных линий скудны и, по сути, сводятся к одной работе (Clark *et al.*, 2005), в которой приведены данные по инфицированности *Wolbachia* мутантных линий и линий дикого типа из коллекции фонда Bloomington Center, США. Авторы отмечали, что паттерн инфицированности заметно отличался для разных групп линий. Каких-либо сведений по генетическому разнообразию бактерии или митотипическому разнообразию *D. melanogaster* в этой работе не приводилось.

Целью нашего исследования было заполнить пробел в данных по инфицированности

мутантных линий, используемых в молекулярных и генетических экспериментах, и сделать доступным широкий набор мутантных линий фонда *D. melanogaster* лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН для исследований взаимодействия вольбахия–хозяин. Для этого мы рассматриваем материнскую наследственность *D. melanogaster*, под которой подразумевается облигатный компонент генома – митохондриальная ДНК – и факультативный – эндосимбионт *Wolbachia*. Описание материнской наследственности конкретной линии обозначается термином «цитотип», который включает митотип и статус инфицированности. В качестве фактического материала мы представляем к рассмотрению результаты скрининга (i) инфицированности 353 мутантных линий фонда лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН, приводим данные по (ii) генотипическому разнообразию *Wolbachia* и (iii) митотипическому разнообразию *D. melanogaster*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии фонда

Для исследования было использовано 353 мутантные линии *Drosophila melanogaster* из фонда лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН (табл. 1). Линии входят в состав 8 групп либо на основании локализации мутаций, либо объединяются по определенным мутациям: «хромосома 1» (118 линий), «yellow» (22), «хромосома 2» (77), «lethal giant larvae» (17), «хромосома 3» (82), «хромосома 4» (6), «транслокации» (8), «мультихромосомная» (23). Указанные в табл. 1 номера линий соответствуют картотеке фонда лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН.

Выделение ДНК, установление статуса инфицированности линий, генетического разнообразия *Wolbachia* и митотипического разнообразия *D. melanogaster*

Выделение ДНК проводилось по стандартной методике с модификациями (Marmur, 1961). Четыре самки каждой линии *D. melanogaster* гомогенизировали и инкубировали в объеме 200

Таблица 1

Генотип и цитотип мутантных линий *Drosophila melanogaster* фонда лаборатории генетики популяций Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН (г. Новосибирск)

Номер линии в фонде	Генотип линии <i>Drosophila melanogaster</i> *	Цитотип**	Примечание***
Группа «хромосома 1»			
1-4	C(1)DX, y w f / B	S/w ⁻	
1-5	Basc / Bx	S/wMelCS2	ранее 1976 г.
1-9	C(1)DX, y w f / car	S/w ⁻	Р.Л. Берг, 1968
1-10	Basc / ct oc v f	S/wMelCS2	
1-11	C(1)DX, y w f / ct ⁿ	S/w ⁻	М. Green, 1975
1-12	C(1)DX, y w f / B ct	S/w ⁻	1972
1-12a	C(1)DX, y w f / ct oc	S/w ⁻	И.Д. Ерохина, 1985
1-13	ct ^{61z50130}	S/w ⁻	1975
1-14	C(1)DX, y w f / ct sn ³	S/w ⁻	1975
1-14a	C(1)DX, y w f / ct ¹²⁹ sn ³	S/w ⁻	†
1-16	C(1)DX, y w f / ct v f	S/w ⁻	1978
1-20	dy ⁹⁰³⁸⁸	S/w ⁻	исп. линия 1-24
1-21	Basc/dx ⁿ f	S/w ⁻	1973
1-24	C(1)DX, y w f / dy ^{73c16} wy ⁷³¹	S/w ⁻	М. Green, 1977
1-26	C(1)DX, y w f / ec dx	S/w ⁻	1973
1-29a	C(1)DX, y w f / f	S/w ⁻	1982
1-30	f ^{K76}	S/w ⁻	Краснодар, 1976
1-30b	f ^{85A A}	S/w ⁻	†
1-32	C(1)DX, y w f / f ^{U88319}	S/w ⁻	
1-33	C(1)DX, y w f / f w	S/w ⁻	
1-35	C(1)DX, y w f / g f	S/w ⁻	
1-36	C(1)DX, y w f / g wup ^{B70}	S/w ⁻	
1-37	FM6/In(1) Hw ^{49c}	S/w ⁻	И.Ф. Жимулев
1-38	kf ² v	S/w ⁻	Т.К. Johnson
1-38a	kf ^{MR1} v	S/w ⁻	Т.И. Герасимова
1-40	C(1)DX, y w f / lz ⁵⁰¹³⁰	S/w ⁻	
1-45	N ³⁵	S/wMelCS2	отбор ♀♀ Notch
1-46	N ⁵⁹	S/wMelCS2	отбор ♀♀ Notch
1-47	C(1)DX, y w f / m ^{U89404}	S/w ⁻	
1-48	FM6/N ⁹²⁸⁷⁸	S/w ⁻	пос. Янтарный, 1992
1-50	N ⁹⁰⁷¹⁹	M/w ⁻	
1-52a	C(1)DX, y w f / m ^{SG1976}	S/w ⁻	
1-53	C(1)DX, y w f / m ct ⁶ g	S/w ⁻	
1-54	FM6 / N ⁸⁸³¹⁹	S/w ⁻	
1-55	FM6 / N ⁹⁰³¹⁰	M/wMel	Запорожье, 1990
1-56	C(1)DX, y w f / ras ^{A77}	S/w ⁻	
1-57	ras v m ^{73127.1}	S/w ⁻	
1-58	rux ²	S/wMelCS2	исп. линия 1-90
1-59a	Basc / r ^{K1979}	S/wMelCS2	†
1-60	Basc / r ^{U1986}	S/wMelCS2	
1-61	C(1)DX, y w f / sc ⁷ v f	S/w ⁻	
1-62	C(1)DX, y w f / sc ⁹ Bx ft w ^a	S/w ⁻	
1-63	sc ^{B1993}	S/wMelCS2	исп. линия 1-90

Продолжение таблицы 1

Номер линии в фонде	Генотип линии <i>Drosophila melanogaster</i> *	Цитотип**	Примечание***
1-64	Basc / sc ec cv v	S/wMelCS2	
1-66a	FM6 / sc ec cv ct ⁶ v g	S/w ⁻	
1-67	C(1)DX, y w f / sn ³ oc ¹²⁹	S/w ⁻	
1-68	svr	S/wMelCS2	
1-70	Basc / sn ⁶³ fw	S/w ⁻	утрата <i>Wolbachia</i> ?
1-72	sn ³	S/wMelCS2	получена из линии 1-94
1-73	Basc / sn ^{SG49-5}	S/wMelCS2	
1-74	C(1)DX, y w f / sn ^{855r855}	S/w ⁻	
1-75	C(1)DX, y w f / sn ^{888m888}	S/w ⁻	
1-76	v	S/w ⁻	Крым, 1961
1-77	C(1)DX, y w f / v ⁹⁰⁰⁴²	S/w ⁻	
1-78	v ⁹⁰⁰⁸⁸	M/w ⁻	†, Умань, 1990
1-79	C(1)DX, y w f / v ⁹⁰²⁵⁵	S/w ⁻	
1-80	w	S/w ⁻	
1-80a	C(1)DX, y w f / w ^{T1980}	S/w ⁻	
1-80b	C(1)DX, y w f / w ^{r4075}	S/w ⁻	
1-81	C(1)DX, y w f / w ^a	S/w ⁻	
1-82	v ⁹⁰⁷¹⁹	M/w ⁻	Магарац, 1990
1-83	w ⁱ	M/w ⁻	от линии 1-50
1-84	w ^{ch}	S/w ⁻	
1-90	Basc / Basc	S/wMelCS2	линия Muller-5
1-90b	C(1)DX, y w f / sc v f B	S/w ⁻	
1-94	w sn ³	S/wMelCS2	исп. линия 1-90
1-97	C(1)DX, y w f / w ^{co} sn ²	S/w ⁻	
1-99	w mus(1) 104 ^{D1}	S/w ⁻	А.С. Ким (МГУ)
1-102	C(1)DX, y f / y	S/wMelCS2	
1-108	C(1)DX, y w f / In(1) dl-49, y	S/w ⁻	
1-110	C(1)DX, y w f / y B	S/w ⁻	†
1-111	Basc / y ct v f	S/wMelCS2	Алма-Ата, 1977
1-112	C(1)DX, y w f / y ct v f	S/w ⁻	
1-113	y ^{A77} ras ^{A77}	S/w ⁻	
1-116	y ^{2sc1} w ^a w ^{ch} N ^{fa-1}	M/w ⁻	Umea Dros. Stock Center, 1996
1-117	y sn ³	S/wMelCS2	†, создана на основе линий 1-102 и 1-72
1-118	C(1)DX, y w f / y ² Su-s ^{5le15} ras v f	S/w ⁻	
1-119	y v	S/wMelCS2	
1-121	y w	S/w ⁻	ЛГУ, 1976
1-121a	y w sn	S/w ⁻	И.Ф. Жимулев
1-122	y cv v f car	S/wMelCS2	исп. линия 1-90
1-123	Basc / y ² sn ³ lz ^{501m}	S/w ⁻	утрата <i>Wolbachia</i>
1-124a	Basc / y cv ^{l403}	S/wMelCS2	
1-125	FM4 / y ^{2MR} kf ^{MR} ; Basc / y ^{2MR} kf ^{MR}	M/w ⁻	Т.И. Герасимова, 1982
1-126	C(1)DX, y w f / y ^{2MR} kf ^{MR}	S/w ⁻	
1-128	y ^{596z} / TY;2 MR102, bw ^v	S/wMEICS	M. Green, 1986
1-130	FM6 / Df(v) ^{L15}	S/w ⁻	И.Ф. Жимулев, 1978
1-130a	C(1)DX, y w f / FM6	S/w ⁻	

Продолжение таблицы 1

Номер линии в фонде	Генотип линии <i>Drosophila melanogaster</i> *	Цитотип**	Примечание***
1-133	y ² cho ²	S/wMelCS	Woodruff, 1981
1-138	Basc / y pn cv v f B	S/wMelCS2	И.Ф. Жимулев
1-139	FM6 / M18	M/w ⁻	М. Монастириоти
1-141	FM6 / Df(1) sc ^{v1} , f ^{36a}	M/w ⁻	
1-142	C(1)DX, y f / In(1) y ^{3PL} sc ^{S1R} In(1)S, y ⁻ ac ⁻ sc ⁻ ; In(2L)Cy, Cy; Dp(1;2)sc ¹⁹	M/wMel	Bowling Green Stock Collection, No. 7136, (USA), 1992
1-143	C(1)DX, y w f / Df(1) Pgd-kz	S/w ⁻	
1-145	FM6/Df(1)ct ¹⁴ f; Df(1)ct ¹⁴ f / ct ⁺ Y	M/wMel	Т.К. Johnson, Kansas State University, 1980
1-147	Df(1) ct ^{4B1} oc ptg / In dl49 y sc ⁴ sc ^{8Iz} Sv B Dp(1;3) sn ^{13a}	S/wMelCS2	†
1-147a	FM4 / Df(1) ct ^{4B1} oc ptg	S/wMelCS2	контаминация Basc
1-148	FM4 / Df(1) ct ^{268 42} y	M/w ⁻	Инст мол. биол., 1980
1-149	FM6 / N ⁹²²⁷⁴	S/w ⁻	отбор ♀♀ Notch
1-152	FM6 / N ⁹²³⁷⁴	M/w ⁻	отбор ♀♀ Notch
1-153	FM6 / In(1) ct ^{HA46} × In(1) ct ^{HA46} / ct ⁺ Y	M/wMel	Инст. мол. биол., 1982
1-155	C(1)DX, y w f / dy ^{88 A-A 148}	S/w ⁻	
1-156	C(1)DX, y w f / y ⁷⁵⁹ dy ⁷⁵⁹	S/w ⁻	
1-157	C(1)DX, y w f / r ⁸⁹³⁰⁰	S/w ⁻	†
1-158	C(1)DX, y f / y ²⁻⁸⁸³¹⁹ f ⁸⁸³¹⁹	S/w ⁻	
1-162	C(1)DX, y f / Basc	S/w ⁻	
1-163	C(1)DX, y w f / Basc	S/w ⁻	
1-166	f ^{A-35}	S/w ⁻	Аскат, 2000 (Алтай)
1-167	Basc / r	S/wMelCS2	
1-168	Basc / r+	S/wMelCS2	от линии 1-167
1-169	pn	M/wMel	Ижевск, 2000
1-170	w ^c	M/wMel	Аскат, 2000 (Алтай)
1-171	w	S/w ⁻	Аскат, 2000 (Алтай)
1-173	C(1)DX(exp) / Y	M/w ⁻	†, из линии w60
1-174	Basc / dy	S/wMelCS2	
1-175	C(1)DX, y w f / f	S/w ⁻	
1-176	C(1)DX(exp) / w	M/w ⁻	из линии 1-173
Группа «хромосома 2»			
2-2	al	S/w ⁻	1976
2-5	al ² Cy pr Bl cn ² L ⁴ bw sp ² / In(2L)NS px sp	S/w ⁻	
2-7	al dp b cn bw	S/w ⁻	Инст. мед. генет., 1978
2-9a	b ^{vm 92}	M/w ⁻	Умань, 1986
2-10	b ⁷⁴	S/wMelCS2	М.Д. Голубовский, 1974
2-11	b cn c	S/w ⁻	МГУ, 1976
2-11a	b cn	S/w ⁻	1979
2-12	b cn bw	S/wMelCS2	Инст. мед. генет., 1978
2-13	b lt l(2) cn mi sp / In(2LR) bw ^{vDe1} , b bw ^{vDe1}	M/w ⁻	Umea Dros. Stock Center, 1995 (№ 39700)
2-19	Bl L ² / SM1	S/wMelCS2	1976
2-20	bw	S/wMelCS2	1976
2-21	bw ⁶⁵	S/wMelCS2	1976

Продолжение таблицы 1

Номер линии в фонде	Генотип линии <i>Drosophila melanogaster</i> *	Цитотип**	Примечание***
2-22	mak / In(2LR) Cy cn	S/wMelCS2	Ю.Н. Иванов, М.Д. Голубовский, 1967
2-23	L ² / In(2LR) Cy cn	S/wMelCS2	1976
2-24	lz ⁺ Ad ^{15v} / In(2LR) Cy cn	S/wMelCS2	М.Д. Голубовский, 1976
2-24a	d ^{15v} / SM5	S/wMelCS2	1976
2-25	c ⁶⁵	S/w ⁻	1976
2-26	MRF / Cy L ⁴	S/wMelCS2	Jannopoulos, 1989; Л.З. Кайданов, 1996
2-27	cn ^{35k}	S/wMelCS2	1976
2-27в	cn ³⁰²⁶	M/w ⁻	
2-27г	cn ³⁰⁵⁸	M/wMel	Запорожье, 1986
2-27е	cn	M/wMel	Нальчик, 1987
2-29	cn ⁸⁸	M/w ⁻	Нальчик, 1988
2-30	cn ⁸⁹	M/w ⁻	Нальчик, 1988
2-31	d / SM5	M/wMel	1976
2-32	Ds ^{38k} / In(2L) Cy dp ² b pr	S/w ⁻	1977
2-35	fes mr cn sp / net dp ^{ixj} Cy b pr Bl lt ³ cn ² L ⁴ sp ²	M/w ⁻	†
2-37	l(2)gl a px or / SM5	M/wMel	С.В. Bridges, 1933
2-38	l(2)gl a px or / In(2LR) Cy cn	S/w ⁻	1988
2-39	l(2)me / SM1	M/w ⁻	США, 1973
2-40	ltd bw	S/w ⁻	Инст. биол. разв. 1979
2-40a	L ⁸¹	S/w ⁻	Ю.Н. Иванов, 1981
2-41	MR U12-2 / In(2LR) Cy cn	S/wMelCS2	Ю.Н. Иванов, 1991
2-42	M(2)S7 / SM5	M/wMel	1976
2-44a	MR-h12 / Cy	S/wMelCS2	М. Green, 1978
2-45	net	S/wMelCS2	О. Ohio, 1973
2-45b	net ⁸⁷	S/wMelCS2	Брянск, 1987
2-47	net al / al Cy sp	M/w ⁻	1976
2-49	MR U12-2 / In(2LR) Cy cn	S/wMelCS2	1995
2-50	mi / In(2LR) Cy cn	S/wMelCS2	
2-51	mi / In(2LR) Cy cn	S/w ⁻	mi ⁺ , исп. линия 1 из мультихр.
2-54	Pet / Cy	S/wMelCS2	1976
2-55	MR T ⁻⁰⁰⁷ / Cy	S/w ⁻	
2-57	sca l(2)C / SM5	M/wMel	
2-58	shr bw ^{2b} abb sp / SM5	S/wMelCS	Umea Drosophila Stock Center, No. 51700
2-59	S Sp Bl / SM1	M/w ⁻	К. Соколова, 1973
2-63	Su 81c / Cy	S/wMelCS2	Л.З. Кайданов
2-67	vg	S/w ⁻	1976
2-75	Df(2)net ⁶² / SM1	S/w ⁻	М.Д. Голубовский, 1974
2-75a	Df(2)net ⁶² / net dp ^{ixi} Cy b pr Bl lt ³ cn ² L ⁴ sp ²	S/w ⁻	Л.А. Кулаков, 1975
2-75b	Df(net l(2)gl) / Cy	M/wMel	†
2-75k	Df(net l(2)gl) / Cy	S/w ⁻	1983
2-76	CyO / Df(2R) M60E	S/w ⁻	Bloomington Dros. Stock Center
2-77	CyO / In(2LR) bw ^{v32g}	S/w ⁻	А. Горчаков, 2000
2-80	cr-u / In(2L+2R) Cy(w ^e)	M/w ⁻	1976
2-86	b ^{88L460}	S/wMelCS2	Ленинакан, 1988

Продолжение таблицы 1

Номер линии в фонде	Генотип линии <i>Drosophila melanogaster</i> *	Цитотип**	Примечание***
2-88	cn ⁹⁰⁰⁶³	<i>M/w</i> ⁻	Умань, 1990
2-89	cn ⁹⁰³⁹¹	<i>S/w</i> ⁻	Запорожье, 1990
2-90	cn ⁹⁰³⁹⁹	<i>M/w</i> ⁻	Запорожье, 1990
2-91	cn ⁹⁰⁴⁵⁰	<i>M/wMel</i>	Запорожье, 1990
2-94	cn ⁹⁰⁷⁷³	<i>S/w</i> ⁻	†
2-95	cn ⁹¹⁰⁶⁶	<i>S/wMelCS</i>	†, Умань, 1991
2-96	cn ⁹¹⁰⁵⁰	<i>M/wMel</i>	Умань, 1991
2-98	ap ^{56f} cn	<i>M/wMel</i>	Тель-Авив, Danny Segal, Н.Е. Грунтенко, 2000
2-99	b ^{K5}	<i>M/wMel</i>	Карамбай, 2000
2-100	ltd ^{K6}	<i>M/wMel</i>	Карамбай, 2000
2-101	ltd ^{K25}	<i>M/wMel</i>	Карамбай, 2000
2-102	stw ¹³ / Cy	<i>M/wMel</i>	Ижевск, 2000
2-103	stw ¹³⁴	<i>S/w</i> ⁻	
2-105	net ^{B27}	<i>M/wMel</i>	Белокуриха, 2000
2-106	bw ^{B7}	<i>S/wMelCS2</i>	Белокуриха, 2000
2-107	bw ^{B-11}	<i>M/wMel</i>	Белокуриха, 2000
2-108	bw ^{B15}	<i>M/wMel</i>	Белокуриха, 2000
2-109	bw ^{B22}	<i>M/wMel</i>	Белокуриха, 2000
2-110	b ^{Ch24}	<i>M/w</i> ⁻	Черкасы, 2001
2-111	b ^{Ch2}	<i>S/w</i> ⁻	Черкасы, 2001
2-114	wg ^{sp-1} Bl ¹ L tm Bc ¹ Pu ² / SM6#16	<i>M/w</i> ⁻	Bloomington Dros. Stock Center, №1219
Группа «хромосома 3»			
3-1	ale	<i>S/wMelCS</i>	И.К. Захаров, Умань, 1971
3-2	w(1); AntpC	<i>S/wMelCS2</i>	И.Ф. Жимулев
3-6	ca	<i>S/w</i> ⁻	1976
3-8	Cu	<i>M/w</i> ⁻	Ю.Н. Иванов, 1979
3-9	Df(3R)Ser, Ser p ^p e ^s / TM3	<i>S/w</i> ⁻	†
3-10	Dfd / TM3, y ⁺ ri p ^p , sep, bx ^{34e} e ^s Ser	<i>M/w</i> ⁻	1976
3-11	Dl ¹⁴ / In(3R)Cyd, Cyd	<i>S/w</i> ⁻	1976
3-13	D In(3LR) / Sb	<i>S/w</i> ⁻	†
3-14	Dr / Ser	<i>M/w</i> ⁻	1979
3-15	e	<i>S/w</i> ⁻	1976
3-16	flr ³ / TM3, Sb Ser	<i>M/wMel</i>	Т. Коана, 1997
3-17	e gl	<i>S/w</i> ⁻	†
3-18	flr ³ / In(3LR) TM3, ri p ^p sep L(3)89 Aa bx ^{34e} e Bd ^S	<i>S/w</i> ⁻	U. Grat, 1994
3-19	flr ³ / TM3, Ser	<i>S/w</i> ⁻	Univ. of Zurich, 1989
3-20	gl	<i>S/w</i> ⁻	1976
3-21	gl ^G	<i>S/w</i> ⁻	1978
3-23	h ri ca	<i>M/wMel</i>	†
3-24	h st rs ³ ss ^a / In(3LR) Ubx ¹³⁰ , Ubx ¹³⁰ e ^s	<i>M/w</i> ⁻	1976
3-26	h th st cp in ri p ^p ss ^a bx ³ sr e / TM1 Me' ri sbd ^e	<i>M/wMel</i>	1976
3-27	Hn ^{[r][2]}	<i>M/w</i> ⁻	†
3-31	Moz ¹ / Ser	<i>M/w</i> ⁻	
3-32	Ly Sb / LVM	<i>M/w</i> ⁻	1976
3-33	Mc / Xa	<i>M/wMel</i>	†

Продолжение таблицы 1

Номер линии в фонде	Генотип линии <i>Drosophila melanogaster</i> *	Цитотип**	Примечание***
3-34	ORR / ORR; flr ³ / In(3LR)TM3, ri p ^p sep l(3) 89 Aa bx ^{34e} e Bd ^S	M/w ⁻	U. Grat, 1994
3-35	mwh	S/w ⁻	†
3-36	mwh	S/w ⁻	U. Grat, 1994
3-37	Pr Dr / TM3, y ⁺ , ae ⁺ , ri, p ^p , sep, bx ^{34e} , e ^S	M/w ⁻	
3-38	Pr Dr / TM3, y ⁺ , ae ⁺ , ri, p ^p , sep, bx ^{34e} , e ^S	M/w ⁻	
3-42	m ¹³¹⁴ roe ¹³¹⁴ / D	S/w ⁻	Горно-Алтайск, 1992
3-43	ri	M/wMel	Л.А. Васильева
3-44	m ¹⁵⁰³ roe ¹⁵⁰³ / D	S/w ⁻	Горно-Алтайск, 1992
3-45	rs	M/wMel	G. Reuter, 1990
3-46	ru h th st cu sr e ^S ca (ru cu ca) / TM6 B, Antp ^{Hu} e ¹ Tb ¹ ca ¹	M/w ⁻	1976
3-47	st ^{V89}	M/w ⁻	Витебск, 1989
3-48	st ^{U85}	S/w ⁻	Умань, 1985
3-49	st ^{U65}	S/w ⁻	Умань, 1965
3-50	st e	S/w ⁻	1976
3-51	st c3G ca / TM1, Me' ri sbd(sp ²)	M/w ⁻	1976
3-53	se	S/w ⁻	1976
3-54	se ^{U65}	S/w ⁻	Умань, 1965
3-55	se ^{B71}	S/w ⁻	Бюракан, 1971
3-56	se ^{G83}	S/w ⁻	Геленджик, 1983
3-57	se ^{V89}	M/w ⁻	Витебск, 1989
3-58	ss bxd k e ^S / Xa	S/w ⁻	1976
3-59	Sb / TM3, y ⁺ ri p ^p sep bx ^{34e} e ^S Ser	M/w ⁻	М.Д. Голубовский, 1973
3-60	Sb Ubx / Xa	M/wMel	
3-62	ve vn ri st	S/wMelCS	Л.А. Васильева
3-63	TM1, Me / TM6, Ubx	S/w ⁻	Т. Коана, 1997
3-64	vn st	S/wMelCS	Garsia Bellido, 1988
3-65	se ^{Z98}	S/w ⁻	Л.П. Захаренко, 1998
3-70	se ^{N89}	M/wMel	Нальчик, 1989
3-71	v; red Su(Hw ²) sbd ²	S/w ⁻	М.А. Волошина, 1992
3-74	Su(Hw ²) sbd / TM1, Me ri sbd ²	S/wMelCS2	И.Ф. Жимулев, 1984
3-75	g ¹⁸⁹¹⁹⁰	M/w ⁻	Умань, 1989
3-78	st ⁹⁰¹¹⁶	M/w ⁻	Умань, 1990
3-80	st ⁹⁰²⁴⁶	M/w ⁻	Умань, 1990
3-81	st ⁹⁰⁰⁹⁰	M/wMel	Умань, 1990
3-82	st ⁹⁰²⁵⁰	M/w ⁻	Умань, 1990
3-84	st ⁹⁰⁰⁹⁰	S/w ⁻	Умань, 1990
3-86	st ⁹⁰²⁴⁷	M/wMel	Умань, 1990
3-89	ry Dr / TM3, Sb Ser kni p ^p sep l(3)89 Aa Ubx ^{bx-34l} e ¹	M/wMel	
3-90	ru h th st cu	M/w ⁻	А. Горчаков, 2000
3-91	th st cu	M/w ⁻	А. Горчаков, 2000
3-92	h th st cu	M/w ⁻	А. Горчаков, 2000
3-93	ru h th st cu sr Pr e ca / TM3, Sb ¹ st ²⁴ pp sep ¹ l(3)89 Aa ¹ Ubx ^{bx-34l} e ¹	M/w ⁻	А. Горчаков, 2000
3-94	Gl Sb Hu / In(3R) Payne	S/w ⁻	Yu. Schwartz, 2000
3-95	bx ^{N2000}	M/wMel	Нальчик, 2000

Продолжение таблицы 1

Номер линии в фонде	Генотип линии <i>Drosophila melanogaster</i> *	Цитотип**	Примечание***
3-95d	bx	S/w ⁻	
3-96	e ^{B4}	M/wMel	Белокуриха, 2000
3-97	e ^{A15}	M/wMel	Асгат, 2000
3-98	e ^{B27}	M/w ⁻	Белокуриха, 2000
3-99	e ^{B28}	M/wMel	Белокуриха, 2000
3-100	det ¹¹⁰	S/w ⁻	Ижевск, 2000
3-101	det ¹⁴⁷	M/wMel	Ижевск, 2000
3-103	sbd ¹⁴²	M/wMel	Ижевск, 2000
3-105	se ^{Ch14}	M/w ⁻	Черкасы, 2001
3-106	se ^{P14}	S/w ⁻	Пычас, 2001
3-107	ru ¹ st ¹ spnE ¹ e ¹ ca ¹ / TM3, Sb ¹	M/w ⁻	В.А. Гвоздев, 2008
3-108	bx ^{IK-2005}	S/w ⁻	Иссык-Куль, 2005
3-109	bx ^{B-2006}	M/wMel	Бишкек, 2006
3-111	Df(3L)fz-M21 st ¹ / TM6	S/w ⁻	Bloomington Dros. Stock Center, № 3126
3-112	Trj ^{S2325}	S/wMelCS	Bloomington Dros. Stock Center, № 12088
Группа «хромосома 4»			
4-2	ci ey	S/w ⁻	1976
4-4	ey	M/wMel	1976
4-5	ey[D]	S/wMelCS2	†
4-7	sv ⁷¹	S/wMelCS2	Владивосток, 1987
4-8	sv ⁿ	S/w ⁻	1976
4-10	ci ^{A39}	M/w ⁻	Асгат, 2000
Транслокации			
604	Y y ⁺ / y, ri	M/wMel	
615	Y ^S XEN B f v y Y ^L y ⁺ & y v bb:= (no free Y)	S/w ⁻	†
618	Df(1) v ^L , y ² ec cv cb Df(1) v ^{L1} m f / FM6, y dm B	S/wMelCS	†
624	C(1)RM, y / 0; T(Y; 2) / Bal x самцы Y ^S X Y ^L , In(1)EN, y/0; T(Y; 2) / Bal	M/w ⁻	
630	C(1)DX, y f / w mus101 ^{A1}	S/w ⁻	
631	C(1)DX, y f / w mus101[D1] f / B[S] Y	S/w ⁻	
633	L(3)183 / In(3LR)TM3, y ⁺ ri p ^p sep Sb bx ^{34e} I ^S Ser	M/w ⁻	
634	mei ^{9L1}	M/wMel	
Мультихромосомная группа			
1	Cy/L ² ; D / Sb	S/w ⁻	1976
2	w; D / Sb	S/wMelCS	Ю.Н. Иванов, 1998
3	sc ^{3B} ; bw; ale	S/w ⁻	Д.П. Фурман, 1982
8	v; e	S/w ⁻	1969
11	bw; e; ey	S/w ⁻	1969
13	br ³ , dx st ; su, dx ² ; ed	S/wMelCS2	1978
14	sn ^w , y; bw; st	S/w ⁻	1987
15	c; e	S/wMelCS	1969
16	w; se	S/w ⁻	1975
17	w; e	S/wMelCS2	1969
20	w; Cy / L	S/wMelCS2	И.Д. Ерохина, 1986
22	y; Dp(1;3), sc ¹⁴ ; flr / TM1; Me, ri, sbd ²	S/w ⁻	Univ. of Zurich, 1985

Продолжение таблицы 1

Номер линии в фонде	Генотип линии <i>Drosophila melanogaster</i> *	Цитотип**	Примечание***
36	y; vg	S/w ⁻	1979
39	w; TM3, Sb / TM6, Tb	S/wMelCS	М.А. Волошина, Индия, 2001
40	CyO; P (Δ 2-3) ⁺ ; ru' st' e ^s ca'	M/w ⁻	А. Горчаков, 2000
42	Dp Y[y ⁺]; CyO, P (Δ 2-3) / Gla	M/w ⁻	А. Горчаков, 2000
43	y ² ; Ly Sb mod ⁴⁴ / TM6, Tb Hu	M/w ⁻	Yu. Schwartz, 2000
44	y, hs-FLP1 22; FRT 10F / CyO	S/w ⁻	Lose Felis de Celis, 2000
45	Cy/Sp; Sb Δ2-3 / TM6	S/wMelCS	Н.Г. Камышев, 1995
50	y ¹ oc ^{R3.2} ; cn ¹ bw ¹ sp ¹ ; LysC ¹ MstProx ¹ GstD5 ¹ Rh6 ¹	M/wMel	†
51	w ¹ ; piwi ² / CyO	M/w ⁻	Л.П. Захаренко, 2008
53	y ac w ¹ ; aub ^{QC42} cn ¹ bw ¹ / CyO	M/w ⁻	В.А. Гвоздев, 2008
54	y w; Cy / If; TM3 Sb / TM6 Tb	S/w ⁻	С.А. Федорова, 2010
55	y w; Cy / If; TM3 Sb / (Δ 2-3) Ki	S/w ⁻	С.А. Федорова, 2010
Группа <i>lethal giant larvae</i>			
280****	l(2)gl a px or / SM5	M/w ⁻	С.В. Bridges, 1933
558	l(2)gl / Cy	M/w ⁻	Умань, 1967
309	l(2)gl / Cy	M/w ⁻	Умань, 1965
DV268	l(2)gl / In(2LR) Cy cn	S/w ⁻	утрата <i>Wolbachia</i> ?
D149	l(2)gl / In(2LR) Cy cn	?/w ⁻	†
D141	l(2)gl / In(2LR) Cy cn	S/wMelCS2	
U245	l(2)gl / In(2LR) Cy cn	M/w ⁻	
2-75*****	Df net ⁶² / Sm1	S/wMelCS2	
Б52	l(2)gl / In(2LR) Cy cn	?/w ⁻	†
705	l(2)gl / In(2LR) Cy cn	S/wMelCS2	
314	l(2)gl / In(2LR) Cy cn	S/wMelCS2	
4067	l(2)gl / In(2LR) Cy cn	S/wMelCS2	
4049	l(2)gl / In(2LR) Cy cn	S/wMelCS2	
4031	l(2)gl / In(2LR) Cy cn	S/wMelCS2	
E430	l(2)gl / In(2LR) Cy cn	S/wMelCS2	
M119	l(2)gl / In(2LR) Cy cn	S/wMelCS2	
M26	Df(2) / Cy	M/wMel	М.Д. Голубовский, Mason, USA
Группа мутаций <i>yellow</i>			
717	y ²	M/wMel	Умань, 1983
719	y ²	M/wMel	Краснодар, 1979
743a	y ²	S/wMelCS2	эксперимент, Л.П. Захаренко, 1998
772	y ²	M/wMel	Умань, 1984
773	y ²	M/wMel	Умань, 1984
775	y ¹	S/wMelCS2	Умань, 1984
787	y ²	M/wMel	Умань, 1984
792	y ²	M/wMel	Умань, 1986
803	y ²	M/w ⁻	Умань, 1987
804	y ²	M/wMel	Умань, 1987
806	y ²	M/wMel	Умань, 1987
807	y ²	M/wMel	Умань, 1987
808	y ²	M/wMel	Умань, 1987
815	y ²	M/w ⁻	Умань, 1987

Окончание таблицы 1

Номер линии в фонде	Генотип линии <i>Drosophila melanogaster</i> *	Цитотип**	Примечание***
827	y ²	S/w ⁻	Умань, 1988
831	y ²	M/w ⁻	Умань, 1988
832	y ²	M/w ⁻	Умань, 1988
835	y ²	M/w ⁻	Умань, 1988
844	y ²	M/wMel	Умань, 1989
845	y ²	M/wMel	Умань, 1989
846	y ²	M/wMel	Умань, 1989
862	y ²	M/w ⁻	Умань, 1991

Примечание. * Описание генотипа дано согласно Lindsley, Grell (1968);

** митотип *D. melanogaster*/наличие (генотип) или отсутствие *Wolbachia*;

*** указывается год создания линии, происхождение линии, фамилия сотрудника, предоставившего линию;

**** линии 2-37 и 280 имеют одно происхождение – Pasadena, USA, Bridges, 1933, в лаборатории были разделены в конце 1960 гг.;

***** линия также включена в фонд «хромосома 2».

† линия утрачена.

мкл экстрагирующего буфера (10 mM Трис-НСl (pH 8,0), 25 mM ЭДТА, 0,5 % SDS, 0,1 M NaCl) при температуре 56 °С в течение двух часов. После преципитации ДНК растворяли в 50 мкл бидистиллированной воды. Статус инфицированности линии устанавливался с помощью метода ПЦР с праймерами, специфичными к гену *Wolbachia wsp* [81F 5'-TGGTCCAATAAGT GATGAAGAAAC-3', 691R 5'-AAAAATTAAC GCTACTCCA-3'] (Zhou *et al.*, 1998). Генотип *Wolbachia* определялся с использованием специфичных праймеров к полиморфным маркерам генома бактерии: двум локусам встройки инсерционной последовательности IS5 (IS5-WD0516/7: F 5'-CCATCAAGGTCTCTTTCA-3', R 5'-TGCAAGGAAAАCTAAACCAG-3'; IS5-WD1310: F 5'-AGGAGAАCTGGTCTACGC-3', R 5'-TGTTGCTGAGCTTTGCT-3'), двум минисателлитным повторам VNTR (VNTR-141: F 5'-GGAGTATTATTGATATGCG-3', R 5'-GAC TAAAGGTTAGTTGCAT-3'; VNTR-105: F 5'-GCAATTGAAAATGTGGTGCC-3', R 5'-ATGACACCTTACTTAACCGTC-3') и инверсии в локусе WD0394-WD0541 (F 5'-AAGTCTGT CACGGTTGAG-3', R 5'-GTAAAAGATGCAG TAAAGG-3') (Riegler *et al.*, 2005). Митотип *D. melanogaster* устанавливался с помощью метода ПЦР на однонуклеотидную замену 37C/T (2187 относительно GenBank NC001709), которая является диагностической для разделения

митохондриальной наследственности на две кланды *M* и *S* (Ilinsky, 2013). Анализ проводился с использованием двух независимых ПЦР: первая – с праймерами COIR1 5'-CCAGTAAATAAT GGGTATCAGTG-3' и 2187-MEL 5'-GCGTTT GATTTTTTGGTGAT-3', вторая – с праймерами COIR1 5'-CCAGTAAATAATGGGTATCAGTG-3' и 2187-CS 5'-GCGTTTGTATTTTTTGGTGAC-3' (Nunes *et al.*, 2008; Ilinsky, 2013). В зависимости от того, какой нуклеотид (С или Т) находится в позиции 2187, ампликон будет нарабатываться только в одной из пробирок. Условия реакции: 25 циклов, первичная денатурация 94 °С – 2 мин, затем 15 с в каждом цикле, отжиг праймеров 55 °С – 30 с, элонгация 72 °С – 30 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы определили цитотипический статус для 353 мутантных линий фонда *D. melanogaster*, которые поддерживаются в лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН (табл. 1, 2). Основное количество линий (78 %) представлено в 3 группах: «хромосома 1» – 33 %, «хромосома 2» – 22 % и «хромосома 3» – 23 %. Группа «yellow» (6 %) исследовалась избирательно, в рассмотрение брали только те линии, которые не скрещивались с какими-либо другими линиями. На долю остальных 4 групп приходится 16 % от общего количества линий.

Таблица 2

Инфицированность бактерией *Wolbachia* линий *Drosophila melanogaster* фонда лаборатории генетики популяций Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН (г. Новосибирск)

Группа мутантных линий	Исследовано линий	Число инфицированных линий			
		генотип <i>Wolbachia</i>			%
		wMel	wMelCS2	wMelCS	
Хромосома 1	117	6	26	2	29
Хромосома 2	77	18	21	2	53
Хромосома 3	82	18	2	4	29
Хромосома 4	6	1	2	0	50
Транслокации	8	2	0	1	38
Мультихромосомная	24	1	3	4	33
<i>yellow</i>	22	13	2	0	68
<i>lethal giant larva</i>	17*	1	9	0	59
Всего	353	60	65	13	39

Примечание. * Одна линия включена в состав группы «хромосома 2».

Для *D. melanogaster* описано 4 главных цитотипа: *M-MEL*, *M-w⁻*, *S-CS* и *S-w⁻*, которые отражают историю материнской родословной линии (Plinsky, 2013). Обозначение *M/S* указывает на одну из двух клад мтДНК *D. melanogaster*, выявляемых по диагностической замене в позиции 37 (*M*: 37-Т и *S*: 37-С), а *MEL/CS/w⁻* указывает на статус инфицированности: к *MEL* группе относятся генотипы *wMel*, *wMel2*, *wMel3* и *wMel4*, а к *CS* – *wMelCS* и *wMelCS2*. Отсутствие *Wolbachia* в линии обозначается как *w⁻*.

1. Инфицированность фонда

Присутствие *Wolbachia* обнаружено у 138 (39 %) линий фонда. Доля инфицированных линий внутри групп оказалась следующей: «хромосома 1» – 29 %, «хромосома 2» – 53 % и «хромосома 3» – 29 %, среди оставшихся (малочисленных) групп этот показатель варьировал от 33 до 68 %.

1.1. Генетическое разнообразие *Wolbachia*

Среди мутантных линий *D. melanogaster* мы выявили 3 генотипа *Wolbachia*: *wMel* (60 линий), *wMelCS2* (65) и *wMelCS* (13). Распределение генотипов между группами оказалось неравномерным. В группе «хромосома 1» от-

мечено только 6 случаев присутствия наиболее распространенного в природных популяциях генотипа *Wolbachia* – *wMel*, тогда как более редкий в природе генотип бактерии *wMelCS2* обнаружен у 26 линий, и у двух линий выявлен *wMelCS*-генотип *Wolbachia*. В группе «хромосома 2» распределение по генотипам *wMel* и *wMelCS2* составляет 18 и 21 линия соответственно, а генотип *wMelCS* выявлен у двух линий. В группе «хромосома 3» две линии инфицированы *Wolbachia* генотипа *wMelCS2* и четыре – *wMelCS*, а генотип *wMel* обнаружен в 18 линиях. В «малочисленных» группах, «*lethal giant larva*», «хромосома 4» и «*yellow*», генотип *wMelCS* отсутствовал, тогда как в мультихромосомной группе выявлены все три генотипа. При более детальном рассмотрении групп выявляются закономерности, которые мы рассматриваем далее в рамках обсуждения распределения генотипов в группах.

1.1.1. Группа «хромосома 1»

В этой группе преобладают неинфицированные линии и линии, инфицированные *Wolbachia* генотипа *wMelCS2*, что объясняется схемой создания многих линий на основе использования самок двух линий-доноров хромосом при выделении анализируемой X-хромосомы.

Соответственно все потомки от подобного скрещивания обладают цитотипом материнского родителя.

Отсутствие *Wolbachia* для 41 из 83 линий в этой группе объясняется использованием в качестве материнского родителя тестерной линии 1-163, содержащей генетическую конструкцию «сцепленные X-хромосомы» – *C(1)DX*, маркированную тремя рецессивными мутациями: *white*, *yellow* и *forked*. Такая конструкция используется для поддержания определенной X-хромосомы в гемизиготном состоянии у самцов (самцы XY, самки XXy). Большинство таких линий создано в лаборатории генетики популяций при скрещивании самца, несущего исследуемую X-хромосому, с самкой 1-163 *C(1)DX, y wf/Y*, которая не инфицирована, и все ее потомки имеют цитотип *S-w⁻*.

В фонде содержатся *C(1)DX*-линии, не связанные родством с линией 1-163. Например, линия 1-142, *C(1)DX, y w/Y*, инфицированная *Wolbachia* генотипа *wMel*, получена из Bowling Green Stock Collection, США. Свободная от *Wolbachia* линия 1-173 *C(1)DX/Y* была создана в эксперименте при радиационном облучении неинфицированной линии дикого типа *w60*. Отметим, что эта линия часто использовалась в экспериментальной работе (Вайсман и др., 2009, 2013), поскольку, согласно картотеке фонда, именовалась как «Canton-S». Однако проверка материнской наследственности выявила несоответствие цитотипа линии *w60* и Canton-S. Истинная линия Canton-S должна обладать цитотипом *S-CS* (генотип *Wolbachia wMelCS*). Не исключено, что отводки этой линии могут обладать цитотипом *S-w⁻*, т. е. быть незараженными, вследствие утраты *Wolbachia*. В случае линии *w60* цитотип оказался *M-w⁻*, что определенно указывает на то, что материнский родитель линии не принадлежал линии Canton-S.

Среди 34 инфицированных линий в группе «хромосома 1» для 26 линий был установлен *wMelCS2*-генотип *Wolbachia*. Это объясняется использованием при выделении этих линий самок маркерной линии с цитотипом *S-CS*, а именно 1-90 *Basc / Basc*. Для некоторых линий, инфицированных бактерией генотипа *wMelCS2*, но не имеющих *Basc*-X-хромосомы, удалось установить факт использования линии 1-90 в

результате уточнения их гибридологической истории по рабочим журналам.

Статус остальных линий в этой группе либо соответствует природным сборам, либо линии были созданы в других лабораториях и гибридологическая история для нас остается неизвестной.

1.1.2. Группа «yellow»

Скрининг группы «yellow» проводился ограниченно, поскольку большинство линий было создано на основе применения метода сцепленных X-хромосом *C(1)DX, y wf*, донором цитоплазмы этих линий являются самки неинфицированной линии 1-163. Взятые нами в анализ линии группы «yellow» были созданы на основе сборов из природных популяций *D. melanogaster*, которые были получены и велись как изосамочки линии, мухи которых не скрещивались с мухами других линий. Исключение представляет только полученная в эксперименте линия 743a, генеалогия которой не до конца ясна. Среди линий группы «yellow» наиболее часто присутствует генотип *Wolbachia wMel* и только в двух случаях зафиксирован генотип *wMelCS2*.

1.1.3. Группа «хромосома 2»

Мухи значительной доли линий в группе «хромосома 2» не скрещивались с какими-либо другими и по материнской наследственности соответствуют сборам из природных популяций *D. melanogaster*. Этим объясняется частое присутствие *Wolbachia* генотипа *wMel* в этой группе в сравнении с группой «хромосома 1».

Для линий, мухи которых скрещивались с мухами других (маркерных) линий, установлена взаимосвязь с линией 2-23, донором хромосомы *In(2LR) Cy cn*. Если использовались самки линии 2-23, то их потомки оказывались инфицированными *Wolbachia* генотипа *wMelCS2*. Однако в отличие от схемы выделения X-хромосомы, для хромосомы 2 принципиально можно использовать самца в качестве донора балансерной хромосомы. В этом случае цитотип будет соответствовать исходной анализируемой линии, а не тестерной. Кроме того, если выделенная из природной популяции *D. melanogaster* хромосома, которая находится в комплаунде с хромосомой

In(2LR) Cy cn, не несет летальную мутацию, то в течение культивирования балансерная хромосома может утратиться. По всей видимости, для большинства линий второй группы так и произошло. Только 5 линий из 21, инфицированных *Wolbachia* генотипа wMelCS2, содержат балансерную хромосому *In(2LR) Cy cn*. Кроме того, не для всех линий основного фонда имеются подробные родословные. Например, можно только предполагать, что при создании линии 2-54 *Pet / Cy*, инфицированной *Wolbachia* генотипа wMelCS2, и некоторых других линий, использовалась линия-маркер 2-23. В этом случае генетическое описание линии должно быть исправлено на *Pet / In(2LR) Cy cn*.

1.1.4. Группа «lethal giant larva»

Группу «lethal giant larva» по критерию локализации мутации можно объединить с группой «хромосома 2», однако мы рассматриваем ее отдельно. Большинство линий этой группы поддерживается в сбалансированном состоянии с хромосомой *In(2LR) Cy cn*. Для линий DV268, D149, D141, U245, B52, 705, 314, 4067, 4049, 4031, E430 и M119 донор балансерной хромосомы *In(2LR) Cy cn* документирован – это линия 2-23, самки которой использовались при создании указанных линий. В соответствии с этим мухи этих линий должны быть инфицированы *Wolbachia* генотипа wMelCS2. Однако для четырех линий, DV268, D149, U245 и B52, показан отрицательный статус инфицированности, что, с одной стороны, может говорить о потере эндосимбионта в течение их культивирования в лабораторных условиях, а с другой стороны, нельзя исключать и возможность неполноты сведений по истории родословных. Проверка митотипического статуса показала, что линия DV268 обладает S-митотипом, что не исключает возможности утраты *Wolbachia* в ходе культивирования линии, а в случае линии U245 митотип принадлежал другой кладе, нежели свойственной предполагаемому материнскому родителю – линии 2-23. Самым простым объяснением отличия цитотипа у линии U245 является то, что линия-донор балансерной хромосомы использовалась в качестве отцовского родителя, а анализируемая хромосома 2 была получена от самки, которая и обладала цитотипом M-w.

Мы не смогли определить митотип линий D149 и B52, поскольку ко времени типирования митохондриальной наследственности эти линии были утрачены.

Для линий 558 и 309 по записям в рабочих журналах удалось установить, что они несли материнскую наследственность линии 2-23, но впоследствии проводились скрещивания с другими линиями. Установить, в каком направлении и с какими именно линиями проводилась гибридологическая работа, в настоящее время невозможно. Однако даже если факт межлинейного скрещивания установлен, то это не определяет потерю эндосимбионта. Возможно, что бактерия была утрачена в течение культивирования линии, а в скрещиваниях использовались самцы из других линий в качестве отцовского родителя. В таком случае замещение цитоплазмы не должно наблюдаться. Поэтому мы внесли поправку для линий 558 и 309: заменили обозначения *l(2)gl / In(2LR) Cy cn* на *l(2)gl / Cy* (табл. 1).

Еще один случай возможной потери эндосимбионта мы обнаружили в линии 280 группы «lethal giant larva», которая представляет собой дубль линии 2-37 из группы «хромосома 2». Эти линии разделены в конце 1960-х годов и поддерживаются независимо в лабораторном фонде. Свое происхождение линия 2-37 ведет из фонда мух лаборатории Т. Моргана, США. В то время как мухи линии 2-37 инфицированы *Wolbachia* генотипа wMel, мухи линии 280 свободны от бактерии. При этом мухи обеих линий имеют одинаковый митотипический статус.

Предполагаемые факты утраты эндосимбионта в культивируемых линиях фонда могут послужить отправной точкой в исследованиях влияния определенных локусов ядерного генома *Drosophila* на присутствие и плотность бактерии в клетках хозяина. В частности, не исключена причастность локуса *lethal giant larva* к таким событиям, как «излечение» от *Wolbachia*.

1.1.5. Группа «хромосома 3»

Среди инфицированной цитоплазмы в группе «хромосома 3» преобладает генотип *Wolbachia* wMel. В четырех случаях выявлен генотип wMelCS, и две линии оказались инфицированы *Wolbachia* генотипа wMelCS2. Значительная

доля, а именно 71 % линий, не инфицирована. По всей видимости, это объясняется созданием многих линий с использованием неинфицированной линии 3-13, несущей балансерные хромосомы, маркированные доминантными видимыми мутациями *Dichate* и *Stubble (D/Sb)* с летальным рецессивным действием, и линии 1 (мультихромосомная группа), маркированной по хромосомам 2 и 3 – *Cy/L; D/Sb*.

1.2. Митотипическое и цитотипическое разнообразие *D. melanogaster*

Тестирование митохондриальной наследственности по однонуклеотидному полиморфизму 37C/T однозначно выявило принадлежность каждой линии к *M*- или *S*-кладе. Доля линий *S*-клады составляет 62 %, а *M*-клады – 38 %.

Цитотип формируется в результате сопоставления данных по инфекционному и митотипическому статусу линии. В соответствии с описанными классами «материнской наследственности» (две группы генотипов *Wolbachia* и отсутствие инфекции, а также два митотипа) теоретически могут существовать 6 цитотипов. В действительности же в линиях фонда наблюдалось только 4 цитотипа *M-MEL*, *M-w⁻*, *S-CS*, *S-w⁻* (табл. 3), что указывает на существование коэволюции митохондриальной и бактериальной наследственности (Richardson *et al.*, 2012; Plinsky, 2013).

Среди линий *D. melanogaster* фонда лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН наиболее представлен цитотип *S-w⁻*, обнаруженный для 40 % линий. Такая частая встречаемость данного цитотипа определяется использованием при создании новых линий самок линии 1-163, обладающих этим цитотипом. Доля остальных цитотипов варьирует от 17 до 22 %. При этом заметная доля редкого для природных популяций цитотипа *S-CS* образована линиями, созданными при использовании самок балансерных линий 1-90 и 2-23, инфицированных *Wolbachia* генотипа wMelCS2.

Мы показали широкую распространенность и генотипическое разнообразие эндосимбионта *Wolbachia* среди мутантных и тестерных линий фонда лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН. Эндосимбионт *Wolbachia* поддерживается в течение длительного времени в линиях фонда. В двух случаях для линий DV268 и DV280 мы предполагаем, что *Wolbachia* могла быть утрачена в ходе культивирования. Цитотипическое разнообразие представлено 4 описанными ранее главными цитотипами: *M-MEL*, *M-w⁻*, *S-CS*, *S-w⁻*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Первое сообщение о присутствии *Wolbachia* у *D. melanogaster* было сделано на основе результатов микроскопических исследований

Таблица 3

Цитотипы мутантных линий *Drosophila melanogaster* фонда лаборатории генетики популяций Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН (г. Новосибирск)

Группа	Число линий	Цитотип			
		<i>M-MEL</i>	<i>M-w⁻</i>	<i>S-CS</i>	<i>S-w⁻</i>
Хромосома 1	117	6	12	28	70
Хромосома 2	77	18	14	23	22
Хромосома 3	82	18	26	6	32
Хромосома 4	6	1	1	2	2
Транслокации	8	2	2	1	3
Мультихромосомная	24	1	5	7	11
<i>yellow</i>	22	13	6	2	1
<i>lethal giant larva*</i>	17	1	5	9	1
Всего	353	60	71	78	142

Примечание. * Для двух линий митотип не определен, поскольку они погибли до проведения анализа.

в середине 1960-х гг. (Wolstenholme, 1965), а в начале 1990-х гг. появились сообщения о молекулярной идентификации эндосимбионта (Glover *et al.*, 1990; O'Niell, Karr, 1990; O'Niell *et al.*, 1992). Последующие исследования выявили широкую распространенность бактерии в природных популяциях (Solignac *et al.*, 1994; Hoffmann *et al.*, 1994, 1998; Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский, 2008; Nunes *et al.*, 2008; Verspoor, Haddrill, 2011; Richardson *et al.*, 2012; Pinsky, 2013) и лабораторных линиях *D. melanogaster* (Clark *et al.*, 2005). Оказалось, что *Wolbachia* способна оказывать влияние на самые разные аспекты биологии плодовой мушки, а именно на репродуктивную систему (Fry *et al.*, 2004), продолжительность жизни (Fry *et al.*, 2004; Вайсман и др., 2009), проявление некоторых ядерных мутаций (Starr, Cline, 2002; Clark *et al.*, 2005; Ikeya *et al.*, 2009), и даже определяет разнообразие мтДНК вида посредством непрямого отбора (Илинский, Захаров 2007а; Nunes *et al.*, 2008; Richardson *et al.*, 2012; Pinsky, 2013).

Наблюдаемое генотипическое разнообразие *Wolbachia* в природных популяциях *D. melanogaster* вызывает ряд вопросов. Каково генотипическое разнообразие *Wolbachia* в линиях фонда? Имеется ли связь инфицированности с длительностью культивирования линий дрозофил в лаборатории? Как связаны инфицированность и история происхождения линий? Есть ли влияние мутаций на присутствие в цитоплазме *D. melanogaster* эндосимбионта *Wolbachia*?

Ответы на эти вопросы могут помочь выявить особенности биологии взаимоотношений симбионт–хозяин. Это может стать особенно важным для работ, в которых цитоплазматический фон *D. melanogaster* не принимался во внимание, что подразумевает переосмысление полученных ранее результатов, а также учет существующих различий по цитоплазматическим факторам при планировании и постановке в будущем экспериментов с использованием лабораторных тестерных линий.

Из 6 генотипов *Wolbachia*, описанных ранее для природных популяций дрозофил, в мутантных линиях фонда лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН мы выявили 3: wMel, wMelCS, wMelCS2. Эти генотипы входят в группу 4 наиболее распространенных в природе генотипов. Нами не был выявлен распростра-

ненный на обширной территории Азии (Индия, Япония, Китай, страны Юго-Восточной Азии) генотип wMel2. Наблюдаемое генотипическое разнообразие *Wolbachia* среди мутантных линий фонда объясняется, во-первых, цитотипом линий-основателей, используемых при создании новых линий, во-вторых, территорией сборов природных популяций для линий, выделенных и поддерживаемых как изосамочки и изогенные линии. Действительно, наиболее часто сборы мух из природных популяций сотрудниками нашей лаборатории осуществляются на территории Восточной Европы, Средней Азии и Алтая, для популяций которых характерно присутствие генотипов wMel, wMelCS и wMelCS2. Таким образом, представленность генотипов *Wolbachia* в фонде мутантных линий может отражать качественный состав генотипов на исследуемой территории. Однако количественное выражение встречаемости генотипов в целом по фонду слабо согласуется с наблюдаемыми в природных популяциях *D. melanogaster* частотами генотипов *Wolbachia* (Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский, 2008). Так, в природных популяциях наиболее часто встречается генотип wMel, который зачастую представлен тотально среди инфицированных особей. В случае фонда мутантных линий встречаемость генотипа wMel составляет менее 50 %, тогда как на долю редкого в природе генотипа wMelCS2 приходится 47 % от доли всех инфицированных линий.

Поскольку митохондрии и эндосимбионт *Wolbachia* сонаследуются вместе, можно ожидать коэволюционные изменения двух компонентов материнской наследственности (Hurst, Jiggins, 2005). Указание на существование подобного эффекта для *D. melanogaster* было констатировано в нескольких публикациях (Pinsky, Zakharov, 2006; Илинский, Захаров, 2007а; Nunes *et al.*, 2008) и окончательно установлено в недавних работах (Richardson *et al.*, 2012; Pinsky, 2013).

Использование однонуклеотидного полиморфизма 37С/Т для подразделения митотипов на две древние клады обосновывается подробными исследованиями разнообразия мтДНК и филогенетическим анализом. Предковая популяция *D. melanogaster*, из которой развилось современное разнообразие материнской наследственности, существовала не позднее

14 тыс. лет назад в тропической Африке (David, Caru, 1988; Richardson *et al.*, 2012; Ilinsky, 2013). В этой популяции произошло разделение митохондриальной наследственности на две главные клады *M* и *S*, а также на две ныне существующие группы генотипов *Wolbachia*.

В нашем исследовании фонда мутантных лабораторных линий *D. melanogaster* мы выявили присутствие четырех цитотипов, *M-MEL*, *M-w⁻*, *S-CS* и *S-w⁻* (табл. 3), а не 6 теоретически возможных, что согласуется с данными по природным популяциям (Ilinsky, 2013). Наиболее представлен цитотип *S-w⁻*, обнаруженный у 40 % линий. Такая частая встречаемость цитотипа определяется линиями, созданными на основе линии 1-163, обладающей этим цитотипом. Необходимо отметить, что существование двух цитотипов, *M-CS* и *S-MEL*, не исключено. Обнаружение этих сочетаний будет указывать на факт горизонтального переноса компонента материнской наследственности. При этом наиболее вероятно этим компонентом будет выступать эндосимбионт. Перенос *Wolbachia* в эволюции между разными видами документирован очень хорошо (Cordaux *et al.*, 2001; Sintupachee *et al.*, 2006; Baldo *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2012; Guidolin, Consoli, 2013). При этом перенос внутри вида, как ожидается, также должен быть интенсивным относительно эволюционной шкалы времени, однако подобные факты выявить трудно и они не многочисленны. Так, разнообразные комбинации генотипических профилей *Wolbachia* и гаплотипов митохондриальной ДНК у паука *Agelenopsis aperta* (Baldo *et al.*, 2008) авторами аргументированно объясняются именно горизонтальным переносом вольбахии внутри вида. В случае *D. melanogaster* мы можем констатировать факт горизонтального переноса, если обнаружим сочетание генотипа *Wolbachia* из группы *Mel* с митохондриальным фоном *S* (или *CS* с *M*), но не в случае переноса *Mel* на фон *M* (*CS – S*). Однако при высокой частоте встречаемости цитотипов *M-Mel* и *M-w⁻* в природных популяциях все основное количество событий горизонтального переноса должно происходить именно среди этих цитотипов.

Определение митотипа и статуса инфицированности линии в совокупности с генотипированием *Wolbachia* оказывается простым и

надежным приемом проверки происхождения линий или истинности гибридов. Такая проверка оказывается особенно актуальной, ввиду того что во многих лабораториях мира в экспериментальной работе используется ограниченное число линий дикого типа. Например, две наиболее популярные линии *D. melanogaster*, *Canton-S* и *Oregon-R*, на основе которых создавались многие другие линии, обладают цитотипами *S-CS* (*wMelCS*) и *S-w⁻* соответственно.

Использованные нами протоколы определения цитотипа могут найти прикладное применение в экспериментальной работе с *D. melanogaster*, не связанной напрямую с исследованием *Wolbachia* или митохондриальной наследственности. Так, в работе с экспериментальными популяциями при использовании изначально двух цитотипов, можно оценивать уровень генетического дрейфа, поскольку матерински наследуемые факторы зачастую можно рассматривать как селективно нейтральные.

Работа частично финансировалась и поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, гранты № 12-04-01319-а и № 12-04-31784-мол_а, и Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа: Современное состояние и проблемы развития», проект № 30.33.

Авторы благодарят Н.А. Вайсман за замечания и предложения, высказанные при описании группы «*lethal giant larva*».

ЛИТЕРАТУРА

- Вайсман Н.Я., Илинский Ю.Ю., Голубовский М.Д. Популяционно-генетический анализ продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*: сходные эффекты эндосимбионта *Wolbachia* и опухолевого супрессора *Igl* в условиях температурного стресса // Журн. общ. биологии. 2009. Т. 70. № 5. С. 425–434.
- Вайсман Н.Я., Голубовский М.Д., Илинский Ю.Ю. Различия в параметрах продолжительности жизни и ее пол-специфичности в популяциях человека и их моделирование на дрозофиле // Усп. геронтологии. 2013. Т. 26. № 1. С. 66–75.
- Илинский Ю.Ю. Эндосимбионт *Wolbachia* в природных популяциях *Drosophila melanogaster* Северной Евразии: Дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2008. 154 с.
- Илинский Ю.Ю., Захаров И.К. Характеристика инфицированности цитоплазматическим эндосимбионтом *Wolbachia* популяции *Drosophila melanogaster* Умани // Докл. АН. 2007а. Т. 413. № 4. С. 561–563.

- Илинский Ю.Ю., Захаров И.К. Эндосимбионт *Wolbachia* в евразийских популяциях *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2007. Т. 43. № 7. С. 905–915.
- Илинский Ю.Ю., Захаров И.К. Цитоплазматическая несовместимость у *Drosophila melanogaster*, обусловленная различными генотипами *Wolbachia* // Экол. генетика. 2009. Т. 7. № 2. С. 11–18.
- Струнов А.А., Илинский Ю.Ю., Захаров И.К., Киселева Е.В. Влияние повышенной температуры на выживаемость *Drosophila melanogaster*, индуцированных патогенным штаммом бактерий *Wolbachia* // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2013. Т. 17. № 2. С. 267–276.
- Baldo L., Ayoub N.A., Hayashi C.Y. *et al.* Insight into the routes of *Wolbachia* invasion: high levels of horizontal transfer in the spider genus *Agelenopsis* revealed by *Wolbachia* strain and mitochondrial DNA diversity // Mol. Ecol. 2008. V. 17. P. 557–569.
- Bandi C., Anderson T.J., Genchi C., Blaxter M.L. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes // Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1998. V. 265. P. 2407–2413.
- Bian G., Joshi D., Dong Y. *et al.* *Wolbachia* invades *Anopheles stephensi* populations and induces refractoriness to *Plasmodium* infection // Science. 2013. V. 340. P. 748.
- Bressac C., Rousset F. The reproductive incompatibility system in *Drosophila simulans*: Dapi-staining analysis of the *Wolbachia* symbionts in sperm cysts // J. Invertebr. Pathol. 1993. V. 61. P. 226–230.
- Clark M.E., Anderson C.L., 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.
- Cordaux R., Michel-Salzat A., Bouchon D. *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission // J. Evol. Biol. 2001. V. 14. P. 237–243.
- David J.R., Capy P. Genetic variation of *Drosophila melanogaster* natural populations // Trends Genet. 1988. V. 4. P. 106–111.
- De Barro P.J., Hart P.J. Antibiotic curing of parthenogenesis in *Eretmocerus mundus* (Australian parthenogenic form) // Entomol. Experimentalis et Applicata. 2001. V. 99. P. 225–230.
- Dobson S.L., Marsland E.J., Rattanadechakul W. Mutualistic *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus*: Accelerating cytoplasmic drive // Genetics. 2002. V. 160. P. 1087–1094.
- Finnegan D.J. Transposable elements // *Drosophila* Information Service. 1990. No. 68. P. 371–382.
- Fry A.J., Palmer M.R., Rand D.M. Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster* // Heredity. 2004. V. 93. P. 379–389.
- Glover D.M., Raff J., Karr T.L. *et al.* Parasites in *Drosophila* embryos // Nature. 1990. V. 348. P. 117.
- Guidolin A.S., Consoli F.L. Molecular characterization of *Wolbachia* strains associated with the invasive Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* in Brazil // Microb. Ecol. 2013. V. 65. P. 475–486.
- Hedges L.M., Brownlie J.C., O'Neill S.L., Johnson K.N. *Wolbachia* and virus protection in insects // Science. 2008. V. 322. P. 702.
- Hilgenboecker K., Hammerstein P., Schlattmann P. *et al.* How many species are infected with *Wolbachia*? – A statistical analysis of current data // FEMS Microbiol. Lett. 2008. V. 281. P. 215–220.
- Hoffmann A.A., Clancy D.J., Merton E. Cytoplasmic incompatibility in Australian populations of *Drosophila melanogaster* // Genetics. 1994. V. 136. P. 993–999.
- Hoffmann A.A., Hercus M., Dagher H. Population dynamics of the *Wolbachia* infection causing cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster* // Genetics. 1998. V. 148. P. 221–231.
- Hurst G.D.D., Jiggins F.M. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts // Proc. Biol. Sci. 2005. V. 272. P. 1525–1534.
- Ikeya T., Broughton S., Alic N. *et al.* The endosymbiont *Wolbachia* increases insulin/IGF-like signalling in *Drosophila* // Proc. R. Soc. B. 2009. V. 206. P. 3799–3807.
- Ilnsky Y., Zakharov I.K. Genetic correlation between types of mtDNA of *Drosophila melanogaster* and genotypes of its primary endosymbiont, *Wolbachia* // *Drosophila* Information Service. 2006. V. 89. P. 89–91.
- Ilnsky Y. Coevolution of *Drosophila melanogaster* mtDNA and *Wolbachia* genotypes // PLoS ONE. 2013. V. 8. No. 1. e54373.
- Kremer N., Voronin D., Charif D. *et al.* *Wolbachia* interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects // PLoS Pathog. 2009. V. 5. No. 10. e1000630.
- Lindsley D.L., Grell E.H. Genetic Variation of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution of Washington Publ., 1968. 472 p.
- Lindsley D.L., Zimm G. The Genome of *Drosophila melanogaster* // *Drosophila* Information Service. 1985. No. 62. 227 p.
- Lindsley D.L., Zimm G. The Genome of *Drosophila melanogaster* // *Drosophila* Information Service. 1990. No. 68. 382 p.
- Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms // J. Mol. Biol. 1961. V. 3. P. 208–218.
- Mercot H., Charlat S. *Wolbachia* infections in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: Polymorphism and levels of cytoplasmic incompatibility // Genetica. 2004. V. 120. P. 51–59.
- 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.
- Mobile DNA / Eds D.E. Berg, M.M. Howe. American Society for Microbiology. Washington, DC. 1989. 958 p.
- Nunes M.D.S., Nolte V., Schlotterer C. Nonrandom *Wolbachia* infection status of *Drosophila melanogaster* strains with different mtDNA haplotypes // Mol. Biol. Evol. 2008. V. 25. No. 11. P. 2493–2498.
- O'Neill S.L., Karr T.L. Bi-directional incompatibility between on specific populations of *Drosophila simulans* // Nature. 1990. V. 348. P. 178–180.
- O'Neill S.L., Giordano R., Colbert A.M. *et al.* 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 2699–2702.
- Osborne S.E., Leong Y.S., O'Neill S.L., Johnson K.N. Variation in antiviral protection mediated by different *Wolbachia* strains in *Drosophila simulans* // PLoS Pathog. 2009. V. 5. No. 11. P. 1–9.
- Reynolds K.T., Thomson L.J., Hoffmann A.A. The effects of host age, host nuclear background and temperature on phenotypic effects of the virulent *Wolbachia* strain popcorn in *Drosophila melanogaster* // Genetics. 2003. V. 164. P. 1027–1034.

- Richardson M.F., Weinert L.A., Welch J.J. *et al.* Population genomics of the *Wolbachia* endosymbiont in *Drosophila melanogaster* // PLoS Genet. 2012. V. 8. No. 12. e1003129.
- Riegler M., Sidhu M., Miller W.J., O'Neill S.L. Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster* // Curr. Biol. 2005. V. 15. P. 1428–1433.
- Riegler M., Iturbe-Ormaetxe I., Woolfit M. *et al.* Tandem repeat markers as novel diagnostic tools for high resolution fingerprinting of *Wolbachia* // BMC Microbiol. 2012. V. 12.
- Sintupachee S., Milne J.R., Poonchaisri S. *et al.* Closely related *Wolbachia* strains within the pumpkin arthropod community and the potential for horizontal transmission via the plant // Microbial Ecol. 2006. V. 51. P. 294–301.
- Solignac M., Vautrin D., Rousset F. Widespread occurrence of the proteobacteria *Wolbachia* and partial cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster* // C. R. Acad. Sci. Paris. 1994. V. 317. P. 461–470.
- Starr D.J., Cline T.W. A host parasite interaction rescues *Drosophila* oogenesis defects // Nature. 2002. V. 418. P. 76–79.
- Taylor M.J., Bandi C., Hoerauf A.M., Lazdins J. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes: A target for control? // Parasitol. Today. 2000a. V. 16. P. 179–180.
- Taylor M.J., Cross H.F., Bilo K. Inflammatory responses induced by the filarial nematode *Brugia malayi* are mediated by lipopolysaccharide-like activity from endosymbiotic *Wolbachia* bacteria // J. Exp. Med. 2000b. V. 191. P. 1429–1436.
- Teixeira L., Ferreira A., Ashburner M. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster* // PLoS Biol. 2008. V. 6. No. 12. P. 2753–2763.
- Verspoor R.L., Haddrill P.R. Genetic diversity, population structure and *Wolbachia* infection status in a worldwide sample of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans* populations // PLoS ONE. 2011. V. 6. No. 10. e26318.
- Watanabe M., Tagami Y., Miura K. *et al.* Distribution patterns of *Wolbachia* endosymbionts in the closely related flower bugs of the genus *Orius*: Implications for coevolution and horizontal transfer // Microb. Ecol. 2012. V. 64. P. 537–545.
- Werren J.H. Biology of *Wolbachia* // Annu. Rev. Entomol. 1997. V. 42. P. 587–609.
- Wolstenholme D.R. A DNA and RNA-containing cytoplasmic body in *Drosophila melanogaster* and its relation to flies // Genetics. 1965. V. 52. P. 949–975.
- Zheng Y., Ren P.-P., Wang J.-L., Wang Y.-F. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility is associated with decreased Hira expression in male *Drosophila* // PLoS ONE. 2011. V. 6. No. 4. e19512.
- Zabalou S., Apostolaki A., Pattas S. *et al.* Multiple rescue factors within a *Wolbachia* strain // Genetics. 2008. V. 178. P. 2145–2160.
- Zug R., Hammerstein P. Still a host of hosts for *Wolbachia*: Analysis of recent data suggests that 40 % of terrestrial arthropod species are infected // PLoS ONE. 2012. V. 7. No. 6. e38544.
- Zhou W., Rousset F., O'Neil S. Phylogeny and pcr-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences // Proc. Biol. Sci. 1998. V. 265. P. 509–515.

**CYTOTYPES OF MUTANT *DROSOPHILA MELANOGASTER*
STOCKS FROM THE COLLECTION OF THE GENETICS OF POPULATION
LABORATORY OF THE INSTITUTE OF CYTOLOGY AND GENETICS SB RAS:
GENOTYPES OF THE *WOLBACHIA* ENDOSYMBIONT AND HOST MITOTYPES**

Yu.Yu. Ilinsky^{1,2}, R.A. Bykov¹, I.K. Zakharov^{1,2}

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

² Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia

Summary

Wolbachia is a genus of maternally inherited bacteria that is widespread in field populations of *Drosophila melanogaster*. However, there are no sufficient data on *Wolbachia* infection among laboratory mutant stocks. We show the wide prevalence of *Wolbachia* among 353 mutant stocks from the collection of the Genetics of Populations Laboratory, Institute of Cytology and Genetics (ICG), Novosibirsk, Russia. The endosymbiont has been stably inherited in laboratory stocks for a long period of time. Two uninfected stocks from the collection are considered as a result of bacteria loss during maintaining them in the laboratory. There are three *Wolbachia* genotypes: wMel, wMelCS, and wMelCS2 in the collection. As endosymbiont is coinherited with mitochondria the definite cytotypes are formed from *Wolbachia* genotypes and mytotypes. We have revealed four cytotypes: M-MEL, M-w⁻, S-CS, and S-w⁻ in the collection that had been described earlier for field populations of *D. melanogaster*. The cytotypic and genotypic frequency patterns differ significantly from those encountered in the wild, that is accounted for genealogy of each stock.

Key words: genetic collections, *Drosophila melanogaster*, *Wolbachia*, mitotype, genotype, cytotypic, coevolution.

УДК 633.358: 631.527: 581.577.2

ИЗУЧЕНИЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ – НОДУЛЯЦИИ И АЗОТФИКСАЦИИ – У РАЙОНИРОВАННЫХ СОРТОВ И ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЛИНИЙ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM* L.) ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ РАСТЕНИЙ НА ДВУХ ФОНАХ ПИТАНИЯ АЗОТОМ

© 2013 г. Л.В. Омелянюк¹, К.К. Сидорова², В.К. Шумный²

¹ Государственное научное учреждение Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Россельхозакадемии, Омск, Россия, e-mail: milya1302@yandex.ru;

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия, e-mail: sidорова@bionet.nsc.ru.

Поступила в редакцию 24 июня 2013 г. Принята к публикации 12 августа 2013 г.

Изучены симбиотические признаки: нодуляция, азотфиксация и продуктивность у 7 районированных сортов и 3 перспективных линий гороха (*Pisum sativum* L.). Выявлены сортовые различия по признакам нодуляции и азотфиксации при выращивании на двух фонах азота. Полученные данные могут быть использованы в селекции гороха на повышение азотфиксации.

Ключевые слова: горох, *Pisum sativum* L., сорт, продуктивность, нодуляция, азотфиксация.

ВВЕДЕНИЕ

Зернобобовые культуры – горох, соя, фасоль, бобы, вика и др. – являются основным источником пищевого и кормового растительного белка. Положительная особенность бобовых культур заключается в способности вступать в симбиоз с клубеньковыми бактериями *Rhizobium leguminosarum* и фиксировать молекулярный азот из воздуха.

Клубеньковые бактерии, способные фиксировать азот, обладают ферментным комплексом «нитрогеназа», которая восстанавливает молекулярный азот до аммиачной формы. При бобово-ризобиальном симбиозе от растения-хозяина бактерии получают все необходимые элементы питания и в первую очередь углеводы, которые необходимы для роста и размножения бактерий, а также для фиксации ими азота атмосферы как источника энергии. Зерновые бобовые культуры могут за один вегетационный период фиксировать азот из воздуха в среднем

70 кг/га, а бобовые травы – 120 кг/га (Вавилов, Посыпанов, 1983).

Природные запасы азота практически не ограничены, так как атмосфера на 78 % состоит из азота. Следует отметить, что источником азота для производства азотных минеральных удобрений также служит азот воздуха. Техническая фиксация его возможна при высоких температурах 400–500 °С и давлении в несколько десятков мегапаскалей. То есть производство азотных минеральных удобрений – очень дорогой энергоемкий процесс.

Биологическая фиксация азота воздуха в микроорганизмах происходит при естественных параметрах температуры и давления. При активной азотфиксации около 30 % углеводов, синтезированных растением в процессе фотосинтеза, затрачивается клубеньками на связывание азота воздуха. До настоящего времени селекция гороха, как и других зернобобовых культур, была ориентирована только на признаки, определяющие продуктивность растения,

длину вегетационного периода, содержание белка, устойчивость к полеганию, неосыпаемость семян. По сравнению с другими бобовыми культурами (вика, фасоль, бобы, люпин и др.) у гороха лучше изучена частная генетика и селекция (Генетика и селекция гороха, 1975).

Генетика симбиотических признаков макросимбионта стала активно развиваться только с 80-х годов прошлого столетия (Jacobsen, Nijdam, 1983; Duc, Messenger, 1989; Gresshoff, 1993). В Российской Федерации по симбиогенетике гороха *Pisum sativum* L. обширные исследования ведутся в двух институтах: ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН (г. Москва) и Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск). Результаты исследований опубликованы в серии монографий и статей в журналах «Биологическая фиксация азота» (1991); «Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции» (1991); «Симбиотическая азотфиксация: генетические, селекционные и эколого-агрохимические аспекты» (2006). В ИЦиГ СО РАН создана коллекция симбиотических мутантов гороха, с использованием которой идентифицированы гены, контролирующие симбиотические признаки: устойчивость к симбиозу с клубеньковыми бактериями, неэффективные клубеньки, супернодуляция (большое количество мелких клубеньков, расположенных по всему корню), гипернодуляция (клубеньки крупные формируются в основном в средней части корня) (Сидорова, Шумный, 2003).

До недавнего времени существовало мнение о том, что у сорта нельзя одновременно повысить продуктивность растения и активность азотфиксации, так как в этих процессах используется один и тот же источник энергии – продукты фотосинтеза. Однако, как показали результаты исследований, проведенных в ИЦиГ СО РАН, сочетание в одном генотипе гороха разных аллелей разных генов – доминантного *Nod5*, контролирующего гипернодуляцию, и рецессивного *nod4*, контролирующего супернодуляцию, можно обеспечить активную азотфиксацию и хорошую продуктивность (Сидорова и др., 2010). В ИЦиГ СО РАН впервые разработан метод использования суперклубеньковых му-

тантов в селекции на повышение азотфиксации (Сидорова и др., 2012).

Цель данной работы – изучить симбиотические признаки, нодуляцию (образование корневых клубеньков) и азотфиксацию, у районированных сортов и перспективных линий гороха *Pisum sativum* L., созданных в Государственном научном учреждении Сибирском научно-исследовательском институте сельского хозяйства Россельхозакадемии, г. Омск (ГНУ СибНИИСХ).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве исходного материала были использованы 7 районированных в 10-м Западно-Сибирском регионе сортов и 3 перспективные линии гороха *Pisum sativum* L., созданных в ГНУ СибНИИСХ Россельхозакадемии.

Урожайность зерна у сортов и линий гороха изучали при выращивании на полях СибНИИСХ – в рамках конкурсного сортоиспытания по общепринятым методикам, а ИЦиГ СО РАН – в гидропонной теплице. Количество клубеньков и активность азотфиксации у растений изучали в теплице при посеве в стеллажах и в сосудах. В качестве субстрата в обоих опытах использовали керамзит.

При посеве в стеллажах применяли стандартный фон минерального питания (Чесноков, Базырина, 1957), за исключением азота, который начинали вносить в фазу полных всходов в дозе 20 % от полной нормы. Начиная с фазы «6–7-й узел стебля» дозу азота увеличивали до полной нормы. Такая схема обусловлена тем, что азот отрицательно влияет на формирование клубеньков.

При посеве в сосудах азот начинали вносить в дозе 20 % от полной нормы в фазу полных всходов. Через 10 дней после всходов дозу азота увеличивали до 40 % от полной нормы, которую соблюдали до конца опыта.

Использовали следующий состав питательной среды: основные элементы – $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; K_2SO_4 ; KH_2PO_4 ; MgSO_4 ; микроэлементы – H_3BO_3 ; MnSO_4 ; CuSO_4 ; ZnSO_4 ; $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$; FeSO_4 .

При выращивании растений в теплице, как в стеллажах, так и в сосудах, инокуляцию проводили в фазу проростков штаммом 250а

Rhizobium leguminosarum, полученным от его создателя (НИИ сельскохозяйственной микробиологии) и хорошо изученным на горохе.

Число корневых клубеньков, активность азотфиксации определяли у 10 растений каждого сорта в фазу «начало цветения» ацетиленовым методом (Hardy *et al.*, 1968) на газовом хроматографе «ЦВЕТ 500», Россия. На этих же делянках (только в стеллажах) в фазу созревания оценивали следующие признаки продуктивности: «высота растений», «число и масса семян/растение». Статистическая обработка выполнена по общепринятой методике (Доспехов, 1985).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показатели по урожайности зерна, длине вегетационного периода, содержанию белка в зерне позволяют утверждать, что созданные сорта и перспективные линии отвечают требованиям, обеспечивающим устойчивое производство зерна гороха при разных погодных условиях (табл. 1). Следует отметить показатели хорошей продуктивности этих сортов и линий в очень засушливое лето 2012 года. Наиболее продуктивными оказались районированные сорта гороха Омский 9, Омский 7, Благовест, Сибур, а также линии Л37/03 и Л38/05.

При выращивании растений гороха в стеллажах гидропонной теплицы инокуляцию проростков клубеньковыми бактериями проводили в один срок. Однако по количеству клубеньков азотфиксирующих бактерий между сортами выявлены существенные различия (табл. 2). Наибольшее число клубеньков – 511 шт./растение отмечено у сорта Омский 9. Однако по активности азотфиксации он уступал другим сортам. Самая высокая активность азотфиксации была у сортов Демос – 1210 нмоль C_2H_4 /растение/ч и у линии Л38/05 – 1029 нмоль C_2H_4 /растение/ч. В данном опыте показано, что между показателями «число клубеньков» и «активность азотфиксации» во многих случаях нет положительной корреляции.

Самая низкая азотфиксация отмечена у сортов Омский 7 – 66 нмоль C_2H_4 /растение/ч и Сибур – 47 нмоль C_2H_4 /растение/ч при достаточно высоком количестве клубеньков. Эти сорта использовали продукты фотосинтеза в основном на продукционный процесс и сформировали самое большое количество семян: сорт Омский 7 – 89,6 шт. и 14,8 г/растение, сорт Сибур – 40,5 шт. и 8,9 г/растение. И наоборот при самых низких показателях по семенной продуктивности у сортов Демос – 7,5 шт. и 1,7 г семян/растение и линии Л3805 – 7 шт. и 1,9 г семян/растение – отмечена самая высокая активность азотфикса-

Таблица 1

Характеристика сортов и перспективных линий гороха *Pisum sativum* L., СибНИИСХ, г. Омск

Сорт, линия	2011 г.			2012 г.			Содержание белка в зерне, %
	Урожайность зерна		Вегетационный период, сут	Урожайность зерна		Вегетационный период, сут	
	т/га	± к St		т/га	± к St		
Омский 9, стандарт	2,58	–	76	1,91	–	55	21,3
Омский 7	2,43	–0,15	75	2,21	0,30	56	20,4
Демос	2,27	–0,31	75	1,81	–0,10	56	21,3
Благовест	2,65	0,07	77	2,39	0,48	56	19,5
Бонус	1,45	–1,13	74	1,83	–0,08	56	21,1
Сибур	2,27	–0,31	80	2,05	0,14	56	21,2
Зауральский 3	2,51	–0,07	79	1,92	0,01	56	19,5
Л 37/03	2,59	0,01	71	2,50	0,59	56	20,9
Л 32/05	2,86	0,28	80	2,08	0,17	57	21,7
Л 38/05	2,54	–0,04	78	2,15	0,24	57	19,0
	НСР ₀₅	0,45		НСР ₀₅	0,24		

Таблица 2
Симбиотические признаки и продуктивность у сортов и линий гороха при выращивании растений в стеллажах

Сорт, линия	Высота, фаза начала цветения		Корневые клубеньки		Активность нитрогеназы		Высота, фаза полного созревания		Семена		Масса семян	
	см	± к St	шт./растение	± к St	нмоль C ₂ H ₄ /растение/ч	± к St	см	± к St	шт./растение	± к St	г/растение	± к St
Омский 9, стандарт	152,2	0,0	511,4	0,0	127,0	0,0	194,2	0,0	20,2	0,0	5,2	0,0
Омский 7	152,6	0,4	335,0	-176,4	66,1	-60,9	267,5	73,3	89,6	69,4	14,8	9,6
Демос	65,0	-87,2	211,4	-300,0	1210,7	1083,7	70,7	-123,5	7,5	-12,7	1,7	-3,5
Благовест	96,0	-56,2	188,8	-322,6	654,2	527,2	166,1	-28,1	18,0	-2,2	5,3	0,1
Бонус	76,4	-75,8	294,0	-217,4	361,4	234,4	88,9	-105,3	11,1	-9,1	2,9	-2,3
Сибур	144,8	-7,4	333,2	-178,2	46,8	-80,2	244,8	50,6	40,5	20,3	8,9	3,7
Зауральский 3	117,4	-34,8	251,6	-259,8	522,5	395,5	155,3	-38,9	26,1	5,9	4,0	-1,2
Л 37/03	121,0	-31,2	288,8	-222,6	307,5	180,5	190,6	-3,6	27,3	7,1	5,2	0,0
Л 32/05	137,4	-14,8	207,2	-304,2	277,5	150,5	253,1	58,9	19,5	-0,7	4,8	-0,4
Л 38/05	67,6	-84,6	271,2	-240,2	1028,7	901,7	80,9	-113,3	7,0	-13,2	1,6	-3,6
	HCP ₀₅	11,5	HCP ₀₅	112,1	HCP ₀₅	384,7	HCP ₀₅	21,9	HCP ₀₅	12,2	HCP ₀₅	2,3

Таблица 3

Симбиотические признаки – нодуляция и активность азотфиксации – у сортов и линий гороха при выращивании растений в сосудах

Сорт, линия	Высота, фаза «начало цветения»		Корневые клубеньки		Активность нитрогеназы	
	см	± к St	шт./растение	± к St	нмоль C ₂ H ₄ /растение/ч	± к St
Омский 9 St	96,9	0,0	311,3	0,0	7618	0,0
Омский 7	113,0	16,1	317,4	6,1	3388	-4230
Демос	41,5	-55,4	193,6	-117,7	6536	-1082
Благовест	81,6	-15,3	130,8	-180,5	2843	-4775
Бонус	47,5	-49,4	246,3	-65,0	4836	-2782
Сибур	103,3	6,4	222,5	-88,8	7506	-112
Л 32/05	111,5	14,6	137,8	-173,5	6286	-1332
Л 38/05	49,9	-47,0	195,3	-116,0	2527	-5091
	НСР	6,2	НСР	90,1	НСР	1210

ции соответственно 1211 и 1029 нмоль C₂H₄/растение/ч.

Следует отметить, что такие закономерности в сортовых различиях по симбиотическим признакам выявлены в контролируемых условиях выращивания растений на фоне полной нормы азота.

При выращивании растений в сосудах, где доза азота была низкой в течение длительного периода роста растений (до фазы «начало цветения»), получены следующие результаты (табл. 3). Самая сильная нодуляция была у сортов Омский 9 и Омский 7. Количество клубеньков на 1 растение соответственно по сортам было: 311,3 и 317,4 шт./растение. При почти одинаковой нодуляции оба сорта показали разную активность азотфиксации. У сорта Омский 9 она составила 7618 нмоль C₂H₄/растение/ч, а у сорта Омский 7 – 3388 нмоль C₂H₄/растение/ч.

При выращивании растений при низкой дозе азота у всех сортов активность азотфиксации была значительно выше, чем на фоне полной нормы азота (табл. 2).

При изучении симбиотических признаков, нодуляции и азотфиксации, у разных сортов гороха выявлены существенные сортовые различия по этим признакам, а также установлено влияние дозы азота на образование клубеньков и активность азотфиксации. Количество корневых клубеньков не всегда коррелирует с показателем активности азотфиксации.

При малых дозах азота растение переходит на симбиотрофный тип питания азотом, активность азотфиксации существенно повышается. При полной или повышенной дозе азота активность азотфиксации снижается. В ближайшей перспективе в некоторые сорта будет введен ген супернодуляции для повышения активности азотфиксации.

Работа частично финансировалась по программе «Разработка новых биологических методов и селекции бобовых на повышение биологической фиксации азота».

ЛИТЕРАТУРА

- Биологическая фиксация азота / Отв. ред. В.К. Шумный, К.К. Сидорова. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. 270 с.
- Вавилов П.П., Посыпанов Г.С. Бобовые культуры и проблема растительного белка. М.: Россельхозиздат, 1983. 255 с.
- Генетика и селекция гороха / Отв. ред. В.В. Хвостова. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1975. 367 с.
- Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции / Под ред. И.А. Тихоновича, Н.А. Проворова. СПб.: Наука, 1998. 194 с.
- Доспехов В.А. Методика полевого опыта. М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.
- Сидорова К.К., Гончарова А.В., Гончаров П.Л., Шумный В.К. Селекция кормового гороха (*Pisum sativum* L.) на повышение азотфиксации с использованием симбиотических мутантов // С.-х. биология. 2012. № 1. С. 105–109.

- Сидорова К.К., Шумный В.К. Создание и генетическое изучение коллекции симбиотических мутантов гороха (*Pisum sativum* L.) // Генетика. 2003. Т. 39. № 4. С. 501–509.
- Сидорова К.К., Шумный В.К., Власова Е.Ю. и др. Симбиогенетика и селекция макросимбионта на повышение азотфиксации на примере гороха (*Pisum sativum* L.) // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 2. С. 357–374.
- Сидорова К.К., Шумный В.К., Назарюк В.М. Симбиотическая азотфиксация: генетические, селекционные и эколого-агрехимические аспекты. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», ИЦиГ СОРАН, 2006. 134 с.
- Чесноков В.А., Базырина Е.Н. Выращивание растений без почвы на искусственных средах // Вестник с.-х. науки. 1957. № 4. С. 121–128.
- Duc G., Messenger A. Mutagenesis of pea (*Pisum sativum* L.) and isolation of mutants for nodulation and nitrogen fixation // Plant Sci. 1989. V. 60. P. 207–213.
- Gresshoff P.M. Molecular genetic analyses of nodulation genes in soybean // Plant Breed. Rev. 1993. V. 11. P. 275–318.
- Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. The acetylene-ethylene assay for N_2 -fixation: laboratory and field evaluation // Plant Physiol. 1968. V. 43. No. 8. P. 1185–1207.
- Jacobsen E., Nijdam H.A. A mutant showing efficient nodulation in the presence of nitrate // Pisum Newslett. 1983. V. 15. P. 31–32.

STUDY OF NODULATION AND NITROGEN FIXATION IN INTRODUCED CULTIVARS AND CANDIDATE LINES OF PEA (*PISUM SATIVUM* L.) GROWN AT TWO NITROGENOUS NUTRITION LEVELS

L.V. Omel'yanuk¹, K.K. Sidorova², V.K. Shumny²

¹ Siberian Research Institute of Agriculture, Russian Academy of Agricultural Sciences, Omsk, Russia, e-mail: milya1302@yandex.ru;

² Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: sidorova@bionet.nsc.ru.

Summary

Symbiotic traits – nodulation, nitrogen fixation, and performance – have been studied in seven introduced cultivars and three candidate lines of pea (*Pisum sativum* L.) The cultivars grown at two nitrogen nutrition levels differ in traits associated with nodulation and nitrogen fixation. The results can be utilized in pea breeding for nitrogen fixation.

Key words: pea, *Pisum sativum* L., cultivar, performance, nodulation, nitrogen fixation.

УДК 577.112.382.3; 579.871.8

СЕЛЕКЦИЯ НОВЫХ ВЫСОКОАКТИВНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ L-АЛАНИНА У *BREVIBACTERIUM FLAVUM* И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИХ АЛАНИНСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ

© 2013 г. Г.Е. Аветисова, Л.О. Мелконян, А.Х. Чахалян, С.К. Келешян, А.С. Сагиян

Научно-производственный центр «Армбиотехнология» НАН РА,
Государственная некоммерческая организация, Ереван, Армения,
e-mail: gavetisova@yahoo.com

Поступила в редакцию 4 июля 2012 г. Принята к публикации 14 июля 2013 г.

У исходного штамма *Brevibacterium flavum* AA5 получены новые, не описанные ранее, устойчивые к L-цикloserину и β-хлор-L-аланину мутанты. Изучена их аланинпродуцирующая способность. Установлено, что устойчивость к L-цикloserину существенно не влияет на выход L-аланина, в то время как у устойчивых к β-хлор-L-аланину штаммов-продуцентов *B. flavum* GL1 и *B. flavum* GL18 уровень синтеза L-аланина превышает исходный на 23 и 38 % соответственно.

Ключевые слова: *Brevibacterium flavum*, мутагенез, штамм-продуцент, L-аланин.

L-аланин является одной из важных заменимых аминокислот и имеет широкое применение в медицине в качестве компонента смеси для парентерального питания, в пищевой промышленности в составе дезодорантов, антиоксидантов, красителей и для имитации вкуса и запаха природных продуктов. Аланин используется также в сельском хозяйстве как составная часть гербицидов и фунгицидов, в парфюмерии и в химической промышленности при синтезе органических соединений и полимеров.

В настоящее время мировое производство L-аланина составляет около 500 тонн в год и основано на способах энзиматического гидролиза из ацетил D,L-аланина с помощью амиоацилазы или микробиологической трансформации из L-аспарагиновой кислоты с помощью иммобилизованных клеток микроорганизмов, обладающих β-декарбоксилазной активностью (Hols *et al.*, 1999; Ikeda, 2003; Dworkin, 2006). В источниках патентной и научно-технической информации о микробиологических способах получения L-аминокислот нет сведений о промышленном производстве L-аланина прямой

ферментацией, что в первую очередь связано с отсутствием соответствующих штаммов-продуцентов, способных обеспечить рентабельное производство (Патент США, 1996; Dworkin, 2006; Wada *et al.*, 2007).

В то же время проблема разработки подобных производств продолжает оставаться актуальной, поскольку применяемые способы получения L-аланина многостадийны, трудоемки и требуют использования дорогостоящих ферментов, которые также необходимо получать микробиологическим путем. Эти способы целесообразно применять в основном при мелкосерийном производстве (Патент США, 2003; Dworkin, 2006).

Общеизвестно, что грамположительные и грамотрицательные бактерии синтезируют аланин в виде рацемической смеси, состоящей из равных количеств D и L-форм аланина. У коринеформных бактерий L-аланин может синтезироваться из пировиноградной кислоты с участием аланинтрансаминазы (КФ 2.6.1.2) и валинпируват-трансаминазы (КФ 2.6.1.66) (Гайбакян и др., 2003; Marienhagen, Eggeling, 2008; Melkonyan *et al.*, 2008; Патент США, 2010).

Ранее нами было проведено сравнительное изучение регуляции биосинтеза L-аланина у родительского штамма дикого типа *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 и генетико-селекционным путем полученного продуцента *B. flavum* AA5, нуждающегося для роста в D-аланине и устойчивого к D,L- α -аминомасляной кислоте (D,L- α -АМК) (Патент США, 1992). Штамм депонирован во Всесоюзной (Всероссийской) коллекции промышленных микроорганизмов под номером ВКПМ В-3991.

В частности, было изучено влияние D-аланина и L-валина, а также аналогов аминокислот D,L- α -АМК, L-цикloserина и β -Cl-L-аланина на активность основного фермента пути синтеза аланина – аланинтрансаминазу. Было показано, что у обоих штаммов исследуемые вещества в одинаковых концентрациях на 50 % ингибируют активность этого фермента. Однако ингибирование L-цикloserином и β -Cl-L-аланином наблюдалось при их значительно низких концентрациях (Melkonyan *et al.*, 2008). Полученные результаты позволили заключить, что резистентность к D,L- α -АМК не повлияла на активность аланинтрансаминазы штамма-продуцента *B. flavum* AA5 и L-цикloserин и β -Cl-L-аланин являются сравнительно сильными ингибиторами активности фермента, что коррелирует с данными других авторов (Beuster *et al.*, 2011).

В настоящей работе была поставлена цель усовершенствования продуцента *B. flavum* AA5 получением устойчивых к L-цикloserину и β -Cl-L-аланину мутантов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходным штаммом для получения нового более активного продуцента L-аланина служил продуцент *B. flavum* AA5 (D-ala⁻, D,L- α -АМК-г), способный при ферментации в колбах на круговой качалке синтезировать 43,8 г/л L-аланина (Патент США, 1992).

Штамм *B. flavum* ATCC 14067 дикого типа был использован для сравнительной характеристики полученных нами мутантов.

Для выращивания исследуемых штаммов использовали мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА) и минимальную среду Гловера, содержащую (%): NH_4Cl – 0,5, NH_4NO_3 – 0,1, Na_2SO_4 – 0,2, K_2HPO_4 – 0,3,

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,025, KH_2PO_4 – 0,1, агар-агар – 1,5. Необходимые добавки вносили в следующих концентрациях: глюкоза – 1 %, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001 %, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,001 %, дестибиотин – 500 мкг/л, тиамин – 70 мкг/л, D-аланин – 100 мкг/мл.

Для получения новых мутантов были выбраны аналоги аланина – L-цикloserин и β -Cl-L-аланин (Cornell *et al.*, 1984; Whalen *et al.*, 1985), использование которых в селекционных работах не описано в литературе.

Культуру обрабатывали мутагеном – раствором N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина в цитратном буфере (pH = 5,5) с концентрацией 300 мкг/мл в течение 30 мин при 30 °C по стандартной методике (Миллер, 1976) и высевали на минимальную среду, содержащую соответствующее количество исследуемого аналога. Выросшие колонии повторно пересеивали на среду с аналогом для получения чистых клонов.

Морфологические исследования клеток штаммов проводили с помощью микроскопа Leica DM500 trinocular ($\times 1000$) и программного обеспечения Digital Camera EC3 Leica Microsystem ($\times 10$).

Оценку аланинпродуцирующей способности отобранных аналогорезистентных мутантов осуществляли по результатам глубинной ферментации на круговой качалке Innova 43 Shaker «New Brunswick Scientific» (США) со скоростью вращения 220 об/мин при температуре 30 °C в течение 96 ч. В колбы Эрленмейера объемом 500 мл разливали по 15 мл инкубационной среды следующего состава: сахароза – 15 %, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5,5 %, KH_2PO_4 – 0,1 %, MgSO_4 – 0,1 %, CaCO_3 – 5 %, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001 %, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,001 %, тиамина хлорид – 70 мкг/л, биотин – 500 мкг/л, D-аланин – 100 мкг/мл. Посевной материал получали смывом суточной культуры с поверхности МПА физиологическим раствором и добавляли в ферментационные колбы в количестве 5 % от объема среды.

Содержание L-аланина в культуральной жидкости (КЖ) после ферментации определялось методом тонкослойной хроматографии (пластины «Silufol») в системе растворителей – аммиак : изопропиловый спирт : ацетон : вода (2 : 4 : 4 : 1) и бумажной хроматографии в системе Парtridge – бутанол : уксусная кислота : вода (4 : 1 : 5), с последующим окрашиванием

0,5 %-м раствором нингидрина в ацетоне. Количество аминокислоты определялось колориметрически при длине волны 490 нм после элюирования окрашенных пятен.

Количество остаточного сахара в культуральной жидкости определяли по методу Бертрана (Филлипович и др., 1982). Оптическую плотность (ОП) бактериальной суспензии измеряли на фотоэлектроколориметре КФК-2 при длине волны 540 нм после предварительного растворения мела в среде добавлением 2N HCl.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения устойчивых мутантов предварительно были определены минимальные концентрации аналогов, ингибирующие рост штамма *B. flavum* AA5. Испытуемые концентрации аналогов подбирались на основе полученных ранее данных об ингибировании активности аланинтрансминазы на 50 % L-цикloserином в концентрации 0,23 мг/мл и β-CI-L-аланином в концентрации 0,024 мг/мл.

Обработанную мутагеном культуру *B. flavum* AA5 высевали на минимальную среду, содержащую 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл, 1,0 мг/мл L-цикloserина. Было выделено всего 33 НГ-индуцированных мутанта, устойчивых к 0,25 мг/мл L-цикloserина.

Определение синтетической активности мутантов проводили в 2 этапа. Предварительно аланинсинтезирующую способность проверяли в кратковременной ферментации в течение 24 ч при 30 °С в пробирках, содержащих по 2 мл жидкой минимальной среды Гловера с 2 % глюкозы и 100 мкг/мл D-аланина. Содержание L-аланина в КЖ определяли методом тонкослойной хроматографии. На этом этапе из проверенных 33 мутантов были отобраны 3 мутанта, которые по активности синтеза L-аланина превосходили исходный штамм. Для более точной характеристики мутанты были проверены в ферментации в колбах на качалке.

Усредненные результаты количественного определения аланина в КЖ методом бумажной хроматографии приведены на рис. 1.

Как видно из рис. 1, устойчивые к L-цикloserину мутанты в условиях глубинной ферментации в колбах существенно не отличаются от контрольного штамма по аланинпродуци-

рующей способности, несмотря на данные об ингибирующем действии использованного аналога на активность фермента.

Иная картина была получена при отборе устойчивых к β-CI-L-аланину мутантов. Обработанную мутагеном культуру *B. flavum* AA5 высевали на минимальную среду, содержащую 0,025 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,1 мг/мл β-CI-L-аланина. Всего было выделено 13 мутантов: 9 мутантов со среды, содержащей 0,025 мг/мл β-CI-L-аланина и 4 мутанта – со среды с 0,05 мг/мл аналога. Характеристика отобранных штаммов по устойчивости к разным дозам β-CI-L-аланина приведена в табл. 1.

Как видно из табл. 1, выделенные мутанты различались по степени устойчивости к аналогу, что свидетельствует об их независимом происхождении. Аланинсинтезирующая способность всех мутантов была определена в условиях глубинной ферментации в колбах.

В табл. 2 приведены характеристики двух мутантов, аланинсинтезирующая активность которых существенно отличалась от активности исходного штамма.

Из данных табл. 2 следует, что мутант GL1, выделенный на среде с 0,025 мг/мл β-CI-L-аланина и одновременно устойчивый к 0,05 мг/мл β-CI-L-аланина, превосходит исходный штамм по активности синтеза аланина в среднем на 23 %, а мутант GL18, выделенный со среды с 0,05 мг/мл β-CI-L-аланина, на 38 %.

Отобранные штаммы-продуценты L-аланина *B. flavum* GL1 и *B. flavum* GL18 по своим культурально-морфологическим признакам не отличаются от родительского штамма *B. flavum* AA5. На

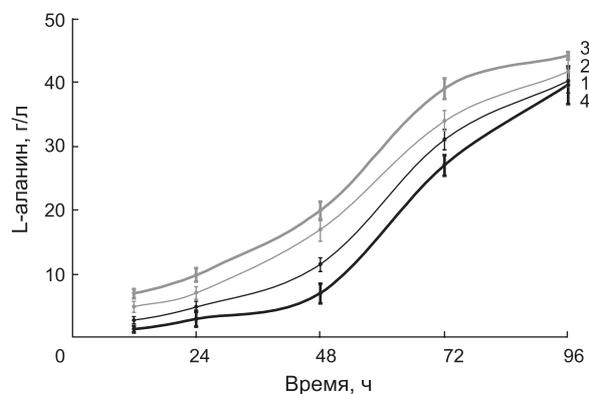


Рис. 1. Выход L-аланина у мутантов, устойчивых к L-цикloserину *B. flavum* AA5; 2) мутант 1; 3) мутант 2; 4) мутант 3.

Таблица 1

Характеристика устойчивых к β -Cl-L-аланину штаммов *B. flavum*

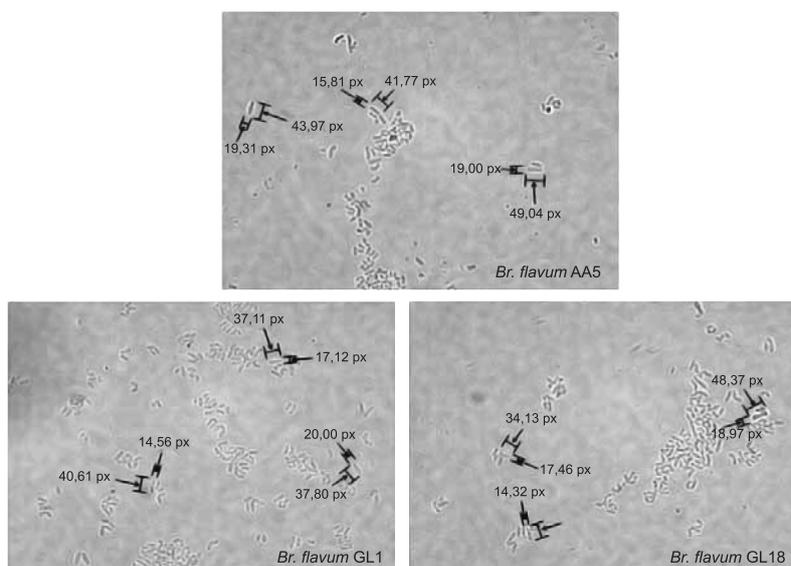
Штамм	Концентрация β -Cl-L-аланина при отборе резистентных мутантов, мг/мл	Минимальная среда			
		без D-аланина	с D-аланином	с D-аланином и β -Cl-L-аланином, мг/мл	
				0,025	0,05
AA5	0,0	–	+	–	–
GL1	0,025	–	+	+	+
GL6		–	+	+	+
GL9		–	+	+	–
GL11		–	+	+	+
GL14		–	+	+	–
GL15		–	+	+	±
GL24		–	+	+	±
GL25		–	+	+	–
GL52		–	+	+	±
GL11		0,05	–	+	+
GL16	–		+	+	+
GL18	–		+	+	+
GL19	–		+	+	–

Примечание. (+), (–) – наличие или отсутствие роста; (±) – следовой рост.

Таблица 2

Сравнительный выход L-аланина у новых штаммов-продуцентов *B. flavum*

Штамм	Оптическая плотность $\lambda = 540$	Титр (КОЕ/мл)	Остаточный сахар, %	Выход L-аланина, г/л
AA5	45	$4,2 \times 10^9$	0,08	43,2
GL1	56	$1,0 \times 10^{10}$	0,04	53,7
GL18	75	$2,1 \times 10^{10}$	0	60,5

Рис. 2. Микроскопический снимок клеток *B. flavum* штаммов-продуцентов L-аланина.

(1 пиксель (px) = 263,6 микрометра).

МПА на 2-е сутки роста при 30 °С они образуют круглые, гладкие, окрашенные в желтоватый цвет колонии диаметром 2 мм. Под микроскопом клетки штаммов неспороносные, овальные, со средним размером 1,1 × 0,5 мкм (рис. 2).

Таким образом, получены новые высокоактивные штаммы-продуценты L-аланина *B. flavum* GL1 и *B. flavum* GL18, которые в результате приобретения устойчивости к аналогу аланина, β-Cl-L-аланину, продуцируют до 60,5 г/л L-аланина и превосходят по активности исходный штамм в среднем на 23 и 38 % соответственно. Штаммы депонированы в Центре депонирования микробов НАН Армении под регистрационными номерами ИНМИА 11841 (*B. flavum* GL1) и ИНМИА 11842 (*B. flavum* GL18).

Существенное повышение выхода L-аланина у устойчивых к β-Cl-L-аланину мутантов в отличие от L-циклосерин устойчивых мутантов, по-видимому, связано с разной степенью ингибирования активности и разрегулиции синтеза основного фермента пути биосинтеза L-аланина – аланинтрансминазы.

ЛИТЕРАТУРА

Гайбалян Л.Д., Аветисова Г.Е., Азизян А.Г. и др. Изучение ферментов биосинтеза аланина у *Brevibacterium flavum* // Биотехнология. 2003. № 1. С. 44–48.
Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 438 с.
Патент США. 1992. № 5124257.
Патент США. 1996. № 5559016.

Патент США. 2003. № 6627420.
Патент США. 2010. № 20100151449A1.
Филипович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. М., 1982. 318 с.
Beuster G., Zarse K., Kaleta C. *et al.* Inhibition of alanine aminotransferase *in silico* and *in vivo* promotes mitochondrial metabolism to impair malignant growth // J. Biol. Chem. 2011. V. 25. P. 22323–22330.
Cornell N.W., Zuurendonk P.F., Kerich M.J. *et al.* Selective inhibition of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in rat hepatocytes // Biochem. J. 1984. V. 220. P. 707–716.
Dworkin M. The Prokaryotes: Symbiotic Associations, Biotechnology, Applied Microbiology. 3rd / Ed. H. Kumagai. Springer, 2006. V. 1. Chapter 3.2. P. 756–765.
Hols P., Kleerebezem M., Schanck A. *et al.* Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering // Nature Biotechnol. 1999. V. 17. P. 588–592.
Ikeda M., Amino acid production processes // Adv. Biochem. Engineer./Biotechnol. 2003. V. 79. P. 1–35.
Marienhagen J., Eggeling L. Metabolic function of *Corynebacterium glutamicum* aminotransferases AlaT and AvtA and impact on L-valine production // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. No. 24. P. 7457–7462.
Melkonyan L.H., Avetisova G.E., Hambardzumyan A.A. *et al.* Study of L-glutamate-pyruvate aminotransferase inhibition in wild type strain of *Brevibacterium flavum* 14067 and L-alanine strain-producer *Br. flavum* AA5 // Intern. Conf. «State-of the-Art Biotechnology in Armenia and ISTC contribution». Armenia, 2008. P. 72.
Wada M., Narita K., Yokota A. Alanine production in an H⁺-ATPase- and lactate dehydrogenase-defective mutant of *Escherichia coli* expressing alanine dehydrogenase // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 76. No. 4. P. 819–825.
Whalen W.A., Wang M.D., Berg C.M. beta-chloro-L-alanine inhibition of the *Escherichia coli* alanine-valine transaminase // J. Bacteriol. 1985. V. 164. No. 3. P. 1350–1352.

DEVELOPMENT OF NEW HIGHLY ACTIVE L-ALANINE PRODUCER STRAINS OF *BREVIBACTERIUM FLAVUM* AND COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF THEIR ALANINE-SYNTHESIZING ACTIVITY

G.Ye. Avetisova, L.H. Melkonyan, A.Kh. Chakhalyan, S.Gh. Keleshyan, A.S. Saghyan

Scientific and Production Center «Armbiotechnology», National Academy of Sciences of Armenia, Yerevan, Armenia, e-mail: gavetisova@yahoo.com

Summary

New mutants, not described previously, resistant to L-cycloserine and β-chloro-L-alanine were derived from the parental strain *Brevibacterium flavum* AA5. Their alanine-producing ability was studied. It was found that the resistance to L-cycloserine did not affect the yield of L-alanine significantly, whereas the resistance to β-chloro-L-alanine of *B. flavum* GL1 and *B. flavum* GL18 strain-producers exceeds the initial level of L-alanine synthesis by 23 and 38 %, respectively.

Key words: *Brevibacterium flavum*, mutagenesis, producer strain, L-alanine.

УДК 599.323.43:575.86(575.61)

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА
ПОПУЛЯЦИЙ КРАСНОЙ ПОЛЕВКИ
MYODES (= *CLETHRIONOMYS*) *RUTILUS* PALLAS, 1779
СЕВЕРНОГО ПРИХОТЬЯ ПО ДАННЫМ ОБ ИЗМЕНЧИВОСТИ
НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ
ГЕНА ЦИТОХРОМА *b* МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК**

© 2013 г. **В.В. Переверзева, А.А. Примак, Е.А. Дубинин**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук (ИБПС ДВО РАН), Магадан, Россия, e-mail: vvpereverzeva@mail.ru

Поступила в редакцию 28 июня 2013 г. Принята к публикации 9 августа 2013 г.

Цель работы – изучение генетической структуры прибрежных популяций вида *Myodes* (= *Clethrionomys*) *rutilus* Северного Приохотья на основании данных об изменчивости фрагмента гена цитохрома *b* мтДНК. Впервые определено нуклеотидное и гаплотипическое разнообразие строения гена цитохрома *b* и установлена генетическая структура популяций красных полевок островов Матькиль, Недоразумения, Спафарьева и Талан (северная часть Охотского моря), полуострова Кони, окрестностей г. Магадана и бассейна р. Ямы. Островные популяции полевок обладают уникальными генофондами, в которые входят 2–3 гаплотипа. У *M. rutilus* материковой части побережья Охотского моря выявлен высокий уровень полиморфизма строения гена цитохрома *b*. Высказано предположение о существовании в Северном Приохотье единой береговой популяции красной полевки. Результаты генетического анализа свидетельствуют о принадлежности *M. rutilus* островов Тауйской губы и континентальной зоны побережья Охотского моря к одной материнской линии. Красные полевки о. Матькиль залива Шелихова относятся к другой генетической ветви.

Ключевые слова: красная полевка, секвенирование мтДНК, цитохром *b* (*cytb*), нуклеотидная последовательность, генетическая структура популяции.

ВВЕДЕНИЕ

Популяционно-генетические исследования являются одной из составных частей комплексного анализа внутривидовой изменчивости. Особый интерес представляет изучение генетической структуры полностью обособленных внутривидовых группировок, длительная географическая изоляция которых может приводить к вступлению на собственный эволюционный путь. Небольшие островные популяции являются идеальными объектами для таких изысканий. На формирование их генофондов значительное влияние оказывают

эффект основателя и стохастические процессы. Сравнительный анализ генетической изменчивости материковых и островных популяций позволяет уточнить историю формирования генофонда вида на части ареала. Для решения этих вопросов успешно применяются методы молекулярно-генетического анализа мтДНК (Hinten *et al.*, 2003; Джикия и др., 2007; Fulgione *et al.*, 2008). В настоящей работе на основании данных об изменчивости нуклеотидного строения фрагмента гена *cytb* мтДНК анализируется генетическая структура островных и материковых популяций красной полевки Северного Приохотья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовано 7 выборок красной полевки северного побережья и некоторых островов Охотского моря (рис. 1).

Объем выборок представлен в табл. 1 и 2. Выделение ДНК, амплификация и секвенирование участка гена *cytb* мтДНК проведены описанными ранее методами (Переверзева, Лазуткин, 2009). Изученный фрагмент состоит из 800 пар нуклеотидов (п.н.) и соответствует положению 14507–15306 п.н. полного генома мтДНК *Myodes regulus* (GenBank № NC016427; 14507 п.н. является 382 п.н. гена *cytb*). Для проведения филогенетического исследования использовались данные о нуклеотидной последовательности участка гена *cytb* красно-серой полевки *Myodes* (= *Clethrionomys*) *rufocanus* Sundevall, 1846 (GenBank № GQ301944), взятой в анализ в качестве внешней группы. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью пакетов программ MEGA-5 (Tamura *et al.*, 2011), ARLEQUIN ver. 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005) и Network 4.5.1.0 (Bandelt *et al.*, 1999).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате предыдущих исследований у красной полевки бассейна среднего течения р. Колымы было найдено 57 гаплотипов гена *cytb*. Варианты В2–В57 произошли от анцестрального

В1 (Переверзева и др., 2011). Обнаруженные у красной полевки Северного Приохотья нуклеотидные замены (относительно последовательности В1) в гаплотипах анализируемого фрагмента гена *cytb* представлены на рис. 2. Наибольшее количество нуклеотидных различий установлено между строением гаплотипов полевков о. Матъкиль (М1–М3) и вариантом В1 (рис. 2). Частоты мтДНК-гаплотипов в изучаемых выборках *M. rutilus* приведены в табл. 1 и 2. У полевков Северного Приохотья обнаружено 43 гаплотипа, из которых 37 найдено впервые (табл. 1, 2). Для каждой выборки проведено сравнение числа гаплотипов и количества нуклеотидных различий между этими гаплотипами и последовательностью В1. Необходимо отметить, что число нуклеотидных различий между гаплотипами полевков о. Матъкиль и вариантом В1 на порядок больше, чем количество найденных в этой популяции вариантов *cytb* (табл. 2). В остальных группах эти величины одного порядка (табл. 1, 2). Характер и частота нуклеотидных замен в кодонах участка *cytb* мтДНК красной полевки Северного Приохотья согласуются с ранее полученными литературными данными (Hassanin *et al.*, 1998).

Только для *M. rutilus* материковой части побережья Охотского моря характерен высокий уровень полиморфизма изученного участка митохондриального генома (табл. 1), тогда как в каждой из островных популяций полевков об-



Рис. 1. Карта-схема района сбора проб.

Таблица 1

Частоты гаплотипов гена цитохрома *b* мтДНК в выборках красной полевки окрестностей г. Магадана, п-ова Кони и бассейна р. Ямы

Локальность, объем выборки, <i>N</i>	Гаплотип № GenBank	Частота	Общее число замен	Число гаплотипов в выборке
Окрестности г. Магадана <i>N</i> = 25	B1 GQ301890*	0,2400	15	13
	B12 Q301901*	0,0400		
	B58 JX885743	0,0400		
	B59 JX885744	0,0400		
	B60 JX885745	0,0400		
	B61 JX885746	0,0400		
	B62 JX885747	0,1600		
	B63 JX885748	0,0800		
	B64 JX885749	0,1200		
	B65 JX885750	0,0400		
	B66 JX885751	0,0400		
	B67 JX885752	0,0400		
	B68 JX885753	0,0800		
Бассейн р. Ямы <i>N</i> = 27	B1 GQ301890*	0,1111	26	21
	B9 GQ301898*	0,0370		
	B24 GQ301913*	0,0370		
	B29 GQ301918*	0,0370		
	B37 GQ301927*	0,0370		
	B59 JX885744	0,0370		
	B62 JX885747	0,0741		
	B66 JX885751	0,0370		
	B69 JX885754	0,0741		
	B70 JX885755	0,0370		
	B71 JX885756	0,1111		
	B72 JX885757	0,0370		
	B73 JX885758	0,0370		
	B74 JX885759	0,0370		
	B75 JX885760	0,0370		
	B76 JX885761	0,0370		
	B77 JX885762	0,0370		
	B78 JX885763	0,0370		
B79 JX885764	0,0370			
B80 JX885765	0,0370			
B81 JX885766	0,0370			
П-ов Кони <i>N</i> = 5	B82 HQ608518	0,6000	3	3
	B83 HQ608519	0,2000		
	B59 JX885744	0,2000		

Примечание. Отмечены гаплотипы, обнаруженные также и в популяции красных полевок бассейна р. Колымы (Переверзева и др., 2011).

наружено не более 3 мтДНК-гаплотипов (табл. 2). Следует отметить, что все митотипы красных полевок с исследованных островов являются уникальными. Можно предположить два варианта формирования современных генофондов островных популяций красных полевок. Допустим, носители базальных ДНК-гаплотипов (С1, Т1, Т2, Н1 или М1) присутствовали на территориях будущих островов в момент отделения их от материка. Исходя из этого предположения, рассмотрим особенности генетических структур островных сообществ и возможные пути их образования.

У полевок о. Спафарьева найдены 3 варианта мтДНК, доминирующим является С1 (табл. 2). Единичные нуклеотидные замены в гаплотипе С1 в третьей позиции кодона привели к появлению С2 и С3 (рис. 2). Низкие частоты вариантов С2 и С3 (табл. 2) указывают на недавнее образование этих гаплотипов, произошедшее, по-видимому, после отделения острова от материка.

У полевок о. Талан идентифицированы 3 гаплотипа гена *cytb* (рис. 2). В данной популяции с высокими частотами встречаются два неродственных варианта Т1 и Т2 (табл. 2). Подобное распределение частот гаплотипов гена *cytb* могло возникнуть в двух случаях. Во-первых, если на территории острова при его отделении от материка одновременно присутствовали в равном соотношении представители двух материнских сублиний полевок. Во-вторых, могла иметь место двухэтапная колонизация острова, при которой вторая волна заселения должна была состоять из большого числа особей, родственных по материнской сублинии. Одинаковый уровень отличий Т1 и Т2 от В1 (рис. 2), а также значительная глубина пролива и отдаленность острова от берега позволяют считать более вероятным первый сценарий. Гаплотип Т3 имеет низкую частоту (табл. 2) и отличается от Т1 одной транзицией (рис. 2), что говорит о его недавнем происхождении, произошедшем, вероятно, после полной изоляции о. Талан.

В выборке полевок с о. Недоразумения обнаружены два неродственных гаплотипа мтДНК (рис. 2). Доминирующим на острове является Н1, вариант Н2 встречается с низкой частотой (табл. 2). Вероятно, изначально отделившийся от материка о. Недоразумения населяли полевки с гаплотипом Н1, а носители Н2 могли

Таблица 2

Частоты гаплотипов гена цитохрома *b* мтДНК в выборках красной полевки островов Охотского моря

Локальность, объем выборки, <i>N</i>	Гаплотип № GenBank	Частота	Общее число замен	Число гаплотипов в выборке
О. Спафарьева, <i>N</i> = 15	C1 HQ840372	0,8667	6	3
	C2 HQ608514	0,0667		
	C3 HQ608515	0,0667		
О. Талан, <i>N</i> = 64	T1 GU251086	0,6094	5	3
	T2 GU251087	0,3750		
	T3 HQ608516	0,0156		
О. Недоразумения, <i>N</i> = 15	H1 GU251085	0,9333	6	2
	H2 HQ608517	0,0667		
О. Матыкиль, <i>N</i> = 38	M1 GU251073	0,9474	17	3
	M2 GU251074	0,0263		
	M3 GU251077	0,0263		

	1111111112	2233333333	3444444455	5555566666	66677
	1334899	0012366783	4500012234	7223778801	3467901246
	3692035401	1570549731	3537927919	8038476913	1049106179
	88944				
B1	ТАСТААГТСА	ТGCGАААТТА	АТТТАGATGT	АСТТТТGAAC	АТТТАСССТТ
B9A.....
B12	G.....
B24G.....
B29A.....
B37	..C.....	.A.....
B58C.....
B59G.....
B60	G.....
B61	G.....	C.....	C.....
B62	C.....	C.....
B63	C.....	C.....
B64	A.....	T.....
B65	A.....	G.....	C.....	CA.....
B66	A.....	C.....	C.....
B67C.....	A.....	C.....T.....
B68	A.....	C.....	TC.....C.....
B69	G.....
B70G.....
B71	C.....
B72C.....	A.....	G.....
B73	C.....
B74	C.....	G.....
B75	C.....
B76G.....	GG.....	G.....T.....
B77	G.....	A.....
B78	G.....	A.....
B79	..T.....	C.....	C.....
B80G.....	AGGG.....	G.....C.....
B81	A.....	A.....	T.....
B82	C.....
B83T.....
T1	A.....	G.....
T2	A.....A.....
T3	A.....	A.....	G.....
H1T.....C.....
H2	C.....	A.....C.....
C1	A.....	C.....	T.....
C2	A.....	C.....	T.....
C3G.....	A.....	C.....	T.....
M1	...G.A...	.AG.....	CG.....	CCG.....	G.....
M2	.G.G.A...	.AG.....	CG.....	CCG.....	G.....
M3	...G.A...	CAG.....	CG.....	CCG.....	G.....

Рис. 2. Гаплотипы фрагмента гена *cytb* популяций красной полевки Северного Приохотья.

В – варианты мтДНК полевок континентальной части побережья; Т – о. Талан; Н – о. Недоразумения; С – о. Спафарьева; М – о. Матыкиль.

попасть на остров позднее. Возможно, это была единственная самка, потомки которой сейчас составляют небольшую долю в популяции. Однако нельзя исключить и изначальное присутствие на острове полевков сублиний Н1 и Н2. В дальнейшем численность носителей Н2 могла уменьшиться в результате стохастических процессов.

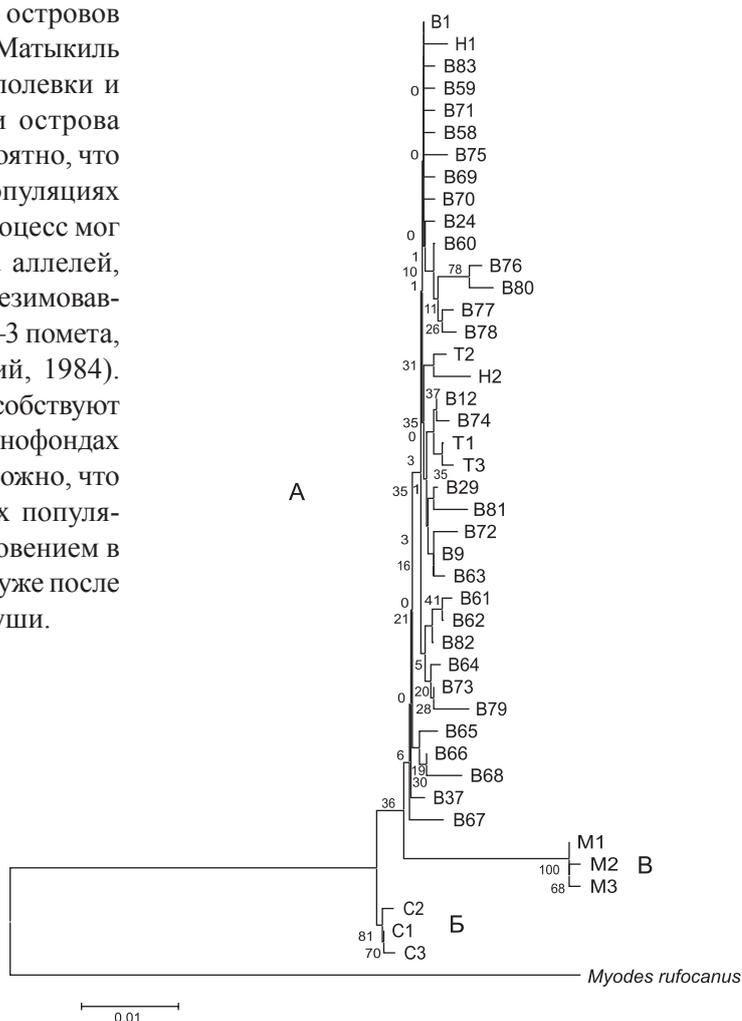
В выборке с о. Матыкиль Ямской губы Охотского моря найдены три варианта гена *cytb* (рис. 2). Популяция полевков о. Матыкиль имеет монофилетическое происхождение. Это подтверждается высокой частотой гаплотипа М1 (табл. 2) и отличием от него вариантов М2 и М3 только по одной замене (рис. 2). Низкая частота последних (табл. 2) указывает на сравнительно недавнее образование этих гаплотипов, которое произошло, по-видимому, после отделения о. Матыкиль от береговой линии.

Формирование генофондов островных популяций красных полевков могло происходить и другим путем. После обособления островов Недоразумения, Спафарьева, Талан и Матыкиль на их территориях присутствовали полевки и других материнских сублиний. Эти острова небольшие по площади и, вполне вероятно, что действие дрейфа генов в данных популяциях полевков было значительным. Этот процесс мог привести к снижению частоты ряда аллелей, вплоть до полной их элиминации. Перезимовавшие самки *M. rutilus* приносят в год 2–3 помета, а самки-сеголетки – 1–2 (Чернявский, 1984). Высокие темпы смены поколений способствуют достаточно быстрому накоплению в генофондах популяций витальных мутаций. Возможно, что уникальность гаплотипов островных популяций полевков объясняется их возникновением в изолированных сообществах полевков уже после отделения территорий островов от суши.

Филогенетические отношения между вариантами гена *cytb* красной полевки Северного Приохотья отражены в дендрограмме, построенной методом ближайшего связывания на основании бипараметрической модели дистанций Кимуры. Все найденные гаплотипы группируются в три клады (рис. 3). Кластер А объединяет варианты мтДНК полевков материка и островов Талан и Недоразумения. Несмотря на большое количество вариантов гена *cytb*, бутстреп-поддержка абсолютного большинства групп гаплотипов менее 50%. Такая топология свидетельствует о генетическом единстве и длительной эволюционной истории *M. rutilus*, населяющей береговую зону. Поэтому можно рассматривать красных полевков материковой зоны побережья Охотского моря как представителей большой популяции с единым генофондом. Кластер Б включает варианты *cytb* полевков о. Спафарьева. Локализация кластера Б

Рис. 3. NJ-филогенетическое дерево, основанное на данных об изменчивости фрагмента гена цитохрома *b* мтДНК красной полевки Северного Приохотья.

На ветвях указаны бутстреп-индексы. А, Б, В – кластеры мтДНК красной полевки. Масштабный отрезок соответствует генетической дистанции между гаплотипами.



на NJ-дереве и уровень бутстреп-поддержки иллюстрируют особенности генофонда спафарьевской популяции полевков, изолированной, вероятно, ранее других островных сообществ Тауйской губы (Велижанин, 1976). Кластер В объединяет гаплотипы полевков о. Матъкиль и имеет самый высокий уровень бутстреп-поддержки – 100 %. Это подтверждает генетическую обособленность матъкильской популяции от всех остальных изученных групп *M. rutilus* Северного Приохотья.

Для уточнения истории формирования генофондов популяций красных полевков Северного Приохотья были рассчитаны индексы генетического разнообразия исследуемых групп (табл. 3).

Индексы молекулярного разнообразия (h , π и Pi) в выборках полевков из окрестностей г. Магадана и бассейна р. Ямы имеют высокие значения, что характерно для устойчивых популяций с высоким значением эффективной численности (Avice, 2000). Для островных сообществ полевков прямой зависимости между уровнем генетического разнообразия и площадью островов, на которых эти популяции обитают, не наблюдается (табл. 3). Наибольшие значения показателей молекулярного разнообразия (h , π и Pi) установлены для популяции *M. rutilus* о. Талан, самого маленького по площади среди исследованных островов. Популяции более

крупных о. Матъкиль и Спафарьева имеют наименьшие значения этих индексов. Полученные нами результаты отличаются от данных некоторых авторов, изучавших островные популяции млекопитающих (Wayne *et al.*, 1991; Hinton *et al.*, 2003), и свидетельствуют в пользу того, что островные поселения красной полевки ведут свое происхождение от небольших групп особей, на генофонд которых в дальнейшем повлиял дрейф генов. Роль эффекта основателя в формировании генетической структуры этих популяций, по-видимому, является преобладающей.

В суммарной выборке полевков с континента (табл. 3) индексы молекулярного разнообразия (h , π и Pi) имеют высокие значения. Такие показатели генетического разнообразия имеют место в двух случаях: 1) при стабильности в течение длительного времени генетически целостных экспансивных популяций с высоким значением эффективной численности; 2) популяция сформирована из особей ранее изолированных группировок (Avice, 2000). Для конкретизации истории образования материковых популяций красной полевки построена гистограмма распределения частот попарных нуклеотидных различий между гаплотипами. На рис. 4 представлен полученный унимодальный паттерн. Подобное распределение частот попарных различий между гаплотипами характерно для популяций, имеющих единое происхождение,

Таблица 3

Нуклеотидное и гаплотипическое разнообразие выборок красных полевков материкового побережья и островов Охотского моря

Локальность	S	N	V	$Pi \pm sd$	$\pi \pm sd$	$h \pm sd$
Континентальные выборки						
Окрестности Магадана		25	15	2,9533 \pm 1,5992	0,0037 \pm 0,0023	0,9133 \pm 0,0358
П-ов Кони		5	3	1,4000 \pm 1,0188	0,0018 \pm 0,0015	0,7000 \pm 0,2184
Пойма р. Ямы		27	26	3,2877 \pm 1,7452	0,0041 \pm 0,0024	0,9772 \pm 0,0171
Суммарная		57	44	3,0426 \pm 1,6084	0,0038 \pm 0,0022	0,9580 \pm 0,0144
Островные выборки						
О. Спафарьева	32	15	2	0,2667 \pm 0,3088	0,0003 \pm 0,0004	0,2571 \pm 0,1416
О. Талан	1,6	64	4	1,9122 \pm 1,1033	0,0024 \pm 0,0015	0,4955 \pm 0,0339
О. Недоразумения	4,5	15	6	0,8000 \pm 0,6110	0,0010 \pm 0,0009	0,1333 \pm 0,1123
О. Матъкиль	8,7	38	2	0,1053 \pm 0,1791	0,0001 \pm 0,0002	0,1038 \pm 0,0668

Примечание. S – площадь острова, км²; N – количество особей в выборке; V – число переменных сайтов в исследуемом участке *cytb* мтДНК; Pi – среднее число парных различий между гаплотипами; π – нуклеотидное разнообразие; h – гаплотипическое разнообразие; sd – стандартное отклонение.

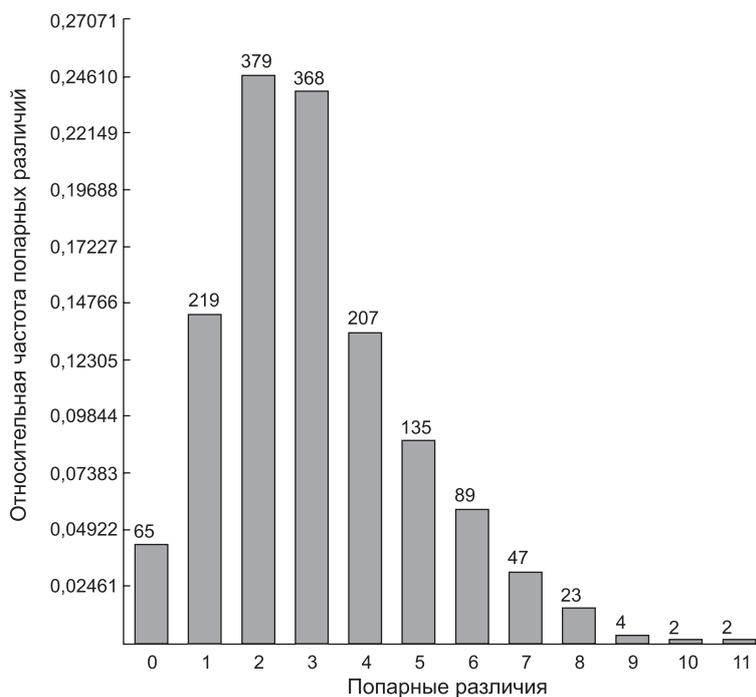


Рис. 4. Распределение частот (ось ординат) величин попарных различий (ось абсцисс) между нуклеотидными последовательностями фрагмента гена цитохрома *b* у красной полевки выборок из окрестностей г. Магадана и бассейна р. Ямы.

высокую эффективную численность, длительно существующих при экспансивном росте без периодов продолжительной регрессии численности и без объединения генетически отдаленных конспецифичных популяций (Rogers, 1995).

Полученные результаты анализа генетического разнообразия групп полевок подтверждают данные сравнительных характеристик нуклеотидного строения и частот мтДНК-вариантов (см. обсуждение рис. 2 и табл. 1 и 2).

Для определения уровня изоляции исследуемых сообществ полевок были сопоставлены генетические дистанции между этими выборками (табл. 4). Расчеты, проведенные методом попарной дифференциации, показали статистически достоверные различия ($P = 0,00000 \pm 0,00000$) между островными популяциями, а также между островными и континентальными выборками.

Материковые группы друг от друга достоверно не отличаются (табл. 4). Наибольшие генетические дистанции установлены между популяцией красных полевок о. Матыкиль и всеми остальными группами.

Строение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *cytb* (рис. 2), филогенетические отношения гаплотипов (рис. 3), показатели индексов молекулярного разнообразия исследованных популяций (табл. 3), характер

распределения частот попарных различий между гаплотипами (рис. 4) и генетические дистанции между выборками (табл. 4) позволяют сделать предположение о существовании в Северном Приохотье единой материковой популяции *M. rutilus*.

Изолированные сообщества красных полевок островов Недоразумения, Спафарьева и Талан Тауйской губы Охотского моря обладают уникальными генофондами. Несмотря на особенности генетической структуры популяций полевок континентальной зоны Приохотья и островов Тауйской губы, строение изученного участка гена *cytb* дает возможность отнести эти сообщества к материнской линии В1, что свидетельствует о единстве их происхождения. Популяция красных полевок о. Матыкиль по всем генетическим параметрам наиболее обособлена от остальных групп и относится к другой филогенетической ветви. По-видимому, расхождение материнских линий, к которым принадлежат гаплотипы В1 и М1, произошло раньше отделения о. Матыкиль от материка. Полученные результаты анализа изменчивости гена *cytb* мтДНК красной полевки Северного Приохотья согласуются с данными биохимической генетики (Примаков, Засыпкин, 2011) и морфометрического анализа (Докучаев и др., 2002).

Таблица 4
Генетические дистанции между выборками из популяций красных полевков Северного Приохотья

Локальность	Окрестности г. Магадана	П-ов Кони	Бассейн р. Яма	О. Спафарьева	О. Талан	О. Недоразумения	О. Магькиль
Окрестности г. Магадана	–	0,2973 ± 0,036	0,0631 ± 0,024	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000
П-ов Кони	0,0196	–	0,1171 ± 0,033	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000
Бассейн р. Ямы	0,0233	0,0287	–	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000
О. Спафарьева	0,6833	0,8941	0,6361	–	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000
О. Талан	0,3243	0,4107	0,2825	0,7567	–	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000
О. Недоразумения	0,4792	0,6898	0,4251	0,9149	0,6133	–	0,0000 ± 0,0000
О. Магькиль	0,9240	0,9852	0,9122	0,9922	0,9248	0,9826	–

Примечание. Под диагональю – генетические дистанции между выборками; над диагональю – уровень достоверности *P*.

ЛИТЕРАТУРА

- Велижанин А.Г. Время изоляции материковых островов северной части Тихого океана // Докл. АН СССР. 1976. Т. 231. № 1. С. 205–207.
- Джикия Е.Л., Колесников А.А., Чудакова Д.А. и др. Генетический полиморфизм командорских популяций песцов // Генетика. 2007. Т. 43. № 9. С. 1239–1245.
- Докучаев Н.Е., Иванов В.В., Засыпкин М.Ю., Примак А.А. Красные полевки (*Clethrionomys rutilus* Pallas, 1779) острова Матыкиль (северная часть Охотского моря) // Териологические исследования. Вып. 1. СПб., 2002. С. 140–142.
- Переверзева В.В., Засыпкин М.Ю., Соловечук Л.Л. и др. Изменчивость гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК в популяции красной полевки *Clethrionomys rutilus* Pallas, 1779 поймы среднего течения реки Колымы // Изв. РАН. Сер. биол. 2011. № 3. С. 283–288.
- Переверзева В.В., Лазуткин А.Н. Полиморфизм гена цитохрома *b* мтДНК красной полевки популяции поймы реки Буюнда // Вестн. СВНЦ ДВО РАН. 2009. № 2. С. 84–89.
- Примак А.А., Засыпкин М.Ю. Аллозимная изменчивость и генетическая гетерогенность красной полевки *Clethrionomys rutilus* Pallas, 1779 некоторых островов северной части охотского моря // Вестн. СВНЦ ДВО РАН. 2011. № 2. С. 100–105.
- Чернявский Ф.Б. Млекопитающие крайнего северо-востока Сибири. М.: Наука, 1984. 392 с.
- Avice J.C. Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard Univ. Press, 2000. 447 p.
- Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. P. 37–48.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis // Evol. Bioinformatics Online. 2005. V. 1. P. 47–50.
- Fulgione D., Guglielmi S., Odierna G. *et al.* Morphological differentiation and genetic structure in island lizard populations // Zool. Sci. 2008. V. 25. P. 465–474.
- Hassanin A., Lecointre G., Tiller S. Related articles, links abstract. The «evolutionary signal» of homoplasy in protein-coding gene sequences and its consequences for a priori weighting in phylogeny // C.R. Acad. Sci. 1998. V. 321. No. 7. P. 611–620.
- Hinten G., Harriss F., Rossetto M., Braverstock P.R. Genetic variation and island biogeography: Microsatellite and mitochondrial DNA variation in island populations of the Australian bush rat, *Rattus fuscipes greyii* // Conserv. Genet. 2003. V. 4. P. 759–778.
- Rogers A.R. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion // Evolution. 1995. V. 49. P. 608–615.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N. *et al.* MEGA-5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. P. 2731–2739.
- Wayne R.K., George S., Gilbert D. *et al.* Morphologic and genetic study of the island fox, *Urocyon littoralis* // Evolution. 1991. V. 5. P. 1849–1868.

**GENETIC STRUCTURE OF THE RED VOLE
MYODES (= CLETHRIONOMYS) RUTILUS PALLAS, 1779 POPULATIONS
OF THE NORTHERN PRIOKHOTYE WITH REGARD TO NUCLEOTIDE
SEQUENCE VARIABILITY OF THE MTDNA *cytb* GENE**

V.V. Pereverzeva, A.A. Primak, E.A. Dubinin

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

Summary

The purpose of the work was to determine the genetic structure of coastal populations of the species *Myodes* (= *Clethrionomys*) *rutilus* in the Northern Priokhotye on the base of the variability of a partial mt DNA *cytb* sequence. For the first time, the nucleotide and haplotypic variability of *cytb* gene, as well as the genetic structure of the red vole populations in Matykil, Nedorazumeniya, Spafar'eva and Talan islands (Northern Priokhotye); Koni peninsula; the outskirts of Magadan; and the Yama river region were determined. The insular red vole populations have unique gene pools comprising two to three haplotypes. A high level of *cytb* gene polymorphism was found in *M. rutilus* from the continental coast of the Sea of Okhotsk. The existence of a contiguous coastal red vole population in the Northern Priokhotye is suggested. Genetic data evidence that *M. rutilus* from the islands of Tauysk Bay and the continental coast of the Sea of Okhotsk belong to the same maternal lineage, whereas the red vole from Matykil island pertains to another genetic branch.

Key words: red vole, mtDNA sequencing, cytochrome *b* (*cytb*), nucleotide sequence, genetic structure of a population.

УДК 599.323.43:575.86(575.61)

**ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ
ПОПУЛЯЦИЙ КРАСНОЙ ПОЛЕВКИ
MYODES (=CLETHRIONOMYS) RUTILUS PALLAS, 1779
СЕВЕРНОГО ПРИХОТЬЯ И КОЛЫМСКОГО РЕГИОНА**

© 2013 г. **В.В. Переверзева, А.А. Примак, Е.А. Дубинин**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук (ИБПС ДВО РАН),
Магадан, Россия, e-mail: vvpereverzeva@mail.ru

Поступила в редакцию 28 июня 2013 г. Принята к публикации 9 августа 2013 г.

Цель работы – на основании анализа полиморфизма фрагмента гена цитохрома *b* мтДНК у представителей некоторых популяций *Myodes* (= *Clethrionomys*) *rutilus* Северо-Востока Азии и Аляски определить филогенетические связи сообществ полевок Северного Приохотья и Колымского региона. Генетический анализ выявил различный уровень дифференциации между популяциями красных полевок бассейнов рек Колымы, Ямы и окрестностей г. Магадана. При этом гаплотипы полевок островных популяций Тауйской губы, материковой части Северного Приохотья и Колымского региона относятся к восточной линии с базальным вариантом гена *B1*. Гаплотипы представителей популяций Камчатки, Аляски и островов Матюкиль и Сахалин принадлежат к берингийской линии. Сибирские образцы значительно отличаются от представителей обеих указанных групп и являются связующим звеном между ними. Дифференциация популяций красной полевки в регионе и филогенетические отношения между группами могут быть следствием особенностей экспансии вида на Северо-Восток Азии в позднем плейстоцене. Первая волна расселения красной полевки по Берингийскому мосту суши достигла Северной Америки. В настоящее время представители этой ветви обитают на Аляске, Сахалине, Камчатке и о. Матюкиль. Повторно красная полевка проникла в регион в конце позднего плейстоцена. В результате второй волны заселения полевки восточной ветви заняли долину р. Колымы и побережье Охотского моря с некоторыми прилегающими островами.

Ключевые слова: красная полевка, секвенирование мтДНК, цитохром *b* (*cytb*), нуклеотидная последовательность, филогенетические связи популяций.

ВВЕДЕНИЕ

Красная полевка *Myodes* (= *Clethrionomys*) *rutilus*, Pallas, 1779 – широко распространенный голарктический вид. При анализе изменчивости нуклеотидного строения митохондриального генома красных полевок ряд авторов выявил 4 основных филогруппы (Iwasa *et al.*, 2002; Abramson, Vodrov, 2008). Согласно этим данным, территорию крайнего Северо-Востока Сибири, включая бассейн р. Колымы и Северное Приохотье с прилежащими островами, населяют полевки восточно-сибирской гаплогруппы. В предыдущих исследованиях было установлено,

что красные полевки Колымского региона, материковой части Северного Приохотья и островов Тауйской губы принадлежат к одной материнской линии, а на о. Матюкиль обитают представители другой генетической ветви (Переверзева и др., 2013). Этот остров расположен в Охотском море, в юго-западной части залива Шелихова. Данные по аллозимной и морфологической изменчивости матюкильских полевок также указывают на их существенные отличия от других островных и материковых популяций региона (Докучаев и др., 2002; Примак, Засыпкин, 2011). Наличие в Северном Приохотье представителей отдельной генетической линии

M. rutilus только на одном острове может быть следствием особенностей расселения вида на Северо-Востоке Азии в плейстоцене. Известны палеонтологические данные по истории формирования и расселения красной полевки. Наиболее древние останки особей рода *Myodes* (= *Clethrionomys*) обнаружены в слоях отложенных раннего плейстоцена Европы и Западной Сибири (Громов, Ербаева, 1995). Самые ранние достоверные ископаемые остатки экземпляров *M. (=Cl.) rutilus* датируются поздним плейстоценом и найдены только в Сибири и на Дальнем Востоке (Громов, Поляков, 1977). Экспансия полевок в Берингию охватывала и территорию современного Дальнего Востока. В настоящее время вид обитает также на Аляске. Для уточнения истории расселения *M. rutilus* и определения филогенетических связей популяций красной полевки Колымского региона и Северного Приохотья использованы полученная нами информация и данные о строении участка гена *cytb* полевок центральной Сибири, Дальнего Востока и Аляски из GenBank.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали данные о строении нуклеотидной последовательности фрагмента (800 пар нуклеотидов) гена *cytb* у 360 экземпляров красных полевок бассейна р. Колымы и Северного Приохотья (Переверзева и др., 2011). Картирование исследуемого участка гена *cytb* проводилось относительно полной нуклеотидной последовательности мтДНК *Myodes regulus* (GenBank № NC016427). Для проведения филогенетического анализа из GenBank были взяты сведения о строении данного участка гена *cytb* у полевок № АВ072218, АВ072219 из окрестностей г. Новосибирска; АУ309424, АУ309425 из окрестностей поселка Стоково (верховье бассейна р. Колымы); АВ072220–АВ072222 с полуострова Камчатка; АВ072223, АВ072224 – с о. Сахалин и АУ309426, АУ309427, АФ119274 – с Аляски. В качестве внешней группы взята последовательность нуклеотидов данного участка гена *cytb* *Myodes rufocanus* Sundevall, 1846 (GenBank № GQ301944).

Статистическая обработка и анализ генетических данных проводились с помощью пакета программ MEGA-5 (Tamura *et al.*, 2011),

ARLEQUIN ver. 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005) и Network 4.5.1.0 (Bandelt *et al.*, 1999).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущих работах исследовалась генетическая структура популяции красной полевки поймы среднего течения р. Колымы и сравнивались островные и континентальные выборки этого вида из Северного Приохотья. Установлено, что популяции полевок бассейна р. Колымы и материковой части побережья Охотского моря относятся к одной материнской линии с анцестральным гаплотипом В1 (Переверзева и др., 2011, 2013). Места отлова красных полевок в бассейне р. Колымы расположены в среднем на расстоянии 300 км от точек сбора образцов на континентальной части побережья Охотского моря. Кроме географической отдаленности существует и большое различие в климатических условиях этих местностей. Климат в районе среднего течения р. Колымы резко континентальный. В экстремальной экологической зоне красные полевки, ведущие зимой активный образ жизни, подвергаются жесткому отбору. По-видимому, высокие темпы размножения полевок позволяют достаточно быстро накапливать витальные мутации без ущерба для общей численности популяции. Можно предположить, что в процессе адаптации к суровым условиям обитания в генофонде популяции происходило интенсивное накопление мутаций, в том числе и в гене *cytb*, который кодирует важнейший фермент метаболизма.

На побережье Охотского моря мягкий морской муссонный климат. По-видимому, в генофонде прибрежных популяций полевок происходит накопление мутаций, адаптивно ценных для обитания в приморских экосистемах. Только два гаплотипа являются общими для выборок красных полевок, собранных в окрестностях г. Магадана и в долине р. Колымы. Это свидетельствует о практически полном отсутствии миграции генов между этими группами полевок. Длительная взаимная изоляция этих сообществ и различное действие отбора способствовали накоплению разных мутаций в данных популяциях.

Выборки полевок из бассейнов рек Колымы и Ямы имеют 5 одинаковых гаплотипов. Можно

предполагать наличие ограниченного потока генов между этими группами. На континентальной части Магаданской области красная полевка обитает в долинах рек и ручьев. Река Малтан впадает в р. Бахапчу – приток р. Колымы. Истоки рек Ямы и Малтана расположены достаточно близко. Эта географическая особенность делает возможным обмен генами между популяциями полевок бассейнов рек Колымы и Ямы.

Для определения уровня дифференциации между популяциями красных полевок долины р. Колымы и континентальной части побережья Приохотья были рассчитаны генетические дистанции в пакете программ ARLEQUIN. Эти величины характеризуют интенсивность потока генов между популяциями полевок и зависящий от него уровень близости генофондов данных родственных сообществ. Генетическая дистанция между выборками красных полевок из долины р. Колымы и всей континентальной части побережья Приохотья составляет $F_{ST} = 0,03544$. Это значение высокодостоверно ($P = 0,00000 \pm 0,0000$). При сопоставлении популяции полевок бассейна р. Колымы по отдельности с выборками из окрестностей г. Магадана и бассейна р. Ямы получены различные результаты. Более высокий уровень дифференциации найден между группами полевок бассейна р. Колымы и окрестностей г. Магадана ($F_{ST} = 0,06072$, $P = 0,00000 \pm 0,0000$). Между выборками из пойм рек Колымы и Ямы наблюдается меньшая степень дифференциации ($F_{ST} = 0,01928$, $P = 0,02703 \pm 0,0139$). Полученные данные свидетельствуют о подразделении популяции *M. rutilus* континентальной части Магаданской области на субпопуляции. Результаты расчетов показывают, что популяция полевок поймы р. Колымы и субпопуляция окрестностей Магадана полностью изолированы друг от друга, а между сообществами красных полевок бассейнов р. Ямы и Колымы, вероятно, возможен обмен генами.

Проведенный в предыдущей работе анализ генетических данных выявил статистически достоверные различия между популяциями полевок островов Тауйской губы, а также между островными и континентальными выборками. Наибольшая генетическая дистанция найдена между популяцией о. Матыкиль и остальными группами. Несмотря на наблюдаемые генети-

ческие различия между популяциями красных полевок континентальной и прибрежной части Магаданской области и островов Тауйской губы, все они относятся к одной филетической линии. В то же время полученные нами результаты свидетельствуют о принадлежности красных полевок о. Матыкиль к другой генетической ветви (Переверзева и др., 2013). При использовании только полученных нами данных определить происхождение популяции полевок о. Матыкиль не представляется возможным. Для выявления филетических связей полевок о. Матыкиль были привлечены сведения о нуклеотидном строении гена *cytb* у особей из дальневосточных и аляскинских популяций. Согласно литературным данным, красная полевка Северо-Востока Азии подразделяется на 4 основные материнские линии, 3 из которых – центральносибирская, восточносибирская и аляскинско-камчатско/сахалинская – населяют Сибирь и Дальний Восток России (Iwasa *et al.*, 2002). Н.А. Абрамсон и С.Ю. Бодров обозначают эти филогруппы как западную, восточную и берингийскую (Abramson, Bodrov, 2008). Принадлежность полевок Колымского региона и Северного Приохотья к определенным филетическим линиям определялась сопоставлением строения фрагмента гена *cytb* у представителей этих филогрупп и исследованных нами особей. Анцестральный гаплотип В1 идентичен АВ072215 (окрестности г. Магадана) восточносибирской линии (Iwasa *et al.*, 2002). Таким образом, все изученные нами выборки полевок, за исключением популяции о. Матыкиль, принадлежат к восточносибирской (восточной) филогруппе. Полевки из окрестностей г. Новосибирска по строению гаплотипов относятся к центральносибирской (западной) линии.

Для определения филогенетических отношений внутри вида *M. rutilus* на Северо-Востоке России и Аляске была построена NJ-дендрограмма (рис. 1). Этот метод основан на бипараметрической модели дистанций Кимуры. Он позволяет корректно реконструировать филогенетические деревья при сравнении близкородственных популяций (Saitou, Imanishi, 1989).

В NJ-дендрограмму входят два кластера. Красные полевки центрального района континента, материковой части побережья и островов Тауйской губы объединены в одну кладу. Обо-

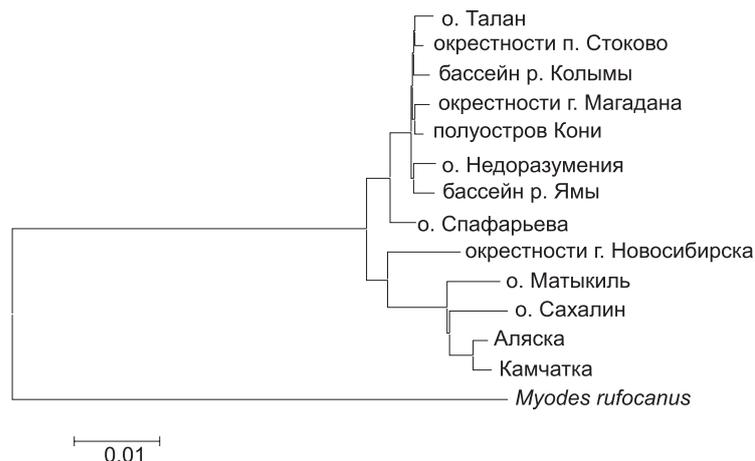


Рис. 1. Филогенетические отношения между некоторыми популяциями красной полевки Северо-Востока Азии и Аляски (NJ-дендрограмма).

Масштабный отрезок соответствует числу нуклеотидных замен на один сайт.

собленное расположение на дендрограмме ветви, характеризующей популяцию о. Спафарьева, может быть объяснено отделением этого острова от материка ранее всех исследованных островов Тауйской губы (Велижанин, 1976).

Вторая клада объединяет полевок, отловленных в окрестностях г. Новосибирска, на о. Маткиль, о. Сахалин, Камчатке и Аляске. Ветви дендрограммы показывают генетическую отдаленность центральносибирских экземпляров от объединенных в один субкластер маткильских, аляскинских, сахалинских и камчатских полевок. Субкластеризация образцов, добытых на Аляске и Камчатке, характеризует генетическую близость красных полевок этих открытых популяций. Обособленность на дендрограмме популяций островов Маткиль и Сахалин иллюстрирует уникальность генофондов данных изолированных сообществ.

Генетические различия между полемками колымского региона и Аляски отмечаются и другими авторами. Гаплотипы красных полевок, отловленных в окрестностях пос. Стоково Магаданской области (AY309424 и AY309425), образуют кластер, отличный от клады, включающей гаплотипы аляскинских полевок (AY309426, AY309427 и AF119274) с высокой бутстреп-поддержкой (Cook *et al.*, 2004).

Для уточнения филогенетических отношений гаплотипов красных полевок, населяющих исследованные острова Охотского моря,

Сахалин, Камчатку, Аляску и окрестности г. Новосибирска, построена медианная сеть по принципу минимального числа нуклеотидных замен (рис. 2). На схеме четко представлены 3 группы гаплотипов.

Первая гаплогруппа включает в себя варианты мтДНК полевок из окрестностей г. Новосибирска, наиболее географически близкого к центру возникновения рода *Clethrionomys* (Громов, Ербаева, 1995). От группы 1 отходят две ветви, показывающие нуклеотидные замены, которые приводят к образованию гаплогрупп 2 и 3. Можно предположить, что гипотетический предковый гаплотип, от которого произошли выявленные линии, имеет наибольшее сходство с нуклеотидным строением генов *cytb* линии 1.

В группу 2 входят гаплотипы полевок островных популяций Тауйской губы, образовавшиеся от анцестрального В1 (идентичного по совпадающему участку *cytb* с найденными в окрестностях пос. Стоково AY309425 (Cook *et al.*, 2004)).

Гаплотипы полевок, отловленных на о. Маткиль, о. Сахалин, Камчатке и Аляске, составляют гаплогруппу 3. Подгруппы 3а и 3б обособлены. Субкластер 3а объединяет гаплотипы полевок о. Маткиль, 3б – о. Сахалин. Варианты мтДНК особей, населяющих эти острова, имеют единое происхождение от гипотетического митотипа mv5. Каждый из гаплотипов, М1, АВ072223 и АВ072224, отличается от mv5 5 нуклеотидными

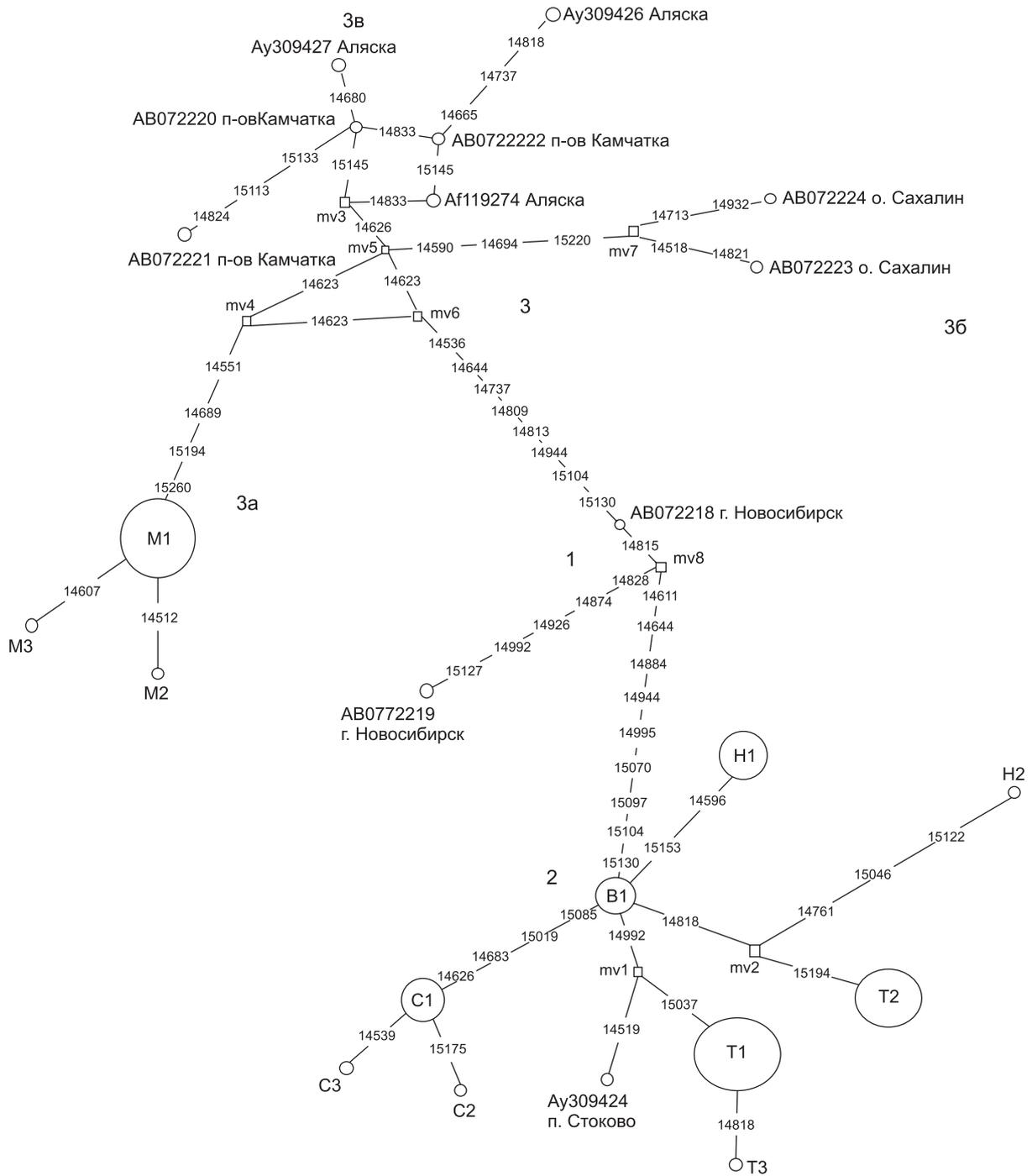


Рис. 2. Медианная сеть гаплотипов мтДНК популяций красной полевки островов Талан (Т), Недоразумения (Н), Спафарьева (С), Матыкиль (М), стоковских, новосибирских, сахалинских, камчатских и аляскинских экземпляров.

Размер кругов пропорционален частоте варианта мтДНК. Цифрами обозначены сайты мутаций на карте полного митохондриального генома *M. regulus* (GenBank № NC016427).

заменами. Это может свидетельствовать о том, что заселение этих островов красными полевками произошло в один временной период. Островные популяции *M. rutilus* формировались под

воздействием дрейфа генов. Остров Матыкиль гораздо меньше по площади, чем Сахалин, поэтому интенсивность стохастических процессов должна быть выше в матыкильской популяции

полевков. Косвенно об этом свидетельствует наличие в популяции полевков о. Матыкиль базального М1, от которого и М2, и М3 отличаются одной нуклеотидной заменой. Гаплотипы красных полевков о. Сахалин АВ072223 и АВ072224 разнятся между собой по 4 сайтам фрагмента гена *cytb*. Остров Сахалин имеет большую площадь. По-видимому, он был заселен красными полевками, принадлежащими, по меньшей мере, к двум материнским сублиниям.

Варианты мтДНК красных полевков, отловленных на Камчатке и Аляске, составляют единую группу 3в в медианной сети. На основании имеющейся в GenBank информации базальным гаплотипом в этом кластере является АВ072220, носитель которого добыт на п-ве Камчатка.

Популяции красной полевки о. Матыкиль, Камчатки, о. Сахалин и Аляски генетически близки. Таким образом, матыкильскую популяцию можно отнести к аляскинско-камчатско/сахалинской (берингийской) линии.

Найденные филогенетические отношения популяций полевков Северного Приохотья и Колымского региона позволяют выдвинуть предположение об особенностях экспансии вида на эти территории. По-видимому, две филогенетические линии, выявленные нами у красных полевков Северного Приохотья, соответствуют двум волнам расселения этого вида на Северо-Востоке Азии в позднем плейстоцене. М.А. Iwasa с соавт. (Iwasa *et al.*, 2002) на основании большей генетической близости популяций красной полевки о. Хоккайдо с полевками о. Сахалин, Камчатки и Аляски, чем с популяциями Магаданской области и Чукотки, полагают, что расселение вида шло из Азии в Америку через Сахалин, Курильскую гряду и Камчатку. Н.А. Абрамсон и С.Ю. Бодров (Abramson, Bodrov, 2008), напротив, считают, что берингийская кладка была сформирована в рефугиуме на Аляске и в течение последнего оледенения распространилась на Камчатку и Сахалин. Мы считаем более реалистичным вариант заселения красной полевкой Северной Америки из Азии в конце плейстоцена, который поддерживают и другие исследователи (Чернявский, 1984; Cook *et al.*, 2004). Распространение вида на восток (Камчатку и Аляску) вряд ли могло идти через острова Курильской гряды. Известно, что даже в период позднеплейстоценовых регрессий, когда уровень

моря падал не менее чем на 100 м, и вдоль всего побережья обнажалась шельфовая зона, между островами центральной части Курильской гряды существовали глубокие проливы (Велижанин, 1976). Поэтому основным путем распространения полевков берингийской гаплогруппы, очевидно, служило побережье Охотского моря, и популяция о. Матыкиль маркирует собой этот позднеплейстоценовый путь.

Время расхождения восточной и берингийской филогрупп красной полевки оценивается в 55–25 тыс. лет (Iwasa *et al.*, 2009). В связи с этим и время проникновения *M. rutilus* на Аляску также может варьировать. Красная полевка могла появиться на Аляске не только в самом конце позднего плейстоцена, но и до последнего ледникового максимума. В наиболее холодный период существования вида ограничивалось немногочисленными рефугиумами. Территория о. Матыкиль, по всей видимости, входила в состав одного из таких рефугиумов. Об этом свидетельствуют сохранившиеся на данном острове некоторые виды лесных трав. Остальная площадь современного Северного Приохотья и бассейна р. Колымы в этот период была покрыта горно-долинными ледниками и безлесными травянистыми и кочкарными тундрами (Воскресенский и др., 1984; Глушкова, 1984), мало пригодными для обитания красной полевки.

Одновременно с потеплением климата представители восточносибирской (восточной) ветви стали расселяться по центральным (бассейн р. Колымы) и прибрежным районам Северо-Востока Азии. Пережить сартанское оледенение они могли в материковых рефугиумах региона. Вероятно, один из подобных участков, судя по обнаруженным останкам красной полевки позднеплейстоценового возраста, находился в бассейне р. Алдан (Вангенгейм, 1977). По-видимому, в это время и были заселены территории, впоследствии ставшие островами Спафарьева и Талан. Их отделение от материка, судя по изменению уровня моря в плейстоцене, произошло в интервале 10–10,5 тыс. лет назад (Велижанин, 1976; Hopkins, 1982; Ложкин, 2002). Проведенный сравнительный анализ филогенетических отношений гаплотипов *cytb* представителей различных популяций красной полевки Северо-Востока Азии и Аляски с привлечением данных палеогеографии позднего плейстоцена

Берингии позволяет предположить, что красные полевки берингийской материнской линии колонизировали Северо-Восток Азии раньше, чем полевки восточной филогруппы.

Таким образом, в результате исследования найдены филогенетические связи некоторых популяций красной полевки Северного Приохотья и бассейна р. Колымы. Установлено, что заселение Северо-Востока Азии *M. rutilus* происходило как минимум дважды, что и определило особенности генетической структуры вида в этом регионе. Изолированная уникальная популяция красной полевки о. Матыкиль является самой древней среди исследованных групп Магаданской области. Родственные ей сообщества полевок обитают на Камчатке, Аляске и о. Сахалин. Все остальное население *M. rutilus* Колымского региона и Северного Приохотья – потомки позднелайстоценовых вселенцев из Сибири. Обитая на достаточно большой по площади и гетерогенной по своим климатическим условиям территории в течение длительного времени, красная полевка распалась на две большие континентальные группы. Первая включает в себя представителей колымской популяции, для которой характерен свободный обмен генами на большой территории бассейна р. Колымы. Материковая часть побережья Охотского моря населена второй генетически обособленной популяцией полевок, подразделенной на ряд субпопуляций. Можно предполагать крайне ограниченный обмен генами между популяциями полевок бассейна р. Колымы и материковой части Северного Приохотья, так как этому процессу препятствует охотско-колымский водораздел. Острова Тауйской губы Охотского моря населены полностью изолированными популяциями *M. rutilus*, обладающими уникальными генофондами.

ЛИТЕРАТУРА

- Вангенгейм Э.А. Палеонтологическое обоснование стратиграфии антропогена Северной Азии (по млекопитающим). М.: Наука, 1977. 171 с.
- Велижанин А.Г. Время изоляции материковых островов северной части Тихого океана // Докл. АН СССР. 1976. Т. 231. № 1. С. 205–207.
- Воскресенский С.С., Чанышева М.Н., Воскресенский И.С. и др. Плейстоценовые оледенения бассейна Колымы. Плейстоценовые оледенения Востока Азии. Магадан: СВКНИИ ДВНЦ АН СССР, 1984. С. 57–65.
- Глушкова О.Ю. Морфология и палеогеография позднелайстоценовых оледенений Северо-Востока СССР. Плейстоценовые оледенения Востока Азии. Магадан: СВКНИИ ДВНЦ АН СССР, 1984. С. 28–42.
- Громов И.М., Ербаева М.А. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. СПб.: ЗИН РАН, 1995. Вып. 167. 522 с.
- Громов И.М., Поляков И.Я. Фауна СССР. Млекопитающие. Л.: Наука, 1977. Т. 3. Вып. 8. 504 с.
- Докучаев Н.Е., Иванов В.В., Засыпкин М.Ю., Примак А.А. Красные полевки (*Clethrionomys rutilus* Pallas, 1779) острова Матыкиль (северная часть Охотского моря) // Териологические исследования. Вып. 1. СПб., 2002. С. 140–142.
- Переверзева В.В., Засыпкин М.Ю., Соловчук Л.Л. и др. Изменчивость гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК в популяции красной полевки *Clethrionomys rutilus* Pallas, 1779 поймы среднего течения реки Колымы // Изв. РАН. Сер. биол. 2011. № 3. С. 283–288.
- Переверзева В.В., Примак А.А., Дубинин Е.А. Генетическая структура популяций красной полевки *Myodes* (= *Clethrionomys*) *Rutilus* Pallas, 1779 Северного Приохотья по данным об изменчивости нуклеотидных последовательностей гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2013. Т. 17. № 3. С. 435–443.
- Примак А.А., Засыпкин М.Ю. Аллозимная изменчивость и генетическая гетерогенность красной полевки *Clethrionomys rutilus* Pallas, 1779 некоторых островов северной части охотского моря // Вестн. СВНЦ ДВО РАН. 2011. № 2. С. 100–105.
- Чернявский Ф.Б. Млекопитающие крайнего Северо-Востока Сибири. М.: Наука, 1984. 392 с.
- Abramson N.I., Bodrov S.Yu. Genetic differentiation and phylogeography of *Clethrionomys rutilus* Pallas 1811 inferred from variation of mitochondrial cytochrome *b* gene // 11th Intern. Conf. «Rodens et Spatium» on Rodent Biology. Myshkin, Russia, July 24–28. Moscow: VTO RAS, 2008. P. 64.
- Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. P. 37–48.
- Cook J.A., Runck A.M., Conroy C.J. Historical biogeography at the crossroads of the northern continents: molecular phylogenetics of red-backed voles (Rodentia: Arvicolinae) // Mol. Phylogenetics and Evol. 2004. V. 30. P. 767–777.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis // Evol. Bioinformatics Online. 2005. V. 1. P. 47–50.
- Hopkins D.M. Aspects of the Paleogeography of Beringia during the Late Pleistocene // Paleogeology. of Beringia. N.Y.: Acad. Press, 1982. P. 3–28.
- Irwin D.M., Koche T.D., Wilson A.C. Evolution of the cytochrome *b* gene of Mammals // J. Mol. Evol. 1991. No. 32. P. 128–144.
- Iwasa M.A., Kartavtseva I.V., Dobrotvorskyy A.K. et al. Local differentiation of *Clethrionomys rutilus* in northeastern Asia inferred from mitochondrial gene sequences // Mamm. Biol. 2002. V. 67. P. 157–166.

- Iwasa M.A., Kostenko V.A., Frisman L.V. *et al.* Phylogeography of the root vole *Microtus oeconomus* in Russian Far East: A special reference to comparison between Holarctic and Palearctic voles // *Mammal Study*. 2009. V. 34. P. 123–130.
- Saitou N., Imanishi T. Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, maximum-likelihood, and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree // *Mol. Biol. Evol.* 1989. V. 6. P. 514–525.
- Tamura K., Peterson D. *et al.* MEGA-5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Mol. Biol. Evol.* 2011. V. 28. P. 2731–2739.

PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AMONG POPULATIONS OF THE RED VOLE *MYODES* (= *CLETHRIONOMYS*) *RUTILUS* PALLAS, 1779 IN THE NORTHERN PRIOKHOTYE AND KOLYMA REGIONS

V.V. Pereverzeva, A.A. Primak, E.A. Dubinin

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

Summary

The goal of the work was the determination of phylogenetic relationships in red vole associations of the Northern Priokhotye and Kolyma regions on the base of analysis of partial mtDNA *cytb* gene sequence polymorphism in some *Myodes* (*Clethrionomys*) *rutilus* populations of Northeastern Asia and Alaska. Genetic analysis allowed the different levels of differentiation among red vole populations from the basins of Kolyma and Yama rivers and the suburbs of Magadan city to be determined. The haplotypes of red vole in the populations from islands of Tauysk Bay, the continental part of the Northern Priokhotye region, and the Kolyma region belong to the eastern lineage with the basal B1 gene variant. The haplotypes of representatives of populations from Kamchatka, Alaska, and Matykil and Sakhalin islands belong to the Beringean lineage. The Siberian samples differ significantly from the above lineages, being an interlink between them. The differentiation of red vole populations in the region and phylogenetic relationships among groups appear to be a consequence of certain features of the species expansion to the northeast in the Late Pleistocene. The first wave of red vole migrated to North America across the Bering land bridge. Presently the descendants of this wave inhabit Alaska, Sakhalin, Kamchatka, and Matykil island. For the second time, the red vole entered the region at the end of the Late Pleistocene. During the second wave of dispersal, red voles from the eastern branch occupied the drainage area of the Kolyma river and the coast of the Sea of Okhotsk together with some neighboring islands.

Key words: red vole, mtDNA sequencing, cytochrome *b* (*cytb*), nucleotide sequence, phylogenetic relationships among populations.

УДК 636.4:636.066

ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ И МОДИФИКАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПАССИВНО-ОБОРОНИТЕЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ ДОМАШНИХ СВИНЕЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К ЧЕЛОВЕКУ

© 2013 г. В.С. Ланкин

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

Поступила в редакцию 11 июня 2013 г. Принята к публикации 10 июля 2013 г.

Проведено сравнительное изучение роли пищевой мотивации в регуляции проявления и изменчивости пассивно-оборонительного поведения по отношению к человеку у свиней специализированных кросс-бредных линий: отцовской европейской лакони и уникальной материнской китайско-европейской тиамеслан. Установлено, что взаимодействие «генотип–пищевая мотивация» является неотделимым от условий этологических тестов фактором средовой изменчивости этого поведения. Вклад данного взаимодействия представляет в среднем 60 % общей фенотипической вариации пассивно-оборонительного поведения у свиней обеих линий. Предложен комплексный подход к минимизации влияния модификационной изменчивости этого адаптивного поведения, адекватно описывающий его наследственное разнообразие у сельскохозяйственных животных.

Ключевые слова: свиньи, взаимодействие «генотип–среда», реакция удаления от человека, фенотипическая изменчивость, генотипические и средовые различия.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследований пассивно-оборонительного поведения по отношению к человеку у сельскохозяйственных животных отмечена в ряде критических обзоров (Boissy *et al.*, 2005; Waiblinger *et al.*, 2006; Forkman *et al.*, 2007). Приведенные в них замечания направлены главным образом на совершенствование методов определения его межиндивидуальных (генотипических) различий, изучению которых посвящено большинство этологических работ. Значительно меньше известно о двух других компонентах общей фенотипической изменчивости этого поведения:

$$P = G + E + GE,$$

создаваемых влияниями среды (E) и взаимодействия «генотип–среда» (GE) (Фолкнер, 1985; Boissy *et al.*, 2005). Тем не менее становится понятным, что при отсутствии отбора по поведению относительный вклад различий между генотипами (G) в наблюдаемую изменчивость

сложных поведенческих признаков составляет в среднем не более 35 % и не превышает среднего вклада взаимодействия GE (Valdar *et al.*, 2006; Bell *et al.*, 2009). Обычной причиной взаимодействия GE являются различия в средовой чувствительности у отличающихся по генотипу особей, проявляющиеся в их разной фенотипической реакции на изменения в среде (Фолкнер, 1985). Как следствие, остающаяся актуальной задача адекватного описания генотипической изменчивости пассивно-оборонительного поведения оказывается тесно связанной с необходимостью выявления факторов среды, индуцирующих взаимодействие GE в генетически гетерогенных популяциях продуктивных животных. Другим необходимым условием для обнаружения взаимодействия GE является сравнительное изучение реакции на факторы среды у наследственно отличающихся по свойствам этого поведения особей, представленных, в частности, трусливым «диким» и спокойным «доместикационным» фенотипами у разных видов сельскохозяйствен-

ных животных (Стакан и др., 1976; Price, 1998; Ланкин, Буиссу, 2001).

Вместе с тем показанное на лабораторных животных постоянное присутствие взаимодействия GE предполагает существование остающегося скрытым фактора(-ов) среды, вызывающих систематическую вариацию признаков поведения, в том числе пассивно-оборонительного по отношению к человеку (Wahlsten *et al.*, 2003a, b). Возможно, что ведущая роль в формировании средовой вариации этого поведения, главным компонентом которого является мотивированная страхом эмоциональная реакция избегания/удаления от незнакомого человека у животных, принадлежит пищевому поведению и реактивности к стрессам (Ланкин, 1996, 1997; Rejala *et al.*, 1997; Veenema *et al.*, 2003). Действительно, различия в реакции удаления, пищевом поведении и реактивности гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы входят в типичный набор скоррелированных признаков, отличающих «дикий» и доместикационный фенотипы у разных видов животных (Ланкин, 1996, 2000; Ланкин, Буиссу, 2001; Reale *et al.*, 2007; Moretz *et al.*, 2007). Выполняющаяся при этом устойчивая интеграция оборонительного и пищевого поведений определяется гипоталамическим механизмом регуляции их фенотипической экспрессии, включающим отрицательное взаимодействие мотиваций этих поведений, чувствительных к средовой стимуляции (Козловская, 1974; Аршавский, Ротенберг, 1993). Известно также, что эмоциональный стресс не только усиливает проявление неофобных реакций, но и подавляет пищевое возбуждение (аппетит) у животных, имеющее широкий диапазон (h^2 в пределах от 0,13 до 0,62) генетической изменчивости (Rothschild, Ruvinsky, 1998; Adam, Epel, 2007). Поэтому уместно считать, что взаимодействие между генотипом и пищевым возбуждением/мотивацией у наследственно отличающихся по чувствительности к изменениям ее уровня животных может представлять постоянный источник средовой вариации пассивно-оборонительного поведения, неотделимый от условий этологических тестов. Неучитываемые влияния взаимодействия «генотип–пищевая мотивация», дополняемые действием эмоционального стресса (контактов с незнакомым человеком,

социальной изоляции) на животных при тестировании, могут вести к появлению смещенных оценок признаков мотивированного страхом поведения, их низкой повторяемости и вариабельности характера наследования (Фолкoner, 1985; Wahlsten *et al.*, 2003b; Bell *et al.*, 2009). Другим неблагоприятным следствием такого взаимодействия может быть образование специфичной для среды этологических тестов изменчивости модифицированных вариантов (фенокопий) генетически детерминированных фенотипов реакции удаления, способной маскировать фенотипическое проявление ее генотипического разнообразия.

Как было отмечено, для обнаружения взаимодействия «генотип–пищевая мотивация» требуются измерения реакции удаления у контрастных поведенческих фенотипов не менее чем в двух средах, разных по уровню пищевого возбуждения животных. Однако обычным для этологических методов является определение оборонительного реагирования на человека у разных видов животных на одном уровне пищевого возбуждения, не учитывающее влияние этого фактора (Waiblinger *et al.*, 2006; Forkman *et al.*, 2007). Возможно также, что по сравнению с лабораторными животными предполагаемый эффект взаимодействия «генотип–пищевая мотивация» должен быть более выраженным у сельскохозяйственных животных с наследственно усиленным у них в процессе селекции по продуктивности потреблением корма (аппетитом) (Holmes, Hastings, 1995). В связи с этим особый интерес представляет изучение факторов вариации реакции удаления у свиней, превосходящих другие виды в 15–20 раз по интенсивности роста, линейно связанной у них со скоростью поедания корма (Bigelow, Houpt, 1988). Тем не менее в доступной нам научной литературе практически отсутствует даже постановка задачи изучения роли пищевой мотивации в средовой регуляции этого адаптивного поведения у сельскохозяйственных животных (Ланкин, 1996, 1997).

Цель настоящей работы – сравнительное качественное и количественное исследование роли пищевой мотивации в проявлении и изменчивости пассивно-оборонительного поведения сельскохозяйственных животных по отношению к человеку. Для ее достижения

была изучена зависимость внутри- и межгрупповой изменчивости этого поведения от изменений пищевой мотивации у свиней двух специализированных кроссбредных линий: отцовской европейской лакони и материнской китайско-европейской тиамеслан. Затем на основании полученных результатов провели количественный анализ вкладов генотипа и среды в общую фенотипическую изменчивость пассивно-оборонительного поведения, необходимый для понимания ее природы и повышения объективности этологических и генетических исследований этого поведения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и экспериментальные условия.

Исследования проводили на 8 группах-аналогах по полу и возрасту (2,7 и 4,6 мес.) свинок и интактных хрячков (всего 116 особей) лакони (LC) и тиамеслан (TM) линий при стабильно комфортных условиях содержания в племкомплексе «Максент» (PenArLan, France). Подопытные свиньи LC (20-е селекционное поколение) получены от 22 маток и 15 хрячков, свиньи TM (12-е поколение) соответственно от 13 и 11 родителей. Свинки и хрячки находились в разных помещениях и содержались группами по 14–15 особей в изолированных клетках. Состав групп не изменялся. Животных кормили вволю сухим монокоормом, вода была всегда доступна.

Этологические тесты. Поведение подопытных свиней изучали по стандартному методу определения отрицательно сопряженных пищевых и пассивно-оборонительных реакций на человека у сельскохозяйственных животных (Ланкин, Буиссу, 2001). Свиней тестировали в их «домашних» клетках 4 раза: сначала 2 раза в группе сверстников, а затем спустя 5–6 сут еще 2 раза, в условиях кратковременной депривации от сверстников. Первое тестирование проводили на голодных животных, после 14–16 ч пищевой депривации. Через 3–4 дня проводили второе тестирование этих животных, но уже со сниженной у них пищевой мотивацией через 4 ч после кормления (первое и второе тестирования, I тест «в группе»). Третье и четвертое тестирования проводили по той же технике на индивидуальных животных, при действии на них социальной изоляции

(третье и четвертое тестирования, II тест «индивидуально»).

Каждое тестирование выявляет у свиней с заданным уровнем пищевой мотивации «частное» разнообразие фенотипов реакции удаления, отличающихся по числу отметок подходов к корму в присутствии незнакомого человека. Спокойные особи, без реакции удаления, ели корм в течение всего времени тестирования (9–12 мин в I и 3–5 мин во II тесте) и получали три отметки краской на спине. Трусливые особи, сразу удалявшиеся от корма, не получали отметок краской. Особи с промежуточным поведением между этими контрастными фенотипами получали 1 или 2 отметки. Тестирования проводились между 9.00 и 13.00 ч в одинаковой последовательности тестов одним и тем же экспериментатором.

Качественные и количественные характеристики поведения. Структуру подопытных групп свиней по реакции удаления характеризовали «частными» распределениями 4 фенотипов по 3 классам: двум крайним с отметкой 3 или 0 и среднему классу фенотипов с 1 или 2 отметками по выраженности у них реакции удаления. В отличие от этого фенотипы доместикационного поведения определяли по оценкам поведения (сочетанию отметок), выявленных у животных с высоким (через 14–16 ч) и с низким (через 4 ч после кормления) уровнем пищевого возбуждения. Такой способ задания фенотипов учитывает влияние пищевой мотивации на проявление реакции удаления и позволяет выявлять 10 «нормальных» (с оценками 0-0, 1-0, 1-1, 2-0, 2-1, 2-2, 3-0, 3-1, 3-2, 3-3) и 6 «парадоксальных» (0-1, 0-2, 0-3, 1-2, 1-3 и 2-3) поведенческих фенотипов (Ланкин, Буиссу, 2001). При этом особей с независимым от изменений пищевой мотивации «константным» отсутствием реакции удаления относили к доместикационному 3-3-фенотипу (оценка 3-3, ранг 10), а с «константно» выраженной реакцией – к «дикому» 0-0-фенотипу (оценка 0-0, ранг 1). Особей с другими оценками (от 1-0 до 3-2, ранги от 2 до 9) относили к фенотипам промежуточного поведения. Структуру групп по доместикационному поведению характеризовали распределениями 16 фенотипов по трем классам: двум, принятым ранее, крайним 3-3- и 0-0-классам и среднему классу фенотипов промежуточного поведения.

Для количественного изучения использовали индивидуальный балл (число отметок) по реакции удаления и ранг доместикационного поведения свиней (Ланкин, Буиссу, 2001). Данные об этом поведении у свиней, а также происхождение обеих линий детально рассмотрены ранее (Ланкин и др., 2007).

Факторы среды и модификационная изменчивость. Уровень пищевого возбуждения/мотивации и эмоционального стресса у свиней формировали контролируемым действием на них соответственно пищевой (14–16/4 ч) и социальной (3–5 мин) депривации. Оба воздействия являются обычными элементами среды этологических тестов, влиянием которых часто пренебрегают (Waiblinger *et al.*, 2006). В нашем эксперименте попарные сравнения частных распределений позволяют оценить простое и комбинированное влияние пищевой мотивации и эмоционального стресса изоляции на реакцию удаления у свиней обеих линий. Предварительный анализ показал достоверную зависимость наследственно обусловленной изменчивости реакции удаления у свиней от комплексного действия обоих факторов среды тестов (табл. 2, дисперсионный комплекс I).

Модификационную изменчивость реакции удаления, индуцируемую действием пищевой мотивации, изучали сравнением частных первого и четвертого распределений фенотипов этой реакции и соответствующих им распределений фенотипов доместикационного поведения, условно обозначенных как «контрольные». Для снижения случайной вариации частот фенотипов сравнения проводили на объединенных выборках свинок и хрячков в 4,6-месячном возрасте, характеризующемся повышенным до 54,4 % проявлением у них генотип-специфичных различий в оборонительном реагировании на человека (Ланкин и др., 2007).

Генетико-статистический анализ. Количественные вклады генотипа и среды тестирования в наблюдаемую у особей крайних классов частных распределений изменчивость реакции удаления оценивали с помощью модели компонентов средних значений признаков Мазера и Джинкса (1985). Адаптированная для поставленной задачи исследования модель описывает вариацию фактических частот фенотипов с отметками 3 и 0 при первом и четвертом тестировании, обозначенных соответственно как $\bar{p}(3)$, $\bar{q}(0)$ и $\bar{p}'(3)$, $\bar{q}'(0)$, через компоненты их отклонения от общей средней частоты (m):

«Средний генотип» особей крайних классов	Компоненты вариации фенотипических частот при тестировании:	
	первое	четвертое
3	$\bar{p}(3) - m = [d] + e + ge$	$\bar{p}'(3) - m = [d] - e - ge$
0	$\bar{q}(0) - m = -[d] + e - ge$	$\bar{q}'(0) - m = -[d] - e + ge$

Компоненты, представляющие средний эффект различий «среднего генотипа» $[d]$ у особей крайних классов, средний эффект различий в их пищевой мотивации (e) и взаимодействия «генотип–пищевая мотивация» (ge), считали по формулам:

$$[d] = 1/4 (\bar{p}(3) - \bar{q}(0) + \bar{p}'(3) - \bar{q}'(0));$$

$$e = 1/4 (\bar{p}(3) + \bar{q}(0) - \bar{p}'(3) - \bar{q}'(0));$$

$$ge = 1/4 (\bar{p}(3) - \bar{q}(0) - \bar{p}'(3) + \bar{q}'(0));$$

$$m = 1/4 (\bar{p}(3) + \bar{q}(0) + \bar{p}'(3) + \bar{q}'(0)).$$

Квадратные скобки указывают на то, что величина $[d]$ является алгебраической суммой влияний разных локусов на экспрессию оборонительной реакции у генетически разнородных особей крайних классов. В связи с этим предварительно проверили адекватность самой модели

для описания вариации поведения у особей этих классов. С использованием модельных оценок компонентов рассчитали ожидаемые частоты фенотипов крайних классов, совпавшие с их фактическими значениями в частных распределениях у свиней всех изучаемых групп (см. табл. 3, 6).

Статистическая обработка экспериментальных данных. Распределения сравнивали с помощью критерия идентичности (I) по методу Л.А. Животовского, внутриклассовые частоты – с помощью 2×2 таблиц ($d.f. = 1$) (Животовский, 1982). Достоверность влияния факторов «средний генотип» и «пищевая мотивация» на межгрупповое разнообразие частот фенотипов оценивали двухфакторным дисперсионным

анализом. Первый фактор, определяемый происхождением свиней от одной из трех, разных по качеству поведения потомства, групп производителей (Ланкин и др., 2007), был случайным, а второй фиксированным. Такая модель анализа объясняет вариацию реакции удаления вкладками генотипических различий животных, внутрииндивидуальной изменчивости (фенотипической пластичности) и взаимодействия «генотип–пищевая мотивация», указывающего на существование генотипической изменчивости пластичности поведения (Fordyce, 2006). Все этапы обработки данных проводили по пакету программ STATISTICA 6.0 для Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Комплексное действие изменений в пищевой мотивации и социальной среде тестов вызывает статистически значимое усиление проявления (снижение среднего балла) и вариабельности реакции удаления у свиней всех групп (табл. 1). Так, независимо от генотипа линии, различий в интенсивности отбора или возрасте животных балл этой реакции снижается в среднем на 16 % ($p < 0,05$), а коэффициент вариации увеличивается на 21 % ($p < 0,01$) от I ко II тесту. Снижение среднего балла и увеличение коэффициента вариации от первого к четвертому тестированию (в табл. 1 не приводятся) оказывается также типичным для частных распределений фенотипов реакции удаления. Отсутствие при этом даже тенденции к увеличению средней величины этой реакции указывает на отсутствие у подопытных свиней привыкания к повторяющимся тестированиям и на зависимость наблюдаемых у них изменений в поведении от действия контролируемых факторов среды тестов.

Выявленные изменения в оборонительном реагировании свиней определяются достоверными влияниями только пищевой мотивации. Так, изменения в пищевом возбуждении определяют изменчивость индивидуальных отметок реакции удаления у разновозрастных самок и самцов обеих линий при первом и втором ($F(1/230) = 10,54; p < 0,002$) и при третьем и четвертом ($F(1/230) = 13,60; p < 0,001$) тестированиях. При этом за исключением самок и самцов ТМ, самцов LC и самок ТМ снижение пищевой мотивации достоверно (при $p < 0,05$ –

0,001) усиливает проявление реакции удаления: от первого ко второму тестированию «в группе» в среднем на 23,8 % ($p < 0,01$) и от третьего к четвертому тестированию «индивидуально» на 31,6 % ($p < 0,001$). Смена уровня пищевой мотивации также влияет на межгрупповое разнообразие фенотипов этой реакции, вызывая достоверные изменения (критерий I в пределах от 6,5 до 13,9; $d.f. = 2; p < 0,05$ –0,001) их частных распределений у самок LC и самцов ТМ, самок и самцов в 2,7 и в 4,6 мес., а также у разновозрастных самок и самцов обеих линий.

В отличие от пищевой мотивации, кратковременная социальная изоляция статистически значимо не влияет на проявление и межгрупповое разнообразие реакции удаления у свиней. Простое действие изоляции ($F(1/230) = 2,31; p = 0,130$) на изменчивость индивидуальных отметок реакции удаления у «голодных» свиней при первом и третьем тестированиях также является недостоверным. Тем не менее этот фактор с пограничной достоверностью ($F(1/230) = 3,55; p = 0,061$) влияет на изменчивость отметок у «сытых» свиней при втором и четвертом тестированиях. Этот факт обнаруживает устойчивую тенденцию к более выраженному усилению проявления реакции удаления у «сытых» (в среднем на 19 %), чем у «голодных» (на 9,5 %) свиней при действии на них социальной изоляции. Очевидно, что вызываемый изоляцией кратковременный эмоциональный стресс, снижающий аппетит (Adam, Epel, 2007), аддитивно усиливает отмеченное регуляторное действие сниженной пищевой мотивации на оборонительное реагирование свиней. Комплементарное действие эмоционального стресса и пищевой мотивации отчетливо обнаруживается при сравнениях первого и четвертого тестирования, усиливающего проявление неохобной реакции удаления в среднем уже на 38 % ($p < 0,001$) у свиней всех групп.

Таким образом, независимо от генотипа линии, различий в интенсивности селекции или возрасте у свиней в принятых условиях этологических тестов пищевая мотивация является основным фактором специфичных ей изменений в проявлении и изменчивости реакции удаления. Как и у других видов животных (Козловская, 1974; Ланкин, 1997), изменения в уровне пищевой мотивации отрицательно сопряжены с

Таблица 1

Разнообразие пассивно-оборонительной реакции на человека
у домашних свиней в разной среде этологических тестирований

Линия, пол (<i>n</i>)	Среда тестов		Частные распределения (%) фенотипов по классам реакции удаления ¹			За одно тестирование $X \pm s_x$	За I и II тесты $X \pm s_x$ $CV \pm s_{cv}$, %
	пищевая депривация, ч	социальный контекст	3	1 или 2	0		
В зависимости от генотипа линии, возраст 4,6 мес.							
Самки и самцы LC (28)	14–16 4	в группе	19 (67,9) 12 (42,9)	6 (21,4) 6 (21,4)	3 (10,7) 10 (35,7)	2,3 ± 0,21 1,6 ± 0,26	1,9 ± 0,17 66,9 ± 6,3
	14–16 4	индивидуально	13 (46,4) 8 (28,6)	10 (35,7) 9 (32,1)	5 (17,9) 11 (39,3)	1,8 ± 0,23 1,2 ± 0,24	1,5 ± 0,17 82,1 ± 7,8
	Эффект среды: Δ(1–4) тестирование и Δ(I–II) тест					1,1**	0,4
Самки и самцы TM (28)	14–16 4	в группе	19 (67,9) 15 (53,6)	4 (14,3) 4 (14,3)	5 (17,9) 9 (32,1)	2,2 ± 0,23 1,9 ± 0,26	2,0 ± 0,18 64,1 ± 6,1
	14–16 4	индивидуально	16 (57,1) 10 (35,7)	5 (17,9) 9 (32,1)	7 (25,0) 9 (32,1)	2,0 ± 0,25 1,4 ± 0,24	1,7 ± 0,18 77,6 ± 7,3
	Эффект среды: Δ(1–4) тестирование, Δ(I–II) тест					0,8*	0,3
В зависимости от интенсивности селекции, возраст 4,6 мес.							
Самки LC и самцы TM (28)	14–16 4	в группе	14 (50,0) 8 (28,6)	8 (28,6) 4 (14,3)	6 (21,4) 16 (57,1)	1,8 ± 0,24 1,1 ± 0,26	1,5 ± 0,18 93,2 ± 8,8
	14–16 4	индивидуально	10 (35,7) 4 (14,3)	11 (39,3) 10 (35,7)	7 (25,0) 14 (50,0)	1,6 ± 0,23 0,8 ± 0,20	1,2 ± 0,16 99,3 ± 9,4
	Эффект среды: Δ(1–4) тестирование, Δ(I–II) тест					1,0**	0,3
Самцы LC и самки TM (28)	14–16 4	в группе	24 (85,7) 19 (67,9)	2 (7,1) 6 (21,4)	2 (7,1) 3 (10,7)	2,7 ± 0,16 2,3 ± 0,21	2,5 ± 0,13 39,6 ± 3,7
	14–16 4	индивидуально	19 (67,9) 14 (50,0)	4 (14,3) 8 (28,6)	5 (17,9) 6 (21,4)	2,2 ± 0,24 1,9 ± 0,24	2,0 ± 0,17 62,3 ± 5,9
	Эффект среды: Δ(1–4) тестирование, Δ(I–II) тест					0,8**	0,5*
В среднем по обеим линиям							
Самки и самцы в 2,7 мес (60)	14–16 4	в группе	31 (51,7) 21 (35,0)	17 (28,3) 19 (31,7)	12 (20,0) 20 (33,3)	2,0 ± 0,15 1,5 ± 0,17	1,8 ± 0,12 71,3 ± 4,6
	14–16 4	индивидуально	30 (50,0) 21 (35,0)	18 (30,0) 9 (15,0)	12 (20,0) 30 (50,0)	1,9 ± 0,16 1,2 ± 0,18	1,6 ± 0,12 86,3 ± 5,6
	Эффект среды: Δ(1–4) тестирование, Δ(I–II) тест					0,8**	0,2
Самки и самцы в 4,6 мес (56)	14–16 4	в группе	38 (67,9) 27 (48,2)	10 (17,9) 10 (17,9)	8 (14,3) 19 (33,9)	2,3 ± 0,16 1,7 ± 0,18	2,0 ± 0,12 65,4 ± 4,4
	14–16 4	индивидуально	29 (51,8) 18 (32,1)	15 (26,8) 18 (32,1)	12 (21,4) 20 (35,7)	1,9 ± 0,17 1,3 ± 0,17	1,6 ± 0,12 79,6 ± 5,3
	Эффект среды: Δ(1–4) тестирование, Δ(I–II) тест					1,0***	0,4*
Самки и самцы в 2,7 и 4,6 мес (116)	14–16 4	в группе	69 (59,5) 48 (41,4)	27 (23,3) 29 (25,0)	20 (17,2) 39 (33,6)	2,1 ± 0,11 1,6 ± 0,12	1,9 ± 0,08 68,4 ± 3,2
	14–16 4	индивидуально	59 (50,9) 39 (33,6)	33 (28,4) 27 (23,3)	24 (20,7) 50 (43,1)	1,9 ± 0,12 1,3 ± 0,12	1,6 ± 0,09 82,8 ± 3,8
	Эффект среды: Δ(1–4) тестирование, Δ(I–II) тест					0,8***	0,3*

Примечание. ¹ Здесь и в табл. 3 слева от скобок даны численные значения частот. Здесь и в табл. 3, 5 и 6 * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; *n* – объем выборки.

проявлением (средней величиной) этой реакции у свиней при первом и втором ($r_{bs} = -0,655$; $N = 14$; $p < 0,05$) и при третьем и четвертом ($r_{bs} = -0,775$; $N = 14$; $p < 0,01$) тестированиях. Эта закономерная регуляторная зависимость оказывается максимально выраженной ($r_{bs} = -0,846$; $N = 14$; $p < 0,001$) при сравнениях первого и четвертого тестирований. Вместе с тем изменения пищевой мотивации в этих тестированиях являются достоверным фактором проявления наследственной изменчивости поведения по отношению к человеку у разновозрастных самок и самцов обеих линий (табл. 2, комплекс II).

Дальнейший анализ роли пищевой мотивации проводили сравнением первого и четвертого распределений, учитывающих возможные различия в средовой чувствительности к действию этого фактора у свиней крайних классов реакции удаления (табл. 3). Все сравниваемые попарно частные распределения статистически значимо отличаются друг от друга (I в пределах от 6,1 до 22,3; $d.f. = 2$; $p < 0,05-0,001$) и от соответствующих им контрольных распределений (I от 6,0 до 23,5; $d.f. = 2$; $p < 0,05-0,001$). За исключением самцов LC и самок TM изменения пищевой мотивации ведут к достоверным и специфичным ей изменениям в частотах фенотипов только крайних классов. Так, независимо от генотипа линии, интенсивности селекции или возраста усиление пищевого возбуждения у свиней при первом тестировании повышает частоту спокойного (с отметкой 3) фенотипа до максимального значения и снижает частоту трусливого (с отметкой 0) фенотипа до минимального значения. Действие пониженного при четвертом тестировании пищевого возбуждения на векторизованные изменения в поведении свиней является противоположным. Происходящая при этом регулярная смена частот фенотипов указывает на обратимость индуцируемых средой модификационных изменений в проявлении реакции удаления у свиней.

Сравнения частных и контрольных распределений обнаруживают присутствие в крайних классах первых трех категорий фенотипов. К двум из них следует отнести контрастно разные по выраженности реакции удаления «фиксированные» фенотипы, частоты которых не зависят от влияния пищевой мотивации. На существование таких фенотипов указывают минималь-

ные частоты спокойных и трусливых особей, практически совпадающие с контрольными частотами соответственно 3-3- и 0-0-фенотипов, характеризующихся «константным» проявлением этой реакции (см. Материалы и методы). В третью категорию попадают модифицированные варианты «фиксированных» фенотипов, частоты которых специфично зависят от смены уровня пищевого возбуждения у свиней. Присутствие трех категорий фенотипов позволяет считать, что максимальные частоты спокойного (при первом) и трусливого (при четвертом тестировании) фенотипов в крайних классах частных распределений образуются суммированием постоянных частот «фиксированных» фенотипов и варьирующих частот их фенкопий. В таком случае частота фенкопий должна быть равной величине разности между максимальной и минимальной частотой фенотипов. Так, у свиней в возрасте 2,7 мес. средняя частота «спокойных» и «трусливых» фенкопий равна соответственно 17 и 30 %. Однако в 4,6 мес. у них устанавливается противоположная тенденция к преобладанию числа спокойных (36 %) над числом трусливых (21 %) фенкопий.

В дополнение к отмеченному свойство векторизованности модификационной изменчивости реакции удаления, вызывающее «разрывное» увеличение/снижение частот только крайних классов, позволяет выделить в качестве вероятного источника фенкопий особей среднего класса (с отметками 1 или 2). Так, оказывается, что у свиней всех групп частоты спокойных и трусливых фенкопий не связаны между собой ($r = 0,383$; $N = 7$; $p > 0,05$). Однако каждая из них достоверно отрицательно сопряжена с изменением частот фенотипов среднего класса соответственно $r = -0,842$ ($N = 7$; $p < 0,05$) и $r = -0,782$ ($N = 7$; $p < 0,05$). Следовательно, увеличение числа фенкопий в крайних классах частных распределений определяется векторизованным изменением частот особей среднего класса с фенотипически пластичной реакцией удаления. Основным фактором образования специфичной уровню пищевого возбуждения модификационной изменчивости реакции удаления служит взаимодействие между генотипом и пищевой мотивацией (табл. 2, комплекс III). Относительный вклад этого взаимодействия (48,2 %) в общую фенотипическую изменчи-

Таблица 2

Факторы изменчивости пассивно-оборонительного поведения
по отношению к человеку домашних свиней

Источник вариации	Степени свободы	Средний квадрат	Сила влияния, %	F	p
I. Внутрелинейная изменчивость реакции удаления в 4 тестированиях					
1. Генотип производителя	2	45,11	11,5	32,5	0,001
2. Интенсивность селекции	1	1,85	0,2	1,3	нд
3. Возраст	1	3,97	0,5	2,9	0,092
4. Среда I и II тестов	1	6,44	0,8	4,6	0,032
Взаимодействие факторов: 1 × 2	2	6,60	1,7	4,8	0,009
1 × 3	2	7,17	1,8	5,2	0,006
1 × 2 × 3	2	5,29	1,3	3,8	0,023
Ошибка	440	1,39	77,6	нет	нет
Общее факториальное влияние	23	152,68	19,4(16,6)	4,8	0,001
II. Внутрелинейная изменчивость реакции удаления в первом и четвертом тестированиях					
1. Генотип производителя	2	23,82	11,8	18,5	0,001
2. Интенсивность селекции	1	1,16	0,3	0,9	нд
3. Возраст	1	4,00	1,0	3,1	нд
4. Пищевая мотивация	1	17,56	4,3	13,6	0,001
Взаимодействие факторов: 1 × 3	2	5,10	2,5	4,0	0,021
Ошибка	208	1,29	66,3	нет	нет
Общее факториальное влияние	23	4,34	24,7(20,0)	3,4	0,001
III. Межгрупповое разнообразие частот фенотипов (по отметкам поведения) двух крайних классов реакции удаления					
1. «Средний генотип»	1	3207,86	29,3	32,9	0,001
2. Пищевая мотивация	1	121,39	1,1	1,2	нд
Взаимодействие факторов: 1 × 2	1	5274,52	48,2	54,1	0,001
Ошибка	24	97,45	21,4	нет	нет
Общее факториальное влияние	3	8603,77	78,6(80,2)	29,4	0,001
IV. Межгрупповое разнообразие частот фенотипов (по оценкам поведения) двух крайних классов реакции удаления					
1. «Средний генотип»	1	3057,67	60,6	43,0	0,001
2. Пищевая мотивация	1	279,09	5,5	3,9	0,060
Взаимодействие факторов: 1 × 2	1	2,06	0,04	0,03	нд
Ошибка	24	1706,71	33,8	нет	нет
Общее факториальное влияние	3	3338,82	66,5(67,7)	15,6	0,001
IVa. Межгрупповое разнообразие частот фенотипов (по оценкам поведения) трех классов реакции удаления					
1. «Средний генотип»	2	5527,31	75,2	70,9	0,001
2. Пищевая мотивация	1	0,00	0,0	0,0	нд
Взаимодействие факторов: 1 × 2	2	420,30	5,7	5,4	0,010
Ошибка	36	78,00	19,1	нет	нет
Общее факториальное влияние	5	2379,04	80,9(80,8)	30,5	0,001

Примечание. Силу влияния оценивали по Плохинскому, в скобках – по Снедекору. Недостовверные взаимодействия факторов опущены; нд – недостоверно.

Таблица 3

Влияние пищевой мотивации на проявление и изменчивость
пассивно-оборонительного поведения по отношению к человеку домашних свиней

Линия, пол, <i>n</i>	Тестирования	Распределение (%) фенотипов по классам реакции удаления			Суммарный эффект генотипов и взаимодействия ¹
		3	1 или 2	0	
В зависимости от генотипа линии, возраст 4,6 мес.					
Самки и самцы LC (28)	первое	19 (67,9)	6 (21,4)	3 (10,7)	+57,2***
	четвертое	8 (28,6)	9 (32,1)	11(39,3)	-10,7
	Эффект среды	+39,3**	-10,7	-28,6*	-
	«Контрольное»	8 (28,6)	17 (60,7)	3 (10,7)	+17,9
	За 2 теста	20 (35,7)	29 (51,8)	7 (12,5)	+23,2**
Самки и самцы ТМ (28)	первое	19 (67,9)	4 (14,3)	5 (17,9)	+50,0***
	четвертое	10 (35,7)	9 (32,1)	9 (32,1)	+3,6
	Эффект среды	+32,2*	-17,8	-14,2	-
	«Контрольное»	10 (35,7)	16 (57,1)	2 (7,1)	+28,6*
	За 2 теста	24 (42,9)	21 (37,5)	11 (19,6)	+23,3**
В зависимости от интенсивности селекции, возраст 4,6 мес.					
Самки LC и самцы ТМ (28)	первое	14 (50,0)	8 (28,6)	6 (21,4)	+28,6*
	четвертое	4 (14,3)	10 (35,7)	14 (50,0)	-35,7**
	Эффект среды	+35,7**	-7,1	-28,6*	-
	«Контрольное»	4 (14,3)	21 (75,0)	3 (10,7)	+3,6
	За 2 теста	11(19,6)	33 (58,9)	12 (21,4)	-1,8
Самцы LC и самки ТМ (28)	первое	24 (85,7)	2 (7,1)	2 (7,1)	+78,6***
	четвертое	14 (50,0)	8 (28,6)	6 (21,4)	+28,6*
	Эффект среды	+35,7**	-21,5*	-14,3	-
	«Контрольное»	14 (50,0)	12 (42,9)	2 (7,1)	+42,9**
	За 2 теста	33 (58,9)	17 (30,4)	6 (10,7)	+48,2***
В среднем по обеим линиям					
Самки и самцы в 2,7 мес. (60)	первое	31 (51,7)	17 (28,3)	12 (20,0)	+31,7***
	четвертое	21 (35,0)	9 (15,0)	30 (50,0)	-15,0
	Эффект среды	+16,7	+13,3	-30,0***	-
	«Контрольное»	15 (25,0)	36 (60,0)	9 (15,0)	+10,0
	За 2 теста	37 (30,8)	64 (53,3)	19 (15,8)	+15,0**
Самки и самцы в 4,6 мес. (56)	первое	38 (67,9)	10 (17,9)	8 (14,3)	+53,6***
	четвертое	18 (32,1)	18 (32,1)	20 (35,7)	-3,6
	Эффект среды	+35,8***	-14,2	-21,4**	-
	«Контрольное»	18 (32,1)	33 (58,9)	5 (8,9)	+23,2**
	За 2 теста	44 (39,3)	50 (44,6)	18 (16,1)	+23,2***
Самки и самцы в 2,7 и 4,6 мес. (116)	первое	69 (59,5)	27 (23,3)	20 (17,2)	+42,3***
	четвертое	39 (33,6)	27 (23,3)	50 (43,1)	-9,5
	Эффект среды	+25,9***	0,0	-25,9***	-
	«Контрольное»	33 (28,4)	69 (59,5)	14 (12,1)	+16,3**
	За 2 теста	81 (34,9)	114(49,1)	37 (15,9)	+19,0***

Примечание. ¹ Суммарный эффект различий генотипов и взаимодействия «генотип–пищевая мотивация» оценивали по разности частот разноименных крайних классов.

вость реакции удаления в 1,6 раза превышает вклад различий генотипов (29,3 %) у свиней обеих линий. Двухфакторный дисперсионный анализ изменчивости частот всех трех классов (в табл. 2 не показан) дает сходные результаты, предполагающие постоянное присутствие генетически разных по чувствительности к изменениям пищевой мотивации особей среднего класса в крайних классах частных распределений.

Таким образом, в подтверждение представления о ведущей роли пищевой мотивации в средовой регуляции проявления и изменчивости пассивно-оборонительного поведения по отношению к человеку, взаимодействие «генотип–пищевая мотивация» является постоянным источником его модификационной изменчивости у продуктивных животных (Ланкин, 1997; Ланкин, Буиссу, 2001). Можно также заключить, что причиной увеличения частот контрастных фенотипов в частных распределениях является сходный по величине и противоположный по знаку «вклад» частот (в среднем 26 %) моди-

фицированных фенотипов среднего класса, суммируемых с постоянными частотами «фиксированных» фенотипов. Этот факт ясно виден в объединенной выборке разновозрастных самок и самцов обеих линий, усредняющей различия в интенсивности простого и комбинированного с эмоциональным стрессом изоляции регуляторного действия пищевой мотивации на оборонительное реагирование свиней.

С целью идентификации «фиксированных» фенотипов и фенокopies, все потенциальное разнообразие фенотипов крайних классов частных распределений разделили на три уже представленные категории: две с «константным» отсутствием/наличием реакции удаления и третью промежуточную, с пластичной реакцией. Для этого по аналогии с контрольным распределением моделируемые фенотипы задавали по оценкам поведения, позволяющим однозначно отделить «фиксированные» (т. е. 3-3- и 0-0-) фенотипы от их фенокopies, изменяющих оценку при смене уровня пищевой мотивации (табл. 4, модель I). Так, например, при первом тести-

Таблица 4

Феноменологические модели популяционного разнообразия пассивно-оборонительного поведения по отношению к человеку домашних свиней

Тестиру- вание	Распределение « фиксированных » и <i>модифицированных</i> модельных фенотипов по классам реакции удаления ¹			Средний эффект	
	3	1 или 2	0	различий генотипов, d	взаимодействия, ge
I. Индивидуальное фенотипическое разнообразие поведения					
Первое	$\tilde{p}(3-3) + \sum \tilde{p}(3-0, 3-1, 3-2)$	$\sum \tilde{p}, \tilde{q}(1-1, 1-2, 2-1, 2-2, 1-0, 2-0, 1-3, 2-3)$	$\tilde{q}(0-0) + \sum \tilde{q}(0-1, 0-2, 0-3)$	$1/2(\tilde{p}(3-3) - \tilde{q}(0-0))$	$1/4(\sum \tilde{p}(3-0, 3-1, 3-2) - \sum \tilde{q}(0-1, 0-2, 0-3) - \sum \tilde{p}(0-3, 1-3, 2-3) + \sum \tilde{q}(1-0, 2-0, 3-0))$
Четвер- тое	$\tilde{p}(3-3) + \sum \tilde{p}(0-3, 1-3, 2-3)$	$\sum \tilde{p}, \tilde{q}(1-1, 1-2, 2-1, 2-2, 0-1, 0-2, 3-1, 3-2)$	$\tilde{q}(0-0) + \sum \tilde{q}(1-0, 2-0, 3-0)$		
Эффект различий среды	$\sum \tilde{p}(3-0, 3-1, 3-2) - \sum \tilde{p}(0-3, 1-3, 2-3)$	$\sum \tilde{p}, \tilde{q}(1-0, 2-0, 1-3, 2-3) - \sum \tilde{p}, \tilde{q}(0-1, 0-2, 3-1, 3-2)$	$\sum \tilde{q}(0-1, 0-2, 0-3) - \sum \tilde{q}(1-0, 2-0, 3-0)$	–	–
II. Дискретное генотипическое разнообразие поведения					
I или II-й тесты	$\tilde{p}(3-3)$	$\sum \tilde{p}, \tilde{q}(1-1, 1-2, 2-1, 2-2, 1-0, 2-0, 3-0, 3-1, 3-2, 0-1, 0-2, 0-3, 1-3, 2-3)$	$\tilde{q}(0-0)$	$1/2(\tilde{p}(3-3) - \tilde{q}(0-0))$	нет
III. Генетическая модель дискретного полиморфизма поведения					
–	$p^2 AA$	$2pq Aa$	$q^2 aa$	$1/2(p - q)$	нет

Примечание. $\sum \tilde{p}$ и $\sum \tilde{q}$ – суммы частот указанных в скобках модифицированных вариантов фенотипов в соответствующих крайних классах; $\sum \tilde{p}, \tilde{q}$ – сумма частот фенотипов среднего класса; p и q – теоретически ожидаемые частоты аллелей предполагаемого единичного локуса. Остальные объяснения в тексте.

ровании к числу спокойных или трусливых фенокопий относили животных, изменяющих свою первую отметку (соответственно 3 или 0) реакции удаления на любую другую, не равную ей вторую отметку, полученную при четвертом тестировании. Особей других фенотипов относили к среднему классу. Сходным образом подразделяли фенотипы при четвертом тестировании. Полученная в результате дискриминантная модель фенотипов реакции удаления адекватно описывает их фактическое разнообразие, выявляемое у свиней на каждом уровне пищевого возбуждения. Действительно, сумма внутриклассовых частот модельных фенотипов не отличается от «валовых» частот фенотипов в частных распределениях у свиней всех групп (табл. 5). Как и предполагали, типичным для частных распределений является константность частот «фиксированных» фенотипов и генотипическая разнородность фенотипически эквивалентных особей крайних классов, создаваемая постоянным присутствием в них фенокопий «фиксированных» фенотипов.

Существенно, что модель I позволяет получить прямые оценки генотипического и средовых компонентов изменчивости реакции удаления у особей крайних классов частных распределений. По определению, первый из них должен создаваться различиями в константных (генотипических) частотах «фиксированных» фенотипов, а два вторых – различиями в частотах фенокопий, модулируемых средой. Более того, при условии адекватного описания этой моделью наследственного разнообразия оборонительного реагирования у свиней прямые оценки генотипического компонента должны соответствовать величине отклонения фактических частот 3-3- и 0-0-фенотипов от их общей средней частоты, а средовых компонентов – их косвенным оценкам из модели Мазера и Джинкса (1985).

Независимо полученные косвенные и прямые оценки компонентов изменчивости реакции удаления у свиней крайних классов даны в табл. 6. В подтверждение литературных сведений (Valdar *et al.*, 2006; Bell *et al.*, 2009) первые из них указывают на преобладающий в частных распределениях средовой вклад взаимодействия «генотип–пищевая мотивация», в среднем в 1,6 раза превышающий вклад генотип-специфичных различий (39 %). Как

следствие, косвенные оценки генотипического компонента оказываются смещенными: величина [d] достоверно связаны с изменчивостью частот фенотипа с отметкой 3 ($r_s = 0,964$; $N = 7$; $p < 0,001$) только при первом и фенотипа с отметкой 0 ($r_s = -0,991$; $N = 7$; $p < 0,001$) только при четвертом тестировании. Эта неблагоприятная ситуация, указывающая на низкую точность определения генотипического разнообразия пассивно-оборонительного поведения у животных с помощью известных этологических методов (Waiblinger *et al.*, 2006; Forkman *et al.*, 2007), исчезает при использовании модельных распределений. В соответствии с моделью I вариация частот «фиксированных» фенотипов определяется только различиями их генотипов. При этом вклад различий генотипов точно описывает изменчивость частот 3-3- ($r_s = 1,0$) и 0-0- ($r_s = -0,836$; $N = 7$; $p < 0,05$) фенотипов. Достигнутое с помощью этой дискриминантной модели адекватное описание наследственного разнообразия мотивированного страхом поведения по отношению к человеку у разновозрастных самок и самцов обеих линий доказывают совпадающие косвенные и прямые оценки его средовых компонентов.

Для минимизации маскирующего влияния модификационной изменчивости применили «естественную» классификацию популяционного разнообразия реакции удаления у свиней, исключающую присутствие фенокопий в крайних классах (табл. 4, модель II). Важным результатом такой классификации явилось обнаружение дискретного генотипического полиморфизма реакции удаления у свиней, не отличающегося от полиморфизма доместикационного поведения в контрольных и суммарных за два теста распределениях (табл. 3). В дискретных распределениях изменчивость частот 3-3- и 0-0-фенотипов определяется достоверным влиянием только их генотипов и не зависит от влияний пищевой мотивации и/или ее взаимодействия (табл. 2, комплекс IV). Подтверждается, что средовая чувствительность к изменениям пищевой мотивации является «внутренним» свойством фенотипов среднего класса. Так, использование особей этого класса в дисперсионном анализе «восстанавливает» достоверное влияние взаимодействия «генотип–пищевая мотивация» (табл. 2,

Таблица 5

Генотипическое и модификационное разнообразие пассивно-оборонительного поведения по отношению к человеку домашних свиней

Линия, пол, <i>n</i>	Тестирование	Распределение (%) «фиксированных» и модифицированных вариантов фенотипов по классам реакции удаления			Эффект ¹	
		3	1 или 2	0	различий генотипов	взаимо- действия
В зависимости от генотипа линии, возраст 4,6 мес.						
Самки и самцы LC (28)	первое	28,6 + 39,3	21,5	10,7 + 0,0	17,9	+39,3***
	четвертое	28,6 + 0,0	32,2	10,7 + 28,6	»	-28,6**
	Эффект среды	+39,3**	-10,7	-28,6*	-	-
Самки и самцы ТМ (28)	первое	35,7 + 32,2	14,3	7,1 + 10,7	28,6*	+21,5*
	четвертое	35,7 + 0,0	32,2	7,1 + 25,0	»	-25,0*
	Эффект среды	+32,2*	-17,9	-14,3	-	-
В зависимости от интенсивности селекции, возраст 4,6 мес.						
Самки LC и самцы ТМ (28)	первое	14,3 + 35,8	28,6	10,7 + 10,7	3,6	+25,1*
	четвертое	14,3 + 0,0	35,8	10,7 + 39,3	»	-39,3***
	Эффект среды	+35,8**	-7,2	-28,6*	-	-
Самцы LC и самки ТМ (28)	первое	50,0 + 35,7	7,2	7,1 + 0,0	42,9***	+35,7**
	четвертое	50,0 + 0,0	28,6	7,1 + 14,3	»	-14,3
	Эффект среды	+35,7**	-21,4*	-14,3	-	-
В среднем по обеим линиям						
Самки и самцы в 2,7 мес. (60)	первое	25,0 + 26,6	28,3	15,0 + 5,0	10,0	+21,6**
	четвертое	25,0 + 10,0	15,0	15,0 + 34,9	»	-24,9***
	Эффект среды	+16,6	+13,3	-29,9***	-	-
Самки и самцы в 4,6 мес. (56)	первое	32,1 + 35,8	17,9	8,9 + 5,4	23,2**	+30,4***
	четвертое	32,1 + 0,0	32,3	8,9 + 26,8	»	-26,8***
	Эффект среды	+35,8***	-14,4	-21,4**	-	-
Самки и самцы в 2,7 и 4,6 мес. (116)	первое	28,4 + 31,0	23,3	12,1 + 5,2	16,3**	+25,8***
	четвертое	28,4 + 5,2	23,2	12,1 + 31,0	»	-25,8***
	Эффект среды	+25,8***	0,1	-25,9***	-	-

Примечание. ¹ Дифференцированный эффект различий генотипов и взаимодействия «генотип-пищевая мотивация» оценивали по разности частот, соответственно «фиксированных» 3-3- и 0-0-фенотипов и их модифицированных вариантов в разноименных крайних классах.

комплекс IVa). Тем не менее предложенная классификация снижает относительный вклад этого взаимодействия от 48 % в частных до 6 % в дискретных распределениях, т. е. в 8 раз. И наоборот она усиливает проявление наследственных различий в оборонительном реагировании у свиней соответственно от 29 до 75 %, т. е. более чем в 2,5 раза. Благоприятным следствием последнего оказывается повышение повторяемости реакции удаления у свиней обеих линий. По

сравнению с повторяемостью у них от первого к четвертому тестированию отметок реакции удаления в возрасте 2,7 мес. ($r = 0,315$; $N = 60$; $p < 0,014$) и в 4,6 мес. ($r = 0,520$; $N = 56$; $p < 0,001$) повторяемость оценок поведения от I ко II тесту выросла соответственно до 0,394 ($p < 0,002$) и 0,681 ($p < 0,001$). При этом только «фиксированные» фенотипы устойчиво воспроизводят свои оценки в 2,7 мес. ($r = 0,550$; $N = 28$; $p < 0,005$) и в 4,6 мес. ($r = 0,712$; $N = 34$; $p < 0,001$). У фе-

Таблица 6

Генотипический и средовые компоненты фенотипической изменчивости пассивно-оборонительного поведения по отношению к человеку домашних свиней

Линия, пол, <i>n</i>	Сравнимые распределения ¹	Средняя частота (%) крайних фенотипов, <i>m</i> ²	Средний эффект			Относительный вклад генотипов ³
			[<i>d</i>]	<i>e</i>	<i>ge</i>	
В зависимости от генотипа линии, возраст 4,6 мес.						
Самки и самцы LC (28)	Фактические	36,6 (31,3)	11,6	2,7	17,0	0,371
	Модельные I (0,589 ± 0,066)	19,6 (9,0)	9,0	2,7	17,0	1,0
Самки и самцы ТМ (28)	Фактические	38,4 (29,5)	13,4	4,5	11,6	0,454
	Модельные I (0,643 ± 0,064)	21,4 (14,3)	14,3	4,5	11,6	1,0
В зависимости от интенсивности селекции, возраст 4,6 мес.						
Самки LC и самцы ТМ (28)	Фактические	33,9* (16,1)	-1,8	1,8	16,1	0,112
	Модельные I (0,518 ± 0,067)	12,5 (1,8)	1,8	1,8	16,1	1,0
Самцы LC и самки ТМ (28)	Фактические	41,0 (44,7)	26,8	5,4	12,5	0,600
	Модельные I (0,714 ± 0,060)	28,6 (21,4)	21,4	5,4	12,5	1,0
В среднем по обеим линиям						
Самки и самцы в 2,7 мес. (60)	Фактические	39,2** (12,5)	4,2	-3,3	11,7	0,336
	Модельные I (0,550 ± 0,045)	20,0 (5,0)	5,0	-3,3	11,6	1,0
Самки и самцы в 4,6 мес. (56)	Фактические	37,5* (30,4)	12,5	3,6	14,3	0,411
	Модельные I (0,616 ± 0,046)	20,5 (11,6)	11,6	3,6	14,3	1,0
Самки и самцы, 2,7 и 4,6 мес. (116)	Фактические	38,4** (21,1)	8,2	0,0	13,0	0,389
	Модельные I (0,582 ± 0,035)	20,2 (8,2)	8,2	0,0	12,9	1,0

Примечание. ¹ В скобках дана теоретически ожидаемая частота аллеля А в «контрольных» распределениях. ² В скобках приведена максимальная величина отклонения частоты крайнего фенотипа от общей средней частоты, равная $(\tilde{p}(3) - m)$ для частных и $(\tilde{p}(3-3) - m)$ для модельных распределений. ³ Относительный вклад различий генотипов оценивали отношением величины [*d*] к указанной в скобках величине отклонения. Звездочками показана достоверность различия между средними частотами крайних фенотипов в частных и модельных распределениях. Остальные объяснения в тексте.

нотипов среднего класса повторяемость оценок ($r = 0,158$; $N = 32$; $p > 0,05$ и $r = 0,352$; $N = 22$; $p > 0,05$) была недостоверной в обоих возрастах. Выясняется также, что частоты «фиксированных» фенотипов избирательно зависят от интенсивности селекции, разной для самок и самцов в обеих линиях (Ланкин и др., 2007). Так, по сравнению с самками LC и самцами ТМ более жесткий отбор по продуктивности самцов LC в отцовской и самок ТМ в материнской линии кос-

венно повысил у них на 36 % ($\chi^2 = 4,77$; $p < 0,01$) концентрацию «селекционно желательного» 3-3-фенотипа (табл. 5).

Генетическую основу «очищенного» от паратипического шума дискретного полиморфизма мотивированного страхом к человеку поведения свиней объясняет гипотеза его промежуточного наследования, контролируемого диаллельным локусом сильного влияния (Ланкин, 2008, 2010) (табл. 4, модель III). Согласно модели,

эффект майоргена должен проявляться в разной фенотипической экспрессии реакции удаления у гомозиготных особей крайних классов и полностью описываться различиями их фактических частот (Мазер, Джинкс, 1985). При этом величина разности частот «фиксированных» фенотипов должна быть равной разности частот аллелей майоргена (см. модели II и III). Для предварительной проверки такого прогноза генетических свойств поведения индивидуальных животных оценили частоты аллелей в контрольных распределениях, находящихся, кроме самок LC и самцов TM ($\chi^2 = 7,01$; $d.f. = 1$; $p < 0,01$) и объединенной выборки ($\chi^2 = 5,78$; $d.f. = 1$; $p < 0,05$) разновозрастных свиней, в равновесии Харди–Вайнберга (табл. 6). В подтверждение этого разность частот аллелей совпала с разностью частот 3-3- и 0-0-фенотипов у свиней всех групп. Также ожидаемую из модели возможность объективной идентификации учтенных генотипов (*AA*, *Aa*, *aa*) по фенотипу поведения свиней доказывает уже показанное соответствие внутригрупповой вариации частот 3-3- и 0-0-фенотипов их генотипическому компоненту (табл. 5, 6).

В дополнение к модели III наличие неотделимой от гетерозигот среднего класса модификационной изменчивости реакции удаления может указывать на существование генетической системы полиморфных генов-модификаторов, осуществляющей зависимость от влияния среды регуляцию экспрессивности альтернативных аллелей предполагаемого майоргена. К числу таких модификаторов могут принадлежать полигены сложных морфологических признаков (рост, развитие), плеiotропно действующие на пищевое поведение (аппетит) животных (Rubin *et al.*, 2010). Расщепление по минус- и плюс-аллелям наборов таких полигенов образует специфичную уровню пищевой мотивации непрерывную вариацию гетерозиготных поведенческих фенотипов, как оказывается, имеющих разную адаптивную и селекционную ценность. Так, показанное селекционное увеличение частоты 3-3-фенотипа совпадает с увеличением концентрации его фенотипов при достоверном снижении частоты фенотипов «дикого» 0-0-фенотипа у самок LC и самцов TM (табл. 5). Следовательно, косвенный отбор генетически гетерогенных «спокойных» особей селекционно значимого

крайнего класса частных распределений ведет к одновременному увеличению частоты «лучшей» из гомозигот и минус-аллелей модификаторов, также снижающих проявление оборонительного реагирования на человека у животных специализированных пород.

Литературных сведений о генетическом контроле реакции удаления от человека у сельскохозяйственных животных мало. Полученные на лабораторных животных и серебристо-черных лисицах данные указывают на полигенный контроль этой реакции (Kukekova *et al.*, 2008; Albert *et al.*, 2009; Sokoloff *et al.*, 2011). Эти результаты подтверждаются исследованиями на крупном рогатом скоте, обнаружившими зависимость у них толерантности к человеку от 3-5 QTL малого влияния (Hiendleder *et al.*, 2003; Guttierrez-Gil *et al.*, 2008). Однако следует учитывать, что использованные в этих работах кроссы между специализированными породами не позволяют идентифицировать селективно значимые гены, фиксированные в процессе доместикизации и формирования пород (Boissy *et al.*, 2005). Известно, что к их числу относятся гены, контролирующие комплекс адаптивных признаков доместикационного фенотипа, физиологически и генетически сопряженных с продуктивностью животных (Mignon-Grasteau *et al.*, 2005; Rubin *et al.*, 2010).

В отличие от рассмотренных работ наше представление о генетическом контроле реакции удаления у продуктивных животных единичным локусом сильного влияния и потенциально большим числом генов-модификаторов подтверждают результаты исследований на кроссбредных цыплятах, полученных от скрещивания диких красных джунглевых кур (RJF) с породой леггорн (WL) (Kerje *et al.*, 2003; Wiren, Jensen, 2010; Wright *et al.*, 2010). У гибридов второго поколения на хромосоме 1 был локализован QTL большого влияния на продуктивность кур, содержащий регуляторный ген *Avpr1a*, гомологичный гену млекопитающих, кодирующему рецептор 1a для гормона и нейропептида вазопрессина. *Avpr1a* является типичным геном сильного влияния на социальное и эмоциональное поведение у птиц и млекопитающих (Caldwell *et al.*, 2008; Engine, Treit, 2008) и может служить геном-кандидатом для модельного майоргена. Показано, что куры,

гомозиготные по WL аллелю, отличаются от гомозигот по RJF аллелю локуса *Avpr1a* развитием у них таких признаков, как резистентность к социальной изоляции, сниженные неофобные реакции, повышенная двигательная активность в тесте открытого поля (Wiren, Jensen, 2010), сходных с доместикационными качествами поведения у разных видов животных (Ланкин, Буиссу, 2001; Sih *et al.*, 2004).

Вместе с тем установленное тесное сцепление локуса *Avpr1a* с QTL большого влияния на скорость роста и живую массу птиц (Ketje *et al.*, 2003; Schutz *et al.*, 2004) подтверждает известную гипотезу о том, что селекция на увеличение продуктивности одновременно является косвенным отбором на доместикационные качества поведения у сельскохозяйственных животных (Стакан и др., 1976; Ланкин, 1996). В связи с этим интересно отметить, что внутригрупповая концентрация аллеля *A* предполагаемого майоргена, отвечающего за отсутствие фенотипической экспрессии реакции удаления, функционально ($r_s = 1,0$; $N = 7$) зависит от разности частот 3-3- и 0-0-фенотипов у свиней обеих линий (табл. 5, 6). Очевидно, что основной причиной изменения этого ключевого соотношения контрастных гомозигот, определяющего генетические параметры изменчивости поведения по отношению к человеку, является косвенное накопление селекцией частот более адаптивных и продуктивных особей 3-3-фенотипа в специализированных породах. Одним из следствий такого систематического повышения концентрации «селекционно благоприятного» аллеля *A* должно быть микроэволюционное формирование транзиторного полиморфизма этого поведения у разных видов продуктивных животных. Действительно, сопряженный с повышением уровня продуктивности пород переход от однообразного состояния по «дикому» 0-0-фенотипу к другому однообразному состоянию по доместикационному 3-3-фенотипу обнаружен, в частности, у овец (монгольская и остфризская породы) и свиней (китайская мейшан и крупная белая породы) (Ланкин и др., 1988; Ланкин, 1996; Ланкин, Буиссу, 2001).

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что пищевая мотивация и регуляторное взаимодействие «генотип–пищевая мотивация» образуют

постоянный источник средовой изменчивости мотивированного страхом к человеку поведения, присутствующий у разных видов одомашниваемых и домашних животных (Козловская, 1974; Rekila *et al.*, 1997; Ланкин, Буиссу, 2001). Вклад данного взаимодействия превалирует в частном разнообразии этого адаптивного поведения, наблюдаемом на одном уровне пищевого возбуждения у свиней. Предложен комплексный подход к снижению влияния индуцируемой этим взаимодействием модификационной изменчивости реакции удаления, сочетающий новые способы выявления, задания и классификации ее внутривидового фенотипического разнообразия (Ланкин, Буиссу, 2000). Общие для разных видов животных свойства индивидуальной изменчивости реакции удаления (Ланкин, Буиссу, 2001) учтены в феноменологических моделях, необходимых для повышения объективности ее генетических исследований и развития надежных методов отбора лучших поведенческих генотипов. Прямое доказательство вытекающей из этих моделей гипотезы майоргенного контроля пассивно-оборонительного поведения требует проведения гибридологических экспериментов со скрещиванием «фиксированных» поведенческих фенотипов, существующих у разных видов сельскохозяйственных животных (Ланкин, 1996; Ланкин, Буиссу, 2001).

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарен M.F. Bouissou, J.P. Signoret (INRA, Tour – Nouzilly, France), J. Naveau, T. Burlot (PenArLan, Maxent, France) за помощь в организации эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА

- Аршавский В.В., Ротенберг В.С. Влияние различных типов поведенческих реакций и эмоциональных состояний на патофизиологические и клинические синдромы // Усп. физиол. наук. 1993. Т. 9. № 3. С. 49–72.
- Животовский Л.А. Показатели популяционной изменчивости по полиморфным признакам // Фенетика популяций. М., 1982. С. 38–44.
- Козловская М.М. Выявление психотропной активности на модели экспериментально вызванных сдвигов эмоционального состояния // Нейрофармакологическая регуляция системных процессов. Л.: Наука, 1974. С. 12–29.

- Ланкин В.С. Доместикационное поведение и его адаптивное значение у копытных животных. Новосибирск: Наука, 1996. 172 с.
- Ланкин В.С. Доместикационное поведение овец // Генетика. 1997. Т. 33. № 8. С. 1119–1125.
- Ланкин В.С. Роль доместикационного поведения в формировании долговременных адаптаций гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы у овец // Усп. соврем. биологии. 2000. Т. 120. № 4. С. 340–347.
- Ланкин В.С. Генетика поведения по отношению к человеку домашних свиней // Докл. РАСХН. 2008. № 2. С. 45–49.
- Ланкин В.С. Генетические компоненты поведения домашних свиней по отношению к человеку // Докл. РАСХН. 2010. № 1. С. 43–46.
- Ланкин В.С., Боуиссу М.Ф. Способ выявления и отбора стрессоустойчивых животных // Бюл. изобретений. № 8. 2000. Патент РФ № 2146444.
- Ланкин В.С., Буиссу М.-Ф. Факторы изменчивости доместикационного поведения у животных продуктивных видов // Генетика. 2001. Т. 37. № 7. С. 947–961.
- Ланкин В.С., Буиссу М.-Ф., Навю Ж. и др. Факторы изменчивости доместикационного поведения свиней специализированных линий // С.-х. биология. 2007. № 4. С. 34–52.
- Ланкин В., Стакан Г., Хинковски Ц. и др. Влияние изменчивости оборонительного поведения на молочную продуктивность овец // Междунар. с.-х. журнал. 1988. № 4. С. 64–67.
- Мазер К., Джинкс Дж. Биометрическая генетика. М.: Мир, 1985. 463 с.
- Стакан Г.А., Мартынова В.Н., Соскин А.А., Чернов Л.Л. Изменчивость и наследование поведения у тонкорунных овец. Сообщение II. Изучение характера наследования доместикационного поведения и корреляций поведения с признаками продуктивности у тонкорунных овец // Генетика. 1976. Т. 12. № 11. С. 35–43.
- Фолкнер Д.С. Введение в генетику количественных признаков. М.: Агропромиздат, 1985. 486 с.
- Adam T.C., Epel E.S. Stress, eating and the reward system // *Physiol. Behav.* 2007. V. 91. P. 449–458.
- Albert F.W., Carlborg O., Plusnina I. *et al.* Genetic architecture of tameness in a rat model of animal domestication // *Genetics*. 2009. V. 182. P. 541–554.
- Bell A.M., Hankison S.J., Laskowski K.L. The repeatability of behaviour: a meta-analysis // *Anim. Behav.* 2009. V. 77. P. 771–783.
- Bigelow J.A., Houpt T.R. Feeding and drinking patterns in young pigs // *Physiol. Behav.* 1988. V. 43. No. 1. P. 99–109.
- Boissy A., Fisher A.D., Bouix J. *et al.* Genetics of fear in ruminant livestock // *Livest. Prod. Sci.* 2005. V. 93. P. 23–32.
- Caldwell H.K., Lee H.-J., Macbeth A.H., Young S. Vasopressin: behavioral roles of an «original» neuropeptide // *Prog. Neurobiol.* 2008. V. 84. P. 1–24.
- Engel E., Treit D. Dissociation of the anxiolytic-like effects of Avpr1a and Avpr1b receptor antagonists in dorsal and ventral hippocampus // *Neuropeptides*. 2008. V. 42. P. 411–421.
- Fordyce J.A. The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity // *J. Exp. Biol.* 2006. V. 209. P. 2377–2383.
- Forkman B., Boissy A., Meunier-Salaun M.-C. *et al.* A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses // *Physiol. Behav.* 2007. V. 92. P. 340–374.
- Gutierrez-Gil B., Ball N., Burton D. *et al.* Identification of quantitative trait loci affecting cattle temperament // *J. Hered.* 2008. V. 99. P. 629–638.
- Hiendleder S., Thomsen H., Reinsch N. *et al.* Mapping of QTL for body conformation and behavior in cattle // *J. Hered.* 2003. V. 94. P. 496–506.
- Holmes I.S., Hastings I.M. Behavioural changes as a correlated response to selection // *Genet. Res. Camb.* 1995. V. 66. P. 27–33.
- Kerje S., Carlborg O., Jacobsson L. *et al.* The twofold difference in adult size between the red junglefowl and White Leghorn chickens is largely explained by a limited number of QTLs // *Animal Genet.* 2003. V. 34. P. 264–274.
- Kukekova A.V., Trut L.N., Chase K. *et al.* Measurement of segregating behaviors in experimental silver fox pedigrees // *Behav. Genet.* 2008. V. 38. No. 2. P. 185–194.
- Mignon-Grasteau S., Boissy A., Bouix J. *et al.* Genetics of adaptation and domestication in livestock // *Livest. Prod. Sci.* 2005. V. 93. P. 3–14.
- Moretz J.A., Martins E.P., Robison B.D. Behavioral syndromes and the evolution of correlated behavior in zebrafish // *Behav. Ecol.* 2007. V. 18. P. 556–562.
- Price E.O. Behavioral genetics and the process of animal domestication // *Genetics and the Behavior of Domestication Animals* / Ed. T. Grandin/ N.Y.: Acad. Press, 1998. P. 31–66.
- Reale D., Reader S.M., Sol D. *et al.* Integrating animal temperament within ecology and evolution // *Biol. Rev.* 2007. V. 82. P. 291–318.
- Rekila T., Harri M., Ahola L. Validation of the feeding test as an index of fear in farmed blue (*Alopex lagopus*) and silver foxes (*Vulpes vulpes*) // *Physiol. Behav.* 1997. V. 62. No. 3. P. 805–810.
- Rothschild M.E., Ruvinsky A. *The Genetics of the Pig*. CAB International. USA, N.Y. 1998. 611 p.
- Rubin C.-J., Zody M.C., Eriksson J. *et al.* Whole-genome resequencing reveals loci under selection during chicken domestication // *Nature*. 2010. V. 464. No. 7288. P. 587–593.
- Schutz K.E., Kerje S., Jacobsson L. *et al.* Major growth QTLs in fowl are related to fearful behavior: possible genetic links between fear responses and production traits in a Red Junglefowl Ч White Leghorn intercross // *Behav. Genet.* 2004. V. 34. P. 121–130.
- Sih A., Bell A., Johnson J.C. Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview // *Trends Ecol. Evol.* 2004. V. 19. No. 7. P. 372–378.
- Sokoloff G., Parker C.C., Lim J.E., Palmer A.A. Anxiety and fear in a cross of C57BL/6J and DBA/2J mice: mapping overlapping and independent QTL for related traits // *Genes, Brain, Behav.* 2011. V. 10. P. 604–614.
- Valdar W., Solberg L. C., Gauguier D. *et al.* Genetic and environmental effects on complex traits in mice // *Genetics*. 2006. V. 174. P. 959–984.
- Veenema A.H., Meijer O.C., de Kloet E.R., Koolhaas J.M. Genetic selection for coping style predicts stressor suscep-

- tibility // *J. Neuroendocrinol.* 2003. V. 15. P. 256–267.
- Wahlsten D., Metten P., Crabbe J.C. A rating scale for wildness and ease of handling laboratory mice: results for 21 inbred strains tested in two laboratories // *Genes, Brain, Behav.* 2003a. V. 2. P. 71–79.
- Wahlsten D., Metten P., Phillips T.J. *et al.* Different data from different labs: lessons from studies of gene-environment interaction // *J. Neurobiol.* 2003b. V. 54. P. 283–311.
- Waiblinger S., Boivin X., Pedersen V. *et al.* Assessing the human-animal relationship in farmed species: A critical review // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2006. V. 101. P. 185–242.
- Wren A., Jensen P. A growth QTL on chicken chromosome 1 affects emotionality and sociality // *Behav. Genet.* 2010. V. 41. P. 303–311.
- Wright D., Rubin C.-J., Barrio A.M. *et al.* The genetic architecture of domestication in the chicken: effects of pleiotropy and linkage // *Molec. Ecol.* 2010. V. 19. P. 5140–5156.

GENOTYPIC AND MODIFICATIONAL VARIABILITY OF THE PASSIVE DEFENSE RESPONSE TO HUMANS IN DOMESTIC PIGS

V.S. Lankin

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

Summary

A comparative study of the role of feeding motivation in the phenotypic expression and variation of the passive response to humans in specialized crossbred pigs: Laconi, paternal line, and unique sino-european Tiameslan, maternal one, was carried out. It was found that the genotype-feeding motivation interaction represented a factor of environmental variation of this behavior inseparable from ethological tests. The contribution of the interaction averages 60 % of total phenotypic variation of defensive behavior in pigs of both lines. An integrated approach is proposed to minimize modification variability in such adaptive behavior. It adequately describes its genotypic diversity in farm animals.

Key words: pigs, interaction genotype-environment, reaction of withdrawal from human, phenotypic variability, genotypic and environmental differences.

УДК 636.9.082.2

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ, ЗАТРАГИВАЮЩИХ ОКРАСКУ, НА СТРУКТУРУ ВОЛОСЯНОГО И КОЖНОГО ПОКРОВА ХОРЬКОВ (*MUSTELA PUTORIUS*)

© 2013 г. О.И. Федорова

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

Поступила в редакцию 24 марта 2013 г. Принята к публикации 8 июля 2013 г.

В работе представлена изменчивость морфологических показателей волосяного покрова и микро-структуры кожной ткани хорьков *золотистой*, *перламутровой* и *пастелевой* окрасок. Результаты исследований были использованы при разработке методического пособия по оценке селекционных достижений у хорьков клеточного разведения.

Ключевые слова: хорь золотистый, перламутровый и пастелевый, микроструктура кожи.

ВВЕДЕНИЕ

Промышленная domestикация хорьков как объекта клеточного пушного звероводства началась с двух разновидностей: *Putorius putorius* и *Putorius evermanni* (Терновский, Терновская, 1994). К настоящему времени на их базе сформировалось большое разнообразие оригинальных окрасочных типов хорьков (рис. 1). Из этого разнообразия фенотипика окраски детально изучена лишь у *альбиносов-фуру* (*c/c*) и их аллельной *пастелевой* формы – (*c^p/c^p*) (Федосеева, 1985; Кузнецов и др., 1987; Nes *et al.*, 1988).

Albino (*c/c*). Остевой волос предпочтительно белый, допускается от белого до светло-кремового. Подпушь предпочтительно белая, от белого до светло-кремового цвета. Глаза только красные. Нос только розовый.

Pastel (*c^p/c^p*). Основание ости белое, края остевых волос от бежевого до светло-коричневого цвета. Подпушь от белого до светло-кремового цвета. Глаза коричневые или черные. Нос розовый или бежевый.

Пастелевый темный. Основание ости белое, края остевых волос от цвета молочного шоколада до цвета горького шоколада. Подпушь от белого до светло-кремового цвета. Глаза

коричневые или черные. Нос от розового до коричневого цвета.

Пастелевый светлый. Основание ости белое, края остевых волос – от светло-бежевого до бежевого цвета. Подпушь от белого до светло-кремового цвета. Глаза коричневые или черные. Нос розовый или бежевый.

Перламутровая группа

Purple. Основание ости белое, края остевых волос черные, 30–50 % от длины остевого волоса. Подпушь от белого до светло-серого цвета. Глаза коричневые или черные. Нос от розового до черного.

Перламутровый светлый. Основание ости белое, края остевых волос – от серого до черного цвета, менее чем на 30 % от длины остевого волоса. Подпушь от белой до светло-серой. Глаза коричневые или черные. Нос от розового до черного цвета.

Перламутровый темный. Основание ости белое, края остевых волос черные, прокрашенные не менее чем на 50 % от длины остевого волоса. Подпушь от белой до светло-серой. Глаза коричневые или черные. Нос темный, прокрашенный или частично прокрашенный, предпочтительно черный.



Albino (c/c)



Pastel (c^p/c^p)



Purple



Gold



Panda



Blaze



Harlequine



Blackself

Рис. 1. Окрасочные фенотипы хорьков.

Золотистая группа

Gold. Основание ости белое, до кремового цвета, края остевых волос от бурого до черного цвета, покрашены от 30 до 50 % от длины остевого волоса. Подпушь от светло-оранжевого до ярко-оранжевого цвета. Глаза коричневые или черные. Нос темный, покрашенный или частично покрашенный, предпочтительно черный.

Светлый золотистый. Основание ости белое, до кремового цвета, края остевых волос от бурого до черного цвета, покрашены не менее чем на 30 % от длины остевого волоса. Подпушь от светло-оранжевой до желто-оранжевой. Глаза коричневые или черные. Нос темный, покрашенный или частично покрашенный, предпочтительно черный.

Темный золотистый. Основание ости белое, до кремового цвета, края остевых волос от бурых до черных, покрашены не менее чем на 50 % от длины остевого волоса. Подпушь ярко-оранжевая, но не желтая. Глаза коричневые или черные. Нос темный, покрашенный или частично покрашенный, предпочтительно черный.

В последнее время в европейских хорьковых питомниках зафиксировано появление *de novo* окрасочных девиаций, наследование которых еще предстоит изучить. К ним относятся следующие aberrации окраски.

Panda. Белая голова и шея (допустимы пятна и покрашенные остевые волосы вокруг глаз), резкий контрастный переход по цвету относительно окраски тела, белые «перчатки» на лапах. Допустимы белый кончик хвоста, белые отметины на локтях и животе.

Pinto Panda. Белые лапы и грудь. Голова практически белая. На белой голове присутствуют отметины основного цвета, граница основной окраски на плечевом поясе неровная, «брызгами» переходит в белый цвет.

Blaze. Четкая белая полоса на голове, возможны белые «перчатки» на лапах, белая «манишка» на груди, белый кончик хвоста, белые отметины на локтях и животе.

Mitt. Белые «перчатки» на лапах, белая «манишка» на груди, возможны белый кончик хвоста, белые отметины на локтях и животе.

Harlequine. Расположение отметин у хорька несимметричное, шахматного типа.

Blackself. Ость черная. Подпушь темно-серая, черная. Цвет равномерно распределен по всему телу. Нет видимой разницы в распределении цвета между конечностями и телом. Допускается легкая видимая разница. Маска сплошная, прерывание цвета в маске не допускается. Допускается окрашивание бровей в более светлый цвет, окрашивание основания носа, верхней губы, нижней губы и подбородка в белый цвет. Нос должен быть равномерно покрашен в основной цвет. Глаза черные, синие. Нос черный (Ness *et al.*, 1988).

В представленной работе изучалась изменчивость морфологических показателей волосяного покрова и микроструктуры кожной ткани у *золотистых, перламутровых и пастелевых хорьков.*

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Хорьков *перламутровой и пастелевой* окраски изучали в племзаводе «Новые меха» Тверской области, *золотистой* окраски – в племзаводе «Пушное» Тульской области и племзаводе «Пушкинский» Московской области. В анализ были взяты молодые животные в период полного созревания зимнего опушения.

Для изучения изменчивости структуры опушения был проведен морфологический анализ волос. Пробы волос брали в точке пересечения двух линий: линии, ограничивающей заднюю треть туловища, и линии, проходящей между боком и хребтом.

Для исследования микроструктуры кожной ткани в период осеннего забоя из пресно-сухих шкурок 5 самок и 5 самцов каждого изучаемого окраса хорьков (золотистого, перламутрового и пастелевого) были взяты пробы гистологических срезов кожи с волосом площадью 0,25 см². Микроструктуру, высоту, толщину, густоту волосяного покрова, толщину кожного покрова исследовали, согласно методике С.А. Каспарьянца (Каспарьянц и др., 1986). На каждом гистологическом срезе изучали и описали 100 полей зрения. В каждом поле зрения определяли общую толщину кожного покрова, толщину эпидермиса и дермы, исследовали дерму по слоям, выяснив ее количественные характеристики (степень разрыхленности дермы, количество волосяных фолликулов, угол

залегания волосяных фолликулов в дерме, толщину коллагеновых волокон, тип коллагеновой вязи).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Высота волосяного покрова зависит от длины различных категорий волос: направляющих, остевых и пуховых. Каждый из этих типов волос формирует у хорьков ярусы волосяного покрова. Верхний ярус образуют редкие, но самые длинные направляющие волосы, средний ярус – остевые волосы. Нижний, самый плотный, ярус образуют нежные пуховые волосы. Направляющие волосы длиннее и толще волос других типов. Грана их наиболее широкая и удлинённая, с многорядной сердцевинкой. Направляющие волосы редкие, но они придают меху красивый вид, усиливая его пышность. Остевые волосы в среднем короче и тоньше направляющих, форма ланцетовидная, сердцевина в расширенной части многорядная. Именно остевые волосы играют главную роль в формировании меха и его устойчивости к сваливанию, они надёжно защищают промежуточные и пуховые волосы. Хотя остевых волос намного больше, чем направляющих, все же в общей массе они составляют от 1,5 до 3 %. Пуховые волосы наиболее тонкие и короткие, цилиндрической формы, с хорошо дифференцированной однорядной сердцевинкой. Пуховые волосы всегда извиты по всей длине (Русских, 1967).

Длина волос. У хорьков всех трех цветовых типов средняя длина направляющих волос самцов превышает среднюю длину волос этой категории у самок. Половой диморфизм по длине остевых волос в пользу самцов наблюдается у хорьков *перламутровой* (8,2 мм) и *пастелевой* (4 мм) окрасок; у *золотистой* окраски он менее выражен (0,6 мм; разница не достоверна) (табл. 1). По длине пуховых волос *перламутровые* хорьки (самцы и самки) превосходят хорьков *золотистой* окраски, но уступают хорькам *пастелевым*. Направляющие волосы *пастелевых* самок в сравнении с *золотистыми* и *перламутровыми* менее уравнены по высоте. Это хорошо иллюстрируют коэффициенты изменчивости длины направляющих волос: 1,6 % у *золотистых* самок, 2,7 % у *перламутровых* и 5,8 % у *пастелевых*. При этом направляющие

волосы самок хорьков *перламутровой* окраски достоверно короче направляющих волос самок *золотистых* и *пастелевых* ($P > 0,999$). У *перламутровых* самцов направляющие волосы на 4,7 мм длиннее, чем у *золотистых* ($P > 0,999$), и на 0,9 мм короче, чем у *пастелевых* самцов (разница не достоверна).

По длине остевых волос также лидируют *перламутровые* самцы: у них средняя длина остевых волос достоверно выше, чем у самцов *золотистой* и *пастелевой* окрасок.

Перламутровая окраска также положительно коррелирует с длиной остевых волос и у самок. Остевые волосы у *перламутровых* самок на 1,7 мм длиннее, чем у *пастелевых* ($P > 0,999$), и на 1 мм длиннее, чем у *золотистых* ($P > 0,95$).

У хорьков промышленного разведения не зафиксировано взаимосвязи между длиной волос и общей окраской хорьков.

При сравнении показателей с ранее полученными в 1982 г. (Федосеева, 1985) оказалось, что: средняя длина остевых волос у самок *золотистых* хорьков увеличилась за 30 лет на 4,9 мм ($P > 0,999$) при одновременном уменьшении длины пуха на 4,4 мм ($P > 0,999$). У самцов присутствует такая же тенденция – ость удлинилась на 3 мм ($P > 0,999$), на 5,2 мм уменьшилась длина пуха ($P > 0,999$). У *перламутровых* хорьков увеличилась длина ости – на 3,9 мм у самок и на 10,9 мм у самцов ($P > 0,999$) при незаметном уменьшении длины пуха – на 0,4 мм у самок, на 0,9 мм у самцов (разница не достоверна).

Толщина волос. Средняя толщина стержня направляющего волоса у самок *золотистой* окраски превышает толщину стержня волоса у самок *пастелевой* и *перламутровой* окрасок (табл. 1). У самцов обратная картина – самый толстый стержень волоса у *перламутровых* самцов ($P > 0,999$). Толщина грани направляющего волоса *перламутровых* самок уступает толщине грани волоса у *золотистых* и *пастелевых* самок. У *перламутровых* самцов грана направляющего волоса достоверно толще грани волоса этой категории у самцов *пастелевой* окраски (на 7,8 мкм) и не отличается от этого показателя у самцов *золотистой* окраски.

При исследовании остевых волос у самок *золотистой* окраски выявлена наибольшая

Таблица 1

Морфологические показатели волосяного покрова хорьков разных типов окраски

Категория волос	Пол	Тип окраски											
		золотистый				перламутровый				пестелевый			
		lim	M ± m	δ		lim	M ± m	δ		lim	M ± m	δ	
Направляющие, (n = 30):													
Длина, мм													
волоса	♀	48-51	49,5 ± 0,1	0,8	46-52	48,6 ± 0,2	1,3		41-53	50,4 ± 0,6			2,9
	♂	48-56	50,9 ± 0,5	2,5	50-60	55,6 ± 0,5	2,7		54-64	56,5 ± 0,3			1,9
пигментированной вершины	♀	23-28	25,6 ± 0,3	1,4	20-28	24,2 ± 0,4	2,2		14-23	18,3 ± 0,5			2,5
	♂	20-28	24,1 ± 0,5	2,4	23-36	28,0 ± 0,6	3,3		17-31	22,3 ± 0,6			3,3
Толщина, мкм													
стержня	♀	84-93	89,1 ± 0,5	2,9	80-90	82,4 ± 0,9	4,4		80-100	85,2 ± 1,3			6,5
	♂	81-110	90,8 ± 1,2	6,2	89-115	100,4 ± 1,6	8,2		70-90	84,7 ± 1,2			6,6
граны	♀	143-154	147,4 ± 0,6	3,4	110-150	128,0 ± 2,2	1,1		120-150	139,2 ± 1,9			9,5
	♂	141-181	153,4 ± 2,9	14,5	140-154	147,8 ± 0,8	3,8		129-150	140,0 ± 1,4			7,6
Остевые, (n = 100):													
Длина, мм													
волоса	♀	39-48	43,0 ± 0,2	2,1	30-49	42,0 ± 0,4	4,5		29-52	43,7 ± 0,4			4,0
	♂	36-48	43,6 ± 0,2	2,5	41-58	50,2 ± 0,4	4,1		33-54	47,4 ± 0,4			4,1
пигментированной вершины	♀	19-26	22,2 ± 0,2	2,2	10-28	20,5 ± 0,4	4,0		8-23	16,5 ± 0,3			3,0
	♂	13-28	21,0 ± 0,3	3,2	2-33	23,2 ± 0,4	3,9		11-25	19,5 ± 0,3			3,1
Толщина, мкм													
стержня	♀	51-87	77,1 ± 0,9	8,7	40-90	69,6 ± 1,2	12,1		40-100	69,0 ± 1,4			13,5
	♂	61-87	75,6 ± 0,7	7,3	63-102	82,0 ± 0,9	8,7		40-90	71,1 ± 1,2			11,7
граны	♀	110-141	123,3 ± 0,8	8,2	90-130	115,7 ± 1,0	9,6		100-170	118,1 ± 1,3			13,2
	♂	109-158	129,3 ± 1,0	10,5	107-146	130,5 ± 1,0	10,0		100-150	125,9 ± 1,1			10,8
Пуховые, (n = 100):													
Длина волоса, мм													
Длина волоса, мм	♀	14-20	16,5 ± 0,2	1,6	13-30	21,3 ± 0,5	4,8		14-29	22,6 ± 0,4			3,7
	♂	11-29	19,6 ± 0,4	3,7	17-30	22,8 ± 0,3	3,1		16-31	25,2 ± 0,2			2,5
Толщина стержня, мкм	♀	15-28	20,4 ± 0,3	3,3	14-24	18,6 ± 0,2	2,0		15-20	18,5 ± 0,2			1,5
	♂	17-23	20,4 ± 0,2	1,6	17-24	19,8 ± 0,2	2,0		16-22	19,2 ± 0,2			1,7

толщина стержня и грани по сравнению с этим показателем у *перламутровых* и *пастелевых* самок. У *перламутровых* самцов толщина остевых волос (в стержне и грани) превышает таковую у самцов *золотистых* и *пастелевых*.

По толщине пуховых волос *перламутровые* хорьки (самки и самцы) занимают промежуточное положение по этому показателю между хорьками *золотистыми* и *перламутровыми*.

Половой диморфизм по толщине всех типов волос зарегистрирован лишь у хорьков *перламутровой* окраски, у *золотистых* и *пастелевых* хорьков разница в толщине волос между самками и самцами не обнаружена.

Окраска кроющих волос. Направляющие и остевые волосы у хорьков всех трех изученных цветовых типов имеют зональную окраску – пигментированную вершину и светлую нижнюю часть стержня. У *золотистых* и *перламутровых* хорьков вершина кроющих волос черная, у *пастелевых* – коричневая различной интенсивности.

Длина пигментированной вершины направляющих и остевых волос коррелирует с качеством окраски – от величины и уравниности этого признака зависит развитие вуали волосяного покрова у хорьков разных цветовых типов. Отношение длины пигментированной вершины направляющего и остевого волос ко всей длине волоса можно ранжировать: самое большое у *золотистых* самок – 52 %; у *перламутровых* – 49 %, и минимальное у *пастелевых* – 37 %. У самцов эти ранги сохраняются, но отношение длины пигментированной вершины ко всей длине волоса иное. Для остевого волоса у *золотистых* самцов оно составляет 48 %, у *перламутровых* – 46, у *пастелевых* – 45. Для направляющих волос соответственно 47, 50, и 39 %.

Микроструктура кожного покрова. Окраска мехового покрова хорька затрагивает соотношение сосочкового и сетчатого слоев дермы, характер переплетения коллагеновых волокон, соотношение количества первичных и вторичных волосяных фолликулов. Исследование показало, что у хорьков всех трех исследованных цветовых форм выражен половой диморфизм: у самцов в сравнении с самками кожный покров более толстый ($P > 0,999$).

Толщина эпидермиса от общей толщины кожного покрова у всех трех окрасочных форм

хорьков варьирует от 2,4 до 4,0 %. Сравнение трех исследованных цветовых типов показало, что самый тонкий кожный покров выявлен у *перламутровых* хорьков (у самок – 704,2; у самцов – 1077 мкм) ($P > 0,999$) (табл. 2). Сетчатый слой более развит у *пастелевых* хорьков.

В сосочковом слое как основе будущих волос закладываются волосяные фолликулы. Из первичных фолликулов развиваются кроющие волосы, из вторичных – пуховые. Из данных, представленных в табл. 3, видно, что густота волос у самцов всех цветовых типов больше, чем у самок (хотя разница во всех трех случаях недостоверна).

Наиболее густоволосыми среди окрасочных форм оказались *перламутровые* хорьки (65 фолликулов в поле зрения микроскопа у самок и 64,3 у самцов). Это соответствует 5417 шт. волос в расчете на 1 см² кожного покрова у самок и 5361 у самцов. Повышенная густота волос *перламутровых* хорьков является следствием лучшего развития у них сосочкового слоя. Так, если у *пастелевых* самок он составляет 65,6 % (466,0 мкм), то у *перламутровых* самок он равен 76,8 % от толщины дермы (521,7 мкм). У *перламутровых* самцов, соответственно, это процентное соотношение составляет 71,6 % против 64,9 % *пастелевых* (табл. 3).

По мнению меховщиков, качество опушения зверей зависит от величины разницы между длиной остевого и пухового волос. Чем больше эта разница, тем пышнее выглядит волосяной покров (например, у соболя). Однако, когда эта разница выходит за пределы оптимума, пух перестает «удерживать» кроющие волосы и на мехе образуются «развалы», что ухудшает эстетический вид шкурки (например, у длинноволосой лисицы). Отсутствие отбора хорьков по высоте и уравниности волосяного покрова может привести к ухудшению товарных качеств шкурок. Данное исследование показывает, что в селекционном процессе следует учитывать генотип: при сравнении густоты волос хорьков разных цветовых типов наиболее густоволосыми оказались хорьки *перламутровые*, наименее – хорьки *пастелевой* окраски ($P > 0,999$). *Золотистые* хорьки занимают промежуточное положение.

Таблица 2

Показатели микроструктуры кожного покрова шкур хорьков разных типов окраски

Цветовые типы хорьков	Пол	Толщина кожного покрова и основных его слоев в линейных (мкм) и относительных единицах (% к общей толщине)															
		кожный покров в целом				эпидермис				дерма				слои дермы			
		M ± m		%		M ± m		%		M ± m		%		M ± m		%	
		M ± m	%	M ± m	%	M ± m	%	M ± m	%	M ± m	%	M ± m	%	M ± m	%		
Золотистые (n = 100)	♀	948,8 ± 54,3	100	24,6 ± 2,1	2,6	924,2 ± 9,6	97,4	648,4 ± 12,3	70,2	275,8 ± 5,3	29,8						
	♂	1356,4 ± 70,2	100	34,8 ± 0,3	2,6	1321,6 ± 18,4	97,4	942,7 ± 10,4	71,3	378,9 ± 15,3	28,7						
Перламутровые (n = 100)	♀	704,2 ± 6,6	100	25,0 ± 0,9	3,6	679,2 ± 7,7	96,4	521,7 ± 7,9	76,8	157,5 ± 4,1	23,2						
	♂	1077,8 ± 19,1	100	37,9 ± 2,1	3,5	1039,9 ± 23,0	96,5	774,4 ± 16,4	71,6	295,5 ± 17,5	28,4						
Пастелевые (n = 100)	♀	740,0 ± 6,5	100	29,3 ± 1,1	4,0	710,7 ± 6,9	96,0	466,0 ± 5,7	65,6	244,7 ± 4,9	34,4						
	♂	1244,7 ± 11,5	100	29,6 ± 1,0	2,4	1215,1 ± 11,2	97,6	788,7 ± 9,7	64,9	426,4 ± 11,2	35,1						

Таблица 3

Количество волосяных фолликулов на шкурках хорьков (в поле зрения микроскопа S = 1,2 мм²) и густота волос, им соответствующая

Цветовые типы хорьков	Пол	Количество фолликулов, шт./см ²						Густота волос, шт./см ²
		первичные		вторичные		общее		
		M ± m	%	M ± m	%	M ± m	%	
Золотистые (n = 100)	♀	4,0 ± 0,1	59,2 ± 1,9	63,2 ± 2,1	5267 ± 33			
	♂	3,8 ± 0,1	61,9 ± 3,8	61,9 ± 3,8	5158 ± 74			
Перламутровые (n = 100)	♀	4,8 ± 0,1	65,0 ± 7,2	65,0 ± 7,2	5417 ± 60			
	♂	4,6 ± 0,1	64,3 ± 4,4	64,3 ± 4,4	5361 ± 37			
Пастелевые (n = 100)	♀	3,8 ± 0,1	52,4 ± 2,2	52,4 ± 2,2	4367 ± 38			
	♂	3,3 ± 0,1	50,7 ± 3,4	50,7 ± 3,4	4225 ± 82			

ЛИТЕРАТУРА

- Каспарьянц С.А., Хлудеев К.Д., Кирилук Б.И. Методические рекомендации по определению показателей качества кожевенного и шубно-мехового сырья. М.: ВАСХНИЛ, 1986. 18 с.
- Кузнецов Г.А., Казакова Г.П., Федосеева Г.А. Возможность выявления гетерозиготных пастелевых хорьков // Науч. тр. НИИПЗК. 1987. Т. 35. С. 132–134.
- Русских А.П., Русских Н.А. Улучшение качества клеточной пушнины (Товароведение). М: Колос, 1967. 271 с.
- Терновский Д.В., Терновская Ю.Г. Экология куницеобразных. Новосибирск: Наука, 1994. 222 с.
- Федосеева Г.А. Характеристика основных хозяйственно полезных признаков хорьков разных типов окраски // Матер. конф. молодых ученых НИИПЗК. 1985. Вып. 8. С. 65–76.
- Ness N.N., Einarson E.J., Lohi O. *et al.* Beautiful Fur Animals – and Their Color Genetics. Glostrup, Denmark. Publ. Scientifur. 1988. 271 p.

**EFFECT OF COAT COLOR MUTATIONS
ON HAIR AND SKIN STRUCTURE IN POLECATS (*MUSTELA PUTORIUS*)****O.I. Fedorova**

K.L. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology,
Moscow, Russia, e-mail: ox_fed@mail.ru

Morphological parameters of hair and microstructure of the leather tissue in polecats of gold, pearl, and pastel colors are considered. The results were used in writing a manual on the assessment of breeding achievements in farm-bred polecats and in the testing of a new breeding achievement, the Tsvetkov breed.

Key words: polecat, gold, pearl, pastel, color, skin microstructure.

УДК 582.675.1

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА *AQUILEGIA* СЕВЕРНОЙ АЗИИ ПО РАЗЛИЧНЫМ ДНК-МАРКЕРАМ

© 2013 г. А.С. Эрст¹, О.В. Ваулин²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: erst_andrew@yahoo.com;

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: oleg.v.vaulin@mail.ru

Поступила в редакцию 17 июля 2013 г. Принята к публикации 12 августа 2013 г.

Результаты молекулярно-генетического исследования нуклеотидной последовательности межгенного участка *rpl32-trnL* и фрагмента генов рРНК ITS1-ITS2 8 видов рода водосбор (*Aquilegia*) из Северной Азии показали генетическую неоднородность популяций *A. borodinii* и *A. jucunda* из разных точек ареала. Молекулярно-генетические данные подтверждают обособленность *A. viridiflora* и *A. atropurpurea* от остальных изученных видов. Оценена степень родства *A. aradanica*, *A. sibirica* и *A. synakensis*. Доказано гибридогенное происхождение вида *A. jucunda*.

Ключевые слова: *Aquilegia*, филогения, виды, популяции, молекулярные маркеры, *rpl32-trnL*, ITS1-ITS2.

ВВЕДЕНИЕ

Род *Aquilegia* L. (водосбор) распространен на территории Евразии, Северной и частично Центральной Америки, представлен 76 видами (Fraser, 1918; Munz, 1946; Камелин, 1973; Nold, 2003) и считается трудным в таксономическом отношении. В настоящее время в Северной Азии известно 17 таксонов (видов, подвидов и межвидовых гибридов) в роде водосбор, статус и ранг которых требует уточнения (Фризен, 1993; Луферов, 1995; Васильева, 1996). Наши данные в значительной степени подтверждают представление о том, что в роде преобладают виды, характеризующиеся высокой степенью эндемизма (Шауло, Эрст, 2010, 2011).

В современных работах представители рода *Aquilegia* часто используются в качестве модельной системы для исследования эволюции растений (Kramer, 2009; Kramer, Hodges,

2010). В последнее время появился ряд работ, направленных на изучение филогении рода по последовательностям внутренних транскрибируемых спейсеров генов рРНК (участок ITS1-ITS2; ядерная ДНК) и участков хлоропластной ДНК (хлДНК) (Ro, McPherson, 1997; Bastida *et al.*, 2010; Fior *et al.*, 2013). Анализ ITS не показал существенных отличий на видовом уровне, так как основные клады в этом анализе имели низкую достоверность. Анализ хлДНК показал хорошую поддержку клад, содержащих все европейские и азиатские виды – *A. glandulosa*, *A. sibirica*, *A. oxypetala* и *A. olympica*. Также было установлено тесное родство североазиатских *A. flabellata*, *A. turczaninowii* и *A. coerulea* из Северной Америки. На основе секвенирования переменных участков ДНК суммарной протяженностью около 24 т.п.н./образец, был проведен филогенетический анализ 61 вида *Aquilegia* (Fior *et al.*, 2013). Результаты указали

на тесное родство североазиатских *A. parviflora*, *A. amurensis* и *A. flabellata* (син. *A. japonica*) со всеми американскими видами и генетическое сходство всех европейских видов. Молекулярные исследования имеют большую ценность для познания филогенетических отношений в роде. Так же необходимо учитывать получение ряда образцов из ботанических садов и частных коллекций (в культуре все виды скрещиваются) и неправильную идентификацию растений в гербарных фондах. Поэтому для изучения необходимо верно идентифицированный материал из природных популяций, часто труднодоступный из-за узкой локализации в пределах горных систем. Кроме того, молекулярные исследования представителей рода часто не учитывают процессов гибридизации при симпатрическом произрастании таксонов.

Данное исследование предпринято для уточнения филогенетических отношений и родственных связей сложных таксономических комплексов *Aquilegia* из Северной Азии, некоторых недавно обнаруженных таксонов (Шауло, Эрст, 2010, 2011).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С помощью модифицированной стандартной методики была выделена ДНК из 25 гербарных образцов *Aquilegia* (табл. 1) (Bender *et al.*, 1983). Все 25 образцов были изучены на изменчивость секвенированием участка ITS1-ITS2 ядерного кластера генов рРНК; для 16 образцов были получены сиквенсы межгенного участка *rpl32-trnL* хлоропластной ДНК.

Для ПЦР участка рДНК ITS1-ITS2 использовали праймеры, подобранные по последовательности *Ranunculus scleratus*, представленной в базе данных ДНК NCBI (№ EF526405): прямой – 5'-aggat-cattg-tcgaa-acctg-3' и обратный – 5'-ctta-actca-gcggg-taatc-3'. Состав реакционной смеси для ПЦР ITS1-ITS2: 1×PCR-buffer (16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM трисHCl (pH 8,8 при 25 °C), 0,1 % Tween-20); 4 mM MgCl₂; 0,4 mM каждого dNTP; 1 мкМ каждого праймера и 1 ед. Taq-полимеразы. Температурный режим ПЦР: денатурация при 94 °C – 1 мин; отжиг при 55 °C – 1 мин; полимеризация при 72 °C – 1 мин; в последнем цикле стадия полимеризации продолжалась 5 мин при 72 °C.

Для ПЦР межгенного участка *rpl32-trnL* хлоропластной ДНК использовались праймеры состава: 5'-cagtt-ccaaa-aaaac-gtact-tc-3' (прямой) и 5'-ctgct-tccta-agagc-agcgt-3' (обратный) (Shaw *et al.*, 2007). Состав реакционной смеси и температурный режим ПЦР аналогичны таковым для ПЦР ITS1-ITS2; но температура отжига праймеров – 57 °C.

Секвенирование участков ДНК ITS1-ITS2 и *rpl32-trnL* проводилось с использованием ресурсов ЦКП «Секвенирование ДНК» СО РАН (г. Новосибирск, <http://sequest.niboch.nsc.ru>).

Выравнивание полученных последовательностей ДНК производилось с помощью программы ClustalW (Higgins *et al.*, 1996), построение дендрограмм – с использованием пакета MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Для укоренения дендрограмм использовались последовательности *Paraquilegia microphylla*, представленные в базе данных ДНК NCBI: № JX233771 (участок ITS1-ITS2) и № JX258542 (участок *rpl32-trnL*). Схемы филогенеза строились как по отдельности для участков ITS1-ITS2 и *rpl32-trnL*, так и для объединенных последовательностей. В связи с тем что часть филогенетической информации в обоих изучаемых участках приходится на делеции/инсерции, использовался вариант алгоритма NJ (pairwise deletion), который, в отличие от алгоритмов максимального правдоподобия или максимальной экономии, позволяет учитывать нуклеотидные замены, приходящиеся на участки, делетированные у части особей. В качестве меры достоверности построений использовался бутстреп (1000 итераций). Особенностью последовательности ITS1-ITS2 изучаемых образцов был внутригеномный полиморфизм, выразившийся в наложении пиков при секвенировании (то есть разные копии в геноме содержат последовательности, отличающиеся по нуклеотидным заменам в одной и той же позиции). При построении дендрограмм мы рассмотрели возможность учета и исключения таких позиций из анализа. В связи с повторяемостью паттернов таких наложений у разных образцов мы оцениваем неполные замены как несущие филогенетическую информацию.

Рассчитаны меры двухпараметрического генетического расстояния Кимуры для оценки особенностей дивергенции между образцами (Kimura, 1980).

Таблица 1

Список образцов, использованных в исследовании

Видовая принадлежность	Наименование образца	Место сбора	Коллекционный номер	Коллекторы
<i>A. aradanica</i>	Aq5	Красноярский кр., Араданский хр., 2010	–	Шауло Д., Эрст А., Мякшина Т.
	Aq6	Красноярский кр., Араданский хр., 2010	–	Шауло Д., Эрст А., Мякшина Т.
	Aq7	Красноярский кр., Араданский хр., 2010	–	Шауло Д., Эрст А., Мякшина Т.
<i>A. aradanica</i> × <i>A. sibirica</i>	Aq11	Красноярский кр., Араданский хр., 2010	DS52	Шауло Д., Эрст А.
	Aq12	Красноярский кр., Араданский хр., 2010	DS52a	Шауло Д., Эрст А.
	Aq13	Красноярский кр., Араданский хр., 2011	–	Шауло Д., Эрст А.
<i>A. atropurpurea</i>	Aq22	Респ. Тыва, хр. Сангилен, 2006	–	Эрст А., Белкин Д.
	Aq24	Респ. Тыва, хр. Ондум, 2010	–	Эрст А., Данилов Ю.
<i>A. borodinii</i>	Aq8	Респ. Алтай, Катунский хр., 2007	–	Артемов И.
	Aq9	Респ. Алтай, Катунский хр., 2007	–	Артемов И.
	Aq14	Красноярский кр., Ойский хр., 2010	DS58	Шауло Д., Эрст А.
	Aq16	Респ. Алтай, Катунский хр., 2007	–	Артемов И.
<i>A. glandulosa</i>	Aq1	Красноярский кр., хр. Ергаки	–	Шауло Д., Эрст А.
	Aq4	Красноярский кр., хр. Ергаки	–	Красноярский кр., хр. Ергаки
<i>A. jucunda</i>	Aq18	Респ. Тыва, хр. Акад. Обручева, 2010	DS34	Шауло Д., Эрст А.
	Aq19	Алт. кр., Тигеревский хр, 2004	AS12	Эрст А.
<i>A. sibirica</i>	Aq2	Респ. Хакасия, хр. Борус, 2010	–	Эрст А., Данилов Ю.
	Aq3	Респ. Хакасия, хр. Борус, 2010	–	Эрст А., Данилов Ю.
	Aq15	Респ. Тыва, хр. Акад. Обручева, 2010	–	Шауло Д., Эрст А.
<i>A. synakensis</i>	Aq10	Респ. Тыва, хр. Акад. Обручева, 2010	DS43	Шауло Д., Эрст А.
	Aq17	Респ. Тыва, хр. Акад. Обручева, 2010	DS43a	Шауло Д., Эрст А.
<i>A. viridiflora</i>	Aq20	Читинская обл., Даурский заповедник, 2004	–	Хан И.
	Aq21	Читинская обл., Даурский заповедник, 2004	–	Хан И.
	Aq26	Читинская обл., хр. Адун-Чалон, 2004	–	Ковтонюк Н.
	Aq27	Читинская обл., хр. Адун-Чалон, 2004	–	Ковтонюк Н.

Примечание. Виды (расположены в алфавитном порядке), коллектор, коллекционный номер (если он имеется), все образцы хранятся в гербарии ЦСБС СО РАН (NS).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Длина фрагмента ДНК, полученного при секвенировании участка ITS1-ITS2, составила 594–595 п.н. Длина изученного участка *rpl32-trnL* варьировала из-за вставок/делеций нуклеотидов в пределах 293–339 п.н. Малая длина изученного

участка *rpl32-trnL* связана с его обогащенностью протяженными блоками из одинаковых нуклеотидов, затрудняющей прочтение последовательности. Значения мер генетического расстояния Кимуры приведены в табл. 2.

Полученные данные указывают на то, что максимальные генетические расстояния в изу-

Таблица 2

Основные значения мер генетического расстояния Кимуры

Участок ДНК	Средние расстояния среди <i>Aquilegia</i>	Средние расстояния между <i>Aquilegia</i> и <i>Paraquilegia microphylla</i>	Максимальные расстояния в парах видов <i>Aquilegia</i> (названия образцов приведены в скобках)
ITS1-ITS2	0,008	0,069	0,019 (Aq24 <i>A. atropurpurea</i> – Aq8 <i>A. borodinii</i>)
<i>rpl32-trnL</i>	0,005	0,113	0,022 (Aq14 <i>A. borodinii</i> – Aq15 <i>A. sibirica</i>)
ITS1-ITS2 + <i>rpl32-trnL</i>	0,007	0,084	0,014 (Aq20 <i>A. viridiflora</i> – Aq14 <i>A. borodinii</i>)

ченной группе *Aquilegia* по разным последовательностям отличаются от средних расстояний между этой группой и *P. microphylla* в 3–6 раз, что может быть использовано как оценка соотношения времен расхождения родов *Paraquilegia* и *Aquilegia* и изученных видов рода *Aquilegia*. Соотношение между длиной изученного участка *rpl32-trnL* и средним расстоянием по этому участку ДНК для изученных видов *Aquilegia* таково, что образцы различаются единичными нуклеотидными заменами. Насыщенность вставками/делециями нуклеотидов затрудняет выравнивание участков *rpl32-trnL* *P. microphylla* и изученных нами образцов. Несколько большая насыщенность заменами участка ITS1-ITS2 среди изученных образцов рода *Aquilegia* и отсутствие мононуклеотидных повторов делают эту последовательность более удобной для филогенетических исследований, чем участок *rpl32-trnL*. При этом определенную сложность для анализа представляют позиции, по которым выявлен внутригеномный полиморфизм.

Дендрограммы, построенные по участкам ITS1-ITS2, *rpl32-trnL* и объединенным последовательностям приведены на рис. 1–3 соответственно. Полного соответствия между разделением образцов на кластеры и виды на дендрограммах не наблюдается, хотя такая тенденция и прослеживается. В частности, на всех дендрограммах образец Aq14 вида *A. borodinii* кластеризуется отдельно от образцов Aq8 и Aq9 того же вида. Образцы вида *A. aradanica* образуют единый кластер на дендрограммах, построенных по ITS1-ITS2 и по объединенным данным, однако по хлоропластной ДНК они группируются с образцом *A. glandulosa* Aq4. При исключении из анализа мононуклеотидных

повторов по участку *rpl32-trnL* образец Aq4 идентичен двум образцам *A. aradanica*. В целом дерево, построенное по объединенным последовательностям, в большей степени сходно с таковым, построенным по ядерному участку ITS1-ITS2. Это объясняется малой изменчивостью участка *rpl32-trnL*, которая в наибольшей степени связана с вариацией по числу мономеров в мононуклеотидных повторах.

Изученные образцы относятся к двум секциям, морфологически различающимся по строению цветка. Первая группа видов, входящих в секцию *Viridiflorae* Fiesen, характеризуется мелкими – желтыми, желто-зелеными или пурпурными цветками с отличной от остальных видов морфологией (тонкие, прямые и расходящиеся шпорцы, чашелистики короче отгиба лепестков и тычиночные нити намного длиннее отгиба лепестков) (Pallas, 1779; Willdenow, 1809; Фризен, 1989). Вторая группа объединяет в себя таксоны с цветками крупных и средних размеров, фиолетовой, синей или сине-белой окраски, как правило, со вздутыми, крючковидно-закрученными шпорцами, чашелистиками длиннее или равными отгибу лепестков, тычинками короче или равными отгибу лепестков. Эти виды относятся к секциям *Glandulosae* I.M. Vassiljeva и *Aquilegia* (Васильева, 1996).

Виды секции *Viridiflorae*, вошедшие в первую кладу, имеют очаги распространения в степных и лесостепных районах Южной и Восточной Сибири, Дальнего Востока, Монголии, Китая и Японии. В разное время были описаны близкородственные зеленоцветковому водосбору виды: *A. viridiflora* Pall., *A. atropurpurea* Willd., *A. buriatica* Peschkova, *A. tuvinica* I.M. Vassiljeva (Pallas, 1779; Willdenow, 1809; Пешкова, 1977;

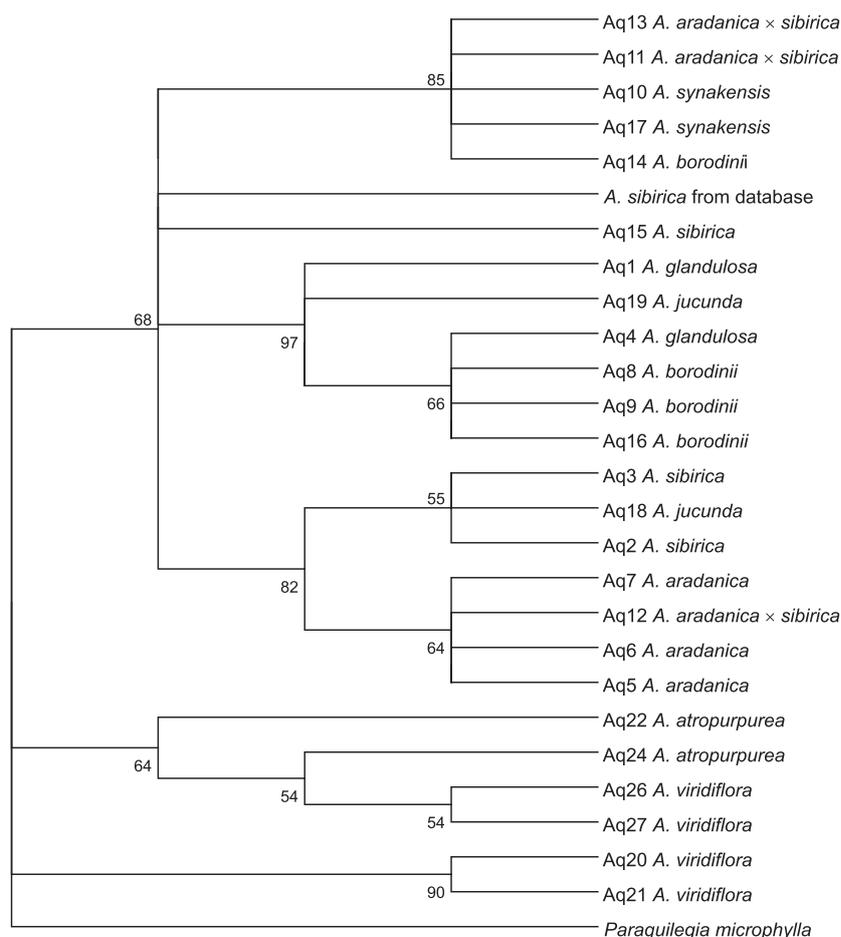


Рис 1. Топология филогенетического дерева, построенного по алгоритму NJ по участку ДНК ITS1-ITS2. Укоренено на последовательность *Paraquilegia microphylla*, представленную в базе данных ДНК под № JX233771. Для построения дендрограммы использовался также образец *Aquilegia sibirica* (номер в базе данных ДНК – EU747259). Указаны обозначения и видовая принадлежность образцов. Бутстреп-оценки менее 50 % не отображены.

Васильева, 1992). Обнародованные таксоны имеют отличия по окраске цветка (зеленый/коричневый), опушению (имеется/отсутствует), характеру поверхности растения (с сизым восковым слоем, зеленое без выраженного воскового слоя кутикулы). Таксономический статус и синонимика этих представителей водосбора требует уточнения: в одних случаях описание не соответствует типовым образцам – на типовых образцах присутствуют растения с различными морфологическими характеристиками, в других случаях описания составлены по изменчивым признакам, которые широко вариабельны в пределах узких экотопов. Самым главным отличием при разграничении таксонов является окраска цветка (желтая и коричневая) и опушение (голые и опушенные) образцов из

различных точек ареала. Как видно на рис. 1, образцы Aq20 и Aq21 из Читинской области образуют отдельную группу и характеризуются сильным опушением и желтыми цветками. Мы относим эти виды к *A. viridiflora*. Другие образцы из Тувы (Aq22 и Aq24) характеризуются коричневыми или желто-коричневыми цветками, наличием или отсутствием опушения, они более полиморфны и относятся, по нашему мнению, к *A. atropurpurea* (рис. 4). Оба вида географически обособлены: *A. viridiflora* распространена в Забайкалье и Дальнем Востоке, а *A. atropurpurea* – в Туве, Китае и Монголии. Различия могут быть связаны с экологическими условиями. При этом два образца *A. viridiflora* (Aq26 и Aq27) кластеризуются в одну ветвь с *A. atropurpurea*. Анализ последовательностей

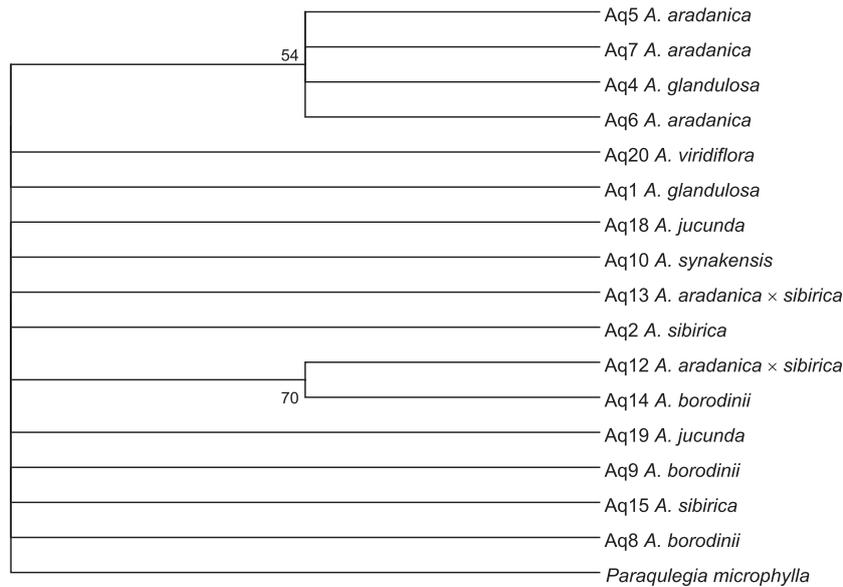


Рис 2. Филогенетическое дерево построено по алгоритму NJ по последовательности участка хлоропластной ДНК *rpl32-trnL*. Укоренено на последовательность *Paraquilegia microphylla*, представленную в базе данных ДНК под № JX258542. Указаны обозначения и видовая принадлежность образцов. Бутстреп-оценки менее 50 % не отображены.

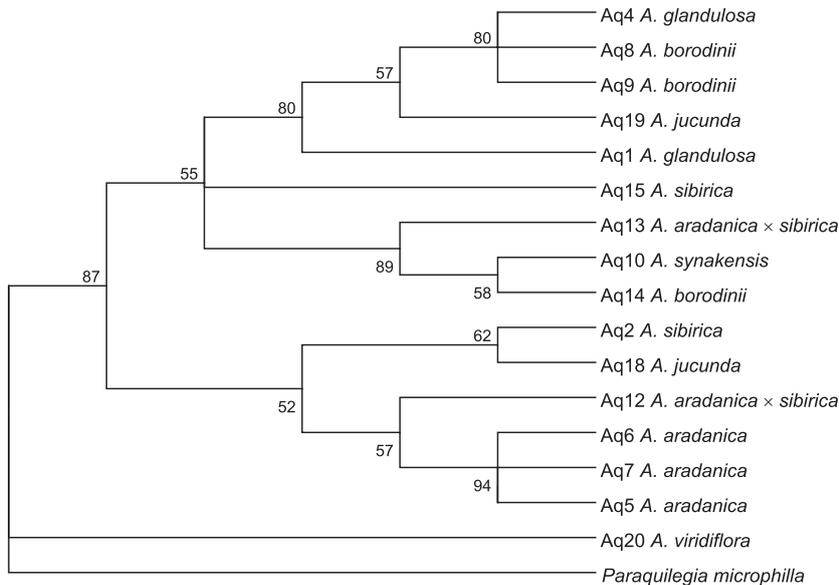


Рис 3. Филогенетическое дерево построено по алгоритму NJ по объединенной последовательности ITS1-ITS2 и *rpl32-trnL* при 1000 итераций бутстрепа. Укоренено на последовательности *Paraquilegia microphylla*, представленные в базе данных ДНК под № JX233771 (участок ITS1-ITS2) и № JX258542 (участок *rpl32-trnL*). Указаны обозначения и видовая принадлежность образцов. Бутстреп-оценки менее 50 % не отображены.

так же показал, что кластеризация образцов в паре видов *A. viridiflora* и *A. atropurpurea* неоднозначна. Таким образом, эти два вида могут быть надежно разделены по морфологическим признакам, но на уровне изменчивости ДНК

ITS1-ITS2 они очень близки. Отметим, что относительно большая обособленность образцов секции *Viridiflorae* подтверждается значениями мер генетических расстояний (табл. 2). Образцы этой подсекции наиболее удалены

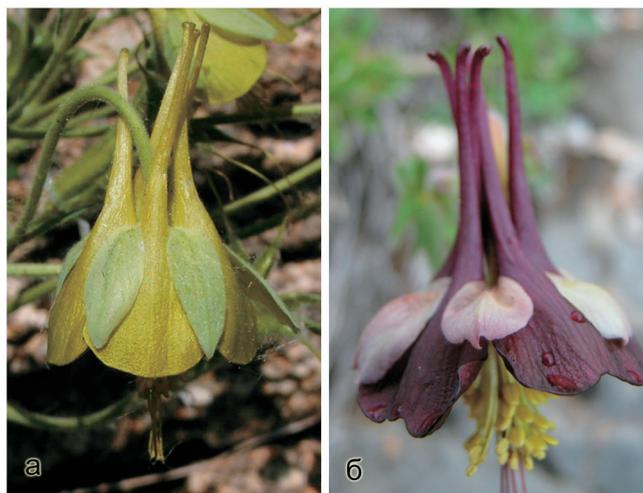


Рис. 4. Цветки *A. viridiflora* (а) и *A. atropurpurea* (б).

от остальных по последовательностям ITS1-ITS2 и объединенным данным. Наибольшая дивергенция по мере генетического расстояния Кимуры по участку *rpl32-trnL* отмечается для образцов секций *Glandulosae* I.M.Vassiljeva и *Aquilegia*. Однако по количеству эволюционных событий (включая делеции/инсерции, но исключая расхождение по мононуклеотидным повторам) наиболее удаленным оказывается образец Aq20 *A. viridiflora* секции *Viridiflorae* (данные не приводятся).

Следующей сложной группой является комплекс видов, которые различаются на секционном уровне – *A. sibirica* и *A. glandulosa* (рис. 5, а, б). По мнению ряда авторов, водосборы в природных популяциях образуют гибриды, которые встречаются при симпатрическом сосуществовании таксонов (Prazmo, 1965; Taylor, 1967;

Губанов, Камелин, 1991). И.А. Губанов и Р.В. Камелин поддерживают данную гипотезу и в своей публикации, касающейся описания новых таксонов из Монголии, приводят *A. × gubanovii* как гибрид *A. sibirica* и *A. glandulosa*, к сожалению, без латинского диагноза (т. е. не было сделано формального описания). Наши образцы из Алтайского края географически обособлены от *A. × gubanovii* R. Kam. и могут иметь генетические отличия. Поэтому в нашей публикации мы применяем обозначение *A. jucunda* Fisch. & C.A. Mey. ex Ledeb., относящееся к территории Казахстана и Алтайского края (рис. 5, в). Этот таксон характеризуется диморфными цветовыми характеристиками цветка, а также промежуточными признаками между предполагаемыми родительскими видами. Изучение типовых образцов *A. jucunda*



Рис. 5. Цветки *A. sibirica* (а), *A. glandulosa* (б) и *A. jucunda* (в).

и образцов со сходными характеристиками из Республик Алтай, Тува, Казахстан; Китая и Монголии показало, что в различных частях ареала образцы отличаются по морфологии вегетативных и генеративных структур и могут быть разными видами; по типу американских представителей группы *A. chrisantha* (Munz, 1946). Как видно на рис. 1, различные образцы *A. jucunda* (Aq18 и Aq19) входят в разные клады. Aq18 образует единую ветвь с двумя образцами *A. sibirica*, а Aq19 – с *A. glandulosa* и частью образцов *A. borodinii*. Аналогичная кластеризация сохраняется и на дереве, полученном по объединенным последовательностям ITS1-ITS2 и *rpl32-trnL* (рис. 3). Это может свидетельствовать о гибридогенном происхождении обсуждаемого таксона, но для окончательного решения данного вопроса необходимо привлечение комплексных подходов. Так как используемые морфологические критерии довольно надежны и экологических различий между *A. jucunda* из разных частей ареала не выявлено, то нет причин считать эти относительно генетически удаленные образцы (Aq18 и Aq19) разными видами. Еще одной трудной для понимания филогении является группа *A. borodinii*. Согласно И. Васильевой (1992), *A. borodinii* (рис. 6, а) является эндемиком Ангаро-Саянского выдела Восточной Сибири и Республики Алтай (Чуйские белки). *A. borodinii* имеет естественные местообитания в пределах Республик Алтай и Хакассия, Красноярского края, Тувы и южной Бурятии (Фризен, 1993). Анализ гербарных материалов показал, что образцы из Республики Алтай не соответствуют типовым материалам. На рис. 1 и 3 наглядно

видно, что образцы Aq8, Aq9 и Aq16 из Республики Алтай входят в одну кладу с *A. glandulosa* и могут быть выделены в качестве гибридного таксона *A. katunika* nothosp. nov. (Shaulo, Erst, 2013. In press). Катунский водосбор имеет некоторое сходство с *A. borodinii*, но родственен *A. jucunda*. Согласно нашим представлениям, *A. borodinii* также является стабильным гибридогенным таксоном, в образовании которого принимали участие предковые виды из групп *A. viridiflora* и *A. glandulosa*. Это подтверждается молекулярными данными (Bastida et al., 2010) и морфологическими критериями (характеристики шпорцев). В дальнейшем этот таксономический комплекс требует более детального рассмотрения с привлечением материалов по близкородственным видам.

В отношении недавно описанных *A. aradanica* Shaulo et A. Erst (рис. 6, в) и *A. synakensis* Shaulo et A. Erst (рис. 6, б) можно сказать следующее: образцы первого вида (Aq5, Aq6 и Aq7) занимают обособленную позицию на филогенетическом дереве и видовая самостоятельность таксона не вызывает сомнения (рис. 1, 3). Помимо этого, в кладу входит образец, имеющий, кроме базовых, признаки *A. sibirica*. Этот образец (Aq12) можно выделить в качестве гибридного таксона *A. sibiridamica* nothosp. nov. (Shaulo, Erst, 2013. In press). Экземпляры с промежуточными признаками между *A. aradanica* и *A. borodinii* (Aq11 и Aq13) входят в одну кладу с *A. synakensis* и *A. borodinii*. Очевидно, оба последних вида участвовали в образовании этих гибридов.

Таким образом, среди таксонов рода *Aquilegia* Северной Азии есть стабильные, генотипически обособленные виды. Имеются также виды древ-

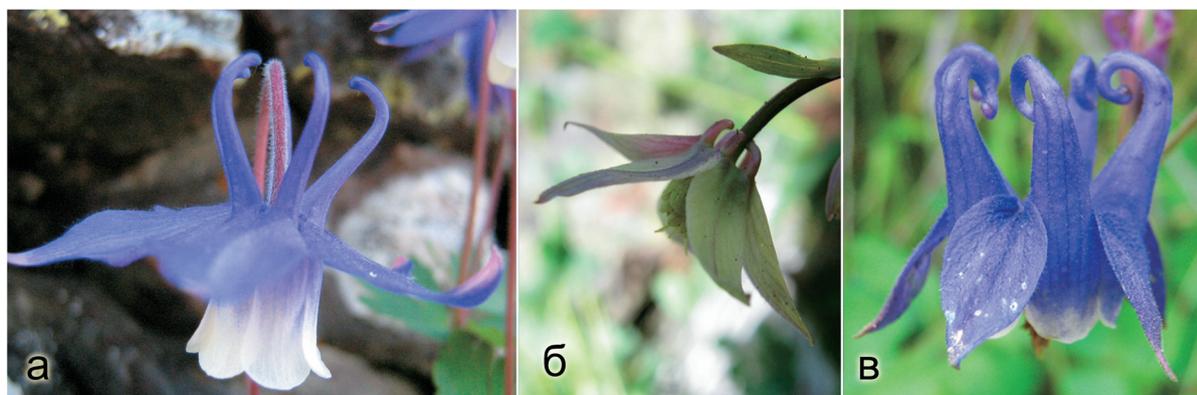


Рис. 6. Цветки *A. borodinii* (а), *A. synakensis* (б) и *A. aradanica* (в).

него гибридогенного происхождения и спонтанные гибриды с признаками, уклоняющимися в сторону родительских таксонов. Для более четкого понимания филогенетических взаимоотношений внутри рода необходимы дополнительные комплексные (молекулярно-генетические, морфологические и экологические) исследования, охватывающие все группы рода.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (№ 12-04-31209 мол_а, 13-04-90848 мол-рф-нр 13-04-00874а и 12-04-01319а).

ЛИТЕРАТУРА

- Васильева И.М. *Aquilegia tuvinica* Vassil. // Ботан. журнал. 1992. Т. 77. № 9. С. 67.
- Васильева И.М. Система рода *Aquilegia* L. (Ranunculaceae) Флоры России и сопредельных государств // Новости систематики высших растений. 1996. Т. 30. С. 8–29.
- Губанов И.А. Камелин Р.В. *Aquilegia gubanovii* R. Kam. // Бюл. МОИП. Отд. биол. 1991. Т. 96. Вып. 6. С. 114.
- Камелин Р.В. Флорогенетический анализ естественной флоры горной Средней Азии. Л.: Наука, 1973. С. 301–305.
- Луферов А.Н. *Aquilegia* L. // Сосудистые растения Советского Дальнего Востока. 1995. Т. 7. С. 26–32.
- Пешкова Г.А. *Aquilegia buriatica* Peschkova // Новости систематики высших растений. Л., 1977. Т. 14. С. 236.
- Фризен Н.В. *Aquilegia* L. // Флора Сибири. Новосибирск: Наука, 1993. Т. 6. С. 112–116.
- Фризен Н.В. Ультраскульптура поверхности семян и систематика сибирских представителей рода *Aquilegia* L. (Ranunculaceae) // Бюл. МОИП. Отд. биол. 1989. Т. 94. № 6. С. 76–78.
- Шауло Д.Н., Эрст А.С. Новый вид рода Водосбор (*Aquilegia* L., Ranunculaceae) из Тувы // Turczaninowia. 2010. Т. 13. № 3. С. 43–45.
- Шауло Д.Н., Эрст А.С. Новый вид *Aquilegia* (Ranunculaceae) из Западного Саяна, Северная Азия // Turczaninowia. 2011. Т. 14. № 3. С. 28–34.
- Bastida J., Alcantara J., Rey P. *et al.* Extended phylogeny of *Aquilegia*: the biogeographical and ecological patterns of two simultaneous but contrasting radiations // Plant Syst. Evol. 2010. V. 284. P. 171–185.
- Bender W., Spierer P., Hognes D.S., Chambon P. Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from Ace and rosy loci of *bithorax* loci in *Drosophila melanogaster* // J. Mol. Biol. 1983. V. 168. No 1. P. 17–33.
- Fior S., Li M., Oxelman B. *et al.* Spatiotemporal reconstruction of the *Aquilegia* rapid radiation through next-generation sequencing of rapidly evolving cpDNA regions // New Phytol. 2013. V. 198. No 2. P. 579–592.
- Fraser A.C. Studies on the Genus *Aquilegia*. N.Y., 1918. 98 p.
- Higgins D.G., Thompson J.D., Gibson T.J. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments // Methods Enzymol. 1996. V. 266. P. 383–402.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // J. Mol. Evol. 1980. V. 16. P. 111–120.
- Kramer E.M. *Aquilegia*: a new model for plant development, ecology, and evolution // Annu. Rev. Plant Biol. 2009. V. 60. P. 261–277.
- Kramer E.M., Hodges S.A. *Aquilegia* as a model system for the evolution and ecology of petals // Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. B. 2010. V. 365. P. 477–490.
- Munz P.A. *Aquilegia*: The cultivated and wild columbines // Gentes Herb. 1946. V. 7. P. 1–150.
- Nold R. Columbines: *Aquilegia*, *Paraquilegia* and *Semiaquilegia*. Portland, Timber Press, 2003. 192 p.
- Pallas P. *Aquilegia viridiflora* Pall. // Acta Acad. Scientiarum Imperialis Petropolitanae. 1779. V. 2. P. 260. pl. 11, f. 1.
- Prazmo W. Cytogenetic studies on the genus *Aquilegia*. III. Inheritance of the traits distinguishing different complexes in the genus // Acta Soc. Bot. 1965. V. 34. P. 403–437.
- Ro K.-E., McPherson B. Molecular phylogeny of the *Aquilegia* group (Ranunculaceae) based on internal transcribed spacers and 5.8S nuclear ribosomal DNA // Biochem. Syst. Ecol. 1997. V. 25. P. 445–461.
- Shauro D., Erst A. New taxa and taxonomic combination of the genus *Aquilegia* from Asia // Phytokeys. 2013. In press.
- Shaw J., Lickey E.B., Schilling E.E., Small R.L. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in Angiosperms: the tortoise and the hare III // Amer. J. Bot. 2007. V. 94. No. 3. P. 275–288.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N. *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. No. 10. P. 2731–2739.
- Taylor R.J. Interspecific hybridization and its evolutionary significance in the genus *Aquilegia* // Brittonia. 1967. V. 19. P. 374–390.
- Willdenow C. *Aquilegia atropurpurea* Willd. // Enumeratio Plantarum Horti Botanici Berolinensis. 1809. P. 577.

**PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS
AMONG SEVERAL NORTH-ASIAN SPECIES OF THE GENUS *AQUILEGIA*
ACCORDING TO VARIOUS MOLECULAR MARKERS**

A.S. Erst¹, O.V. Vaulin²

¹ Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: erst_andrew@yahoo.com;

² Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail:
oleg.v.vaulin@mail.ru

Summary

Molecular study of the nucleotide sequence of the *rpl32-trnL* spacer and the ITS1-ITS2 fragment of rRNA genes in eight species of the genus *Aquilegia* sampled in Northern Asia has shown that populations of *A. borodinii* and *A. jucunda* from various localities are genetically diverse. The results confirm that *A. viridiflora* and *A. atropurpurea* are genetically distant from other species studied. The relationship degrees among *A. aradanica*, *A. sibirica*, and *A. synakensis* have been determined. The hybrid origin of *A. jucunda* is proven.

Key words: *Aquilegia*, phylogeny, species, populations, molecular markers, *rpl32-trnL*, ITS1-ITS2.

УДК 634.11

ПРОГРАММЫ, МЕТОДЫ, ПРИЕМЫ СЕЛЕКЦИИ ЯБЛОНИ, ИХ РАЗВИТИЕ И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ

© 2013 г. **Е.Н. Седов**

ГНУ Всероссийский НИИ селекции плодовых культур Россельхозакадемии,
д. Жилина, Орловская область, Россия, e-mail: info@vniispk.ru

Поступила в редакцию 19 апреля 2013 г. Принята к публикации 8 июля 2013 г.

В статье показано, что на основе многолетнего изучения некоторых особенностей онтогенеза яблони стало возможным интенсифицировать селекционный процесс и сократить период создания сорта с 36–48 лет до 23–27 и даже 13–17 лет. Отмечается, что постоянно возрастают требования к новым селекционным сортам: они должны быть высокоадаптивны, скороплодны, урожайны, с плодами массой 140–160 г, с тонкой прочной кожицей без оржавленности и воскового налета, не осыпающиеся при полном вызревании, с содержанием сахаров не менее 12 % и аскорбиновой кислоты 30 мг/100 г, с лежкостью зимних сортов не менее 7–8 месяцев (Кичина, 2011). Создать идеальный сорт невозможно, так как требования к сортам изменяются быстрее, чем время, необходимое на его создание, но стремиться к этому следует.

В результате многолетней селекции на улучшение биохимического состава плодов удалось создать сорта с высоким содержанием Р-активных веществ (до 400–600 мг/100 г), но до сих пор не получено сортов с желаемым содержанием аскорбиновой кислоты: 25–30 мг/100 г.

В России создан ряд сортов, иммунных к парше (с геном V_f). Однако предстоит создать сорта на ди-генной основе с более длительной устойчивостью на основе сочетания генов V_f и V_r , V_f и V_m и т. д. Необходимо создать иммунные или высокоустойчивые сорта к мучнистой росе, а также к красному плодovому клещу, плодoжорке и др. Нужны сорта с комплексной устойчивостью к болезням и вредителям.

Селекция яблони на полиплоидном уровне во ВНИИСПК оказалась весьма перспективной и дала первые в России триплоидные сорта яблони, полученные от разнохромосомных скрещиваний типа $2x \times 4x$ и $4x \times 2x$, отличающиеся более регулярным плодоношением, высокой товарностью плодов и повышенной самоплодностью. Этот раздел селекции должен получить дальнейшее развитие.

Для интенсификации садоводства представляют интерес сорта колонновидной яблони, созданные во ВСТИСП, ВНИИГиСПР, ВНИИСПК и других научных учреждениях. Они ценны, прежде всего, в приусадебных и любительских садах. Селекционерам предстоит создать колонновидные, иммунные к парше, триплоидные сорта с высоким качеством плодов.

Большой интерес представляет перспектива развертывания селекции по созданию сортов для бесподвойной (корнесобственной) культуры яблони и самоплодных сортов с использованием безлепестных форм.

В связи с глобальным изменением климата возможны переоценка существующего сортимента яблони и появление новых задач в селекции.

Ключевые слова: яблоня, сорта, разделы селекции, программы, методы, приемы, биохимический состав, иммунитет к парше, полиплоидия, самоплодность, корнесобственная культура.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с интенсификацией садоводства и новыми требованиями к сортименту плодовых и ягодных культур на смену ведущим в прошлом

сортов приходят новые селекционные сорта. Так, по яблоне выходят в тираж или теряют свое моделирующее значение такие широкоизвестные сорта, сыгравшие свою положительную роль, как Антоновка обыкновенная, Пепин

шафранный, Синап северный, Бабушкино, Анис серый, Осеннее полосатое, Грушовка московская, Папировка и др.

В настоящей статье сделана попытка проследить изменения в программах, методах и приемах селекции яблони за последние 60 лет и обозначить наиболее перспективные приемы и направления в селекции яблони.

ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ОНТОГЕНЕЗА ЯБЛОНИ В СВЯЗИ С УСКОРЕНИЕМ СЕЛЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

Изучение на протяжении двух десятилетий на большом экспериментальном материале некоторых особенностей онтогенеза яблони в связи с селекцией показало, что позднее вступление сеянцев яблони в пору плодоношения связано с длительным ювенильным периодом. Возрастная разнокачественность по длине ствола наблюдается даже у взрослых (24–34-летних) сеянцев яблони, что выражается в наличии ювенильных признаков (сильная разветвленность, мелкие острозубреные листья, слабая их опушенность) у однолеток, когда в качестве прививочного материала использовались черенки с нижней части кроны, прикорневой поросли и однолеток, полученных из разных зон (по удаленности от ствола) корней. С возрастом вегетативно размноженных растений эти различия постепенно сглаживаются и к моменту плодоношения растения разных вариантов практически не отличаются.

Растения, выращенные из черенков прикорневой поросли, а также растения, полученные из корневой системы сеянцев, обычно вступают в плодоношение на 1–3 года позже, чем растения, выращенные из черенков верхней части кроны этих же сеянцев. Корневая система сеянцев яблони, хотя и медленнее, чем надземная часть, проходит определенные качественные изменения, связанные с индивидуальным развитием. Растения, полученные из адвентивных почек на корнях сеянцев яблони, как правило, к моменту плодоношения обладают всеми признаками, характерными для сорта (Седов, 2011). Растения же, полученные из адвентивных почек придаточных корней (выращенные из око-

ренных сортовых черенков), несмотря на то что несут ряд признаков «дикости», присущих ювенильным сеянцам, являются онтогенетически зрелыми организмами.

Твердо установлено, что прививка молодых 1–2-летних сеянцев яблони на любые (в том числе и карликовые) подвои не изменяет их наследственных качеств, но может в значительной степени ускорить селекционный процесс.

На основе результатов изучения некоторых особенностей онтогенеза нами совместно со многими селекционерами были разработаны приемы ускорения и интенсификации селекционного процесса яблони. При этом особое внимание было уделено подбору скороплодных родительских форм, прививке молодых сеянцев на слаборослые подвои, совмещению отдельных этапов селекции (собственно селекция, первичное изучение и государственное испытание). Экспериментально было показано, что период создания сорта яблони может быть сокращен с 36–48 лет до 23–27 и даже 13–17 лет.

Разработанные приемы совершенствования технологии выведения новых сортов плодовых культур вошли в рекомендации (Совершенствование ..., 1989) и включены в учебник для высших учебных заведений (Общая и частная селекция ..., 2004).

ТРЕБОВАНИЯ К НОВЫМ СОРТАМ ЯБЛОНИ

Задачи по созданию новых сортов постоянно изменяются и усложняются. В настоящее время к новым сортам предъявляются жесткие требования по силе и характеру роста дерева, устойчивости к болезням, скороплодности, продуктивности, товарным и потребительским качествам плодов, агротехническим приемам.

Стратегия селекции яблони предусматривает наличие в новом сорте следующих показателей (Цит. по: Кичина, 2011):

1. Адаптация для широкого ареала при достаточном региональном уровне зимостойкости.
2. Энергия развития – мощная.
3. Сила роста – карлики и полукарлики.
4. Габитус компактный, спуровый.
5. Иммуниетет к парше (ген V_f).
6. Иммуниетет к мучнистой росе (гены Pl_1 и Pl_2).

7. Высокая продуктивность при урожайности 70–90 т/га.
8. Скороплодность на уровне и выше самых скороплодных существующих сортов.
9. Плодоношение ежегодное.
10. Окраска плодов – яркая, красная, желтая, зеленая.
11. Форма плодов – округлая, сферическая.
12. Кожица плодов – тонкая, прочная, без оржавленности и воскового налета.
13. Диаметр плодов – 65–70 мм, масса – 140–160 г.
14. Вкус – сладкий, с кислинкой, pH – 3,6–3,8. Сахаров – 12–16 %.
15. Мякоть плодов – сочная, скалывающаяся, мелкозернистая.
16. Окраска мякоти – чисто-белая.
17. Сердечко – небольшое и компактное, семенная трубка закрытого типа.
18. Лежкость плодов зимних сортов – 7–8 мес. и более.
19. Сохраняемость плодов летних сортов после съема и зимних после изъятия из холодильника – 15–20 дней.
20. Содержание в плодах витамина С – на уровне 30 мг/100 г и выше.
21. Неосыпаемость плодов при полном вызревании.
22. Плоды не мельчают при перегрузке урожаем и ослаблении ухода.
23. Выход плодов товарной категории «экстра» – 80–90 %.
24. По срокам созревания – зимние, осенние, летние.

Очевидно, надо согласиться с В.В. Кичиной в том, что создать идеальный сорт невозможно, так как понимание идеального сорта довольно быстро меняется (Кичина, 2011), но стремиться к нему следует с учетом его назначения: десертный, консервный и т. д.

СЕЛЕКЦИЯ ЯБЛОНИ НА УЛУЧШЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ПЛОДОВ

Плоды, используемые в пищу, являются ценными источниками сахаров, органических кислот, пектинов, эфирных масел, аскорбиновой кислоты (витамина С) и биологически активных фенольных соединений (витамина Р).

И.В. Мичурин в 1930-е годы обратил внимание на возможность получения таких сортов, употребление плодов которых будет способствовать изменению тех или иных болезней. Им был получен сорт яблони Салицил-китайка, плоды которого предполагалось использовать для лечебных целей (Мичурин, 1948. Т. 3).

Целенаправленная крупномасштабная селекция яблони на повышенное содержание аскорбиновой кислоты в плодах во ВНИИСПК ведется с 1970 г. (Седов и др., 2007). Созданы и включены в Госреестр новые сорта с повышенным содержанием аскорбиновой кислоты в плодах (выше 15 мг/100 г) Пепин орловский, Куликовское, Масловское, Низкорослое, Ветеран, Ивановское и др. К сожалению, селекционерам Средней полосы России не удалось создать сорта яблони с содержанием в плодах не менее 25–30 мг/100 г аскорбиновой кислоты, что требуется по Комплексной программе селекции на 2001–2020 г. (2001 г.) Установлен ряд зависимостей накопления аскорбиновой кислоты от некоторых морфологических и биохимических признаков: низкая отрицательная связь – с массой плодов, средняя ($r = +0,41^{***}$) корреляция – с содержанием растворимых сухих веществ, а также слабая корреляционная связь между содержанием в плодах аскорбиновой кислоты и суммой сахаров ($r = 0,16^{**} - 0,28^{**}$).

Селекция яблони на повышенное содержание аскорбиновой кислоты имеет большие перспективы, так как внедрение в производство интенсивных высоковитаминных сортов позволяет увеличить пищевую и лечебно-профилактическую ценность плодов без дополнительных затрат невозполнимых источников энергии. Многие новые сорта яблони селекции ВНИИСПК (Орловская область, д. Жилина) характеризуются высоким содержанием (более 450–639 мг/100 г) Р-активных веществ в плодах: Афродита, Память Семякину, Яблочный спас, Августа, Кандиль орловский, Радость Надежды.

Из гибридного фонда отобрано 29 элитных сеянцев с содержанием в плодах Р-активных веществ более 450 мг/100 г. Все эти сорта и гибридные сеянцы в 2–2,5 раза превосходят новые требования к новым сортам, которые будут предъявляться к 2012 г. (Программа и методика селекции ..., 1995; Комплексная программа ...,

2001). Исключительно высоким содержанием Р-активных веществ в плодах (1460 мг/100 г) характеризуется сеянец 18-36-135 [Бабушкино × 12-19-47 (Неизвестный сеянец × Несравненное)], полученный от ступенчатого сложного скрещивания. Его плоды обладают высоким содержанием аскорбиновой кислоты (44,2 мг/100 г) (Седов и др., 2007).

СЕЛЕКЦИЯ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К БОЛЕЗНЯМ И ВРЕДИТЕЛЯМ

Приоритетным направлением в селекции яблони является создание сортов, устойчивых или иммунных к основным болезням и вредителям. И.В. Мичурин (1948) и Н.И. Вавилов (1964) считали селекцию наиболее радикальным средством борьбы с болезнями.

Для возделывания яблони в промышленных садах проводится от 5–6 до 15–20 и более опрыскиваний против болезней и вредителей различными химикатами, что требует больших финансовых затрат, а главное – серьезно ухудшает экологическую обстановку и ведет к обеднению биоразнообразия не только в садах, но и на прилегающих территориях, ухудшает санитарное качество плодов, делает продукцию менее ценной или даже вредной. Необходимо такой подход к использованию экосистем, такая их хозяйственная нагрузка, чтобы их эксплуатация не вела к потере способности восстановления (Грязев, 2006).

Парша (*Venturia inaequalis* (Ске. Wint)) – одно из самых вредоносных заболеваний яблони. Снижение урожая яблок в Средней полосе России от поражения паршой составляет не менее 40%, а в отдельные годы достигает от 70 до 80%. Различают вертикальную и горизонтальную устойчивость к парше. Вертикальная устойчивость определяется действием главных генов (олигогенов), а горизонтальная – малыми генами (полигенами). Селекция на горизонтальную устойчивость к парше ведется во всех селекционных учреждениях. Высокоустойчивые к парше сорта используются в качестве исходных форм. К таким сортам относятся: Бель розовая, Коммунарка, Нежное забайкальское, Пепин орловский, Ренет Черненко, Феникс и др.

При селекции на полевую устойчивость во ВНИИСПК создан ряд относительно устой-

чивых к парше сортов яблони: Память воину, Память Семякину, Синап орловский и др., которые включены в Госреестр селекционных достижений, допущенных к использованию.

Создание первых иммунных к парше сортов яблони связано с кооперативной программой PRI, в которой первоначально участвовали в США Университет Purdue (штат Индиана), Rutgers (Университет в Нью Джерси) и Университет в штате Иллинойс (Illinois). Начало программы относится к первым десятилетиям XX в.

К 2000 г. 18 иммунных к парше сортов яблони, содержащих ген V_f от восточноазиатского вида *Malus floribunda* 821, было создано при осуществлении программы PRI.

К настоящему времени в различных странах мира создано более 200 иммунных к парше сортов. В России пионером в селекции иммунных сортов яблони к парше с главным геном V_f является ГНУ ВНИИСПК Россельхозакадемии (Седов, Жданов, 1983; Жданов, Седов, 1991). К настоящему времени в этом институте создано более 30 иммунных к парше сортов яблони, 22 из которых уже включены в Госреестр (районированы), в том числе Имрус, Болотовское, Веньяминовское, Афродита, Свежесть, Солнышко, Орловское полесье и др. Созданы иммунные к парше сорта и в других учреждениях России: СКЗНИИСиВ, Крымской ОСС СКЗНИИСиВ, ВНИИГиСПР, ВСТИСП, ВНИИ люпина, ВНИИЦиСК, Свердловская селекционная станция садоводства, Кабардино-Балкарская ГСХА.

Потеря устойчивости некоторых зарубежных и отечественных сортов с геном V_f ставит задачу ускорения и интенсификации превентивной (опережающей) селекции на устойчивость к болезням. В связи с этим в предстоящие два десятилетия усилия селекционеров должны быть направлены на решение следующих задач:

- 1) расширение генетического разнообразия сортов по генам иммунности к парше;
- 2) выведение сортов, гомозиготных по генам V_f и V_r устойчивости к парше, с целью использования их в качестве доноров для увеличения выхода иммунных сеянцев и повышения уровня иммунитета;
- 3) создание сортов на дигенной основе иммунитета с сочетанием генов V_f и V_r , V_f и V_m , V_r и V_m ;
- 4) создание сортов на комплексной олигогенно-полигенной основе устойчивости.

Эти задачи отражены в Комплексной программе по селекции семечковых культур в России на 2001–2020 гг. (2001). Основным разработчиком раздела комплексной программы по созданию сортов яблони, устойчивых к болезням и вредителям, является доктор сельскохозяйственных наук В.В. Жданов.

Назрела необходимость форсировать создание сортов, устойчивых к другой широко распространенной и вредоносной болезни – мучнистой росе, а также устойчивых к наиболее распространенным вредителям: красному плодovому клещу (*Panonychus ulmi*), плодovожоркам (*Corporcapsa pomonella*) и др. Целесообразно широко развернуть исследования по селекции яблони на комплексную устойчивость к болезням и вредителям.

СЕЛЕКЦИЯ НА ПОЛИПЛОИДНОМ УРОВНЕ

Триплоидные формы яблони характеризуются, как правило, более регулярным плодоношением, более крупными и товарными плодами, повышенной самоплодностью. Еще в конце 30-х – начале 40-х годов XX в. шведский исследователь Нильсон-Эле был вдохновлен идеей селекции триплоидных сортов путем скрещивания диплоидных сортов с тетраплоидами (Nilsson-Ehle, 1938, 1944). Другой шведский ученый Д. Айнсет (Einset, 1947) впервые показал, что среди сеянцев от свободного опыления диплоидных сортов Делишес, Мекауна, Кортланд и Мекинтош можно отобрать 0,3 % триплоидных сеянцев, тогда как в то время около 25 % промышленных сортов США являлись спонтанными триплоидами. Это дало основание сделать заключение о том, что триплоидные сеянцы в селекционном отношении более ценны, чем диплоидные. Уже к 1943 г. были известны тетраплоидные спорты (клоны) сортов Мекинтош, Онтарио, Папировка и Уэлси. Эти формы не представляли интереса для их использования в производстве, как правило, из-за низкого качества плодов, сильнорослости деревьев и их меньшей зимостойкости в сравнении с их диплоидными аналогами. Перспективе селекции яблони на полиплоидном уровне уже тогда придавали большое значение. Отмечалось даже, что развитие этого направления следует считать

как вступление в новую эру селекции яблони (Einset, 1947; Dermen, 1951). Шведские ученые ставили задачу: от систематических скрещиваний тетраплоидных сортов с диплоидами получить новые триплоидные сорта, отвечающие производственным требованиям (Nilsson, 1947). Однако в дальнейшем эти работы в Швеции не получили должного развития.

Начало селекции яблони на полиплоидном уровне в России во ВНИИСПК положено в 1970 г. (Седов, 1981, 1983; Седов, Седышева, 1985; Седышева, Седов, 1994). Работа проводилась совместно с лабораторией цитогенетики (зав. лаб. д.с.-х.н. Г.А. Седышева). Общий объем скрещиваний с целью селекции на полиплоидном уровне за 40 лет составил 634 тыс. цветков по 446 комбинациям скрещиваний. От гибридизации получено 118 тыс. сеянцев и выращено 42,2 тыс. однолетних сеянцев.

В качестве доноров диплоидных гамет использовались следующие тетраплоидные сорта: Альфа-68 (4x), Мекинтош тетраплоидный (4x), Мелба тетраплоидная (4x), Спартан тетраплоидный (4x); тетраплоидные химеры: Антоновка плоская (2-4-4-4x), Джаент Спай (2-4-4-4x), Папировка тетраплоидная (2-4-4-4x), Уэлси тетраплоидный (2-4-4-4x), а также ряд тетраплоидных гибридных сеянцев (4x). Наиболее перспективными типами скрещиваний для получения триплоидных сеянцев оказались скрещивания $4x \times 2x$ и $2x \times 4x$. Определение плоидности у гибридов от скрещиваний типа $4x \times 2x$, по данным Г.А. Седышевой, показало, что 55,13 % из них триплоиды, а при скрещивании $2x \times 4x$ триплоидных было 69,5 % сеянцев (Седов, 2011).

Учеты, проведенные В.В. Ждановым, показали, что наблюдается определенная тенденция повышения устойчивости к парше у триплоидных сеянцев по сравнению с диплоидными. Только в 2 семьях из 15 триплоидные сеянцы оказались сильнее поражены паршой, чем диплоидные. У остальных 13 семей средний балл поражения паршой при искусственном заражении у триплоидных сеянцев был на 0,1–1,0 балла ниже, чем у диплоидных из той же комбинации скрещиваний. К настоящему времени от разнохромосомных скрещиваний ($2x \times 4x$ и $4x \times 2x$) впервые в России получено 15 триплоидных сортов, из которых 8 уже включены в Госреестр (районированы): Ав-

густа, Александр Бойко, Бежин луг, Дарёна, Масловское, Орловский партизан, Осиповское, Яблочный Спас. 4 триплоидных сорта, полученных от скрещивания диплоидных сортов, также районированы: Низкорослое (Скрыжапель × Пепин шафранный), Память Семакину (Уэлси × 11-24-28), Рождественское (Уэлси × ВМ 41497) и Юбиляр (814 – свободное опыление).

Многолетние исследования показали высокую эффективность селекции яблони на полиплоидном уровне. Так, для получения одного районированного сорта при скрещивании на диплоидном уровне за период 1970–2007 гг. опылялось 86,6 тыс. цветков и выращивалось 16,7 тыс. однолетних сеянцев, а на полиплоидном уровне – только 46,2 тыс. цветков и 2,9 тыс. однолетних сеянцев (почти в 6 раз меньше).

Полученные данные убедительно свидетельствуют о высокой эффективности селекции яблони на полиплоидном уровне. Совершенно очевидно, что селекция на полиплоидном уровне имеет большие перспективы. Исключительный интерес представляет совмещение в генотипе одного сорта триплоидии и иммунитета к парше. К настоящему времени создано 9 сортов, обладающих иммунитетом к парше (ген V_f) и триплоидным набором хромосом. Из них 7 получено от гетероплоидных скрещиваний типа $2x \times 4x$, у которых один родитель является донором иммунитета к парше (ген V_f) и второй – донором диплоидных гамет (тетраплоид).

Продолжают оставаться актуальными вопросы выявления спонтанных и создания путем гибридизации новых тетраплоидных исходных форм – доноров диплоидных гамет, а также получение нередуцированной пыльцы путем использования воздействия на мейоз физическими и химическими средствами, вопросы изучения эмбриональных структур генеративной сферы полиплоидных форм и разработка экспресс-методов для идентификации полиплоидов как в селекционной школке, так и в селекционном саду.

СЕЛЕКЦИЯ КОЛОННОВИДНЫХ СОРТОВ ЯБЛОНИ ДЛЯ ИНТЕНСИВНЫХ САДОВ

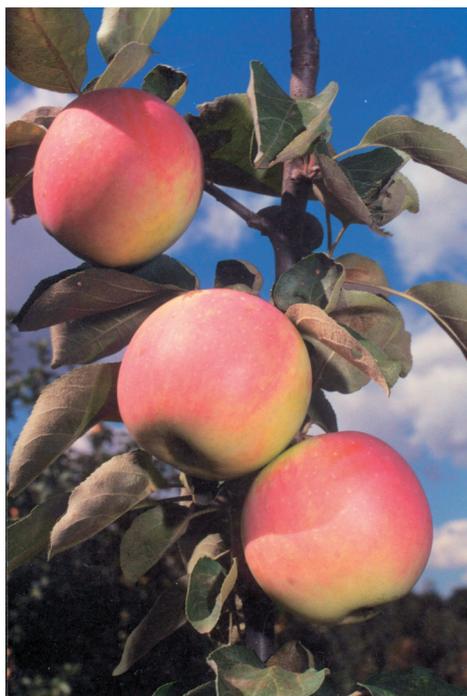
Возделывание колонновидных сортов яблони, относящихся к новой биологической форме растений, имеет целый ряд преимуществ. Эти

сорта дают возможность уже на 3–5-й год после закладки сада получать существенный урожай, который невозможно получать в обычном интенсивном саду, упрощают уход, сокращают или исключают работы по обрезке и формированию кроны деревьев, сокращают объем ручного труда на единицу продукции, позволяют создать более комфортные условия для работы в саду.

В колонновидном саду имеется и целый ряд нерешенных проблем. Одним из главных недостатков для создания суперинтенсивного сада колонновидных сортов по классической схеме закладки с размещением деревьев $1 \text{ м} \times 0,5 \text{ м}$ или $1 \text{ м} \times 0,4 \text{ м}$ являются огромные затраты на посадочный материал (Седов и др., 2013).

История происхождения колонновидных форм яблони такова. В 1964 г. в Канаде, в селении Келовна (провинция Британская Колумбия), хозяин яблоневого сада на 50-летнем дереве сорта Мекинтош обнаружил необычно большую ветвь, похожую на палку, так как она была почти без боковых разветвлений и вся покрыта кольчатками и копыцами с большим числом яблок. Хозяин сада показал эту ветвь селекционеру местной опытной станции К. Лапинсу. По договоренности с хозяином эту необычную спонтанную мутацию размножили и назвали Ваяк (Wijcik) (Кичина, 1985, 1996). Из-за недостаточной урожайности и качества плодов Мекинтош «Ваяк» не получил широкого распространения как промышленный сорт, но стал исходной формой для селекции. Мекинтош «Ваяк» характеризуется слаборослостью, короткими и толстыми междоузлиями, высокой облиственностью.

В России пионером селекции колонновидных сортов яблони стал профессор В.В. Кичина. Он использовал пыльцу сорта Ваяк в скрещивании с Коричным полосатым, а в дальнейшем полученные гибриды – с другими сортами. Совместно с Н.Г. Морозовой были получены колонновидные сорта Валюта, Малюха, Президент, Останкино, Васюган и др. Большую работу по селекции и оценке колонновидных сортов проводит М.В. Качалкин (2001, 2004, 2008). Колонновидные сорта Московское ожерелье и Янтарное ожерелье селекции М.В. Качалкина уже включены в Госреестр. Проходят государственное испытание колонновидные сорта яблони селекции Всероссийского НИИ генетики и селекции плодовых растений (Готи-



Августа (Орлик × Папировка тетраплоидная).



Патриот (16-37-63 × 13-6-106(4x)).



Александр Бойко (Прима × Уэлси тетраплоидный).



Орловский партизан (Орлик × 13-6-106(4x)).



Осиповское (Мантет × Папировка тетраплоидная).



Масловское (Редфри × Папировка тетраплоидная).

ка, Стела, Стрела) (Савельев, 1995; Савельев и др., 2009), сорта, созданные в Башкирии (Ахтям Мансуров, Урал Тау и Кызыл Маяк (Мансуров, 2011)). Ведется селекция колонновидных сортов в Кабардино-Балкарии (Шидаков и др., 2012). Целенаправленная селекционная работа по созданию колонновидных форм яблони ведется во Всероссийском НИИ селекции плодовых культур с 1984 г. Создано и выделено в элиту 8 сортов, получивших рабочие названия: Восторг, Гирлянда, Зеленый шум, Есения, Память Бlynского, Поэзия, Приокское, Созвездие, из которых Поэзия и Приокское проходят государственное испытание (Седов и др., 2013). Нами проведено изучение возможности выращивания колонновидных сортов в кроне полукарликового подвоя 3-4-98. В саду двулетние деревья подвоя 3-4-98 окулировались в год посадки в основания основных боковых ветвей и проводника колонновидными сортами. На каждом дереве выросло от 5 до 9 колонновидных ветвей. Общее количество колонновидных ветвей зависело от плотности размещения деревьев-скелетообразователей и от особенностей сорта и составляло от 9,3 тыс. у сорта Поэзия при схеме 3 м × 2 м до 30 тыс. у сорта Восторг при схеме размещения 3 м × 1 м, т. е. не меньше, чем при стандартном выращивании колонновидных сортов на карликовом подвое при схеме посадки 1 м × 0,5 м. Урожайность сорта Приокское в среднем за 4 года (начиная с 3-го года после посадки) составила 187,5 ц/га, а на 6-й год урожайность была 423,3 ц/га.

Колонновидные сорта на скелете полукарликового подвоя 3-4-98 вступали в плодоношение уже на 3-й год после окулировки. На 6-й год после окулировки все затраты на закладку сада по схемам 3 м × 1 м и 3 м × 1,5 м окупились и была получена прибыль. Рентабельность выращивания ябллок этим способом была от 200 до 400 % в зависимости от сорта (Седов и др., 2013).

В перспективе предстоит создать колонновидные, иммунные к парше, триплоидные сорта яблони.

В заключение следует отметить, что возделывание колонновидных садов позволяет сократить пестицидную нагрузку в саду, создает более комфортные условия труда и показывает высокую экономическую эффективность производства плодов.

БЕСПОДВОЙНАЯ (КОРНЕСОБСТВЕННАЯ) КУЛЬТУРА ЯБЛОНИ. СЕЛЕКЦИЯ НА КОРНЕГЕНЕЗ

Яблоня традиционно размножается путем прививки на семенной или клоновый подвой. Другой путь размножения – на собственных корнях, который исключает процесс прививки на подвой.

Еще в 30-е годы прошлого столетия в Институте плодоводства им. И.В. Мичурина (ныне Всероссийский НИИ садоводства им. И.В. Мичурина) была показана возможность массового размножения мичуринских сортов яблони при помощи горизонтальных отводков (Шуб, 1937). В 1936–1940 гг. в Казахском НИИ плодоводства и виноградарства были проведены опыты по сравнительной оценке корнесобственной и привитой культуры яблони. Было установлено, что по основным показателям состояния и продуктивности корнесобственные насаждения яблони не уступают садам на семенных подвоях, но по размерам корнесобственные деревья были на 25–30 % меньше (Раузин и др., 2009). Кроме умеренного роста появилось и другое достоинство корнесобственной культуры – способность деревьев к восстановлению после суровых зим.

Большая работа по селекции яблони на корнегенез была проведена на Млеевской опытной станции (ныне Институт помологии им. Л.П. Симиренко) (Чупринюк, 1994, 1995). В селекционном питомнике и в саду по корнеобразованию и бороздчатым вздутиям – бернотам – было отобрано 2,4 тыс. семян.

Ученые ТСХА им. К.А. Тимирязева показали, что для выращивания саженцев яблони на собственных корнях и привитых затрачивается одинаковое время (Маслова, Скалий, 1985; Маслова и др., 2005).

Показаны следующие особенности корнесобственной культуры яблони:

- 1) более полное проявление сортовых качеств;
- 2) способность деревьев восстанавливаться при зимних повреждениях за счет поросли;
- 3) исключение создания подвойных маточников;

4) возможность выращивать на участках с более поверхностным залеганием грунтовых вод, так как корневая система у корнесобственных растений более поверхностная (Маслова, Скалий, 1985; Исачкин, Кулямзин, 2011).

Эти же авторы показали, что ряд известных сортов яблони способны давать высокий процент окоренения зеленых черенков (на уровне лучших клоновых подвоев).

Преимущество корнесобственной яблони проявляется в зоне рискованного плодоводства (Маслова и др., 1997).

Создание сортов яблони, пригодных для корнесобственной культуры и обладающих всеми необходимыми другими хозяйственно-биологическими качествами, начато во ВНИИСПК в 1984 г., когда было получено от научного сотрудника Млеевской опытной станции В.Я. Чупринюка пять гибридов с хорошо окореняющимися черенками. В 1989 г. после вступления этих гибридов в пору плодоношения нами были проведены скрещивания четырех из них с нашими иммунными к парше сеянцами (с геном V_f), а также зимостойкого сорта Боровинка с легкоукореняемой формой. Всего по 5 комбинациям скрещивания было опылено 5,5 тыс. цветков, выращено 1160 однолетних сеянцев и после бравок в селекционный сад № 27 высажено 158 растений, из которых к настоящему времени сохранилось 136.

Предстоит изучить лучшие по качеству плодов сеянцы на окореняемость.

В другом опыте нами сделана попытка предварительной оценки способности иммунных к парше гибридных сеянцев яблони к окоренению по наличию на них бородавчатых вздутий – бернотов (Седов, Серова, 2011). У сеянцев кроме наличия бернотов оценивалось также качество плодов (масса, внешний вид и вкус). Берноты на ветвях деревьев развиваются из скрытых придаточных корней, которые образуются снаружи от камбия и сердцевидных лучей. Наличие бернотов свидетельствует о возможности возникновения придаточных корней и степени окореняемости растений (Цуркан, 1990). Наибольшее количество (9,4 и 10,7 %) сеянцев с бернотами получено в семьях № 4204 [22-40-98 (814 × Мекинтош тетраплоидный) – свободное опыление] и 4071 [R 12740-7A – свободное опыление] × 7-1-112 (Голден Грайма – свободное

опыление)]. У всех изученных сеянцев один из родителей обладал иммунитетом (гены V_f и V_r). Среди сеянцев с бернотами выделены лучшие по качеству с массой плодов от 100 до 140 г, с внешним видом плодов от 4,0 до 4,3 балла и вкусом – от 3,7 до 3,9 балла.

Приведенные собственные экспериментальные данные и литературные сведения свидетельствуют о том, что селекция яблони на корнегенез перспективна и может стать самостоятельным разделом.

СЕЛЕКЦИЯ НА САМОПЛОДНОСТЬ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕЗЛЕПЕСТНЫХ ФОРМ ЯБЛОНИ

подавляющее количество промышленных сортов яблони является самобесплодными и для нормального плодоношения требует совместной посадки с сортами-опылителями, что создает определенные организационные трудности. В условиях ухудшения экологической обстановки в саду, более плотного размещения деревьев, ухудшения обеспеченности насекомыми-опылителями создание самоплодных или хотя бы частично самоплодных сортов особенно актуально.

Наши предварительные данные, нуждающиеся в перепроверке, свидетельствуют о том, что предположение о существенном повышении самоплодности у инбредных сеянцев яблони не оправдалось.

И.П. Елисеев (1979) в своих работах указывал на заманчивую перспективу создания хозяйственно ценных безлепестных сортов, позволяющих закладывать односортовые насаждения, которые не нуждаются в сортах-опылителях и в наличии насекомых, обеспечивающих опыление. Он считал, что безлепестные яблони должны стать важным объектом для дальнейшего изучения. В отечественной литературе первое описание безлепестной яблони сделано русским помологом А.Т. Болотовым в его известном труде «Изображение и описание разных пород яблок и груш, родящихся в Дворяниновских, а отчасти и в других садах» (Болотов, 1952). Безлепестные яблони описывались В.В. Пашкевичем (1930), С.Ф. Черненко (1953, 1957) и другими авторами. Ч. Дарвин (1941), ссылаясь на литературные источники 1825 и 1830 гг., также давал описа-

ние безлепестной яблони. В дальнейшем безлепестные формы яблони интересовали многих пловодов, ученых и практиков.

Безлепестные яблони разделяют на три группы. В первую группу входят формы, которые цветут, но не завязывают плоды, ко второй группе относятся формы, завязывающие плоды только при условии принудительного опыления чужой пылью, и растения третьей группы дают партенокарпические или апомиктические плоды. Именно последняя группа безлепестных яблонь представляет практический интерес для селекции (Пономаренко, 1980).

Начиная с 1985 г. нами проводился сбор и закрепление в генетической коллекции ВНИИСПК безлепестных форм яблони.

В плодах безлепестных форм яблони содержалось от 0,1 до 5,0 нормально развитых семян на 1 плод при свободном опылении и от 0 до 3,7 – при искусственном опылении.

Начиная с 1990 г., по мере вступления безлепестных яблонь в плодоношение, проводили скрещивания их с иммунными к парше сортами и гибридными сеянцами ВНИИСПК. Общий объем гибридизации за 1990–2004 гг. составил 58 тыс. цветков. От искусственной гибридизации получено 4590 нормально развитых семян, выращено 2744 однолетних сеянца, из которых 380 высажено в сад. Отобрано по качеству плодов 4 сеянца, из которых у 3 частичная самоплодность проявилась при естественном или искусственном опылении. Два сеянца от безлепестных форм по качеству плодов уже включены в отборные. Предстоит изучить самоплодность этих сеянцев.

Большой практический интерес представляет возможность отобрать из гибридных сеянцев кандидаты в сорта, обладающие безлепестностью или с нормальными цветками, но хорошо завязывающие плоды без опыления. Несомненно, большой интерес представляет также увеличение самоплодности за счет повышения плоидности у новых сортов. Наши данные убедительно указывают на высокую самоплодность у ряда тетраплоидных сортов по сравнению с диплоидными аналогами и повышенную самоплодность у триплоидных сортов.

Говоря о задачах селекции на перспективу, следует отметить, что глобальное изменение климата может привести к переоценке существ-

ующих сортов яблони и к возникновению новых задач в селекции.

Практическим результатом крупномасштабной селекционной работы за 60 лет во ВНИИСПК является создание более 70 сортов яблони разного срока созревания, из которых 43 уже включены в Госреестр селекционных достижений, допущенных к использованию (районированы), в том числе 19 иммунных к парше и 9 первых триплоидных сортов, полученных от разнохромосомных скрещиваний.

ЛИТЕРАТУРА

- Болотов А.Т. Изображение и описание разных пород яблок и груш, родящихся в Дворяниновских, а отчасти и в других садах (Рисованы и описаны Андреем Болотовым в Дворянинове с 1797 по 1801 гг.) // Избр. соч. по агрономии, плодководству, лесоводству, ботанике. М.: МОИП, 1952. С. 241–277.
- Вавилов Н.И. Проблемы иммунитета культурных растений // Избр. тр. в 5 т. Т. 4. М.; Л.: Наука, 1964. 518 с.
- Грязев В.А. Планета Земля нуждается в исцелении. Ростов на Дону, 2006. 212 с.
- Дарвин Ч. Изменение животных и растений в домашнем состоянии. М.: Сельхозгиз, 1941. 247 с.
- Елисеев И.П. К вопросу о происхождении, полиморфизме и эволюционном значении безлепестных форм яблони // Тр. Горьк. СХИ. 1979. Т. 136. С. 101–120.
- Жданов В.В., Седов Е.Н. Селекция яблони на устойчивость к парше. Тула: Приокск. кн. изд-во, 1991. 2008 с.
- Исачкин А.В., Кулямзин Е.А. Некоторые вопросы перспективности селекции сортов яблони на ризогенез // Садоводство и виноградарство. 2011. № 3. С. 23–27.
- Качалкин М.В. Использование колонновидных сортов яблони в суперинтенсивных насаждениях // Изв. ТСХА. М., 2001. Вып. 4. С. 134–140.
- Качалкин М.В. Корнесобственная культура колонновидной яблони // Садоводство и виноградарство. 2004. № 2. С. 14–16.
- Качалкин М.В. Колонны, которые плодоносят. М., 2008. 32 с.
- Кичина В.В. Доноры компактной колонновидной кроны яблони // Садоводство. 1985. № 4. С. 24–25.
- Кичина В.В. Принципы улучшения садовых растений. М., 2011. 528 с.
- Кичина В.В. Сады колонновидных форм яблони // Плодководство и ягодоводство России: Сб. науч. работ. М., 1996. Т. 3. С. 147–156.
- Комплексная программа по селекции семечковых культур в России на 2001–2020 гг. // Постановление Муждунар. науч.-метод. конф. «Основные направления и методы селекции семечковых культур». Орел, 2001. 31 с.
- Мансуров Г.А. Селекция колонновидных сортов яблони в Башкортостане // Сады будущего: Сб. матер. междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию со дня рожд. В.И. Будаговского. Мичуринск-наукоград, 2011. С. 165–168.

- Маслова В.А., Лунькова В.М., Исачкин А.В., Хаджиян И.И. Изучение закономерностей наследования способности к регенерации придаточных корней у зеленых черенков гибридов яблони F₁ // Изв. ТСХА. 2005. Вып. 4. С. 74–82.
- Маслова В.А., Скалий Л.П. Особенности роста укорененных зеленых черенков яблони // Проблемы вегетативного размножения в садоводстве: Сб. науч. тр. М., 1985. С. 32–39.
- Маслова В.А., Лунькова В.М., Хаджиян И.И. Сравнительное изучение корнесобственной яблони из зеленых черенков и привитой на сеянцы Антоновки обыкновенной и парадизку В 9 // Изв. ТСХА, 1997. Вып. 3. С. 132–147.
- Мичурин И.В. Сочинения. Т. I–IV. М., 1948.
- Общая и частная селекция и сортоведение плодовых и ягодных культур / Под ред. Г.В. Еремина. М.: Мир, Колос, 2004. 422 с.
- Пашкевич В.В. Общая помология или учение о сортах плодовых деревьев. Л.; М.: Госиздат, 1930. С. 29.
- Пономаренко В.В. К уточнению происхождения систематики и морфологии безлепестных яблонь // Бюл. ВНИИР. 1980. № 103. С. 14–18.
- Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур / Под ред. Е.Н. Седова. Орел: ВНИИСПК, 1995. 504 с.
- Раузин Е.Г., Харламова Т.А., Долгих С.Г. Корнесобственная культура плодовых растений // Тр. Каз. НИИ пловодства и виноградарства. 2009. С. 7–10.
- Савельев Н.И. Наследование компактности в потомствах яблони, полученных с участием компактных форм и сортов типа спур // Бюл. науч. инф. ВНИИГиСПР. 1995. Вып. 52. С. 6–10.
- Савельев Н.И., Савельева Н.Н., Савельева И.Н. Особенности роста колонновидных сортов и форм яблони в зависимости от генотипа и подвоя // Создание адаптивных интенсивных яблоневых садов на слаборослых вставочных подвоях: матер. междунар. науч.-практ. конф. Орел: ВНИИСПК, 2009. С. 114–117.
- Седов Е.Н. Селекция и новые сорта яблони. Орел: ВНИИСПК, 2011. 624 с.
- Седов Е.Н., Макаркина М.А., Левгерова Н.С. Биохимическая и технологическая характеристика плодов генофонда яблони. Орел: ВНИИСПК, 2007. 310 с.
- Седов Е.Н., Корнеева С.А., Серова З.М. Колонновидная яблоня в интенсивном саду. Орел: ВНИИСПК, 2013. 64 с.
- Седов Е.Н. Основные направления и методы селекции яблони // Селекция яблони в СССР: Сб. ст. Орел, 1981. С. 14–27.
- Седов Е.Н., Серова З.М. Отбор гибридов яблони с бернотами как предварительный этап их возможной способности к корнеобразованию // Аграрный вестн. Урала. 2011. № 6 (85). С. 52–53.
- Седов Е.Н., Седышева Г.А. Роль полиплоидии в селекции яблони. Тула: Приокск. кн. изд-во, 1985. 146 с.
- Седов Е.Н., Жданов В.В. Устойчивость яблони к парше (сорта и селекция). Орел: Приокск. кн. изд-во, 1983. 116 с.
- Седов Е.Н. Яблоня // Достижения селекции плодовых культур и винограда. М.: Колос, 1983. С. 23–52.
- Седышева Г.А., Седов Е.Н. Полиплоидия в селекции яблони. Орел: ВНИИСПК, 1994. 272 с.
- Совершенствование технологии выведения новых сортов плодовых культур, их испытания и внедрение в производство (рекомендации). М.: ВО «Агропромиздат», 1989. 17 с.
- Цуркан И.П. Берноты // Садоводство. Энциклопедия. Кишинев: Гл. ред. Молд. Сов. Энциклопедии, 1990. Т. 1. С. 134.
- Черненко С.Ф. Безлепестная яблоня // Природа. 1953. № 12. С. 105–108.
- Черненко С.Ф. Яблоня с безлепестными цветками // Полвека работы в саду. М.: Гос. изд-во с.-х. лит-ры, 1957. С. 144–148.
- Чупринюк В.Я. Корнегенез в селекции яблони домашней // Посадочный материал для интенсивных садов. Варшава, 1994. С. 71–72.
- Чупринюк В.Я. Селекция яблони на корнегенез // Последователи Л.П. Симиренко – садоводству Украины: Сб. науч. тр. к 140-летию Л.П. Симиренко. Черкассы, 1995. С. 22–31.
- Шидаков Р.С., Шидакова А.С., Эржибов А.Х. Селекция яблони на колонновидную форму кроны в предгорьях Северного Кавказа // Плодоводство и яговодство России: Сб. науч. работ. М., 2012. Т. 34. Ч. 2. С. 386–391.
- Шуб Д.Б. Выращивание корнесобственных деревьев мичуринских сортов // Плодоовощное хозяйство. 1937. № 6. С. 32–36.
- Dermen H. Tetraploid and diploid adventitious shoots from a giant sport of McIntosh apple // J. Hered. 1951. V. 42. P. 144–149.
- Einset J. Apple breeding enters a new era // Fm Res. N.Y., 1947. V. 13. No. 2. P. 5.
- Nilsson F. Practical results from fruit tree breeding // Svensk. JordbrForsk. 1947. P. 109–119.
- Nilsson-Ehle H. Production of tetraploid apples and their significance for practical apple breeding in Sweden // Hereditas. 1938. V. 24. P. 195–209.
- Nilsson-Ehle H. Some new information about tetraploid apple varieties and their use and role in the breeding of fruit trees // Sverig. Pomol. Fören Årsskr. 1944. P. 229–237.

APPLE BREEDING PROGRAMS AND METHODS: THEIR DEVELOPMENT AND IMPROVEMENT

E.N. Sedov

All Russia Research Institute of Fruit Crop Breeding, Russian Academy of Agricultural Sciences,
Zhilina, Orel oblast, Russia, e-mail: info@vniispk.ru

Summary

Long-term studies of apple development features allowed breeding intensification and shortening of the time of cultivar development from 36–48 years to 23–27 or even 13–17 years. It is noted that requirements for cultivar are constantly toughened. They include high fitness, early maturation, performance, large size of fruits (140–160 g), thin and firm skin without rust signs or waxing; absence of abscission, sugar content no less than 12 %, ascorbic acid content about 30 mg/100 g. The preservation capacity of winter varieties must be no less than 7–8 months (Kichina, 2011). A perfect cultivar is impossible, because cultivar requirements change faster than the time required for breeding, but we should aspire to it.

As a result of long-term breeding for the improvement of fruit biochemical composition, we managed to raise cultivars with high contents of P-active substances (up to 400–600 mg/100 g), but cultivars with the desirable content of ascorbic acid 25–30 mg/100 g have not been developed so far.

A number of apple cultivars resistant to scab (bearing the V_f gene) have been developed in Russia. However, it is in prospect to develop cultivars with longer resistance on a digenic base combining genes V_f and V_r , V_f and V_m , etc. It is necessary to create cultivars immune and highly resistant to powdery mildew, European red mite, apple moth, and other pests. We need apple cultivars with multiple resistance to pests and diseases.

Apple breeding on a polyploidy level at the Institute of Fruit Crop Breeding proved to be quite promising. For the first time in Russia, triploid apple cultivars were obtained from different chromosome crossings $2x \times 4x$ and $4x \times 2x$. They are notable for more regular fruit-bearing, high marketability of fruit and higher autogamy. This direction in breeding must be developed in the future.

Columnar apples developed at Russian research institutes are of interest for fruit-growing intensification. They are valuable in amateur gardens, first of all. Breeders have to develop columnar, scab-resistant and triploid apple cultivars with high quality fruit.

In the future, breeding should be aimed at developing cultivars for true-rooted apple and autogamous cultivars with the use of apetalous plants.

With regard to the global climate warming, it may become necessary to revise the range of apple varieties and directions in breeding.

Key words: apple, cultivars, directions of breeding, programs, methods, biochemical composition, scab immunity, polyploidy, autogamy, true-rooted crop.

УДК 634.11:631.52:576.356.5

СЕЛЕКЦИОННАЯ ОЦЕНКА ГЕТЕРОПЛОИДНЫХ СКРЕЩИВАНИЙ ПРИ СОЗДАНИИ ТРИПЛОИДНЫХ СОРТОВ ЯБЛОНИ

© 2013 г. **Е.Н. Седов, Г.А. Седышева, З.М. Серова, Н.Г. Горбачева, С.А. Мельник**

ГНУ Всероссийский НИИ селекции плодовых культур Россельхозакадемии,
Орловская область, Орловский район, Россия,
e-mail: info@vniispk.ru

Поступила в редакцию 6 февраля 2013 г. Принята к публикации 2 апреля 2013 г.

40-летняя работа по селекции яблони на полиплоидном уровне показала, что для надежного планомерного получения триплоидных сортов наиболее перспективными являются скрещивания типа $2x \times 4x$ и $4x \times 2x$.

Цитологический контроль позволяет констатировать, что реципрокные комбинации неравнозначны по выходу семян разной плоидности. В скрещиваниях типа $2x \times 4x$ выход триплоидных семян выше, чем в скрещиваниях типа $4x \times 2x$. Причина заключается в разной степени самоплодности исходных тетраплоидных форм – при опылении некастрированных цветков высокосамоплодные формы предпочтительнее опыляются своей пылью. Для получения большего числа триплоидных растений в скрещиваниях типа $4x \times 2x$ необходима предварительная кастрация цветков этих форм. В статье дана производственно-биологическая характеристика 8 триплоидных сортов яблони, обладающих более регулярным плодоношением и высокой товарностью плодов.

Ключевые слова: яблоня, селекция, сорта, полиплоидия, гетероплоидные скрещивания.

В связи с высокой негативной нагрузкой антропогенных и техногенных факторов на окружающую среду и ухудшением экологической обстановки в целом на планете снижается устойчивость большинства сортов яблони. Этим объясняется необходимость постоянного совершенствования существующего сортимента яблони. Использование полиплоидии в селекции яблони наряду с традиционными методами открывает большие возможности для создания новых высокоадаптивных сортов с хозяйственно ценными свойствами, пригодных для возделывания в садах интенсивного типа.

Селекция яблони на полиплоидном уровне во Всероссийском НИИ селекции плодовых культур (ранее Зональной плодово-ягодной опытной станции) начата в 1970 г. (Седов, Седышева, 1979; Седов, 1981). Общий объем скрещиваний с целью селекции на полиплоидном уровне за 40 лет составил 639 тыс. цветков по 446 комбинациям скрещиваний. От гибридизации получено

118093 семени и выращено 42212 однолетних семян.

За период 1970–2010 гг. осуществлены следующие типы скрещиваний: $4x \times 4x$; $4x \times 3x$; $3x \times 4x$, $4x \times 2x$; $2x \times 4x$; $3x \times 3x$; $3x \times 2x$; $2x \times 3x$. Общие результаты гибридизации с использованием исходных сортов яблони разных уровней плоидности представлены в табл. 1.

При проведении исследований руководствовались общепринятыми методиками (Программа и методика сортоизучения ..., 1973, 1999; Программа и методика селекции ..., 1980, 1995).

Плоидность гибридных семян определяли подсчетом хромосом на временных давленных препаратах, приготовленных пропионолактоидным методом в нашей модификации (Каптарь, 1967; Седышева, 1990). Регулярный цитологический контроль при скрещивании разнохромосомных форм был начат в 1977 г. Общий объем и результаты цитологического

Таблица 1

Общие результаты гибридизации с использованием исходных сортов яблони разных уровней пloidности (1970–2010 гг.)

Типы скрещиваний ♀ + ♂	Опылено цветков, шт.	Снято плодов		Получено семян		Выращено однолетних сеянцев, шт.
		Кол-во, шт.	к опыленным цветкам, %	Кол-во, шт.	на 1 плод	
4x × 4x	11875	632	5,3	990	1,6	372
4x × 3x	1363	15	1,1	23	1,5	4
3x × 4x	5269	168	3,2	315	1,9	64
4x × 2x	97564	3966	4,1	11550	2,9	4228
2x × 4x	461810	26126	5,7	99393	3,8	35599
3x × 3x	1890	0	0	0	0	0
3x × 2x	19590	1460	7,5	3981	2,7	704
2x × 3x	39564	324	0,8	1841	5,7	1241
По всем типам скрещивания полиплоидных форм						
	638925	32691	5,1	118093	3,6	42212
От скрещивания между собой диплоидных сортов (2x × 2x)						
2x × 2x*	146509	12637	8,6	80355	6,4	28043

* Для сравнения взяты данные от скрещиваний между собой диплоидных сортов (2x × 2x) за 2003–2005 гг.

контроля в скрещиваниях разного типа приведены в табл. 2.

Следует отметить, что реципрокные комбинации не равнозначны по количеству сеянцев разной пloidности. Например, в комбинации типа 4x × 2x формируется 49,1 % триплоидных растений, 26,8 % – тетраплоидных. В комбинациях типа 2x × 4x число триплоидных растений в среднем составляет 62,23 % (в разных семьях может составлять от 77 до 90 %), а тетраплоид-

ных – только 0,33 %. Такое же различие наблюдается и в скрещиваниях ортоплоидных форм с анертоплоидными. Так, в скрещивании типа 4x × 3x формируются преимущественно диплоидные растения – 59,8 %, около 10 % – триплоидные и тетраплоидные сеянцы и 29,6 % растений имеют несбалансированный анеуплоидный набор хромосом. В реципрокной комбинации 3x × 4x число анеуплоидных растений составляет 97,9 %.

Таблица 2

Пloidность гибридных сеянцев от разных типов скрещивания (данные за 1977–2012 гг.)

Тип скрещивания	Всего изучено сеянцев, шт.	В том числе			
		диплоиды, шт. / %	триплоиды, шт. / %	тетраплоиды, шт. / %	анеуплоиды, шт. / %
4x × 4x	113	2/1,8	5/4,4	106/93,8	–
4x × 3x	179	107/59,8	6/3,4	13/7,2	53/29,6
4x × 2x	1933	455/23,54	949/49,1	59/26,8	10/0,56
3x × 4x	47	1/21	–	–	46/97,9
3x × 3x	–	–	–	–	–
3x × 2x	249	82/32,9	2/0,8	–	165/66,3
2x × 4x	16843	6300/37,4	10483/62,23	56/0,33	4/0,02
2x × 3x	252	242/96,0	1/0,4	–	9/3,6

Еще более отчетливо видна разница между реципрокными комбинациями в скрещиваниях типа $2x \times 3x$ и $3x \times 2x$. Если в скрещиваниях типа $2x \times 3x$ преобладают диплоидные сеянцы, число которых составляет 96 %, то в комбинации $3x \times 2x$ диплоидные сеянцы составляют только 32,9 %, а анеуплоидные – 66,3 %. Такие различия можно объяснить, во-первых, разной степенью самоплодности материнских форм, во-вторых, избирательностью материнских форм по отношению к пыльце разной степени жизнеспособности. Поскольку опыляются некастрированные цветки, то при опылении пыльцой триплоидного отцовского компонента, пыльца которого заведомо имеет пониженную жизнеспособность, преимущественное развитие получают пыльцевые трубки пыльцы материнской формы. Отсюда в скрещиваниях типа $2x \times 3x$ подавляющее большинство растений имеет диплоидный набор хромосом.

Анализ пloidности гибридных сеянцев от скрещиваний разного типа позволяет констатировать, что для массового получения триплоидных гибридных растений наиболее эффективны скрещивания типа диплоид \times тетраплоид, тетраплоид \times диплоид. В этих скрещиваниях формируется гибридный материал, обладающий широким генетическим разнообразием, позволяющий при использовании в гибридизации доноров ценных признаков выделять новые сорта, пригодные для возделывания в интенсивных садах.

В наших исследованиях подтверждается ранее высказанное другими учеными мнение о преимущественных свойствах триплоидных сортов перед диплоидными (Лозицкий, 1970; Бавтуто, 1977; Singh, Wafai, 1984).

Учеты, проведенные В.В. Ждановым, показали, что наблюдается определенная тенденция к повышению устойчивости к парше у триплоидных сеянцев по сравнению с диплоидными. Только в 2 семьях из 15 (в скрещиваниях Мелба \times Папировка тетраплоидная и Редфри \times Папировка тетраплоидная) триплоидные сеянцы оказались сильнее поражены паршой, чем диплоидные. У остальных 13 семей средний балл поражения паршой при искусственном заражении у триплоидных сеянцев был на 0,1–1,0 балл ниже, чем у диплоидных из той же комбинации скрещивания (табл. 3) (Седов, Седышева, 2008; Седов, 2011).

Многолетнее сравнительное изучение урожайности и массы плодов у лучших диплоидных и триплоидных сортов яблони селекции ВНИИСПК показало, что новые триплоидные сорта яблони по урожайности не уступают диплоидным, а по массе плодов как главному показателю товарности достоверно превосходят их (табл. 4).

Исключительный интерес представляет получение иммунных к парше триплоидных сортов с регулярным плодоношением и высокотоварными плодами. Включение в гибридизацию форм, характеризующихся иммунитетом к парше, дает возможность целенаправленно получать иммунные к парше триплоидные сорта (рис. 1).

Из полученных нами иммунных к парше триплоидных сортов 3 сорта – Александр Бойко, Яблочный Спас и Масловское – уже включены в Госреестр селекционных достижений, допущенных к использованию, а остальные 4 сорта проходят государственное испытание.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СЕЛЕКЦИИ ЯБЛОНИ НА ПОЛИПЛОИДНОМ УРОВНЕ И ЕЕ ПЕРСПЕКТИВЫ

По нашим экспериментальным данным, при гибридизации на полиплоидном уровне было получено в 2,3 раза меньше семян и в 4,7 раза меньше выращено однолетних сеянцев по отношению к опыленным цветкам, чем при гибридизации на диплоидном уровне. Однако селекционная ценность сеянцев, полученных от гибридизации на полиплоидном уровне, была значительно выше, о чем свидетельствуют следующие данные. При гибридизации на диплоидном уровне для выделения одного элитного сеянца необходимо было в среднем вырастить 4,1 тыс. сеянцев, а на полиплоидном – 0,8 тыс.; для создания одного сорта, передаваемого в государственное испытание на диплоидном уровне, опылялось в среднем 86,6 тыс. цветков и выращивалось 16,7 тыс. однолетних сеянцев, а на полиплоидном уровне – только 46,2 тыс. цветков и 2,9 тыс. однолетних сеянцев (почти в 6 раз меньше).

В отдельных комбинациях скрещиваний на полиплоидном уровне при создании сорта потребовался еще меньший объем гибридизации и выращивания гибридных сеянцев. Так,

Таблица 3

Степень поражения паршой семян от интервалентных скрещиваний на искусственном инфекционном фоне (Седов и др., 2008)

Название комбинации	Тип скрещивания	Плоидность	Число учетных семян	Средний балл поражения	±
Данные за 1981 г.					
Мекинтош × Антоновка плоская	2x × 4x	2x 3x	6 35	2,5 2,2	-0,3
Ветеран × Антоновка плоская	2x × 4x	2x 3x	30 70	3,0 2,6	-0,4
Орлик × Антоновка плоская	2x × 4x	2x 3x	27 67	2,4 1,9	-0,5
Скрыжапель × Антоновка плоская	2x × 4x	2x 3x	65 63	2,8 2,7	-0,1
Скрыжапель × Уэлси тетраплоидный-М	2x × 4x	2x 3x	41 9	2,6 2,5	-0,1
Антоновка обыкновенная × Уэлси тетраплоидный-М	2x × 4x	2x 3x	44 5	2,4 2,0	-0,4
Мелба × Папировка тетраплоидная	2x × 4x	2x 3x	85 6	2,6 2,8	+0,2
Уэлси тетраплоидный-М × Антоновка обыкновенная	4x × 2x	2x 3x 4x	41 4 5	2,0 1,5 1,2	-0,5 -0,8
Данные за 1982 г.					
Орлик × Антоновка плоская	2x × 4x	2x 3x	8 54	1,6 0,8	-0,8
Мекинтош × Антоновка плоская	2x × 4x	2x 3x	16 34	2,8 1,8	-1,0
Мантет × Папировка тетраплоидная	2x × 4x	2x 3x	2 4	3,0 2,0	-1,0
Антоновка плоская × Орлик	4x × 2x	2x 3x	2 12	2,0 1,3	-0,7
Данные за 1992 г.					
Джонафри × Голден Делишес тетраплоидный*	2x × 4x	2x 3x	60 9	0,6 0,4	-0,2
Либерти × Мекинтош тетраплоидная*	2x × 4x	2x 3x	20 15	0,5 0,2	-0,3
Редфри × Папировка тетраплоидная*	2x × 4x	2x 3x	129 20	0,6 0,9	+0,3

Примечание. * Семена получены из Северо-Кавказского НИИ садоводства и виноградарства.

сорт Бежин луг получен в семье Северный синап × Уэлси тетраплоидный от гибридизации в объеме 13,2 тыс. цветков и всего из 709 семян. Сорт Августа (Орлик × Папировка тетраплоидная) получен от гибридизации 8,5 тыс. цветков и выделен в семье, состоящей из 0,9 тыс. семян.

Нами не выявлено четких постоянных различий по содержанию биологически активных веществ в плодах триплоидных и диплоидных сортов. Следует лишь отметить высокое содержание Р-активных веществ в плодах триплоидных сортов Тургеневское – 482 мг/100 г, Память Семакину – 501 мг/100 г и Августа –

Таблица 4

Урожайность и масса плодов у лучших диплоидных и триплоидных сортов яблони селекции ВНИИСПК

Лучшие диплоидные сорта			Триплоидные сорта		
Сорт	Урожайность, т/га	Масса плодов, г	Сорт	Урожайность, т/га	Масса плодов, г
Афродита	22	135	Августа	24	160
Болотовское	24	150	Александр Бойко	29	200
Веньяминовское	20	130	Бежин луг	25	150
Ветеран	22	130	Вавиловское	21	170
Имрус	20	140	Дарёна	20	170
Кандиль орловский	28	120	Жилинское	16	190
Куликовское	25	125	Масловское	16	230
Орлик	25	120	Низкорослое	22	130
Орлинка	20	140	Орловский партизан	26	200
Орловим	20	130	Осиповское	20	135
Орловское полесье	23	140	Память Семакину	26	160
Орловское полосатое	23	150	Патриот	20	240
Память воину	18	140	Рождественско	20	140
Радость Надежды	18	150	Спасское	25	170
Свежесть	23	140	Тургеневское	20	180
Синап орловский	18	150	Юбиляр	23	130
Солнышко	22	140	Яблочный Спас	22	175
Среднее (\bar{X}_1)	22	137	Среднее (\bar{X}_2)	22	172

Примечание. $\bar{X}_2 - \bar{X}_1 = 172 - 137 = 35^{**}$ НСР₀₅ = 29.

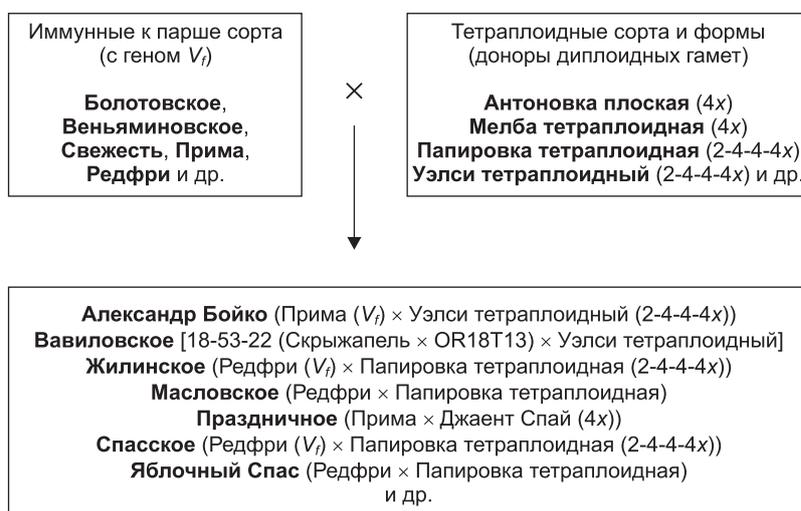


Рис. 1. Схема создания иммунных к парше триплоидных сортов яблони.

472 мг/100 г и повышенное содержание аскорбиновой кислоты в плодах триплоидного сорта Низкорослое – 18,0 мг/100 г.

В заключение следует отметить, что новые триплоидные сорта яблони отличаются повы-

шенной массой плодов. Большинство триплоидных сортов не уступает диплоидным широко распространенным сортам по содержанию в плодах сахаров, Р-активных веществ, аскорбиновой кислоты, а отдельные – значительно превосходят

их. По вкусовым качествам плодов ряд триплоидных сортов превосходит диплоидные.

С учетом более регулярного плодоношения, повышенной устойчивости к парше, массы плодов, а также повышенного содержания в плодах питательных и биологически активных веществ многие триплоидные сорта заслуживают широкого испытания в производстве.

Ниже дается производственно-биологическая характеристика 8 триплоидных сортов яблони, включенных в государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию (районированных).

ХОЗЯЙСТВЕННО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРИПЛОИДНЫХ СОРТОВ ЯБЛОНИ СЕЛЕКЦИИ ВНИИСПК

Сорта с летним созреванием плодов

Августа. Позднелетний триплоидный сорт, получен от скрещивания в 1982 г. Орлик × Папировка тетраплоидная. В 2002 г. сорт принят на государственное испытание, в 2008 г. включен в Госреестр. Авторы сорта: Е.Н. Седов, З.М. Серова, Г.А. Седышева и Е.А. Долматов.

Плоды выше среднего размера (160 г), одномерные, продолговатые, конические, ширококребристые, скошенные. Кожица гладкая, блестящая. Основная окраска плодов зеленая во время съема и зеленовато-желтая в состоянии потребительской зрелости. Покровная окраска на большей части поверхности плода – в виде размытого красного румянца. Подкожных точек много, они крупные, хорошо заметные. Оценка внешнего вида плодов – 4,4–4,5 балла. Плодоножка средней длины и толщины, изогнутая. Семена недоразвитые, щуплые, светло-коричневые.

Мякоть плодов зеленоватая, средней плотности, крупнозернистая, сочная, кисло-сладкая, отличного вкуса (4,4 балла). Химический состав плодов: сахара – 10,1 %, титруемые кислоты – 0,76 %, аскорбиновая кислота – 13 мг/100 г.

Съемная зрелость в условиях Орла наступает 15–20 августа, потребительский период продолжается около месяца.

Урожайность сорта высокая. Молодые 5–8-летние деревья этого сорта дали по 23 кг с дерева,

тогда как одновозрастные деревья контрольного сорта Мелба – только 12 кг.

Сорт сравнительно устойчив к парше. Наибольшее повреждение паршой листьев – 1,0 балла и плодов – 1,5 балла. Сорт Мелба поражается паршой на 3,0 и 3,5 балла соответственно. За время изучения сорт не имел серьезных повреждений морозами.

Достоинства сорта: высокая товарность и десертный вкус плодов.

Дарёна. Позднелетний триплоидный сорт, получен от скрещивания в 1981 г. Мелба × Папировка тетраплоидная. Посев гибридных семян был проведен в 1982 г., сорт принят на государственное испытание в 2002 г., а в 2011 г. включен в Госреестр по Центрально-Черноземному региону. Авторы сорта: Е.Н. Седов, З.М. Серова, Г.А. Седышева и Е.А. Долматов.

Плоды выше среднего размера (170 г), продолговатые, конические, ширококребристые, скошенные. Основная окраска зеленовато-желтая, покровная – на большей части плода в виде румянца и розовых крапин. Подкожных точек много, они крупные, зеленые, хорошо заметные. Плодоножка средней длины и толщины, изогнутая, косо поставленная. Семена среднего размера, конические, коричневые.

Мякоть белая или слегка зеленоватая, средней плотности, крупнозернистая, сочная, кисло-сладкая, со слабым ароматом. Внешний вид плодов оценивается на 4,5 балла, вкус – 4,3 балла. Химический состав плодов: сахара – 10,7 %, титруемые кислоты – 0,79 %, аскорбиновая кислота – 10,6 мг/100 г, Р-активные вещества – 450 мг/100 г, сумма пектиновых веществ – 13,3 %.

В отдельные годы в средней степени поражается паршой. Сорт урожайный, с регулярным плодоношением. Съемная зрелость в условиях Орловской области наступает во второй половине августа так же, как и у Мелбы. Потребительский период плодов продолжается до конца сентября.

Достоинства сорта: красивые товарные плоды с хорошими вкусовыми качествами.

Недостатки: лишь средняя устойчивость к парше.

Масловское. Летний, триплоидный, иммунный к парше (ген V_f) сорт яблони получен от скрещивания Редфри × Папировка тетраплоид-

ная, которое проведено в СКЗНИИСиВ. Последующие этапы селекционной работы – посев семян на искусственном инфекционном фоне, отбор сеянцев в теплице, в селекционной школке и в саду – проведены во ВНИИСПК. В 2005 г. сорт принят на государственное испытание, в 2010 г. включен в Госреестр. Авторы сорта: Е.Н. Седов, З.М. Серова, В.В. Жданов, Г.А. Седышева, Л.И. Дутова и Т.В. Рагулина.

Плоды крупные (230 г), средней одномерности, приплюснутые, широкоребристые, слабоскошенные. Плодоножка короткая, средней толщины, изогнутая. Основная окраска плодов зеленовато-желтая, покровная – по меньшей части плода в виде крапин розового цвета.

Мякоть плодов зеленоватая, плотная, очень сочная, кисло-сладкая. Внешний вид и вкус плодов оцениваются на 4,3 балла. Химический состав плодов: сумма сахаров – 10,7 %, титруемых кислот – 0,71 %, аскорбиновой кислоты – 17,5 мг/100 г, Р-активных веществ – 318 мг/100 г.

Съемная зрелость плодов в Орловской области наступает 10–15 августа, потребительский период продолжается до 10 октября.

Достоинства сорта: иммунитет к парше, скороплодность, высокая товарность плодов, повышенное содержание аскорбиновой кислоты.

Осиповское. Летний, триплоидный, высокоурожайный сорт с регулярным плодоношением и высокотоварными десертными плодами. Скрещивание (Мантет × Папировка тетраплоидная) проведено в 1989 г., посев семян – в 1990 г., отбор в селекционной школке – в 1991 г., размещение в селекционный сад – в 1992 г. В саду первичного изучения сорт наблюдается с 2002 г. (в кроне полукарликового подвоя 3-4-98). В 2011 г. сорт принят на государственное испытание, районирован в 2013 г. Авторы: Е.Н. Седов, З.М. Серова и Г.А. Седышева.

Плоды средней массы (133 г), высотой 55 мм, размер по наибольшему поперечному диаметру 71 мм, приплюснутые, широкоребристые, скошенные. Поверхность плода гладкая. Кожица плода маслянистая, блестящая. Основная окраска зеленовато-желтая, покровная – на меньшей части плода в виде розовых штрихов. Плодоножка короткая, средней толщины, изогнутая. Семена щуплые, среднего размера, коричневые.

Мякоть плодов зеленоватая, средней плотности, мелкозернистая, сочная. Плоды характеризуются высоким содержанием растворимых сухих веществ (13,2 %) и сахаров (12,1 %), тогда как у контрольного сорта Мелба – 12,2 и 9,9 % соответственно. Содержание титруемых кислот – 0,49 %, аскорбиновой кислоты – 8,1 мг/100 г. Отношение сахара к кислоте – 25,9. Привлекательность внешнего вида и вкус плодов оцениваются на 4,4 балла.

По урожайности сорт Осиповское значительно превосходит контрольный сорт Мелба (20,0 и 12,0 т/га соответственно). По зимостойкости новый сорт не уступает контролю. В зиму 2005/2006 гг. подмерзание отмечено на 0,7 балла. Съемная зрелость плодов в условиях Орла наступает в начале августа, потребительский период продолжается до середины сентября. К парше сорт устойчив.

Достоинства сорта. Высокие урожайность, товарные и потребительские качества плодов.

Сорта с зимним созреванием плодов

Александр Бойко. Триплоидный, иммунный к парше сорт с плодами глубоко зимнего срока созревания. Скрещивание (Прима × Уэлси тетраплоидный) проведено в 1993 г. в Северо-Кавказском зональном НИИ садоводства и виноградарства. Посев семян (1994 г.) и все другие этапы селекционного процесса: отбор сеянца в селекционной школке (1995 г.), посадка сеянца в селекционный сад (1996 г.), закладка участка первичного сортоизучения сорта путем прививки в крону полукарликового подвоя 3-4-98 (2002 г.) проведены во Всероссийском НИИ селекции плодовых культур. Авторы сорта – сотрудники ВНИИСПК: Е.Н. Седов, З.М. Серова, В.В. Жданов и Г.А. Седышева, сотрудники СКЗНИИСиВ: Л.И. Дутова и Т.В. Рагулина. В 2010 г. сорт принят на государственное испытание, а в 2013 г. включен в Госреестр.

Плоды выше средней массы (200 г), высотой 72 мм, размер по наибольшему поперечному диаметру – 77 мм, одномерные, среднеуплощенные, слегка конические. Основная поверхность плода гладкая и лишь в верхней части слаборебристая. Кожица плода маслянистая, блестящая. Основная окраска плодов в момент

съемной зрелости зеленая, а в состоянии потребительской зрелости – зеленовато-желтая. Покровная окраска занимает примерно половину поверхности плода; в момент съема плодов она темно-малиновая, а в состоянии потребительской зрелости – ярко-малинового цвета. Семена среднего размера, конические, коричневые.

Мякоть плодов зеленоватая, плотная, сочная. Вкус кисло-сладкий. В плодах содержится 12,0 % растворимых сухих веществ, 10,1 % сахаров, 0,5 % титруемых кислот, 7,8 мг/100 г аскорбиновой кислоты. Отношение сахара к кислоте – 15,8. Привлекательность внешнего вида плодов оценивается на 4,4 балла, вкус – на 4,3 балла.

Съемная зрелость плодов в условиях Орла наступает в середине сентября, плоды могут сохраняться в хранилище до второй декады марта.

Сорт по урожайности превосходит контрольный Антоновку обыкновенную на 73 %. Зимостойкий, не уступает по этому показателю контрольному сорту.

Достоинства сорта: высокая продуктивность, регулярное плодоношение, иммунитет к парше, перспективен для широкого производства.

Бежин луг. Зимний триплоидный сорт, получен от скрещивания в 1984 г. Северный синап × Уэлси тетраплоидный. С 2002 г. сорт проходил государственное испытание, а с 2010 г. включен в Госреестр. Авторы сорта: Е.Н. Седов, З.М. Серова, Г.А. Седышева, Е.А. Долматов и В.И. Павлюк. В 2010 г. сорт включен в Госреестр по Центрально-Черноземному региону.

Плоды выше среднего размера, массой 150 г, продолговатые, широкоребристые, с гладкой поверхностью, скошенные. Основная окраска в момент съемной зрелости зеленая, а в состоянии потребительской зрелости – зеленоватая. Покровная окраска на половине поверхности плода в виде размытого малинового румянца. Плодоножка короткая, косо поставленная. Семена недоразвитые, коричневые.

Мякоть плодов зеленоватая, средней плотности, нежная, мелкозернистая, сочная, кисло-сладкого вкуса, со слабым ароматом. Химический состав плодов: сахара – 9,3 %, титруемые кислоты – 0,5 %, аскорбиновая кислота – 7,4 мг/100 г, Р-активные вещества – 435 мг/100 г. Внешний

вид плодов оценивается на 4,4 балла, вкус – 4,3 балла.

Съемная зрелость в условиях Орловской области наступает 15–20 сентября. Потребительский период плодов продолжается до февраля. Транспортабельность плодов хорошая. Характеризуется скороплодностью и урожайностью. По урожайности превосходит контрольный сорт Антоновку обыкновенную на 60 %.

Сорт сравнительно устойчив к парше. За годы изучения мы не наблюдали поражения листьев более 1,5 балла и плодов – 0,5 балла.

Достоинства сорта: высокая устойчивость к парше, регулярность плодоношения, высокие качества плодов.

Орловский партизан. Зимний триплоидный сорт. Скрещивание [Орлик × 13-6-106 (Сеянец Суворовца) (4х)] проведено в 1988 г., посев семян – в 1989 г., отбор в селекционной школке – в 1990 г., посадка в селекционный сад – в 1991 г. Авторы: Е.Н. Седов, З.М. Серова, Г.А. Седышева и Е.А. Долматов. В 2008 г. сорт принят на государственное испытание, а в 2010 г. включен в Госреестр.

Плоды выше среднего размера (200 г), одномерные, среднеуплощенные, конические, скошенные. Поверхность ребристая в верхней части и дольчатая у основания. Кожица гладкая, блестящая. Основная окраска зеленая, покровная – на половине поверхности плода в виде румянца и полос свекольного цвета. Привлекательность плодов оценивается на 4,5 балла. Плодоножка короткая, средней толщины, косо поставленная. Воронка плода глубокая остроконическая, узкая, со слабой оржавленностью серого цвета. Блюдце глубокое, широкое, бороздчатое. Семена отсутствуют или недоразвитые, щуплые.

Мякоть плодов плотная, зеленоватая, сочная. Вкусовые качества оцениваются на 4,4 балла. Химический состав плодов: сумма сахаров – 12,0 %, титруемые кислоты – 0,4 %, аскорбиновая кислота – 4,3 мг/100 г.

Съемная зрелость наступает в середине сентября, плоды могут сохраняться до конца января.

Сорт отличается высокой урожайностью. За 2006–2010 гг. средний урожай на 1 дерево составил 24 кг, или 24 т/га (посадка 5 × 2 м), тогда как у Антоновки обыкновенной – 7 кг и 7 т/га соответственно.

Достоинства сорта: товарность плодов, их хорошие вкусовые качества, устойчивость к парше и высокая урожайность.

Патриот. Триплоидный, устойчивый к парше сорт с высокотоварными плодами зимнего созревания. Скрещивание [16-37-63 (Антоновка краснобочка × SR0523) × 13-6-106 (Сеянец Суворовца)] проведено в 1989 г., посев семян – в 1990 г., отбор в селекционной школке – в 1991 г., посадка в селекционный сад – в 1992 г. В 2003–2004 гг. отборный сеянец был привит в крону полукарликового подвоя 3-4-98 для первичного изучения. Авторы сорта: Е.Н. Седов, З.М. Серова, Г.А. Седышева и В.В. Жданов. В 2010 г. сорт принят на государственное испытание, в 2013 г. включен в Госреестр.

Плоды крупные (240 г), средней одномерности, отдельные плоды достигают массы 270–290 г. По форме плоды среднеуплощенные, слабokonические с широкими ребрами, сильно-ребристые в верхней части, слегка скошенные. Кожица плода гладкая, маслянистая, блестящая. Основная окраска в момент съемной зрелости зеленая, а в состоянии потребительской зрелости – золотисто-желтая. Покровная окраска занимает меньшую часть поверхности плода в виде размытого красного румянца, переходящего в момент потребительской зрелости в ярко-красный румянец. Семена среднего размера, яйцевидные, коричневые, щуплые (недоразвитые).

Мякоть плодов зеленоватая, плотная, сочная, кисло-сладкая, со слабым ароматом. Привлекательность плодов оценивается на 4,5 балла, вкус – на 4,3 балла. В плодах содержится растворимых сухих веществ 13,6 %, сахаров – 12,2 %, титруемых кислот – 0,4 %, аскорбиновой кислоты – 7,2 мг/100 г. Отношение сахара к кислоте – 29,8.

Съемная зрелость плодов наступает во второй декаде сентября. Плоды могут сохраняться до начала февраля, а иногда и дольше. Сорт урожайный и зимостойкий. В зиму 2005–2006 гг., когда минимальная температура опускалась до

–38 °С, деревья сорта Патриот не имели сколько-нибудь серьезных повреждений.

Достоинства сорта. Регулярность плодоношения, высокая товарность плодов зимнего срока созревания.

В заключение следует отметить, что результаты селекционной работы во ВНИИСПК с использованием полиплоидии убедительно свидетельствуют о высокой перспективности данного направления в селекции яблони.

ЛИТЕРАТУРА

- Бавтута Г.А. Новые методы в селекции плодово-ягодных культур. Минск: Высш. шк., 1977. 188 с.
- Каптарь С.Г. Ускоренный пропионо-лактоидный метод приготовления и окрашивания временных цитологических препаратов для подсчета хромосом у растений // Цитология и генетика. 1967. Т. 1. № 4. С. 87–90.
- Лоцицкий А.Я. Биологическая и хозяйственная характеристика полиплоидных сортов яблони и груши: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л., 1970. 20 с.
- Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур. Мичуринск, 1980. 407 с.
- Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур. Орел: ВНИИСПК, 1995. 504 с.
- Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур. Мичуринск, 1973. 492 с.
- Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур. Орел: ВНИИСПК, 1999. 608 с.
- Седов Е.Н. Основные направления и методы селекции яблони // Селекция яблони в СССР: Сб. ст. Орел, 1981. С. 14–17.
- Седов Е.Н. Селекция и новые сорта яблони. Орел: ВНИИСПК, 2011. 624 с.
- Седов Е.Н., Седышева Г.А. Полиплоидия – один из путей повышения продуктивности яблони // Биологические основы продуктивности плодовых семечковых культур: Матер. конф. М.: Наука, 1979. С. 83–84.
- Седов Е.Н., Седышева Г.А., Серова З.М. Селекция яблони на полиплоидном уровне. Орел: ВНИИСПК, 2008. 368 с.
- Седышева Г.А. К методике окраски соматических хромосом у плодовых растений // Сорта и технологии для современного сада. Тула: Приокск. кн. изд-во, 1990. С. 24–27.
- Singh R., Wafai B.A. Intravarietal polyploidy in the apple (*Malus pumila* Mill) / Cultivar Hazratbali // Euphytica. 1984. V. 33. No. 1. P. 209–214.

BREEDING ASSESSMENT OF HETEROPLOID CROSSES IN THE DEVELOPMENT OF TRIPLOID APPLE VARIETIES

E.N. Sedov, G.A. Sedysheva, Z. M. Serova, N.G. Gorbacheva, S.A. Melnik

All Russia Research Institute of Fruit Crop Breeding, Russian Academy of Agricultural Sciences,
Zhilina, Orel oblast, Russia, e-mail: info@vniispk.ru

Summary

A 40-year work on apple breeding on a polyploidy level has shown that the most promising crosses for reliable regular development of triploid varieties are $2x \times 4x$ and $4x \times 2x$.

Cytological control shows that reciprocal combinations are unequal in the output of seedlings with different ploidy. In crosses $2x \times 4x$ the output of triploid seedlings is higher than in crosses $4x \times 2x$. The cause is the different degrees of autogamy in parental tetraploid forms: when nonemasculated flowers are pollinated, highly autogamous forms are preferably pollinated with their own pollen. When larger number of triploid plants is required in crosses $4x \times 2x$ flowers of these forms should be emasculated.

The production and biological characteristics of eight apple varieties with stable fruit-bearing and highly marketable fruit, are given in this paper.

Key words: apple, breeding, varieties, polyploidy, heteroploid crosses.

УДК 635.649:631.526.32

ЦИТОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО МУТАНТА ОВОЩНОГО ПЕРЦА *CAPSICUM ANNUUM VAR. ANNUUM L.*

© 2013 г. О.Ю. Тимин¹, О.О. Тимина², П.Ю. Монтвид³, А.П. Самовол³

¹ Государственное учреждение Научно-исследовательский институт экологии и природных ресурсов, Бендеры, Приднестровье, e-mail: otimin@mail.ru;

² Приднестровский государственный университет, Тирасполь, Приднестровье, e-mail: otimina@mail.ru;

³ Институт овощеводства и бахчеводства Национальной академии аграрных наук Украины, Харьков, Украина, e-mail: montvid@mail.ru

Поступила в редакцию 27 января 2013 г. Принята к публикации 16 июля 2013 г.

У овощного перца *Capsicum annuum* var. *annuum* идентифицированы две новые спонтанные мутации, проявившиеся в 5-й световой зоне в условиях пленочной теплицы. Проведена их первичная цитолого-генетическая характеристика, согласно которой мутации являются доминантными и контролируются двумя независимыми факторами. Одна из мутаций летальная, проявляющаяся в фазе семядолей, а вторая относится к главным хромосомным мутациям с эффектом сниженной жизнеспособности у гомозигот, характеризуется специфичным спектром и частотой хиазм и хромосомных aberrаций, зависит от дозы гена. Обсуждаются возможности ее использования в прикладных и фундаментальных селекционно-генетических исследованиях овощного перца.

Ключевые слова: овощной перец, *C. annuum* var. *annuum*, селекция, цитолого-генетический анализ, мейоз, спонтанные мутации.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема полного обеспечения населения овощами и продуктами их переработки для государств СНГ остается нерешенной. Статистика свидетельствует (Нормы физиологических потребностей..., 2008) о том, что уровень потребления всех овощей различными слоями общества колеблется в среднем от 50 до 70 % от рекомендованных физиологических норм (140 кг в год). Пониженный уровень потребления вызван различными причинами, но в том числе и недостаточным объемом производимой разнообразной отечественной продукции. Поэтому создание принципиально новых высокоурожайных сортов и гибридов овощных культур, обеспечивающих получение высококачественной экологически чистой продукции, а также расширение их ассортимента, остаются в ряду важнейших задач, стоящих перед се-

лекционером, направленных на обеспечение рационального питания и сохранения здоровья человека. Овощной перец является экономически значимой культурой для стран Европы, Азии и Америки и выращивается везде, где сумма положительных температур составляет не менее 3 тыс. °С, а с учетом защищенного грунта в настоящее время он культивируется на территории от 55° ю.ш. до 55–56° с.ш. (Даскалов, Колев, 1958; Пышная 2005). Мировое товарное производство перца превышает 27 млн тонн в год (Кучеренко, 2011; Недбал, 2011). Научно обоснованная норма потребления сладкого перца человеком составляет 20–30 кг/год. Однако в России потребляют не более 2–3 кг/год, в США – 14–16 кг/год, в Болгарии – 18–20 кг/год (Белавкин, 2010).

Перец является методически сложным генетическим объектом, что связано со строением его наследственного аппарата. Диплоидный

набор хромосом у перца $2n = 24$. Большинство хромосом метацентрические, одинаковые по размеру, поэтому морфологически практически неразличимы. Обычными цитологическими методами поддаются дифференцировке хромосомы 1, 11 и 12. Первая хромосома – самая длинная. У хромосомы 11 субтерминальная центромера, а 12-я представляет собой наименьшую акроцентрическую хромосому с ядрышковым организатором (Pickersgill, 1977, 1988). Одним из методов повышения эффективности селекционно-генетических исследований культуры перца является использование мутантного генофонда. Первые мутанты у перца были получены еще в 30-е годы прошлого столетия (Andrasfalvy, Csillery, 1995). В 1965 г. опубликовали список всего из 49 фенотипически проявляющихся мутантов (Lippert *et al.*, 1965). К середине 1990-х гг. у овощного перца количество новых зафиксированных и идентифицированных мутаций насчитывало уже несколько сот, а к середине 2000-х гг. – 270, включая и ряд молекулярных маркеров (Daskalov, Poulos, 1994; Andrasfalvy, Csillery, 1995; Wang, Bosland, 2006). Безусловным прорывом в генетических исследованиях перца явилась разработка полной генетической карты генома перца, основанной на серии общих генов, распределенных не только у томата, картофеля, баклажана и других видов семейства пасленовых (эффект синтении), но и в том числе модельного растения *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh (Wu *et al.*, 2009). Однако не менее важной и пока не решенной задачей является выявление соответствия между наработанными молекулярными COSII-маркерами и конкретными хозяйственно-ценными признаками *S. annuum* var. *annuum* для практического использования в маркерной помощи отбору. Дополнительное использование фенотипически выраженных мутантов повышает достоверность данных и вследствие этого может и должно использоваться для сопоставления результатов, полученных на основе различных подходов и методов по идентификации и картированию морфологических, адаптивных и хозяйственно ценных признаков, а также для изучения генотип-средовых взаимоотношений. Поэтому получение новых фенотипически выраженных мутантов и их идентификация

остаются актуальной задачей. Целью наших исследований явилась цитолого-генетическая характеристика нового мутанта овощного перца спонтанного происхождения. В задачи исследований входил его морфологический, генетический и цитологический анализы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходный растительный материал. В предварительных исследованиях мы использовали популяцию сорта Катюша (*S. annuum* var. *annuum*, *сортотип* Grossum) нашей селекции (А.с. ..., 2003). Сорт Катюша с желто-оранжевой окраской перикарпия получен методом индивидуального отбора из популяции красноплодного сорта Ласточка при отборе ее элиты на площади 3 га. При просмотре 240 тыс. растений в открытом грунте было найдено 4, у которых плоды были желтоокрашенными. Из полученных и индивидуально высеянных отборов перспективным оказался только один, который и явился родоначальником сорта Катюша. Таким образом, сорт Катюша выведен из спонтанного «продвинутого», т. е. не требующего значительной селекционной доработки мутанта естественного происхождения. В популяции сорта Катюша, в свою очередь, в дальнейших исследованиях был выделен новый тип мутанта с гипертрофированной чашечкой, полностью охватывающей околоцветник и околоплодник: венчик, завязь, а также и плод. При созревании плода чашечка окрашивается в желто-оранжевый цвет аналогично перикарпию. Выделенный нами мутант представляет собой инбредный вариант сорта Катюша, фенотип которого обозначен нами символом Calcc – Calyx completely closed. Морфологические признаки и их изменчивость у цветков и плодов семей мутанта, включая степень развития чашечки, ее окраску, форму, общее количество плодов на кусте, среднюю массу плода с куста, наличие семян в плоде, их количество, измерялись у 15–20 растений в онтогенезе. Биометрические измерения проводились в фазу семядолей, цветения и биологического созревания. Растения выращивались в весенне-летний период по общепринятой технологии (Ершова, 1990; Методические указания ..., 1997) в условиях необогреваемой

пленочной теплицы. Результаты обрабатывались математически общепринятыми методами (Лакин, 1990) с подсчетом среднего значения и его ошибки, нахождением *t*-критерия.

Гибридологический анализ. Потомство мутанта оказалось неоднородным по признаку «окраска семядолей» (в популяции наблюдалось выщепление полностью желтоокрашенных сеянцев) и степени проявления признака Calcc. Выщеплялись варианты с плодами, погруженными в чашечку на 1/3, наполовину и полностью закрытые чашечкой, как в «футляре». Но выделялись и фенотипические варианты с нормальной неохватывающей чашечкой. Поэтому, прежде всего, проводили посемейный анализ наследования желтой окраски семядолей (данный фенотип обозначен нами символом Ycol – yellow cotyledon lethal) и мутации с фенотипом Calcc у индивидуальных самоопыленных отборов, а также в целом у полученной инбредной популяции мутанта.

Мутант Calcc был скрещен с сортом Мираж (российская селекция) и линией Л 5/92 (наша селекция). У обоих образцов перикарпий красноокрашенный. Красная окраска доминирует над желтой и в наших исследованиях является маркерным признаком гибридности. Скрещивания выполнялись на растениях мутанта с изоляцией, обратные скрещивания не получились в виду пониженной пыльцевой продуктивности мутанта и, возможно, ее низкой жизнеспособности. В случае с сортом Мираж было получено всего 5 семян, а в случае с линией Л 5/92 – 26. Половина полученных семян F₁ высевалась для самоопыления, которое проводили с изоляцией, и получения F₂, а вторая половина использовалась для полного гибридологического анализа вместе с популяцией F₂ и родительскими формами в следующем году. Учеты получившихся фенотипических классов в инбредной популяции и двум гибридным комбинациям проводили по признаку окраски семядолей в фазе сеянцев, а по признаку Calcc – в биологической фазе спелости. Обработка результатов скрещиваний проводилась на основе статистического критерия χ^2 по общепринятой методике.

Цитологический анализ мейоза. Изучение специфики мейотического деления клеточного ядра у мутанта с фенотипом Calcc проводили согласно Жученко с соавт. (1980). В качестве

контроля использовали инбредные варианты с нормальной чашечкой, выщепляющиеся из популяции мутанта. Для проведения анализа разновозрастные бутончики мутанта, различающиеся по степени проявления стерильности и осеменности плодов, фиксировали по Карнуа в течение 24 ч. Материал промывали в двух сменах 96°-го этилового спирта и хранили в 70°-м спирте. Бутоны извлекали из флаконов с фиксатором, удаляли венчик и обрабатывали материал в течение 30 мин 4 %-м раствором железистоаммиачных квасцов. Материал промывали в нескольких сменах водопроводной воды. Пыльнички извлекали из остатков бутонов, раздавливали скальпелем в капле 1 %-го ацетокармина, прогревали на водяной бане до интенсивного окрашивания ядра и цитоплазмы в насыщенный черный цвет, после чего контрастировали 45 %-й уксусной кислотой. Препараты изучали под иммерсией при увеличении 800, микроскоп марки Микмед-1. По каждому варианту анализировали до 50 делящихся клеток в профазе I, в остальных фазах, как правило, изучалось не менее 100 клеток. Препараты фотографировали с помощью цифровой камеры марки Canon Ixus-75. Полученные данные обрабатывались математически: подсчитывали среднее количество бивалентов на мейоцит, количество унивалентов, частоту и спектр хиазм (интерстициальные и дистальные или терминальные хиазмы) на мейоцит. К терминальным относили хиазмы с хроматидами, расположенными с одной, а не с двух сторон (Ригер, Михаэлис, 1967). Подсчитывали количество хиазм на каждый мейоцит строго на стадии раннего диакинеза для исключения возможных погрешностей из-за дальнейшей конденсации бивалентов. Определяли характер и количество нарушений по стадиям мейоза. Взаимосвязь признаков степени осеменности и характера прохождения мейоза определяли методом многомерного шкалирования всего массива стандартизованных данных. Математическая обработка данных проводилась с применением пакета Statistica 6,0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Морфологическое описание и гибридологический анализ мутанта Calcc. Новый мутант Calcc был выделен в условиях пленочной необог-

реваемой теплицы в 2008 г. Мутант характеризовался совокупностью измененных признаков у вегетативных (стадия семядолей) и генеративных органов. В потомстве самоопыленных растений Calcc выделялись сеянцы с постоянно желтыми семядолями, которые не росли и не развивались, белели и постепенно погибали. Мы предположили, что фенотип данных растений является результатом эпистатического взаимодействия доминантного гена, обуславливающего летальность, фенотипически проявляющегося в виде пожелтения окраски семядолей, и его доминантного подавителя. В фазе семядолей по этому признаку была исследована популяция 706 растений (табл. 1). Результаты гибридологического анализа (фактическое соотношение фенотипов 13 : 3) согласуются с принятой гипотезой об эпистатическом взаимодействии двух доминантных генов и криптомерности рецессивного аллеля – подавителя по отношению к рецессивному аллелю летального фактора.

Отклонения в фенотипе у растений Calcc, наблюдающиеся в период цветения и плодообразования, подразделялись по степени выраженности на три варианта. В первом варианте околоцветник и околоплодник в оболочке, но лепестки венчика выступают из-под чашечки наполовину, а плоды закрыты на 1/3. Для второго варианта характерен не замкнутый полностью околоцветник, из которого выступают края лепестков, плоды охвачены чашечкой на 2/3. В третьем варианте венчик и плоды располагаются полностью внутри разросшейся чашечки и полностью закрыты ею (рис. 1). Характерной особенностью мутанта оказалась кроме гипертрофированной и охватывающей чашечки также измененная структура цветка. В цветке мутанта закладывался не только один центрально расположенный пестик, но и второй дополнительный

круг с пестичными структурами, т.е. проявлялся признак многопестичности.

При этом тычинки сохранялись, а количеству тычинок, как правило, соответствовало количество дополнительных пестичных структур либо их было не более 1–2 (рис. 1). В ходе онтогенеза дополнительные пестичные структуры разрастались и также оставались под оболочкой чашечки. Они окрашивались в желтый цвет в фазу биологической спелости в соответствии с окраской центрального плода, развивавшегося из центрального пестика. Семена, как правило, в таком плоде либо отсутствовали, либо их было очень мало, в пределах 2–6 шт. на плод, и они располагались только в центральном плоде. Общее количество плодов на растении Calcc варьировало от 15 до 40 шт., средняя масса плода – от 3 до 40 г, а общий урожай с куста – от 190 до 400 г. Плоды преобладали мелкие, длиной 1,5–4,8 см и диаметром 2,5–4,2 см. У растений дикого типа с нормальной чашечкой общее количество плодов с куста варьировало от 6 до 10 шт. при средней массе 50–75 г, длине плода – 6,0–8,5 см, диаметре – 4,1–5,9 см, общем урожае с куста – 560–670 г.

Поскольку в потомстве семей мутанта постоянно выделялись растения с нормальной чашечкой, мы предположили, что растения мутанта гетерозиготны по этому признаку, так как гомозигота может быть с пониженной жизнеспособностью и, возможно, сцеплена с фактором летальности. Таким образом, в скрещиваниях Calcc с Л 5/92 и сортом Мираж, скорее всего, будут участвовать только гаметы гетерозиготных растений Calcc. Характер наследования признака мутантной чашечки представлен в табл. 2.

Результаты гибридологического анализа подтвердили наши предположения. Гибриды

Таблица 1

Проявление и наследование мутации Ycol – летального фактора желтой окраски семядолей у мутанта Calcc в условиях парниковой теплицы на стадии сеянцев, 2012 г.

Фенотип семядолей	Частота		O – E	(O – E) ²	$\chi^2 = (O - E)^2/E$
	O	E			
Зеленые	598	573,62	24,38	594,14	1,036
Желтые	108	132,38	-24,38	594,14	1,036
При P = 0,05 χ^2 табл = 3,84; при P = 0,01 χ^2 табл = 6,34					$\Sigma = 2,072$



Рис. 1. Фенотип нового мутанта Calcc и его проявление в F_1 и F_2 .

были получены в обеих комбинациях, о чем свидетельствовал характер проявления маркерной красной окраски в F_1 и сегрегации по этому признаку в F_2 . В комбинации скрещивания Calcc с сортом Мираж расщепление по форме чашечки не произошло, так как мутант гетерозиготен по признаку «форма чашечки», а гибрид образовался при скрещивании гамет, несущей фактор нормальной чашечки. Форма чашечки у мутанта Calcc контролируется моногибридным доминантным фактором, наследуется независимо от фактора окраски

перикарпия в биологической спелости с фенотипически выраженной дозой гена. Гомозигота по форме чашечки несет, возможно, фактор женской стерильности, что фенотипически проявляется в виде закладки дополнительных пестичных структур.

Результаты цитологического изучения мутанта Calcc. Цитологический анализ показал особенности прохождения мейоза у семей Calcc, различающихся по степени наличия стерильных плодов на кусте и осемененности плодов и выраженности признака Calcc. Во всех вариантах

Таблица 2

Наследование признаков «охватывающая чашечка» у растения Calcc и «окраска перикарпия» в биологической фазе спелости, пленочная теплица, 2011–2012 гг.

Комбинация скрещивания	Поколение	Фенотип	Частота фактическая	Соотношение фенотипических классов	χ^2
Самоопыленный мутант Calcc	F ₃	Желтый дикий	28	3 : 1	0,004
		Желтый мутантный	85		
♀ Calcc × ♂ Мираж	F ₁	Красный дикий	2	1 : 0	–
		Красный мутантный	0		
	F ₂	Красный дикий	92	3 : 1	1,24
		Желтый дикий	25		
♀ Calcc × ♂ 5/92	F ₁	Красный дикий	0	1 : 0	–
		Красный мутантный	24		
	F ₂	Красный дикий	50	9 : 3 : 3 : 1	0,198
		Красный мутантный	166		0,244
	Желтый дикий	17	0,032		
	Желтый мутантный	51	0,095		

не выявлено статистически значимых отличий по числу открытых и кольцевых бивалентов. Однако семьи мутанта значительно отличались по нетипичным бивалентам и повышенным частотам интерстициальных хиазм (табл. 3).

В варианте с фертильными, хорошо осемененными плодами (количество семян в плоде ≥ 250 шт.) и нормальной неохватывающей чашечкой количество унивалентов значительно превышало все остальные. Интересные результаты

получены и по анализу aberrаций по фазам мейоза (табл. 4, рис. 2).

Типичными нарушениями оказались униваленты у полюсов, фрагменты, мосты, формирование микроядер, преждевременная конденсация хромосом. Максимальный вклад в общую сумму aberrаций привнесли преждевременные отхождения унивалентов к полюсу, фрагменты и микроядра. Общее количество aberrаций в варианте с нормальной чашечкой было

Таблица 3

Спектр и частота хиазм у мутанта в зависимости от степени выраженности признаков «процент бессемянных плодов на растении», «осемененность плодов» и формы чашечки

Количество бивалентов на мейоцит на стадии раннего диакинеза			Количество унивалентов на мейоцит	Частота хиазм на мейоцит	
открытые (одна хиазма на бивалент)	кольцевые (две хиазмы на бивалент)	тип «8» (три хиазмы на бивалент)		интерстициальные	терминальные
8,16 ± 0,30	3,56 ± 0,25	0,11* ± 0,05	0,36* ± 0,13	3,33 ± 0,25	12,31 ± 0,30
7,70 ± 0,20	3,47 ± 0,25	0,47 ± 0,12	0,72 ± 0,40	3,50 ± 0,2	12,40 ± 0,35
8,20 ± 0,27	3,33 ± 0,26	0,13* ± 0,05	0,68 ± 0,26	2,72 ± 0,24	12,34 ± 0,26
7,50 ± 0,20	3,68 ± 0,20	0,36 ± 0,07	0,92 ± 0,20	2,58 ± 0,13	13,22 ± 0,30
7,70 ± 0,25	3,43 ± 0,30	0,21 ± 0,07	1,12 ± 0,25	2,23 ± 0,24	13,20 ± 0,45

Примечание. Здесь и в последующих таблицах: вариант 1 – 71 % бессемянных плодов на растении, в плоде ≤ 4 семян; далее соответственно 2 – 27 % и ≤ 20 семян; 3 – 50 % и ≤ 55 семян; 4 – 0 % и ≤ 150 семян; 5 – 0 % и ≤ 300 семян. Варианты 1–4 – семьи мутанта Calcc. 5 – инбредный вариант мутанта с нормальной чашечкой. * значимые отличия в сравнении с вариантом с максимальным показателем при $p = 0,05$.

Таблица 4

Характер и частота хромосомных мейотических aberrаций у мутанта Calсс

Количество нарушений на разных стадиях мейоза, %														Всего	
метафаза I		анафаза I			телофаза I		метафаза II		анафаза II			телофаза II		количество де-лящихся клеток	%
количество де-лящихся клеток	унивалентны у полюсов	количество де-лящихся клеток	мосты	фрагменты	количество де-лящихся клеток	микроядра	количество де-лящихся клеток	унивалентны у полюсов	количество де-лящихся клеток	мосты	фрагменты	количество де-лящихся клеток	микроядра		
166	25,9	149	0,7	23,5	130	16,9	150	16	147	0	16,3	248	15,7	990	19,0
133	24,8	115	0,9	13,0	145	15,6	122	12,3	126	0	7,9	178	10,0	819	13,8
197	27,9	150	0	20,0	168	23,2	153	17,0	133	0	23,3	185	18,9	986	22,1
89	29,0	35	23,0	17,0	118	18,6	153	11,7	128	0,8	13,2	166	15,7	689	18,0
193	8,8	169	0	7,6	183	8,1	165	10,9	149	0	9,4	169	13,6	1028	9,8

в 1,5–2 раза меньше в сравнении с остальными вариантами.

Анализ взаимосвязи степени осеменности плодов и характера прохождения мейоза методом многомерного шкалирования показал, что количество стерильных плодов на кусте и количество семян в плоде ассоциируются с разными спектром, частотой хиазм и типами хромосомных aberrаций в мейозе, а следовательно, контролируются неодинаковыми группами генов (рис. 3).

Процент бессемянных плодов на кусте ассоциируется, прежде всего, с количеством терминальных хиазм на мейоцит, суммарным количеством хиазм на мейоцит и с aberrациями хромосом, такими, как образование микроядер в телофаза I, преждевременное отхождение унивалентов к полюсу в метафаза II, фрагментация хромосом в анафаза II. Показатели осеменности плодов на диаграмме разброса данных (рис. 3) ближе всего к кластеру с переменными: мейоциты с кольцевыми хиазмами и унивалентами, интерстициальными бивалентами и aberrациями хромосом типа «мосты» в анафаза I и II.

ОБСУЖДЕНИЕ

Новый перечный мутант был выделен в 5-й световой зоне в условиях пленочной теплицы, где ежегодно наблюдаются экстремально высокие температуры и повышенная инсоляция в летний период. И хотя имеются данные (Ве-

личко, 2012) о том, что тепловой шок способен вызвать разрывы в нуклеиновых кислотах и структурные перестройки хроматина, что при отсутствии репараций может вызвать появление мутаций, однако однозначно определить, что сочетанное воздействие указанных факторов среды явилось причиной мутации, пока нет оснований. Причиной мутации в данных условиях могла оказаться и высокая нестабильность локуса, контролирующего форму чашечки у исходного сорта, также имеющего мутантное происхождение. Нужны дополнительные исследования по выявлению возможных причин нестабильности. И для этого, прежде всего, более детально по наблюдаемым маркерным aberrациям необходимо будет уточнить тип мутагенного воздействия.

Результаты первичной идентификации новой спонтанной мутации у перца свидетельствуют фактически о наличии как минимум двух, которые можно отнести, согласно определению, (Картель и др., 1999) к главным мутациям хромосомного типа. Первая мутация проявляется на постзиготической фазе у спорофита на стадии семядолей в результате эпистатического взаимодействия двух доминантных генов, один из которых дикого типа, а второй мутировал, и является летальной для ее носителей. Вторая мутация у этого же мутанта также является доминантной, вызывая значительное фенотипически выраженное отклонение в строении околоцветника и околоплодника, и также связана с пониженной

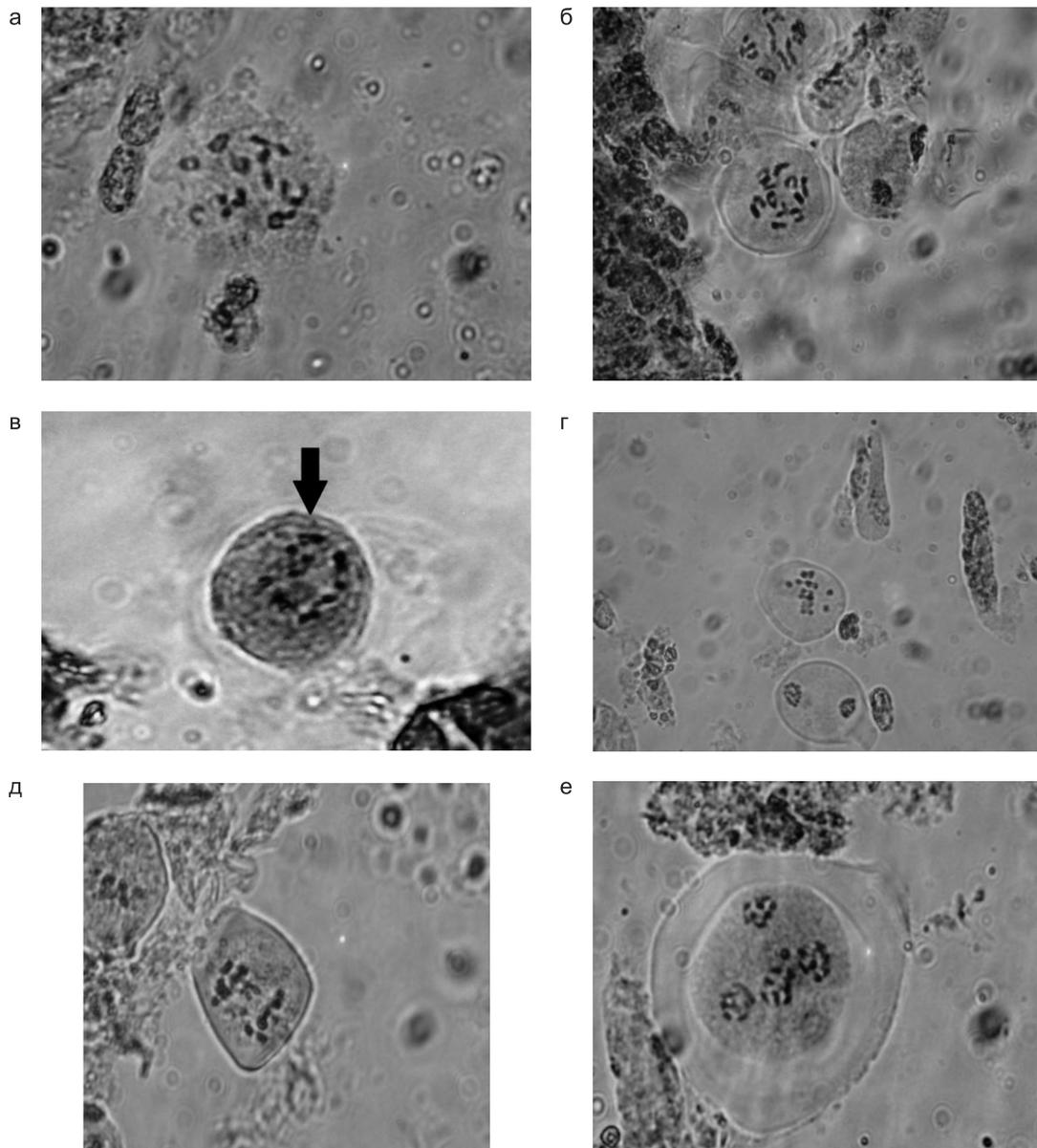


Рис. 2. Диакинез (а, б), бивалент типа «8» (в) и некоторые хромосомные нарушения (г, д) в мейозе у мутанта Calss.

а – диакинез; 6 кольцевых и 6 открытых бивалентов; б – диакинез; 12 открытых бивалентов; в – бивалент с тремя хизмами; г – униваленты у полюсов, метафаза I; д – фрагменты в анафазе I; е – микроядро, телофаза 2.

жизнеспособностью гомозиготы. Поскольку не наблюдалось сдвигов в наследовании в потомствах мутанта и полученного гибрида по маркерным признакам (окраска перикарпия и форма чашечки), можно с высокой долей вероятности утверждать, что мутации у мутантов Calss и Ycol не сцеплены и сегрегируют независимо.

Цитологический анализ мейоза у мутанта Calss выявил ряд хромосомных aberrаций.

При этом преждевременное отхождение унивалентов к полюсу в метафазе I и II указывает на нарушение веретена деления, а хромосомные aberrации: мосты, фрагменты, униваленты – на нарушение процесса конъюгации. В то же время хромосомные мутации у перца связывают с его эволюционным продвижением. Известно, например, что ядерного вещества в расчете на ядро у видов в роде *Capsicum* в среднем 8,42 пг,

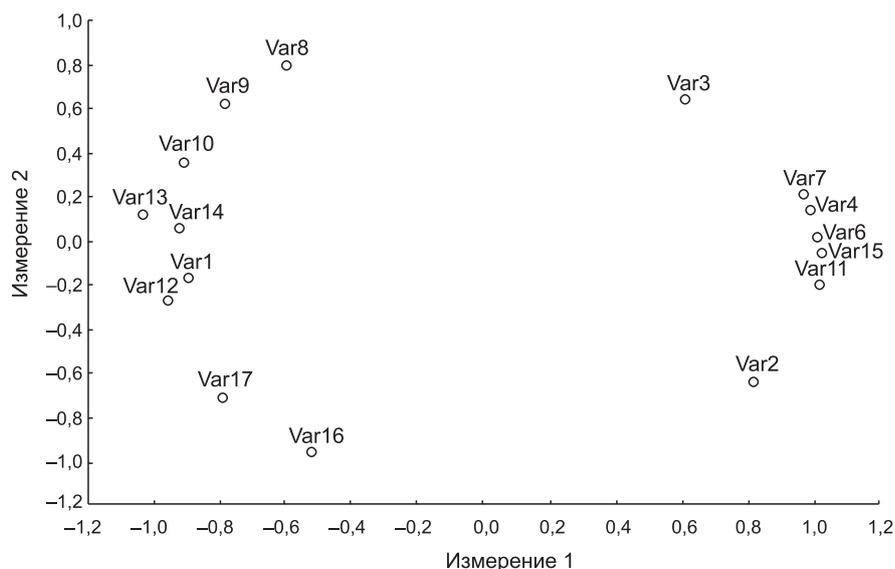


Рис. 3. Взаимосвязь признаков стерильности растений и осемененности плодов со спектром, частотой и типом хиазм, а также хромосомными нарушениями в мейозе у мутанта Calcc. (По данным табл. 3 и 4).

Var1 – процент бессемянных плодов на кусте, Var2 – среднее число семян в плоде, Var3 – количество открытых бивалентов на мейоцит, Var4 – количество кольцевых бивалентов на мейоцит, Var5 – количество бивалентов с 3 хиазмами на мейоцит, Var6 – количество унивалентных на мейоцит, Var7 – количество интерстициальных хиазм на мейоцит, Var8 – количество терминальных хиазм на мейоцит, Var9 – суммарное количество хиазм на мейоцит, Var10 – процент мейоцитов с унивалентами у полюсов в метафазе I, Var11 – процент мейоцитов с мостами в анафазе I, Var12 – процент мейоцитов с фрагментами хромосом в анафазе I, Var13 – процент мейоцитов с микроядрами в телофазе I, Var14 – процент мейоцитов с унивалентами у полюсов в метафазе II, Var15 – процент мейоцитов с мостами в анафазе II, Var16 – процент мейоцитов с фрагментами хромосом в анафазе II, Var17 – процент мейоцитов с микроядрами в телофазе II.

и содержание его варьирует в генофонде от 7,65 пг у *C. annuum* до 9,72 пг у *Capsicum pubescens* Ruis et Pavon (Arumuganathan, Earle, 1991; Belletti *et al.*, 1995). У томата эта цифра в четыре раза меньше при одинаковом количестве хромосом у обоих видов. (Lefebvre *et al.*, 1997). Увеличение размера генома перца связывают именно с хромосомным мутагенезом: с транслокациями, инверсиями в процессе дивергенции от общего предка перца и томата (Livingstone *et al.*, 1998). Хромосомный тип мутагенеза позволяет переносить гены в геномы путем анеуплоидии без нарушения функций исходных систем (Гриф, 2007). В наших исследованиях у мутанта Calcc отмечается еще одно ценное качество: у некоторых его семей наблюдается повышенное количество бивалентов с тремя хиазмами на мейоцит, т. е. нетипичных и редко встречающихся. Поэтому новый мутант может быть полезен в скрещиваниях с линиями, обладающими хозяйственно ценными признаками, для возможного повышения разнообразия в потомствах за счет появления нетрадиционных

рекомбинантов. В частности, в скрещиваниях мутанта Calcc с линией 5/92 нами, возможно, получен именно такой рекомбинант с повышенным количеством плодов (20 штук) на растении при одноразовой уборке в фазу биологической спелости и высокой продуктивностью (1,45 кг с куста). Обычно с куста выход плодов этой линии при одноразовой уборке в биологической спелости не превышает 8–12 плодов общим весом 1 кг. Полученный материал пройдет дальнейшее селекционно-генетическое исследование.

Поскольку у мутанта Calcc кардинально изменились соотношения количества и массы плодов на растении, параметры плода и его индекс при сохранении всех остальных признаков неизменными, мутант Calcc может оказаться удобной моделью для уточнения состава генной сети продуктивности и вклада ее элементов в процесс продуктивности. Перспективно использование нового мутанта и для исследования генной сети цветка.

Таким образом, проведена первичная цитолого-генетическая характеристика нового спон-

танного мутанта овощного перца, выделенного в условиях пленочных теплиц. Цитогенетический анализ выявил у мутанта две новые мутации, которые контролируются двумя независимыми доминантными факторами. Одна из мутаций, проявляющаяся в фазе семядолей, является летальной. Вторая мутация относится к главным хромосомным мутациям с эффектом сниженной жизнеспособности у гомозигот, характеризуется специфичным спектром и частотой хиазм и хромосомных aberrаций, зависит от дозы гена. Новая мутация может быть использована для прикладных и фундаментальных селекционно-генетических исследований овощного перца.

ЛИТЕРАТУРА

- А.с. № 37487. Сорт сладкого перца «Катюша» / О.О. Тимина, О.Ю. Тимин. Зарегистрировано в государственном реестре селекционных достижений РФ, допущенных к использованию. 2003.
- Белавкин Е.С. Оценка и создание исходного материала для селекции сортов и гибридов перца сладкого, адаптированных к условиям малообъемной технологии: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. М.: ВНИИССОК, 2010. С. 24.
- Величко А.К. Влияние теплового шока на репликацию ДНК, стабильность генома и структуру хроматина: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: Ин-т биологии гена РАН, 2012. С. 25.
- Гриф В.Г. Мутагенез и филогенез растений // Цитология. 2007. Т. 49. № 6. С. 433–441.
- Даскалов Х.С., Колев Н.Б. Овощеводство. София: Гос. изд-во с.-х. лит-ры, 1958. 562 с.
- Ершова В.Л. Возделывание перца сладкого в МССР (рекомендации). Кишинев: Молдагроинформреклама, 1990. 16 с.
- Жученко А.А., Грати В.Г., Андрищенко В.К., Грати М.И. Индуцирование хромосомных перестроек и локализация генов, контролирующих некоторые хозяйственно ценные признаки в геноме томатов // Изв. АН Молд. ССР. Сер. биол. и хим. наук. 1980. № 4. С. 24–30.
- Картель Н.А., Макеева Е.Н., Мезенко А.М. Генетика. Энциклопедический словарь. Минск: Тэхналогія, 1999. 448 с.
- Кучеренко Т. Рынок овощей и бахчевых культур: текущая конъюнктура и прогноз // Овощеводство. Украинский журн. для профессионалов. 2011. № 11/8. С. 30–37.
- Лакин Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие для биол. спец. вузов. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высш. шк., 1990. 352 с.
- Методические указания по селекции сортов и гибридов перца, баклажана для открытого и защищенного грунта. М., 1997. С. 1–88.
- Недбал А. Перец – культура южных широт // Овощеводство. Украинский журнал для профессионалов. 2011. № 11/8. С. 42–49.
- Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации // Методические рекомендации / Под ред. В.А. Тутельян. 2008.
- Пышная О.Н. Научное обоснование системы методов селекции и семеноводства перца сладкого и острого для средней полосы России: Автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. М.: ВНИИССОК, 2005. 47 с.
- Ригер Р., Михаэлис А. Генетический и цитогенетический словарь. М.: Колос, 1967. 608 с.
- Andrasfalvy A., Csillery G. The integrated gene pool of *Capsicum*. How to make it available to the breeder? // EUCARPIA. IXth Meeting on Genetics and Breeding on *Capsicum* and Eggplant, Budapest, Hungary, August 21–25, 1995. P. 14–18.
- Arumuganathan K., Earle E.D. Nuclear DNA content of some important plant species // Plant Mol. Biol. Reprod. 1991. V. 9. P. 208–219.
- Belletti P., Marzachi C., Nada E., Lanteri S. Nuclear DNA content in different species of *Capsicum* measured by flow cytometry // *Capsicum* and Eggplant Newslett. 1995. V. 14. P. 30–33.
- Daskalov S., Poulos F.M. Updated *Capsicum* gene list // *Capsicum* and Eggplant Newslett. 1994. V. 13. P. 15–26.
- Lefebvre V., Caranta C., Pflieger S. *et al.* Updated intraspecific maps of pepper // *Capsicum* and Eggplant Newslett. 1997. V. 16. P. 36–41.
- Lippert L.F., Bergh B.O., Smith P.Y. Gene list for the pepper // J. Hered. 1965. V. 56. P. 30–34.
- Livingstone K.D., Zhang Y., Lackney V.K. *et al.* An update on *Capsicum* mapping activities at Cornell // Xth Meeting on Genetics and Breeding of *Capsicum* and Eggplant, Avignon-France, September 7–11, 1998. P. 231–234.
- Pickersgill B. Chromosomes and evolution in *Capsicum* / Ed. E. Pochard. «*Capsicum 77*», C.R. Zeme congrès Eucarpia sur la génétique et la sélection du piment, 5–8 Juillet 1977, Montfavet Avignon (France), 1977. P. 27–38.
- Pickersgill B. The genus *Capsicum*: a multidisciplinary approach to the taxonomy of cultivated and wild plants // Biol. ZNBL. 1988. V. 107. P. 381–389.
- Wang D., Bosland P. The Genes of *Capsicum* // HortScience. 2006. V. 41. No. 5. P. 1169–1187.
- Wu F., Eannetta N.T., Xu Y. *et al.* A CosII genetic map of the pepper genome provides a detailed picture of synteny with tomato and new insights into recent chromosome evolution in the genus *Capsicum* // Theor. Appl. Genet. 2009. V. 118. P. 1279–1293.

CYTOLOGICAL AND GENETIC CHARACTERIZATION OF A NEW MUTANT OF VEGETABLE PEPPER *CAPSICUM ANNUUM* VAR. *ANNUUM* L.**O.Yu. Timin¹, O.O. Timina², P.Yu. Montvid³, A.P. Samovol³**¹ Research Institute of Ecology and Natural Resources, Tiraspol, Transnistria, e-mail: otimin@mail.ru;² Transnistrian State University, Tiraspol, Transnistria, e-mail: otimina@mail.ru;³ Institute of Vegetable and Melon Growing, Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kharkov, Ukraine, e-mail: montvid@mail.ru

Two new spontaneous mutations of the vegetable pepper *C. annuum* var. *annuum* have been identified in the 5-th insolation zone in a greenhouse. Tentative cytologic and genetic characterization shows that both were dominant and were controlled by two separately inherited single factors. The mutation manifested at the cotyledon stage is lethal, and the other belongs to basic chromosome mutations, causing a reduced viability of the homozygote. It is characterized by a specific spectrum and frequency of chiasmata and chromosomal aberrations. It depends on the gene dose. Application of the new mutation in pure breeding and genetic research of vegetable pepper is discussed.

Key words: vegetable pepper, *C. annuum* var. *annuum*, breeding, cytogenetic analysis, meiosis, spontaneous mutations.

УДК 633.11:631.5:582 (479.24)

МОРФОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СОСТАВ МЯГКИХ ПШЕНИЦ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) АЗЕРБАЙДЖАНА

© 2013 г. Х.Н. Рустамов

Институт генетических ресурсов Национальной академии наук Азербайджана, Азербайджан,
e-mail: xanbala.rustamov@yahoo.com

Поступила в редакцию 30 апреля 2013 г. Принята к публикации 2 июля 2013 г.

В статье приведена информация о распространении мягкой пшеницы на Южном Кавказе, в том числе и в Азербайджане. Проанализированы подвидовой и разновидностный состав и история создания староместных и новых селекционных сортов пшеницы мягкой. Показано, что для получения достоверных научных результатов при сравнительном изучении физиолого-биохимических признаков необходимо использовать контрастные по экотипу группы разновидностей мягкой пшеницы.

Ключевые слова: мягкая пшеница, сорт.

Азербайджан как один из основных очагов Переднеазиатского центра происхождения культурных растений отличается также исключительным разнообразием почвенно-климатических условий. Мягкие пшеницы Азербайджана богаты по морфо-ботаническому составу. По количеству собранных генотипов и разновидностей Азербайджан занимает первое место на Южном Кавказе. Здесь совместно с ВНИИР им. Н.И. Вавилова проведены многочисленные экспедиции и собран материал, отражающий внутривидовое разнообразие мягкой пшеницы. Собранные генотипы относятся к азиатскому (subsp. *hadropyrum* (Flaks.) Tzvel., convar. *rigidum* (Vav.) A. Filat. et Dorof., convar. *inflatum* (Vav.) A. Filat. et Dorof. и convar. *semirigidum* (Vav.) A. Filat. et Dorof.) и европейскому (subsp. *aestivum* = subsp. *indoeuropeum*) подвидам. У группы разновидностей *inflatum*, subconvar. *inflatum* найдена только одна разновидность – var. *glau-cilutinflatum*. Образцы, относящиеся к subsp. *hadropyrum*, convar. *inflatum*, subconvar. *eligu-latinflatum* (Flaksb.) A. Filat. et Dorof.; и convar. *semirigidum*, subconvar. *eligulatum* (Vav.) A. Filat. et Dorof. в Республике Азербайджан не найдены (Пшеницы мира, 1987).

Наиболее распространенные разновидности: var. *pseudoerythrospermum*, var. *lutescens*, var. *ferrugineum* и var. *caesium*. Кроме того, как био-

логическая примесь встречались var. *milturum*, var. *barbarossa*, var. *pseudobarbarossa* и var. *hostianum*. Собранные в низменных и предгорных районах пшеницы были озимыми, а в горах и высокогорье – яровыми и полуозимыми (Мустафаев, 1973; Культурная флора СССР, 1979). Большая часть материала (63,6 %) относилась к полуригидной, 16,4 % – ригидной группе разновидностей, 20 % – европейскому подвиду.

Азербайджан в географическом отношении расположен на границе Азии с Европой. Поэтому здесь встречаются разновидности как европейского, так и азиатского подвидов. Это еще раз доказывает продвижение пшеницы мягкой из Азии в Европу «по солнечной траектории» – с юго-востока на северо-запад. Сгруппировать современные селекционные сорта Азербайджана с экологической точки зрения очень трудно. Они, являясь смесью сложных гибридов различных отдаленных экотипов, морфологически в основном близки к европейскому подвиду. В настоящее время большинство (74 %) районированных в Азербайджане сортов по ботаническому составу принадлежат к европейскому подвиду: var. *lutescens*, var. *graecum*, var. *pseudoerythrospermum*, var. *ferrugineum* и var. *villosum*.

Широкий морфобиологический полиморфизм азербайджанских пшениц, кроме разно-

образа эколого-географических условий и несознательного искусственного отбора, был обусловлен «Великим шелковым путем». Древняя «магистраль», связывающая Европу с Индией и Китаем, проходила по низменной и предгорной территории Азербайджана. Кроме других товаров, по этому великому пути, вероятно, привозили также семенной материал зерновых культур и их диких сородичей. Ареалы генотипов, отличавшихся по хозяйственно ценным признакам, расширялись, и многочисленные спонтанные гибриды, естественные мутанты, дав начало сортам народной селекции, редким разновидностям, обогащали генофонд пшеницы. В Азербайджане с древних времен возделывали в основном сорта-популяции пшеницы твердой. В посевах часто наблюдалась смесь популяций из твердой, мягкой, тургидной, компактной и других тетра- и гексаплоидных видов пшеницы. Наряду с пшеницей твердой созданы и веками выращивались староместные сорта пшеницы мягкой: Гюргана, Гюльгери, Кырмызы бугда, Хырда бугда и др. В 1930–1960-х гг. на их основе методом индивидуального отбора созданы первые сорта научной селекции: Араз бугдасы (*Egythrospergum* 1335/2), Местный турцикум (Нахчыван), Кырмызы бугда (*Ferrugineum* 704/2) – автор В.Н. Громачевский, Бол бугда, Бол бугда 2, Арзу – автор И.Д. Мустафаев. В 1950–1980 гг. с использованием сортов местной и зарубежной, в основном российской (КНИИСХ), мексиканской, аргентинской селекции и образцов из мировой коллекции ВИР, методом скрещивания созданы и районированы: Азербайджан 1, Азербайджан 2, Ферругинеум 27, Галяба, ВГ 5 (В.Н. Громачевский, С.В. Рожановский и др.), Гюргана 1, Бирлик, Грекум 75/50, Зардаби (И.Д. Мустафаев и др.) и другие сорта мягкой пшеницы.

Созданные и районированные до 1980-х годов сорта были экстенсивного типа и не позволяли получать высокие урожаи. Было необходимо создать новые, высокоурожайные сорта с высоким качеством зерна, адаптированные к различным экологическим условиям. В связи с чем в Азербайджанском НИИ земледелия под руководством академика Д.А. Алиева была подготовлена научно обоснованная комплексная селекционная программа. Разработаны теоретические и практические основы для создания

«идеальной» пшеницы – высокопродуктивных сортов озимой пшеницы с высоким качеством зерна, устойчивых к абиотическим и биотическим факторам среды. Начиная с 1970 г. в НИИ земледелия созданы 79 сортов зерновых и зернобобовых культур. Из них 41, в том числе 10 сортов пшеницы мягкой, районированы (сорта – Гийматли 2/17, Акинчи 84, Азаматли 95, Нурлу 99, Азери, Угур, Тале 38, Аран, Муров 2, Гырмызы гюль); и 6 сортов находятся в сортоиспытании (Гюнашли, Зирва 80, Йегане, Фатима, Кызыл бугда, Шафаг 2). В последние десятилетия усилились связи с CIMMIT, ICARDA и другими международными организациями. С привлечением их генофондов в селекционный процесс также созданы устойчивые к болезням, засухе высокоурожайные сорта интенсивного типа, позволяющие получать 80–100 ц/га. (Алиев и др., 2012).

В последние годы (с 2009 г.) завезены и районированы высокоурожайные сорта Память, Москвич, Таня, Нота, Батко, Краснодар 99, Фактор, Крошка (Россия, КНИИСХ); Akteur, Hattrick, Chealier (Германия). Кроме скороспелых сортов Таня и Нота, все они – среднеспелые. Несмотря на высокие показатели их урожайности в своей зоне, эти сорта не адаптированы к местным условиям (недостаток осадков в период вегетации; жаркое, засушливое, знойное лето; в основном бедные гумусом, минеральными элементами и в различной степени подверженные эрозии и засолению почвы из-за применения примитивных способов орошения). Эти сорта созданы для других почвенно-климатических условий, отзывчивы к высокому агрофону, неустойчивы к местным популяциям патогенов.

Азербайджан – небольшая по территории страна. Тем не менее, здесь встречаются 9 из 12 эколого-географических зон. Поэтому даже внутри страны необходимо создавать сорта, соответствующие конкретным почвенно-климатическим условиям. Оптимизируя условия выращивания новых сортов селекции Азербайджанский НИИ земледелия, своевременно проводя комплексные агротехнические приемы, повышая культуру земледелия, можно обеспечить высокие урожаи с высоким качеством зерна. Новые сорта адаптированы к контрастным условиям региона, устойчивы к местным расам патогенов, воздушной и почвенной засухе в

период налива зерна. Даже в условиях пониженного агрофона эти сорта могут гарантировать устойчивые урожаи.

Надежное сохранение генофонда в национальных генбанках и изучение пшениц по определителям ВИР (Культурная флора ..., 1979; Пшеницы мира ..., 1987) – результату напряженного труда трех–четырёх поколений тритикологов, остается актуальным и необходимым. Ряд таксонов, указанных в данном определителе как виды, полностью не отвечают видовому рангу (барьеры скрещиваемости, ареал распространения, образование сложных групп популяций и т. д.). Несмотря на спорные вопросы о месте некоторых видовых таксонов в роде *Triticum* L., для поддержания коллекций в биологически чистом виде определитель ВИР незаменим. В Азербайджане до сих пор используются определители К.А. Фляксбергера (Культурная флора ..., 1935) и И.Д. Мустафаева (1973), в которых разновидности не сгруппированы на подвиды и группы разновидностей. Разновидности описаны только по морфологическим признакам колоса, без учета эколого-географического распространения-экотипа (Мустафаев, 1973. С. 77–114).

В некоторых физиологических, генетических исследованиях сравниваются разновидности по таким сложным признакам, как устойчивость к биотическим и абиотическим факторам, с целью выявления различий внутри группы. Не понятно, как можно сравнивать генотипы белоколосых и красноколосых разновидностей внутри одного подвида по таким сложным признакам, как засухо-, жаро-, зимо- и солеустойчивость и устойчивость к болезням. Генотипы по этим признакам можно изучать и идентифицировать только на клеточном или молекулярно-генетическом уровне. По нашему мнению, сравнительное изучение физиолого-биохимических признаков на основе старых определителей к достоверным научным результатам не приведет.

Если изучаемые объекты, разновидности, как в определителе ВИР, сгруппировать не только по морфологическим признакам колоса, а еще с учетом экотипа систематизировать в группы разновидностей, подвиды, виды, можно получить намного больше информации о генотипе. Например, определение всех остистых, неопу-

шенных, с белым колосом и зерном генотипов как var. *graecum* не несет информацию о габитусе растений; форме, размерах стеблей и листьев; устойчивости к различным факторам среды. Такое определение дает информацию только о признаках колоса и зерна. Если неопушенные, остистые, с белым колосом и зерном генотипы, относящиеся к subsp. *hadropyrum*, convar. *rigidum* (Средняя Азия, Афганистан, Иран, Южный Кавказ), определить как var. *subgraecum*; генотипы, относящиеся к subconvar. *inflatum*, – var. *graecinflatum*; генотипы, относящиеся к subconvar. *eligulatinflatum*, – var. *korshinskyi*; генотипы, относящиеся к subconvar. *eligulatum*, – var. *gunticum*; генотипы, относящиеся к subconvar. *semirigidum*, – var. *graecum*; генотипы, относящиеся к европейскому подвиду (subsp. *aestivum*), – var. *oblivense*, то можно получить намного больше информации о генофонде, поддерживаемом в генбанках. Следовательно, определение с учетом экотипа дает возможность получить информацию о происхождении, экотипе, морфофизиологических признаках растений, устойчивости к биотическим и абиотическим факторам. Вместо множества описаний, только одно название разновидности несет всю информацию о генотипе. Сравнительное изучение сложных физиолого-биохимических признаков подвидов, групп разновидностей, включающих отдельные экотипы, позволит получить точную научную информацию о генотипе.

При подборе родительских пар в скрещиваниях для создания исходного материала, генетических источников и доноров для резко континентальных условий более перспективны генотипы, относящиеся к азиатскому подвиду. Такие формы обычно обладают комплексом морфофизиологических признаков, обеспечивающих адаптивность к абиотическим факторам среды.

Как правомерно считают многие исследователи, с конца XX в. в Азербайджане интенсивность формообразовательного процесса понизилась. Причиной тому являются: развитие семеноводства, повышение культуры земледелия, исключение из посевов сортопопуляций, уменьшение посевных площадей редких видов пшеницы, что, в свою очередь, связано с исключением спонтанной внутри- и межвидовой гибридизации – основы появления новых форм

и разновидностей. Во-первых, семеноводство еще слабо развито, во-вторых, сети селекционных и других станций наоборот расширяются. Здесь ежегодно высеваются многие тысячи сортов, гибридов и видов пшеницы разного происхождения. Несмотря на то что в процессе селекции и семеноводства появляющиеся спонтанные гибриды выбраковываются, есть еще шанс найти спонтанные гибриды, новые и редкие разновидности.

В последние годы нами в различных регионах собраны и включены в питомник изучения спонтанные гибриды редких разновидностей азиатского подвида (сonvar. *rigidum*, subconvar. *semirigidum*). Эти формы весьма важны для более эффективного вовлечения в селекционный процесс с целью получения засухоустойчивых, скороспелых аборигенных пшениц, хорошо приспособленных к аридным условиям произрастания. Данный материал посеян в условиях необеспеченной богары (Гобустанский ЗОС) с

целью получения истинно озимых и полуозимых форм, исходного материала, генетических источников и доноров зимо-, засухоустойчивости, высокой потенциальной урожайности и качества зерна.

ЛИТЕРАТУРА

- Алиев Д.А., Талаи Дж.М., Мусаев, А.Д., Ахмедов М.Г. Вклад Института земледелия в продовольственную безопасность страны (на азербайджанском языке) // Тр. Аз. НИИ земледелия. Т. 23. Баку, 2012. С. 6–12.
- Культурная флора СССР / Под общим руководством В.Ф. Дорощева. Т. 1. Пшеница / Дорощев В.Ф., Филатенко А.А., Мигушова Э.Ф. и др. Л.: Колос, 1979. 346 с.
- Пшеницы мира / Дорощев В.Ф., Удачин Р.А., Семенова Л.В. и др. / Под ред. В.Ф. Дорощева. Сост. Р.А. Удачин. 2-е изд., пер. и доп. Л.: ВО Агропромиздат, 1987. 560 с.
- Мустафаев И.Д. Определитель пшениц Азербайджана. Баку: Аз. Гос. Изд., 1973. 148 с.
- Культурная флора СССР / Под общ. рук. Н.И. Вавилова, под ред. Е.В. Вульф; Наркомзем СССР. ВАСХНИЛ. ВИР. М.; Л.: Сельхозгиз, 1935. Т. 1. Хлебные злаки. Пшеница / Сост. К.А. Фляксбергер. 435 с.

MORPHOBIOLOGICAL STRUCTURE OF BREAD WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) IN AZERBAIJAN

Kh.N. Rustamov

Genetic Resources Institute, Azerbaijan National Academy of Sciences, Azerbaijan,
e-mail: xanbala.rustamov@yahoo.com

Summary

The article presents information on the distribution of bread wheat in South Caucasus, including Azerbaijan. The subspecies and varietal composition and history of traditional and newly bred varieties of bread wheat are considered. It is shown that ecotype-contrasting groups of varieties should be used to obtain reliable scientific results on the comparative study of physiological and biochemical characteristics.

Key words: bread wheat, variety.

УДК 633.11:577.21

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СЛОЖНОСТЬ И КОНТЕКСТ-СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПРИЗНАКОВ УРОЖАЯ ПШЕНИЦЫ В ЗАСУШЛИВЫХ УСЛОВИЯХ

© 2013 г. В. А. Крупнов

Государственное научное учреждение Научно-исследовательский институт
сельского хозяйства Юго-Востока, Саратов, Россия,
e: mail: raiser_saratov@mail.ru

В редакцию поступила 21 февраля 2013 г. Принята к публикации 14 августа 2013 г.

В засушливых регионах дефицит воды разной продолжительности и интенсивности часто сочетается с жарой и другими и стрессами, и лишь изредка встречаются годы с благоприятным увлажнением. В этих контрастных условиях ведущую роль в урожае зерна играет образ жизни сорта (озимые, яровые, продолжительность вегетационного периода) и технология. Например, в конце XX в. в Поволжье РФ потепление в зимний период и улучшение технологии позволили озимой пшенице почти повсеместно вытеснить яровую. Идентификация и маркирование QTL открыли новые возможности для выявления генетических различий между генотипами по каждому признаку, на которые опирается традиционная селекция, более обоснованно подбирать родительские пары для скрещивания и проводить отбор. Однако эффект QTL, как правило, в огромной степени зависит, с одной стороны, от генетического фона (плейотропия, эпистаз, использование чужеродных генов), с другой – от внешней среды (время и интенсивность засухи, технология выращивания) и взаимодействия между аллелями и внешней средой. Все это вынуждает в каждом селекционном цикле каждый новый рекомбинантный генотип подвергать генетической идентификации в единстве с аккуратным фенотипированием. В условиях ограниченного финансирования селекции наибольшую пользу от использований ДНК-технологий можно ожидать лишь на популяциях от скрещиваний лучших элитных сортов и перспективных линий и тогда, когда для улучшения признака(ов) одно традиционное фенотипирование, без дополнения генотипированием, безуспешно.

Ключевые слова: пшеница, молекулярная селекция, молекулярные маркеры, генотип, фенотип, признак, картирование, фенология, уборочный индекс, линии, абиотические факторы среды.

ВВЕДЕНИЕ

Селекция направлена, прежде всего, на устранение у лучших, хорошо адаптированных сортов и перспективных линий признаков, лимитирующих урожай зерна (УЗ) и его качество. Чем удачнее подобраны реципиент и донор желательного признака, тем быстрее можно создать новый сорт путем прямого, эмпирического отбора на УЗ и его качество из достаточно обширных гибридных популяций. Опираясь на этот подход, традиционная рекомбинационная селекция в сочетании с совершенствованием технологии выращивания растений позволила в XX в. более чем удвоить производство зерна.

Однако чем выше достижения селекции, тем труднее повышать ее эффективность, особенно в засушливых регионах, и неслучайно здесь вклад селекции в продуктивность в несколько раз ниже, чем в регионах, с благоприятным увлажнением (Brisson *et al.*, 2010; Крупнов, 2011; Вьюшков и др., 2012; Manès *et al.*, 2012).

Засуха – самый сложный и разрушительный абиотический стрессор, сопровождающий всю историю земледелия. По времени наступления и продолжительности засуха может быть краткосрочной (в начале, середине или конце вегетации) и долгосрочной (в течение всего вегетационного сезона), разной степени интенсивности. Это явление – не просто де-

фицит воды, а сложная комбинация дефицита воды, температурного стресса, сухости воздуха («суховей»), засоления почвы и других абиотических и биотических факторов. Ущерб от нее превышает ущерб от любого другого стрессора. В РФ особенно сильной засуха была в 2010 и 2012 гг.

В засушливых регионах круг задач шире: нужно улучшать не только толерантность к дефициту воды, но одновременно и отзывчивость на благоприятные условия, так как здесь засушливые сезоны непредсказуемо чередуются с сезонами, относительно благоприятными по водному режиму, когда урожайность зерна пшеницы может быть значительно выше, чем в острозасушливые сезоны. Для создания сорта, сочетающего в себе максимум нужных признаков, необходимы достаточно представительные гибридные популяции, между тем, продуктивность одного растения в засушливых условиях крайне низкая (ниже 20–25 семян). Здесь почва в результате иссушения сильно растрескивается (не говоря уже о неоднородности по механическому составу, плодородию, содержанию питательных веществ и воды), нередко даже соседние делянки неравномерно заселяются вредителями, возбудителями болезней, сорняками. Наследуемость признаков весьма низкая. К тому же все компоненты продуктивности интегрированы, тесно взаимосвязаны между собой. Все это крайне затрудняет отбор на повышение потенциала продуктивности. В этих условиях оценка сортов и линий на продуктивность на мелких делянках в одном пункте ненадежна. Более надежна она не в одном, а в разных пунктах, резко различающихся по условиям произрастания (мультилокационные испытания), однако не каждый селекционер располагает соответствующими средствами. Все эти факторы затрудняют, замедляют и обременяют отбор на продуктивность, и в отсутствие надежных маркеров он остается в определенной степени искусством (Шехурдин, 1961; Crow, 2001; Jackson *et al.*, 2011; Passioura, 2012). Новые возможности для селекции открыло молекулярное маркирование признаков, выяснение их генетической архитектуры и зависимости эффектов признаков от межгенных взаимодействий и взаимодействия генотип–среда. В нашей стране это направление исследований (в полном

селекционном цикле создания новых сортов) еще не получило распространения. Между тем за рубежом размах исследований неуклонно расширяется и в ряде стран ДНК-технологии уже используются в практической селекции.

Цель обзора – применительно к условиям РФ рассмотреть: а) генетическую архитектуру морфологических и физиологических признаков, используемых в традиционной селекции пшеницы в засушливых регионах; б) обобщить информацию о зависимости эффектов QTL от генофона (плейотропия, эпистаз) и агроландшафта, что нельзя не учитывать в практической селекции.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАСЧЛЕНЕНИЕ ПРИЗНАКОВ УРОЖАЯ ЗЕРНА

Основными методами генетического расчленения сложных признаков и картирования QTL (quantitative trait loci) являются анализ сцепления в популяциях от двуродительских скрещиваний (McCartney *et al.*, 2005; Quarrie *et al.*, 2005; Rebetzke *et al.*, 2008; McIntyre *et al.*, 2010) и ассоциированное картирование QTL в наборах сортов и линий (association mapping) (Brescghello, Sorrells, 2006; Crossa *et al.*, 2007; Maccaferri *et al.*, 2011; Charmet, Storlie, 2012). Наиболее вероятное количество «реальных» QTL и их консенсус на хромосомах изучаются с помощью метаанализа (Zhang *et al.*, 2010). Фронт исследований по генетической архитектуре УЗ непрерывно расширяется при разном уровне продуктивности вплоть до 7–9 т/га и выше (Snape *et al.*, 2007; Maccaferri *et al.*, 2011). В подавляющем большинстве случаев исследования проводятся на мягкой пшенице (*Triticum aestivum* L.) и крайне редко – на *Triticum durum* Desf. Исследованиями охвачены генотипы ярового, озимого и альтернативного (факультативного) посевов. Локусы QYG (quantitative yield grain) идентифицированы и локализованы во всех без исключения хромосомах (Zhang *et al.*, 2010), но в одних группах гомеологов они встречаются чаще (например, в группах 2, 3, 4), а в других – реже (например, в группах 5 и 6). Многие из идентифицированных QYG являются малозначимыми или минорными (Quarrie *et al.*, 2005; Dilbirligi *et al.*, 2006;). Количество выявляемых QYG зависит от различий между

генотипами по продуктивности и адаптивности, а также от количества пунктов, контрастных по влиянию абиотических и биотических стрессов (Tardieu, 2012).

КОМПОНЕНТЫ ПРОДУКТИВНОСТИ

Урожай зерна складывается из: (1) числа зерен на единице площади (ЧЗП, QTL *Kpsm*) и (2) крупности или среднего веса (масса) зерновки (обычно определяют массу 1000 зерен, QTL *Tkw*). ЧЗП в решающей степени определяется условиями, складывающимися в период до колошения, а масса 1000 зерен – после колошения, и наследуемость этого признака значительно выше, чем ЧЗП. Повышение крупности зерна (особенно максимальное, до «видового потолка») обычно сопровождается снижением ЧЗП и значимого выигрыша в урожае зерна, как правило, не наблюдается. Поэтому основным путем повышения УЗ является увеличение ЧЗП (этот признак нередко ради удобства подразделяют на число продуктивных колосьев, число зерен в колосе и массу зерна с колоса). В популяциях рекомбинантных инбредных линий и наборах сортов идентифицированы и локализованы на многих хромосомах QTL *Tkw* признака «масса 1000 зерен», однако в каждой из этих популяций основными обычно являются лишь единичные локусы (Groos *et al.*, 2003; Чесноков и др., 2008; Sun *et al.*, 2008; Gegas *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012). Аналогичная, но более сложная картина по распространению локусов характерна и для признака ЧЗП: QTL *Kpsm* ЧЗП также идентифицированы и локализованы с разной частотой встречаемости почти на всех хромосомах (Huang *et al.*, 2004; Marza *et al.*, 2006; Dilbirligi *et al.*, 2006; Kirigwi *et al.*, 2007; Kuchel *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2011; Nguoka *et al.*, 2011). Метаанализ свидетельствует о небольшом числе основных QTL *Kpsm* ЧЗП, экспрессия которых подтверждена в мультилокационных исследованиях (Zhang *et al.*, 2010; Maccaferri *et al.*, 2011).

ВЕГЕТАЦИОННЫЙ ПЕРИОД

Увеличение/оптимизация продолжительности фотосинтетической активности растений – важнейший фактор урожая (Кумаков,

1985). Например, в Поволжье вегетационный период озимой пшеницы достигает 300 дней (включая 100–120 дней зимовки под снегом), а яровой пшеницы в знойные засушливые годы сокращается до 70–75 дней. В таких условиях нормально перезимовавшая озимая пшеница, как правило, по урожайности зерна превышает яровую пшеницу в 1,5–2 раза. Благодаря этому преимуществу в условиях потепления климата (особенно в зимнее время), во многих областях Поволжья за последние полвека вместо яровой пшеницы стали выращивать озимую пшеницу (Крупнов, 2011). Главное генетическое различие между этими культурами заключается, во-первых, в состоянии аллелей *Vrn*: у типично яровых они доминантные, а у типично озимых – рецессивные. У более скороспелых генотипов чаще встречаются доминантные аллели в *Ppd*-локусах (реакция на длину дня). Аллели *Vrn* и *Ppd* значимо влияют не только на дату колошения (и подготовку к перезимовке), но также на продуктивность пшеницы (Stelmakh, 1998; Dyck *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2010). Установлены эпистатические взаимодействия между *Vrn* и *Ppd* (Yoshida *et al.*, 2010; Le Gouis *et al.*, 2012). Кроме *Vrn* и *Ppd* на продолжительность периода вегетации влияют *Eps*-локусы (Earliness per se) и другие QTL (Hanocq *et al.*, 2007; Griffiths *et al.*, 2009; Le Gouis *et al.*, 2012). У яровых и озимых генотипов направление связи QTL/QYG с QTL скорости колошения и других признаков периода вегетации зависит от многих факторов (Kuchel *et al.*, 2007; Snape *et al.*, 2007; Rebetzke *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010; Bogard *et al.*, 2011). Если в условиях терминальной засухи (в репродуктивный период) обычно выигрывают скороспелые генотипы, то в годы с благоприятным увлажнением они проигрывают сортам средне- или позднеспелым (Мамонтова, 1980; Кузьменко, 2005).

ПОЛОГ

В засуху особое значение приобретает время формирования сплошного полога, играющего решающую роль в фотосинтезе. Полог замедляет прогревание почвы и испарение из нее влаги, затрудняет прорастание семян сорняков. Время его формирования зависит, как от генотипа, так и от технологии (время посева, норма высева семян и т. д.) и других

факторов. Для образования полога большое значение имеют такие признаки, как продолжительность периода от посева до появления всходов (скорость появления всходов), полнота всходов, время начала кущения и количество побегов кущения, включая колеоптильные (Liang, Richards, 1994). Каждый из признаков образования полога контролируется многими QTL, и их экспрессия сильно зависит от внешней среды, особенно от обеспеченности всходов водой, азотом, фосфором и другими ресурсами (Rebetzke *et al.*, 2007). QTL температуры полога идентифицированы на многих хромосомах (Pinto *et al.*, 2010). Чем дольше задерживается старение листьев, тем более полно идет процесс реутилизации и налива зерна (Кумаков, 1985; Naruoka *et al.*, 2012). QTLs задержки старения листьев идентифицированы на хромосомах 1A, 2A, 2B, 2D, 3A, 3B, 4A, 6A, 6B, 7A, 7D (Verma *et al.*, 2004; Vijayalakshmi *et al.*, 2010; Naruoka *et al.*, 2012). Эффект QTLs зависит от факторов внешней среды (Verma *et al.*, 2004; Naruoka *et al.*, 2012). В образовании полога участвуют также ости колоса. Однако их влияние на урожай сильно зависит как от генного фона, так и от внешней среды (Вьюшков и др., 1991; Motzo, Giunta, 2002; Foulkes *et al.*, 2007).

ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТЬ

Адаптация растений к засухе включает различные физиологические механизмы избегания засухи и собственно толерантности к дефициту воды (Des Marais, Juenger, 2010). Очень часто засуха сочетается с жарой и многими другими неблагоприятными факторами, что весьма затрудняет вычленение эффекта дефицита воды. В таких условиях о засухоустойчивости сорта/линии обычно судят по УЗ (Blum, 2009; Richards *et al.*, 2010). На производство 1 т зерна на 1 гектаре пшеница расходует воды 500–1000 м³, что равно 50–100 мм осадков (Passioura, 2007; Qiu *et al.*, 2008; Sadras, Angus, 2006). Дефицит воды может лимитировать УЗ в разные этапы вегетации: а) получение нормальной густоты всходов, б) формирование сплошного полога и роста, в) цветение и оплодотворение, г) формирование и налив зерна. Не выявлено ни одного гена/признака, который обеспечивал бы толерантность ко всем типам засухи (Sinclair, 2011; Passioura, 2012).

В зависимости от генотипа и от времени наступления, интенсивности и продолжительности засухи у пшеницы идентифицированы и локализованы на хромосомах многочисленные QTL, ассоциируемые с устойчивостью к различным сценариям дефицита воды (Bennett *et al.*, 2012). В связи с этим при одном сценарии засухи эффект одного и того же QTL может быть положительный, при другом – нейтральный, а при третьем – отрицательный (Tardieu, 2012). Контекст-зависимы также эффекты QTLs для температуры полога (van Ginkel, Ogbonnaya, 2007), содержания хлорофилла (индикатор потенциала фотосинтетической способности), водорастворимых углеводов в стебле, определения изотопа углерода (Rebetzke *et al.*, 2008) и других физиологических признаков, ассоциируемых с УЗ (Kumar *et al.*, 2012). Контекст-зависимы также эффекты транскрипционных факторов, каждый из них лишь частично повышает толерантность трансгенных растений к дефициту воды (Fleury *et al.*, 2010). Например, эффект DREB (dehydration-responsive element-binding protein) у трансгенных линий пшеницы в полевых условиях был ниже, чем в теплице (Saint Pierre *et al.*, 2012).

ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ЖАРЕ (ЖАРОСТОЙКОСТЬ)

Пшеница – умеренно теплолюбивая культура. Для нее в период налива оптимальная температура около 15 °С (Wardlaw *et al.*, 1989). Особенно губительно сочетание жары с засухой. Так, в Поволжье в условиях дефицита воды повышение средней температуры воздуха в период вегетации растений с 16,5 до 22,2 °С снижает урожайность зерна яровой мягкой пшеницы даже на посевах по черному пару с 2330 до 695 кг/га, или в 3,3 раза (Германцев, Крупнов, 2001). QTL для толерантности к жаре идентифицированы на хромосомах 1A, 1B, 2A, 2B, 3B, 5A, 6D (Mason *et al.*, 2011). На рекомбинантных инбредных линиях от скрещивания Ventnor/Karl 92 идентифицированы девять QTL толерантности к жаре (в период после цветения) на хромосоме 2A, два QTL на хромосомах 6A и 6B и по одному QTL на хромосомах 3A, 3B и 7A. При этом оба родителя показали вклад как в жаростойкость, так и в задержку старения

листьев (Vijayalakshmi *et al.*, 2010). В условиях жары и дефицита воды даже при исключении варьирования по высоте растений и фенологии роста и развития общие QTL УЗ были идентифицированы на хромосомах 1В, 2В, 3В, 4А, 4В и 7А (Pinto *et al.*, 2010). Возможно, во многих случаях толерантность к засухе и жаре контролируется одними и теми же генами (Pinto *et al.*, 2010).

ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ЗАСОЛЕНИЮ

Во многих засушливых регионах почвы нередко засоленные (содержание солей выше 0,25 %), что крайне неблагоприятно для урожая (Munns *et al.*, 2006; Nevo, Chen, 2010). Толерантность к засолению – сложный признак, контролируемый многими QTL, ряд из них идентифицирован на хромосомах 2D, 6D, 2А, 5А, 6А, 7А, 1В, 4В, 3В, 6В, 7В (Diaz De Leon *et al.*, 2011). Толерантность к засолению зависит как от генотипа и стадий онтогенеза, так и от химического состава соли (карбонат натрия, хлориды и сульфаты), степени засоления почвы, содержания в ней воды и многих других факторов (Diaz De Leon *et al.*, 2011).

КОРНИ

В засушливых регионах требования к корневой системе определяются, прежде всего, сценарием засухи и количеством воды, накопленной в почве до посева (Palta *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2011; Tardieu, 2012). В годы с ранней засухой верхний слой почвы высыхает настолько быстро, что растения не могут образовать узловые корни и живут только на трех–четыре зародышевых корнях (Германцев, Крупнов, 2001). На этих посевах, например, в Нижнем Поволжье, даже если в период после колошения выпадает достаточное количество осадков, урожай зерна не превышает 1,5–1,8 т/га. Между тем яровой ячмень в этих условиях, как правило, превосходит яровую пшеницу как по стартовой скорости роста, так и по способности формировать узловые корни. В условиях долговременной устойчивой засухи (например, в 2010 г.), когда растения снабжаются водой только из глубинных слоев почвы, особое значение приобретает длина корней (Крупнов, 2011).

Предполагается, что отбор на продуктивность сопровождается совершенствованием корневой системы. Однако непропорционально большой расход продуктов ассимиляции на развитие массы корней может неблагоприятно сказаться на урожае зерна (Ma *et al.*, 2008; Palta *et al.*, 2011). Сорты и линии различаются по глубине проникновения корней, распределению их по слоям почвы, анатомическим и другим признакам, включая их массу и отношение этой массы к надземной массе (Li *et al.*, 2007; Christopher *et al.*, 2008; Wojciechowski *et al.*, 2009; Karley *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2011), устойчивости к корневым болезням и вредителям (Watts *et al.*, 2011). Известны сообщения QTL зародышевых корней и скорости укоренения (Sanguineti *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2011), QTL, ассоциированные с усвоением азота и фосфора всходами (Su *et al.*, 2009). На формирование корневой системы влияет 1RS-транслокация от ржи (Ehdaie *et al.*, 2010), *Rht*-гены (Wojciechowski *et al.*, 2009). У ряда генотипов пшеницы установлены различия в поглощении азота из почвы (Palta *et al.*, 2011).

ВЫСОТА РАСТЕНИЙ И УБОРОЧНЫЙ ИНДЕКС ЗЕРНА

Высота растений (ВР) – важный детерминант архитектоники растений, уборочного индекса зерна и урожая (Стебут, 1915; Maccaferri *et al.*, 2008; Sadeque, Turner, 2010). Она контролируется многими специфическими и неспецифическими генами (Лобачев, 2000). *Rht*-гены (reduced height) наиболее эффективны в условиях достаточного увлажнения/орошения, внесения удобрений и защиты растений от сорняков и паразитов. Установлена ассоциация QYG с QTL высоты растений на хромосомах 4В, 2В, 5В, 6В, 7В и других (Cadalen *et al.*, 1998; Snape *et al.*, 2007; Rebetzke *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010). QTL устойчивости к полеганию идентифицированы на 1В, 1D, 2В, 2D, 4В, 4D, 6D и 7D (Verma *et al.*, 2005). Однако в остро-засушливых регионах, например, в Поволжье, «задействовать» в сортах *Rht*-гены, в частности *Rht-B1b* и *Rht-D1b*, не удается. Здесь ВР у новых сортов остается такой же, как у старых (местные ландрасы). Высокорослые сорта, в отличие от низкорослых сортов, лучше конкурируют с

сорняками и накапливают в зерне больше белка и клейковины (Лобачёв, 2000).

УСТОЙЧИВОСТЬ К БИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ

В засушливых регионах прямой отбор на урожай нередко сопровождается снижением уровня устойчивости к болезням (Шехурдин, 1961; Мамонтова, 1980), а от введения в хорошо адаптированные к местным условиям сорта и линии генов устойчивости урожай может снижаться и без эпидемий. Оба эти крайне неприятные явления могут быть результатом либо нежелательного сцепления, либо недостаточной адаптивности *R*-гена(ов) к условиям внешней среды, либо результатом действия каких-то других неизвестных механизмов. Поэтому генетическую архитектуру урожая нельзя рассматривать в отрыве от QTL, контролирующих устойчивость к вредителям и возбудителям болезней, хотя, строго говоря, это факторы не повышения урожая, а «самообороны» растений, обеспечения нормального фотосинтеза и недопущения неэффективного использования воды и других ресурсов (Bolton, 2009). Устойчивость к биотическим стрессам (как и к абиотическим стрессам) связана с определенным отвлечением ассимилятов и метаболитов. В условиях эпидемий паразитов эти «непроизводительные» расходы с лихвой перекрываются выигрышем в урожае устойчивых растений, по сравнению с неустойчивыми. При отсутствии эпидемии патогена или массового размножения вредителя некоторые гены устойчивости отрицательно влияют на продуктивность растений (Касатов, Крупнов, 1983; Tian *et al.*, 2003; Orgil *et al.*, 2007; Makepeace *et al.*, 2007; Hao *et al.*, 2009; Kalinina *et al.*, 2011). Между тем сорт должен быть конкурентоспособным и при отсутствии эпидемии патогена.

ЧУЖЕРОДНЫЕ ГЕНЫ

Отсутствие в генофонде пшеницы нужных генов/признаков вынуждает селекционеров обращаться за ними к различным сородичам (Friebe *et al.*, 1996; Крупнов, Сибикеев, 2005; McIntosh *et al.*, 2008; Nevo, Chen, 2010). Пока в коммерческих сортах «задействованы» преиму-

щественно гены/транслокации, которые просто наследуются и контролируют устойчивость к биострессорам. Беспрецедентное распространение получила 1RS транслокация от ржи (*Secale cereale* L.) (Villareal *et al.*, 1998; Rebetzke *et al.*, 2008; Беспалова и др., 2012; Sharma *et al.*, 2011). В ряде сортов успешно используется 6VS-транслокация от *Dasypyrum villosum* (syn *Haynaldia villosa* L.), контролирующая устойчивость к стеблевой ржавчине, фузариозу колоса, вирусу корней (Li *et al.*, 2007). В ряде регионов получила распространение Lr19-транслокация от *Agropyron elongatum* Host., которая положительно влияет на урожай зерна, даже при отсутствии эпидемий листовой ржавчины. Однако этот эффект зависит от генофона и взаимодействия генотипа с внешней средой (Reynolds *et al.*, 2001; Крупнов, Сибикеев, 2005). Аналогичное явление характерно и для 1RS-транслокации от ржи (Kim *et al.*, 2004; Peake *et al.*, 2011).

КАЧЕСТВО ЗЕРНА

Важнейшими признаками качества зерна являются содержание в нем белка (СБЗ) и его состав. Однако взаимосвязь между УЗ и СБЗ в большинстве случаев значимо отрицательная и многие из идентифицированных QTL/QGrc ассоциированы со снижением урожая зерна (Blanco *et al.*, 2012). Наиболее ярким выражением отрицательной корреляции между УЗ и СБЗ у твердой и мягкой пшеницы является действие Grc-B1, который ускоряет пожелтение, старение листьев и ремобилизацию азота (Brevis *et al.*, 2010). QGrc нередко ассоциируются с различными морфологическими и физиологическими признаками: высота растений, скороспелость, крупность зерна, устойчивость к абио- и биострессорам (Крупнов, Крупнова, 2012). Качество зерна в большой степени зависит от состава и числа копий HMW-GS генов, однако их влияние на УЗ и адаптивность трансгенных генотипов слабо изучено (Graybosch *et al.*, 2011).

ПЛЕЙОТРОПИЯ

Плейотропия характерна для многих генов/локусов, что (в ряде случаев) затрудняет их использование в селекции. Например, *S*-ген, контролирующий шарозерность, плейотропно

влияет на многие морфологические признаки, а также на урожай зерна (Salina *et al.*, 2000; Лобачев, 2000; Боровик, 2004). *Sst*-ген (хромосома 3В), контролирующий выполненность соломины и защиту от хлебных стеблевых пилильщиков, плеiotропно влияет на количество продуктивных колосьев и урожай зерна (Касатов, Крупнов, 1983). С *Rht*-генами (*Rht-B1b* и *Rht-D1b*) ассоциируется повышение восприимчивости к возбудителям ряда болезней (Agraiano *et al.*, 2009; Srinivasachary *et al.*, 2009). На почти изогенных линиях пшеницы, различающихся по аллелям *Rht*, установлено положительное плеiotропное влияние DELLA-белков на устойчивость к одним патогенам и отрицательное – к другим, в зависимости от их типа питания (биотрофы, гембиотрофы, некротрофы) (Saville *et al.*, 2012). В полевых посевах (но не в теплице) у трансгенных линий, содержащих *Pm3b* (устойчивость к мучнистой росе), установлен его плеiotропный эффект на признаки колоса и морфологию листа (Brunner *et al.*, 2011).

ЭПИСТАЗ

Помимо взаимодействия аллелей одного QTL с аллелями другого QTL, известно также взаимодействие эпистаза с внешней средой. Механизмы эпистаза, а также его взаимодействие с плеiotропией остаются слабо понятыми. Эпистаз и его взаимодействия наиболее четко выявляются в условиях разных стрессов (Ma *et al.*, 2006; Dashti *et al.*, 2010; Miedaner *et al.*, 2011; Vnejdi *et al.*, 2011). Известны сообщения о роли эпистаза в детерминации изменчивости таких признаков урожая пшеницы, как компоненты продуктивности (Reif *et al.*, 2011), фенология, высота растений, устойчивость к абиотическим (Dashti *et al.*, 2010) и биотическим стрессам (Ma *et al.*, 2006; Miedaner, Voss, 2008; Vnejdi *et al.*, 2011) Эпистаз усложняет и затрудняет изучение взаимосвязи «генотип–фенотип» (Reif *et al.*, 2011).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молекулярно-генетические исследования показывают генетическую сложность многих признаков, на которые селекционеры опираются в отборе генотипов и с которыми связаны успехи современной селекции. Благодаря

использованию ДНК-технологий, выявляются QTLs-аллели, лимитирующие урожай зерна, что особенно важно в завершающих поколениях каждого селекционного цикла, где бывает крайне трудно различать линии по продуктивности, качеству и адаптивности. Чем больше молекулярных маркеров и контрастных агроландшафтов, тем полнее можно раскрыть генетическую архитектуру признаков. Вклад в урожай любого гена/QTL, как и морфологического или физиологического признака, во-первых, лишь частичен (т. е. ни один из них не может быть волшебным средством или панацеей от засухи), во-вторых, специфичен (положительный, нейтральный или отрицательный), в зависимости от взаимодействия с внешней средой, и каждый новый рекомбинантный генотип нуждается в новой идентификации в разных агроландшафтах. Однако даже в мультиусловиях среды идентификация QTLs, контролирующих урожай зерна, невозможна без надежного фенотипирования, которое зависит не только от опыта и эрудиции исследователя, наличия соответствующих инструментов, но также от крайне сложного и все еще недостаточно изученного взаимодействия растения с абиотическими и биотическими факторами среды. В каждом агроландшафте выявляется лишь специфика генетической архитектуры признака для этих условий. Тем не менее, идентификация и локализация множества генов и QTLs, лимитирующих урожай при разных сценариях засухи, не только показывает различие генотипов по целевому признаку, но также позволяет более осмысленно подбирать «стратегических» родителей для скрещивания и производить отбор с использованием молекулярных маркеров. Однако, поскольку эффект многих QTL зависит от генофона и взаимодействия генотипа с внешней средой, а урожай зерна характеризуется низкой наследуемостью, в отборе «последнее слово» остается за результатами фенотипирования: чем оно аккуратнее, тем выше «отдача» от генотипирования, иными словами, в практической селекции генотипирование обречено на единство с фенотипированием. Интеграция этих двух подходов на лучших элитных сортах и перспективных линиях – наиболее надежный путь к сокращению сроков создания новых сортов и повышения вклада ДНК-технологий в селекцию.

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.
- Боровик А.Н. Селекционно-генетическая ценность сорта шарада (*T. sphaerococum* Pers.): автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Краснодар, 2004. 21 с.
- Вьюшков А.А., Мальчиков П.Н., Сюков В.В., Шевченко С.Н. Селекционно-генетическое улучшение яровой пшеницы: изд. 2-е. Самара: Известия Самарского научного центра РАН, 2012. 536 с.
- Вьюшков А.А., Шевченко С.Н., Германцев Л.А. и др. Продуктивность остистых и безостых изолиний яровой мягкой пшеницы на Юго-Востоке // Биологические основы селекции. Саратов, 1991. С. 159–165.
- Германцев Л.А., Крупнов В.А. Влияние температуры воздуха на продуктивность яровой пшеницы в зоне каштановых почв Поволжья // Вестн. Рос. акад. с.-х. наук. 2001. Т. 2. С. 33–35.
- Касатов В.И., Крупнов В.А. Выполненность соломины и продуктивность яровой мягкой пшеницы // Докл. ВАСХНИЛ. 1983. № 3. С. 10–12.
- Крупнов В.А. Засуха и селекция пшеницы: системный подход // С.-х. биология. 2011. № 1. С. 12–23.
- Крупнов В.А., Крупнова О.В. Генетическая архитектура содержания белка в зерне пшеницы // Генетика. 2012. Т. 48. № 2. С. 149–159.
- Крупнов В.А., Сибикеев С.Н. Чужеродные гены для улучшения мягкой пшеницы // Идентифицированный генофонд растений и селекция / Под ред. Б.В. Ригина, Е.И. Гаевской. СПб.: ВИР, 2005. С. 740–758.
- Кузьменко А.И. Саратовские сорта яровой мягкой пшеницы (практическая селекция). Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2005. 300 с.
- Кумаков В.А. Физиологическое обоснование моделей сортов пшеницы. М.: Агропромиздат, 1985. 270 с.
- Лобачёв Ю.В. Проявление генов низкорослости у яровых пшениц в Нижнем Поволжье. Саратов: Изд-во СГАУ, 2000. 264 с.
- Мамонтова В.Н. Селекция и семеноводство яровой пшеницы: Избр. тр. М.: Колос, 1980. 287 с.
- Стебурт А.И. Отчет селекционного отдела // Тр. Саратовской областной с.-х. станции. Саратов, 1915. Вып. 3. С. 227–445.
- Чесноков Ю.В., Почепня Н.В., Бёрнер А. и др. Эколого-генетическая организация количественных признаков растений и картирование локусов, определяющих агрономически важные признаки у мягкой пшеницы // Докл. АН. 2008. Т. 418. № 5. С. 1–4.
- Шехурдин А.П. Избранные сочинения. М.: Сельхозиздат, 1961. 326 с.
- Arraiano L.S., Balaam N., Fenwick P.M. *et al.* Contributions of disease resistance and escape to the control of *Septoria tritici* blotch of wheat // Plant Pathol. 2009. V. 58. P. 910–922.
- Bennett D., Reynolds M., Mullan D. *et al.* Detection of two major grain yield QTL in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) under heat, drought and high yield potential environments // Theor. Appl. Genet. 2012. V. 125. P. 1473–1485.
- Blanco A., Mangini G., Giancaspro A. *et al.* Relationships between grain protein content and grain yield components through quantitative trait locus analyses in a recombinant inbred line population derived from two elite durum wheat cultivars // Mol. Breed. 2012. V. 30. P. 79–92.
- Blum A. Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress // Field Crops Res. 2009. V. 112. P. 119–123.
- Bnejdi F., Colin H., El Gazzeh M. Genetic adaptability of inheritance of resistance to biotic and abiotic stress level on crop: Role of epistasis // Afr. J. Biotechnol. 2011. V. 10 (86). P. 19913–19917.
- Bogard M., Jourdan M., Allard V. *et al.* Anthesis date mainly explained correlations between post-anthesis leaf senescence, grain yield, and grain protein concentration in a winter wheat population segregating for flowering time QTLs // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. P. 3621–3636.
- Bolton M.D. Primary metabolism and plant defense-fuel for the fire // Mol. Plant Microbe Interact. 2009. V. 22. P. 487–497.
- Breseghele F., Sorrells M.E. Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars // Genetics. 2006. V. 172. P. 1165–1177.
- Brevis J.C., Morris C.F., Mantley F., Dubcovsky J. Effect of the grain protein content locus Gpc-B1 on bread and pasta quality // J. Cereal Sci. 2010. V. 51. P. 357–365.
- Brisson N., Gate P., Gouache D. *et al.* Why are wheat yields stagnating in Europe? A comprehensive data analysis for France // Field Crops Res. 2010. V. 119. P. 201–212.
- Brunner S., Humi S., Herren G. *et al.* Transgenic Pm3b wheat lines show resistance to powdery mildew in the field // Plant Biotechnol. J. 2011. V. 9. P. 897–910.
- Cadalen T., Sourdille P., Charmet G. *et al.* Molecular markers linked to genes affecting plant height in wheat using a doubled-haploid population // Theor. Appl. Genet. 1998. V. 96. P. 933–940.
- Charmet G., Storlie E. Implementation of genome-wide selection in wheat // Вавилов. журн. генет. и селекции, 2012. Т. 16. № 1. С. 61–68.
- Christopher J.T., Manschadi A.M., Hammer G.L., Borrell A.K. Developmental and physiological traits associated with high yield and stay-green phenotype in wheat // Aust. J. Agric. Res. 2008. V. 59. P. 354–364.
- Crossa J., Burgueño J., Dreisigacker S. *et al.* Association analysis of historical bread wheat germplasm using additive genetic covariance of relatives and population structure // Genetics. 2007. V. 177. P. 1889–1913.
- Crow J.F. Plant breeding giants. Burbank, the artist; Vavilov, the scientist // Genetics. 2001. V. 158. P. 1391–1395.
- Cui F., Ding A., Li J. *et al.* Wheat kernel dimensions: how do they contribute to kernel weight at an individual QTL level? // J. Genet. 2011. V. 90. P. 409–425.
- Dashti H., Naghav M.R., Tajabadipour A. Genetic analysis of salinity tolerance in a bread wheat cross // J. Agr. Sci. Tech. 2010. V. 12. P. 347–356.
- Deng S., Wu X., Wu Y. *et al.* Characterization and precise mapping of a QTL increasing spike number with pleiotropic effects in wheat // Theor. Appl. Genet. 2011. V. 122. P. 281–289.
- Des Marais D.L., Juenger T.E. Pleiotropy, plasticity, and the evolution of plant abiotic stress tolerance // Ann. N.Y.

- Acad. Sci. 2010. Sept. 1206. P. 56–79.
- Diaz De Leon J.L., Escoppinichi R., Geraldo N. *et al.* Quantitative trait loci associated with salinity tolerance in field grown bread wheat // *Euphytica*. 2011. V. 181. P. 371–383.
- Dilbirli M., Erayman M., Campbell B.T. *et al.* High-density mapping and comparative analysis of agronomically important traits on wheat chromosome 3A // *Genomics*. 2006. V. 88. P. 74–87.
- Dyck J.A., Matus-Cádiz M.A., Hucl P. *et al.* Agronomic performance of hard red spring wheat isolines sensitive and insensitive to photoperiod // *Crop Sci.* 2004. V. 44. P. 1976–1981.
- Ehdaie B., Merhaut D.J., Ahmadian S. *et al.* Root system size influences water-nutrient uptake and nitrate leaching potential in wheat // *J. Agron. Crop Sci.* 2010. V. 196. P. 455–466.
- Fleury D., Jefferies S., Kuchel H., Langridge P. Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat // *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61. P. 3211–3222.
- Foulkes M.J., Sylvester-Bradley R., Weightman R., Snape J.W. Identifying physiological traits associated with improved drought resistance in winter wheat // *Field Crops Res.* 2007. V. 103. P. 11–24.
- Friebe B., Jiang J., Raupp W.J. *et al.* Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: Current status // *Euphytica*. 1996. V. 91. P. 59–87.
- Gegas V.C., Nazari A., Griffiths S. *et al.* A genetic framework for grain size and shape variation in wheat // *Plant Cell*. 2010. V. 22. P. 1046–1056.
- Graybosch R.A., Seabourn B., Chen Y.R., Blechl A.E. Quality and agronomic effects of three high-molecular-weight glutenin subunit transgenic events in winter wheat // *Cereal Chem.* 2011. V. 88. No. 1. P. 95–102.
- Griffiths S., Simmonds J., Leverington M. *et al.* Meta-QTL analysis of the genetic control of ear emergence in elite European winter wheat germplasm // *Theor. Appl. Genet.* 2009. V. 11. P. 383–395.
- Groos C., Robert N., Bervas E., Charmet G. Genetic analysis of grain protein-content, grain yield and thousand-kernel weight in bread wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2003. V. 106. P. 1032–1040.
- Hanocq E., Laperche A., Jaminon O. *et al.* Most significant genome regions involved in the control of earliness traits in bread wheat, as revealed by QTL metaanalysis // *Theor. Appl. Genet.* 2007. V. 114. P. 569–584.
- Hao Z.N., Wang J., Wang L.P., Tao R.X. Influences of the disease resistance conferred by the individual transgenes, Pi-d2, Pi-d3 and Xa21, on the transgenic rice plants in yield and grain quality // *Afr. J. Biotechnol.* 2009. V. 8. P. 4845–4848.
- Huang X.Q., Kempf H., Ganai M.W., Roder M.S. Advanced backcross QTL analysis in progenies derived from a cross between a German elite winter wheat variety and a synthetic wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 2004. V. 109. P. 933–943.
- Jackson S.A., Iwata A., Lee S.-H. *et al.* Sequencing crop genomes: approaches and applications // *New Phytol.* 2011. V. 191. P. 915–925.
- Kalinina O., Zeller S.L., Schmid B. Competitive performance of transgenic wheat resistant to powdery mildew // *PLoS ONE*. 2011. V. 6. No. 11. e28091.
- Karley A.J., Valentine T., Squire G. Dwarf alleles differentially affect barley root traits influencing nitrogen acquisition under low nutrient supply // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 3917–3927.
- Kim W., Johnson J.W., Baenziger P.S. *et al.* Agronomic effect of wheat-rye translocation carrying rye chromatin (1R) from different sources // *Crop Sci.* 2004. V. 44. P. 1254–1258.
- Kirigwi F.M., Van Ginkel M., Brown-Guedira G. *et al.* Markers associated with a QTL for grain yield in wheat under drought // *Mol. Breed.* 2007. V. 20. P. 401–413.
- Kuchel H., Williams K., Langridge P. *et al.* Genetic dissection of grain yield in bread wheat. II. QTL-by-environment interaction // *Theor. Appl. Genet.* 2007. V. 115. P. 1015–1027.
- Kumar S., Sehgal S. K., Kumar U. *et al.* Genomic characterization of drought tolerance-related traits in spring wheat // *Euphytica*. 2012. V. 186. P. 265–276.
- Le Gouis J., Bordes J., Ravel C. *et al.* Genome-wide association analysis to identify chromosomal regions determining components of earliness in wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2012. V. 124. P. 597–611.
- Li G.P., Chen P.D., Zhang S.Z. *et al.* Effects of the 6VS-6AL translocation on agronomic traits and dough properties of wheat // *Euphytica*. 2007. V. 155. P. 305–313.
- Liang Y.L., Richards R.A. Coleoptile tiller development is associated with fast early vigour in wheat // *Euphytica*. 1994. V. 80. P. 119–124.
- Ma H.X., Bai G.H., Zhang X., Lu W.Z. Main effects, epistasis, and environmental interactions of quantitative trait loci for Fusarium head blight resistance in a recombinant inbred population // *Phytopathology*. 2006. V. 96. P. 534–541.
- Ma S.C., Xu B.C., Li F.M. *et al.* Effects of root pruning on competitive ability and water use efficiency in winter wheat // *Field Crops Res.* 2008. V. 105. P. 56–63.
- Maccafferri M., Sanguineti M. C., Corneti S. *et al.* Quantitative trait loci for grain yield and adaptation of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) across a wide range of water availability // *Genetics*. 2008. V. 178. P. 489–511.
- Maccafferri M., Sanguineti M.C., Demontis A. *et al.* Association mapping in durum wheat grown across a broad range of water regimes // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 409–438.
- Makepeace J.C., Oxley S.J.P., Havis N.D. *et al.* Associations between fungal and abiotic leaf spotting and the presence of mlo alleles in barley // *Plant Pathol.* 2007. V. 56. P. 934–942.
- Manès Y., Gomez H.F., Puhl L. *et al.* Genetic yield gains of the CIMMYT International semi-arid wheat yield trials from 1994 to 2010 // *Crop Sci.* 2012. V. 52. P. 1543–1552.
- Marza F., Bai G.H., Carver B.F., Zhou W.-C. Quantitative trait loci for yield and related traits in the wheat population Ning7840 × Clark // *Theor. Appl. Genet.* 2006. V. 112. P. 688–698.
- Mason R.E., Mondal S., Beecher F.W., Hays D.B. Genetic loci linking improved heat tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) to lower leaf and spike temperatures under controlled conditions // *Euphytica*. 2011. V. 180. P. 181–194.
- McCartney C.A., Somers D.J., Humphreys D.G. *et al.* Mapping quantitative trait loci controlling agronomic traits in the spring wheat cross RL4452 × ‘AC Domain’ // *Genome*. 2005. V. 48. P. 870–883.
- McIntosh R., Yamazaki Y., Dubcovsky J. *et al.* Catalogue of Gene Symbols for Wheat. 2008. <http://www.grs.nig>.

- ac.jp/wheat/komugi/genes/.
- McIntyre C.L., Mathews K.L., Rattey A. *et al.* Molecular detection of genomic regions associated with grain yield and yield components in an elite bread wheat cross evaluated under irrigated and rainfed conditions // *Theor. Appl. Genet.* 2010. V. 120. P. 527–541.
- Miedaner T., Voss H-H. Effect of dwarfing *Rht* genes on Fusarium head blight resistance in two sets of near-isogenic lines of wheat and check cultivars // *Crop Sci.* 2008. V. 48. P. 2115–2122.
- Miedaner T., Würschum T., Maurer H.P. *et al.* Association mapping for Fusarium head blight resistance in European soft winter wheat // *Mol. Breed.* 2011. V. 28. P. 647–655.
- Motzo R., Giunta F. Awnedness affects grain yield and kernel weight in near-isogenic lines of durum wheat // *Aust. J. Agric. Res.* 2002. V. 53. P. 1285–1293.
- Munns R., James R.A., Lauchli A. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals // *J. Exp. Bot.* 2006. V. 57. P. 1025–1043.
- Naruoka Y., Sherman J.D., Lanning S. P. *et al.* Genetic analysis of green leaf duration in spring wheat // *Crop Sci.* 2012. V. 52. No. 1. P. 99–109.
- Naruoka Y., Talbert L.E., Lanning S.P. *et al.* Identification of quantitative trait loci for productive tiller number and its relationship to agronomic traits in spring wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2011. V. 123. P. 1043–1053.
- Nevo E., Chen G. Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement // *Plant Cell, Environ.* 2010. V. 33. P. 670–685.
- Orgil U., Araki H., Tangchaiburana S. *et al.* Intraspecific genetic variations, fitness cost and benefit of RPW8, a disease resistance locus in *Arabidopsis thaliana* // *Genetics.* 2007. V. 176. P. 2317–2333.
- Palta J.A., Chen X., Milroy S.P. *et al.* Large root systems: are they useful in adapting wheat to dry environments? // *Funct. Plant Biol.* 2011. V. 38. P. 347–354.
- Parry M.A., Reynolds M., Salvucci M.E. *et al.* Raising yield potential of wheat. II. Increasing photosynthetic capacity and efficiency // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 453–467.
- Passioura J.B. The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. P. 113–117.
- Passioura J.B. Phenotyping for drought tolerance in grain crops: when is it useful to breeders? // *Functional Plant Biol.* 2012. V. 39. P. 851–859.
- Peake A.S., Gilmour A. Cooper M. The 1BL/1RS translocation decreases grain yield of spring wheat germplasm in low yield environments of north-eastern Australia // *Crop Pasture Sci.* 2011. V. 62. P. 276–288.
- Pinto R.S., Reynolds M.P., Mathews K.L. *et al.* Heat and drought adaptive QTL in a wheat population designed to minimize confounding agronomic effects // *Theor. Appl. Genet.* 2010. V. 121. P. 1001–1021.
- Qiu G.Y., Wang L., He X. *et al.* Water use efficiency and evapotranspiration of winter wheat and its response to irrigation regime in the north China plain // *Agric. Forest Meteorol.* 2008. V. 148. P. 1848–1859.
- Quarrie S.A., Steed A., Calestani C. *et al.* A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring×SQ1 and its use to compare QTLs for grain yield across a range of environments // *Theor. Appl. Genet.* 2005. V. 110. P. 865–880.
- Rebetzke G.J., Ellis M.H., Bonnett D.G., Richards R.A. Molecular mapping of genes for coleoptile growth in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 2007. V. 114. P. 1173–1183.
- Rebetzke G.J., Herwaarden A.F., Jenkins C. *et al.* Quantitative trait loci for water-soluble carbohydrates and associations with agronomic traits in wheat // *Aust. J. Agric. Res.* 2008. V. 59. P. 891–905.
- Reif J.C., Maurer H.P., Korzun V. *et al.* Mapping QTLs with main and epistatic effects underlying grain yield and heading time in soft winter wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2011. V. 123. P. 283–292.
- Reynolds M.P., Calderini D.F., Condon A.G., Rajaram S. Physiological basis of yield grains in wheat associated with the Lr19 translocation from *Agropyron elongatum* // *Euphytica.* 2001. V. 119. P. 139–144.
- Richards R.A., Rebetzke G.J., Watt M. *et al.* Breeding for improved water productivity in temperate cereals: phenotyping, quantitative trait loci, markers and the selection environment // *Funct. Plant Biol.* 2010. V. 37. P. 85–97.
- Sadeque A., Turner M.A. QTL Analysis of plant height in hexaploid wheat doubled haploid population // *J. Agr. Sci.* 2010. V. 43. P. 91–96.
- Sadras V.O., Angus J.F. Benchmarking water-use efficiency of rainfed wheat in dry environments // *Aust. J. Agric. Res.* 2006. V. 57. P. 847–856.
- Saint Pierre C., Crossa J.L., Bonnett D. *et al.* Phenotyping transgenic wheat for drought resistance // *J. Exp. Bot.* 2012. V. 63. P. 1799–1808.
- Salina E., Borner A., Leonova I. *et al.* Microsatellite mapping of the induced sphaerococcoid mutation genes in *Triticum aestivum* // *Theor. Appl. Genet.* 2000. V. 100. P. 686–689.
- Sanguineti M.C., Li S., Maccaferri M. *et al.* Genetic dissection of seminal root architecture in elite durum wheat germplasm // *Ann. Appl. Biol.* 2007. V. 151. P. 291–305.
- Saville R.J., Gosman N., Burt C.J. *et al.* Green Revolution' dwarfing genes play a role in disease resistance in *Triticum aestivum* and *Hordeum vulgare* // *J. Exp. Bot.* 2012. V. 63. P. 1271–1283.
- Sharma S., Xu S., Ehdaie B. *et al.* Dissection of QTL effects for root traits using a chromosome arm-specific mapping population in bread wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2011. V. 122. P. 759–769.
- Simmonds J.R., Fish L.J., Leverington-Waite M.A. *et al.* Mapping of a gene (*Vir*) for a non-glaucous, viridescent phenotype in bread wheat derived from *Triticum dicoccoides*, and its association with yield variation // *Euphytica.* 2008. V. 159. P. 333–341.
- Sinclair T.R. Challenges in breeding for yield increase for drought // *Trends in Plant Sci.* 2011. V. 16. P. 289–293.
- Snape J.W., Foulkes J., Simmonds J. *et al.* Dissecting gene × environmental effects on wheat yields via QTL and physiological analysis // *Euphytica.* 2007. V. 154. P. 401–408.
- Srinivasachary Gosman N., Steed A., Hollins T.W. *et al.* Semi-dwarfing *Rht-B1* and *Rht-D1* loci of wheat differ significantly in their influence on resistance to Fusarium head blight // *Theor. Appl. Genet.* 2009. V. 118. P. 695–702.
- Stelmakh A.F. Genetic systems regulating flowering response in wheat // *Euphytica.* 1998. V. 100. P. 359–369.

- Su J.Y., Zheng Q., Li H.W. *et al.* Detection of QTLs for phosphorus use efficiency in relation to agronomic performance of wheat grown under phosphorus sufficient and limited conditions // *Plant Sci.* 2009. V. 176. P. 824–836.
- Sun X-Y., Wu K., Zhao Y. *et al.* QTL analysis of kernel shape and weight using recombinant inbred lines in wheat // *Euphytica.* 2008. V. 65. P. 615–624.
- Tardieu F. Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: just design the right drought scenario // *J. Exp. Bot.* 2012. V. 63. P. 25–31.
- Tian D., Traw M.B., Chen J.Q. *et al.* Fitness costs of R-gene-mediated resistance in *Arabidopsis thaliana* // *Nature.* 2003. V. 423. P. 74–77.
- van Ginkel M., Ogonnaya F. Novel genetic diversity from synthetic wheats in breeding cultivars for changing production conditions // *Field Crops Res.* 2007. V. 104. P. 86–94.
- Verma V., Foulkes M.J., Worland A.J. *et al.* Mapping quantitative trait loci for flag leaf senescence as a yield determinant in winter wheat under optimal and drought stressed environments // *Euphytica.* 2004. V. 135. P. 255–263.
- Verma V., Worland A.J., Savers E.J. *et al.* Identification and characterization of quantitative trait loci related to lodging resistance and associated traits in bread wheat // *Plant Breed.* 2005. V. 124. P. 234–241.
- Vijayalakshmi K., Fritz A.K., Paulsen G.M. *et al.* Modeling and mapping QTL for senescence-related traits in winter wheat under high temperature // *Mol. Breed.* 2010. V. 26. P. 163–175.
- Villareal R.L., Banuelos O., Mujeeb-Kazi A., Rajaram S. Agronomic performance of chromosomes 1B and T1BL.1RS near-isolines in the spring bread wheat Seri M82 // *Euphytica.* 1998. V. 103. P. 195–202.
- Wardlaw I.F., Dawson I.A., Munibi P., Fewster R. The tolerance of wheat to high-temperatures during reproductive growth. 1. Survey procedures and general response patterns // *Aust. J. Agric. Res.* 1989. V. 40. P. 1–13.
- Watts S.M., Dodson C.D., Reichman O.J. The Roots of Defense: Plant resistance and tolerance to belowground herbivory // *PLoS ONE.* 2011. V. 6. No. 4. e18463. doi:10.1371/journal.pone.0018463.
- Wojciechowski T., Gooding M.J., Ramsay L., Gregory P.J. The effects of dwarfing genes on seedling root growth of wheat // *J. Exp. Bot.* 2009. V. 60. P. 2565–2573.
- Yoshida T., Nishida H., Zhu J. *et al.* Vrn-D4 is a vernalization gene located on the centromeric region of chromosome 5D in hexaploid wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2010. V. 120. P. 543–552.
- Zhang L.Y., Liu D.C., Guo X.L. *et al.* Genomic distribution of quantitative trait loci for yield and yield-related traits in common wheat // *J. Integr. Plant Biol.* 2010. V. 52. P. 996–1007.

GENETIC COMPLEXITY AND CONTEXT SPECIFICITY OF TRAITS IMPROVING WHEAT YIELD UNDER DROUGHT CONDITIONS

V.A. Krupnov

Agricultural Research Institute for South-East Regions, Saratov, Russia,
e-mail: raiser_saratov@mail.ru

Summary

Under drought conditions, water shortage of varying duration and intensity is often combined with heat and other stresses, and years with favorable moisture are occasional. In these contrasting conditions, the key role in grain yield is played by growth habit, growing period, and technology. For example, in the late twentieth century temperate winters in the Volga region of Russia and improved technology allowed winter wheat to supplant spring wheat almost everywhere in the region. Identification and labeling of QTL has opened up new opportunities for identifying genetic differences between genotypes for each trait underlying traditional breeding, obtaining more information on parents to choose a pair of crosses, and performing selection. However, the effect of QTL, typically depends mainly on the genetic background (pleiotropy, epistasis, and use of alien genes), environment (time and intensity of drought, growth technology) and interaction between alleles and the environment. These factors demand that in each breeding cycle each new recombinant genotype be subjected to genetic identification together with accurate phenotyping. With resource-limited funding of breeding, the greatest benefit from the use of DNA technology can only be expected when working on populations, derived from crosses between of elite varieties and promising lines, and when traits cannot be improved solely by traditional phenotyping, not supplemented by genotyping.

Keywords: wheat, molecular breeding, molecular markers, quantitative trait loci (QTL), mapping, phenology, harvest index, phenotyping, advanced lines.

УДК 633.11:575.1

АЛЛЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ *Wx*-ГЕНОВ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ, ВОЗДЕЛЫВАЕМЫХ В ПЕРМСКОМ КРАЕ И В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН

© 2013 г. И.В. Бобошина^{1,2}, С.В. Боронникова^{1,2}

¹ ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»,
Пермь, Россия, e-mail: coccinela@yandex.ru;

² Естественнаучный институт ПГНИУ, Пермь, Россия

Поступила в редакцию 28 июня 2013 г. Принята к публикации 5 июля 2013 г.

В работе представлены результаты по изучению аллелей *Wx* генов 30 сортов *Triticum aestivum* L., возделываемых в Пермском крае и в Республике Башкортостан. С помощью двух молекулярных маркеров гена *Wx-A1* выявлено, что все данные сорта несут аллель дикого типа (*Wx-A1a*). Установлено, что сорта Башкирская 4, Башкирская 26 и Башкирская 28 характеризуются функциональным аллелем гена *Wx-B1* – *Wx-B1e*. Сорт Ульяновская 100 гетерозиготен, так как несет аллели *Wx-B1a* и *Wx-B1e*. У 30 изученных сортов не обнаружено нуль-аллелей гена *Wx-B1*. У всех изученных сортов по гену *Wx-D1* выявлены аллели только дикого типа.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., мягкая пшеница, сорта, молекулярные маркеры, гены *Wx*.

ВВЕДЕНИЕ

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) является одной из основных сельскохозяйственных культур мира. Содержание крахмала в эндосперме пшеницы мягкой составляет 67–72 % сухого вещества. Крахмал – полимер, состоящий из двух типов глюкозных углеводов – амилозы и амилопектина, соотношение которых определяет различия в температуре клейстеризации, вязкости крахмального клейстера, его текстуре и способности к гелеобразованию, устойчивости к механическим воздействиям и влиянию кислой среды (Nemery *et al.*, 2007).

Ключевым ферментом синтеза амилозы в гранулах крахмала является фермент GBSSI (GBSSI – Granule-bound starch synthase I), который также называют *Wx* протеином (Shure *et al.*, 1983). В геноме *T. aestivum* изоформы фермента GBSSI кодируют три гомеологичных гена (Nakamura *et al.*, 1993), получившие название *Wx* и расположенные в следующих хромосомах: 7AS (*Wx-A1*), 4AL (*Wx-B1*) и 7DS (*Wx-D1*). Каждый *Wx*-ген имеет два аллеля: ак-

тивный (*a*), кодирующий синтез определенного *Wx*-протеина, и неактивный (*b*), или нуль-аллель, который блокирует синтез *Wx*-протеина. Нефункциональные *b*-аллельные варианты локусов влияют на образование крахмала с пониженным содержанием амилозы (при наличии одного или двух нуль-аллелей), и состоящего только из амилопектина (когда во всех трех генах присутствуют нуль-аллели). Среди сортов пшеницы были найдены разные комбинации активных и неактивных *Wx*-аллелей (Nakamura *et al.*, 2002; Vanzetti *et al.*, 2009; Климушина и др., 2010, 2012; Saito *et al.*, 2010; Абдулина и др., 2013). Самое значительное снижение амилозы обуславливает наличие нуль-аллеля гена *Wx-B1* в сравнении с нуль-аллелями *Wx-A1* и *Wx-D1* (Игнатъева и др., 2009; Дивашук и др., 2011).

Изучение различных аллельных вариантов *Wx*-генов имеет большое значение в связи с их ценностью для пищевой промышленности, а также при получении биоэтанола (Nakamura *et al.*, 1995; Игнатъева и др., 2009; Дивашук и др., 2011). Соотношение амилоза/амилопектин в пшеничном крахмале определяет технологиче-

ские свойства крахмала и муки, производимой из пшеницы мягкой. Крахмал Wx-пшеницы с нулевым содержанием амилозы очень чувствителен к механическому воздействию. При помоле происходит разрушение гранул крахмала, что увеличивает площадь поверхности и приводит к повышению водопоглотительной способности и амилолитической активности муки, создавая тем самым благоприятные условия для высокой активности дрожжей в тесте (Климушина и др., 2012). Мука из такой пшеницы характеризуется высокими показателями газообразующей способности и подъемной силы теста. Крахмал Wx-пшениц значительно лучше выдерживает режим заморозки-разморозки, чем обычный крахмал. Данное свойство позволяет применять его для изготовления продуктов из замороженного и слоеного теста (Yamamori, Quynh, 2000; Петрова и др., 2007; Игнатъева и др., 2009; Климушина и др., 2012).

Наиболее широкое распространение для идентификации аллельных вариантов генов *Wx* в последнее время получили методы молекулярного маркирования (Nakamura *et al.*, 2002; Vanzetti *et al.*, 2009; Климушина и др., 2010, 2012; Saito *et al.*, 2010; Дивашук и др., 2011; Абдулина и др., 2013).

Идентификация сортов пшеницы мягкой с высокими технологическими свойствами зерна является актуальной задачей для Пермского края и Республики Башкортостан, относящимся к зоне рискованного земледелия, климат которых характеризуется продолжительной, холодной и снежной зимой, теплым коротким летом и ярко выраженными температурными инверсиями (Назаров, 2006; Российская..., 2010). Исследования генетической структуры локальных сортов пшеницы мягкой с помощью генетических методов необходимы для создания генетически обоснованных программ по выявлению генетической изменчивости, ее анализу в целях дальнейшего сохранения и использования, в том числе для нужд агропромышленного комплекса двух субъектов Российской Федерации.

Цель нашей работы – характеристика аллельных вариантов генов *Wx* сортов пшеницы мягкой, возделываемых в Пермском крае и в Республике Башкортостан. В результате данной работы получена информация о функциональ-

ных аллелях *Wx* генов, контролирующих содержание амилозы и амилопектина в зерновках 30 сортов пшеницы мягкой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал и выделение ДНК.

Материалом для исследования служили свежие листья 30 сортов *T. aestivum*, возделываемых в Пермском крае и Республике Башкортостан (Результаты сортоиспытания ..., 2011). Для молекулярно-генетического анализа были избраны допущенные к использованию (Государственный реестр ..., 2013) и находящиеся на испытании сорта пшеницы мягкой. Семена сортов были получены из ГНУ Пермский научно-исследовательский институт сельского хозяйства РАСХН (г. Пермь), Ординского и Березовского сортоучастков ГСУ Пермского края и ГНУ Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства (г. Уфа). Выделение ДНК проводили из проростков пшеницы, полученных в лабораторных условиях, по методике А. Торрес с соавт. (Torres *et al.*, 1993). Концентрацию и спектральные характеристики ДНК определяли на приборе Spectrofotometr TM NanoDrop 2000 («Thermo scientific», США). Геномная ДНК была разбавлена до концентрации 10 нг/мкл в ТЕ-буфере.

Праймеры и условия ПЦР. Праймеры, их последовательности и условия проведения полимеразной цепной реакции указаны в табл. 1. ПЦР проводили при условиях, рекомендуемых разработчиками праймеров. Амплификацию ДНК проводили в термоциклерах Gene Amp PCR System 9700 («Applied Biosystems», США) и MyCycler («BioRad», США). Для верификации полученных данных ПЦР проводили 3 раза. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала: 1 × буфер для *Taq*-ДНК-полимеразы, 1,0 U *Taq*-ДНК-полимеразы, 200 μM каждого dNTP («Силекс», Москва), 0,2 μM каждого праймера и 100–150 нг ДНК-матрицы. Концентрация хлорида магния составляла 2,5 mM. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2–3 %-м агарозном геле в 1× TBE-буфере (Tris-Borate-EDTA), окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете в системе гель-документации Gel Doc XR («BioRad», США). В качестве маркеров

Таблица 1

Праймеры и условия ПЦР для идентификации аллелей Wxу-генов

Гены	Праймеры	Последовательности праймеров 5'→3'	Условия ПЦР
<i>Wx-A1</i>	AFC AR2 (Nakamura <i>et al.</i> , 2002)	TCGTGTTTCGTCGGCGCCGAGATGG CCGCGCTTGTAGCAGTGGGAAGTACC	95 °С – 5 мин; 32 цикла: 95 °С – 30 с, 65 °С – 30 с, 72 °С – 2 мин; 1 цикл: 72 °С – 7 мин
	Wx-A1b-F-MH Wx-A1Bb-R-MH* (Vanzetti <i>et al.</i> , 2009)	CCCCAAAGCAAAGCAGGAAAC CGGCGTCGGGTCCATAGATC	94 °С – 3 мин; 40 циклов: 94 °С – 45 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 60 с; 1 цикл: 72 °С – 7 мин
<i>Wx-B1</i>	BDFL BRD (Nakamura <i>et al.</i> , 2002)	CTGGCCTGCTACCTCAAGAGCAACT CTGACGTCCATGCCGTTGACGA	95 °С – 5 мин; 32 цикла: 95 °С – 30 с, 65 °С – 30 с, 72 °С – 2 мин; 1 цикл: 72 °С – 7 мин
	Wx-B1L Wx-B1R (Vanzetti <i>et al.</i> , 2009)	CGCAGGGGAAGACGTGGT CGTTGACGATGCCGGTGATG	95 °С – 5 мин; 32 цикла: 95 °С – 30 с, 65 °С – 30 с, 72 °С – 2 мин; 1 цикл: 72 °С – 7 мин
<i>Wx-D1</i>	BDFL DRSL (Nakamura <i>et al.</i> , 2002)	TAGTGCGTCCAGACTCACAG GAGATGGTCAAGAACTGCAT	94 °С – 5 мин; 32 цикла: 94 °С – 30 с, 58 °С – 30 с, 72 °С – 120 с; 1 цикл: 72 °С – 7 мин
	Wx-D1-1-F Wx-D1-1-R (Vrinten <i>et al.</i> , 1999)	CTGGCCTGCTACCTCAAGAGCAACT CTGTTTACCATGATCGTCCCCTT	95 °С – 3 мин; 40 циклов: 94 °С – 30 с, 55 °С – 45 с, 72 °С – 1 мин; 1 цикл: 72 °С – 7 мин

* После амплификации проводился гидролиз ПЦР-продукта эндонуклеазой рестрикции *Hind*III («Fermentas», Литва) при 37 °С в течение 5 ч. Фрагменты ДНК, полученные в результате гидролиза, разделяли в агарозном геле.

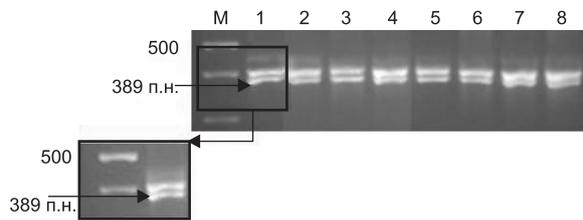


Рис. 1. Фрагмент электрофореграммы продуктов ПЦР, полученных с праймерами AFC и AR2.

1 – сорт Московская 39; 2 – сорт Волжская К; 3 – сорт Иргина; 4 – сорт Ирень; 5 – сорт Стрела; 6 – сорт Красноуфимская 100; 7 – сорт Свеча; 8 – сорт Горноуральская; М – маркер длины фрагментов ДНК. Стрелкой указан фрагмент, характерный для аллеля *Wx-A1a*.

длины фрагментов ДНК использовали маркеры молекулярной массы 100 bp + 50 bp DNA Ladder (ООО «СибЭнзим-М», Москва) и 100 bp GeneRuler («Fermentas», Литва).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ген *Wx-A1*. Для идентификации гена *Wx-A1* и верификации полученных результатов были использованы две пары праймеров. При использовании праймеров AFC и AR2 при наличии аллеля дикого типа амплифицирова-

лись фрагменты размером 389 п.н. (*Wx-A1a*), а при наличии нуля-аллеля – 370 п.н. (*Wx-A1b*) (Nakamura *et al.*, 2002). При применении этих праймеров у изученных 30 сортов *T. aestivum* идентифицирован аллель *Wx-A1a* (рис. 1).

Праймеры Wx-A1b-F-MH и Wx-A1Bb-R-MH амплифицируют фрагмент 671 п.н. у растений, несущих аллель *Wx-A1a*, и фрагмент 652 п.н. у растений, несущих аллель *Wx-A1b* (Vanzetti *et al.*, 2009). Продукты амплификации аллелей *Wx-A1a* (671 п.н.) и *Wx-A1b* (652 п.н.) трудно различимы в агарозном геле, поэтому применялась рестриктаза *Hind*III к последовательности от аллеля *Wx-A1a*, который разделяет фрагмент 671 п.н. на два фрагмента – 495 п.н. и 176 п.н. У последовательности аллеля *Wx-A1b* рестрикция отсутствует. При использовании праймеров Wx-A1b-F-MH и Wx-A1Bb-R-MH у изученных 30 сортов установлен аллель *Wx-A1a*.

Таким образом, изученные нами 30 возделываемых в Пермском крае и в Республике Башкортостан сортов *T. aestivum* несут аллели дикого типа *Wx-A1a*.

Ген *Wx-B1*. Для идентификации гена *Wx-B1* и верификации полученных результатов были также использованы две пары праймеров. При

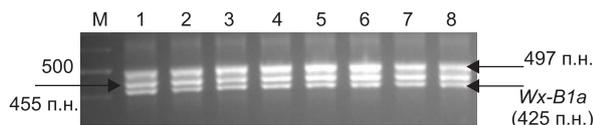


Рис. 2. Фрагмент электрофореграммы продуктов ПЦР, полученных с праймерами BDFL и BRD.

1, 2 – сорт Ватан; 3, 4 – сорт Тулайковская Золотистая; 5, 6 – сорт Тулайковская 10; 7, 8 – сорт Тюменская 31; М – маркер длины фрагментов ДНК.

использовании праймеров BDFL и BRD при наличии аллеля дикого типа (*Wx-B1a*) амплифицировались три фрагмента размером 497 п.н., 455 п.н. и 425 п.н. (Nakamura *et al.*, 2002). При наличии нуль-аллеля (*Wx-B1b*) при амплификации в геле идентифицировались только два фрагмента, самый легкий фрагмент (425 п.н.) отсутствовал. У всех изученных сортов детектирован фрагмент 425 п.н., что указывает на наличие аллеля *Wx-B1a* (рис. 2).

Праймеры Wx-B1L и Wx-B1R (Vanzetti *et al.*, 2009) амплифицировали фрагмент ДНК размером 461 п.н., который соответствует функциональному аллелю *Wx-B1a*, а отсутствие амплифицированного фрагмента указывает на наличие нуль-аллеля *Wx-B1b*. Кроме того, при применении этих праймеров на геле может быть виден фрагмент немного большей длины по сравнению с аллелем дикого типа – 495 п.н., характерный для функционального аллельного варианта *Wx-B1e*. Анализ наших сортов показал, что 26 сортов являются носителями аллеля *Wx-B1a*, 3 сорта (Башкирская 4, Башкирская 26 и Башкирская 28) несут функциональный аллель *Wx-B1e*. Сорт Ульяновская 100 оказался гетерозиготой, несущей как аллель *Wx-B1a*, так и аллель *Wx-B1e* (рис. 3).

Таким образом, изученные нами сорта *T. aestivum* характеризуются различными функциональными аллельными вариантами гена *Wx-B1*.

Ген Wx-D1. Для определения аллельного состояния гена *Wx-D1* использовались два молекулярных маркера (Nakamura *et al.*, 2002). При использовании праймеров BDFL и DRSL при наличии аллеля дикого типа амплифицировались фрагменты размером 2307 п.н. (*Wx-D1a*), а при наличии нуль-аллеля – 1731 п.н. (*Wx-D1b*). Из изученных нами 30 сортов *T. aestivum* у 28 отмечен аллель дикого типа, а у 2 сортов

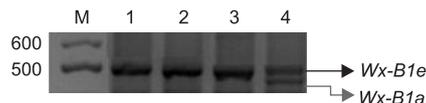


Рис. 3. Фрагмент электрофореграммы продуктов ПЦР, полученных с праймерами Wx-B1L и Wx-B1R.

1 – сорт Башкирская 4; 2 – сорт Башкирская 26; 3 – сорт Башкирская 28; 4 – сорт Ульяновская 100; М – маркер длины фрагментов ДНК. Темной стрелкой указан фрагмент, характерный для аллеля *Wx-B1e*, светлой стрелкой – фрагмент, характерный для аллеля *Wx-B1a*.

(Московская 39 и Иргина) в агарозном геле не выявлено амплифицированных фрагментов ДНК, что может быть вызвано ингибированием ПЦР в отдельных образцах некоторых сортов (Nakamura *et al.*, 2002) и согласуется с литературными данными.

Праймеры Wx-D1-1-F и Wx-D1-1-R (Vrinten *et al.*, 1999) у сортов, несущих аллель дикого типа, амплифицируют фрагменты размером 930 п.н. (*Wx-D1a*), а у сортов, несущих нуль-аллель, – 342 п.н. (*Wx-D1b*). Было показано, что все исследуемые нами сорта несли аллели *Wx-D1a*, т. е. аллели дикого типа.

Таким образом, у изученных нами 30 возделываемых в Пермском крае и в Республике Башкортостан сортов *T. aestivum* выявлены аллели дикого типа *Wx-D1a*.

При молекулярно-генетическом анализе 30 сортов мягкой пшеницы, возделываемых в Пермском крае и в Республике Башкортостан, показано, что все сорта являются носителями аллелей *Wx-A1a* и *Wx-D1a*, 3 сорта имеют аллели *Wx-B1e* гена *Wx-B1* и растения одного сорта являются гетерозиготами, несущими аллели *Wx-B1a* и *Wx-B1e* гена *Wx-B1*. В то же время Т. Накамура с соавт. (Nakamura *et al.*, 1992) и М. Ямамоти с соавт. (Yamamoto *et al.*, 1994) показали, что в коллекциях сортов пшеницы азиатских стран обнаруживалось до 20 % сортов, несущих нуль-аллели по генам *Wx-A1* и *Wx-B1*. М. Климушина с соавт. (Климушина и др., 2012) отметили, что пониженное содержание амилозы, которое обуславливается наличием нуль-аллелей *Wx* генов, оказывает выраженное положительное влияние на качество лапши удон, основного продукта, на производство которого используется мягкая пшеница в азиатских странах. В России же мягкая пшеница в основном используется для выпечки хлеба. В этом случае наличие только

Таблица 2
Аллельные варианты *Waxy*-генов
у изученных сортов *T. aestivum*

Сорт	<i>Wx-A1</i>	<i>Wx-B1</i>	<i>Wx-D1</i>
Московская 39	<i>a</i>	<i>a</i>	*
Волжская К	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Иргина	<i>a</i>	<i>a</i>	*
Ирень	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Стрела	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Красноуфимская 100	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Свеча	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Горноуральская	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Терция	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Экада 70	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Экада 109	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Штру 0622071	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Штру 0521911	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Икар	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Баженка	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Гамлет	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Диаблон	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Терси	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Уралосибирская	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Ярица	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Красноуфимская 110	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Башкирская 4	<i>a</i>	<i>e</i>	<i>a</i>
Башкирская 26	<i>a</i>	<i>e</i>	<i>a</i>
Башкирская 28	<i>a</i>	<i>e</i>	<i>a</i>
Жница	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Фотос	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Тюменская 31	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Сударыня	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
Ульяновская 100	<i>a</i>	<i>a/e</i>	<i>a</i>
ЦХ Кампала	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>

Примечание. * – для генов *Wx-D1a* и *Wx-D1b* амплифицированных фрагментов ДНК не выявлено.

одного нуль-аллеля не оказывает выраженного положительного влияния на хлебопекарные качества пшеницы. Кроме того, М. Климушина с соавт. (Климушина и др., 2012) заметили, что следует учитывать, что основные источники нуль-аллелей – это белозерные сорта азиатского происхождения, а в России селекция пшеницы традиционно ориентируется на краснозерные сорта ввиду ряда их преимуществ в нашей климатической зоне. В связи с этим и вероятность привнесения нуль-аллеля в результате селекционных скрещиваний была крайне мала. Следует также отметить, что нуль-аллель гена

Wx-D1 крайне редко встречается у образцов мягкой пшеницы (Климушина и др., 2010).

У изученных сортов *T. aestivum* были детектированы чаще всего аллели дикого типа *Waxy*-генов (табл. 2). Кроме того, была обнаружена дополнительная генетическая изменчивость в локусах *Wx-B1*, а именно аллель *Wx-B1e*.

Аллель *Wx-B1e* в сортах Башкирская 4, Башкирская 26 и Башкирская 28, вероятнее всего, был получен от родительских форм. Так, например, сорт Башкирская 4 получен от скрещивания сортов пшеницы мягкой Саратовская 46 и линии твердой пшеницы (<http://www.bniish.ru>). Влияние аллеля *Wx-B1e* на содержание амилозы в крахмале пшеницы до конца еще не изучено (Климушина и др., 2012). Для интерпретации полученных фрагментов сорта Ульяновская 100 нами планируется проведение дальнейшего анализа с определением нуклеотидных последовательностей.

Таким образом, при молекулярно-генетическом анализе возделываемых в Пермском крае и в Республике Башкортостан сортов пшеницы мягкой был изучен полиморфизм по генам *Wx* с использованием ПЦР. Среди 30 изученных сортов *T. aestivum* не были детектированы нуль-аллели по генам *Wx-A1*, *Wx-B1* и *Wx-D1*. Вместе с тем установлена дополнительная генетическая изменчивость в локусах гена *Wx-B1* 3 сортов *T. aestivum*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем искреннюю благодарность сотрудникам ГНУ Пермского научно-исследовательского института сельского хозяйства РАСХН (г. Пермь), Ординского и Березовского сортоучастков ГСУ Пермского края и ГНУ Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства (г. Уфа) за предоставление сортов пшеницы мягкой, возделываемых на Урале. Искренне благодарим рецензентов данной работы за ценные замечания.

Работа выполнена в соответствии с государственным заданием на оказание услуг, частично финансируемых Министерством образования и науки РФ из средств федерального бюджета, на оборудовании, закупленном в ходе реализации проекта развития Пермского национального исследовательского университета.

ЛИТЕРАТУРА

- Абдулина И.Р., Вафин Р.Р., Ржанова И.В. и др. Молекулярная идентификация генотипов яровой пшеницы по аллельным вариантам *Waxy*-генов // Фундаментальные исследования. 2013. № 1. С. 13–17.
- Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. Сорта растений. М., 2013. 392 с.
- Дивашук М.Г., Климушина М.В., Карлов Г.И. Молекулярно-генетическая характеристика аллеля *Wx-B1e* мягкой пшеницы и применимость ДНК-маркеров для его идентификации // Генетика. 2011. Т. 47. № 12. С. 1611–1615.
- Игнатъева Н.Г., Васюшкина Н.Е., Кравченко Н.С. и др. Генетический полиморфизм амилолитических ферментов зерна пшеницы и генетика ферментов биосинтеза крахмала // Зерновое хозяйство России. 2009. № 4. С. 22–26.
- Климушина М.В., Крупин П.Ю., Дивашук М.Г. и др. Об оптимизации систем молекулярного маркирования *Waxy*-генов пшеницы для целей MAS-селекции // С.-х. биология. 2010. № 5. С. 36–41.
- Климушина М.В., Гладких Н.И., Дивашук М.Г. и др. Распределение аллелей генов *Wx* в коллекции мягкой пшеницы Краснодарского НИИСХ им. П.П. Лукьяненко // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012. Т. 16. № 1. С. 187–192.
- Назаров Н.Н. География Пермского края. Ч. I. Природная (физическая) география. Пермь, 2006. 139 с.
- Петрова И.В., Чеботарь С.В., Рыбалка А.И. и др. Идентификация *Wx*-генотипов среди сортов озимой мягкой пшеницы // Цитология и генетика. 2007. № 6. С. 11–17.
- Результаты сортоиспытания сельскохозяйственных культур на госсортоучастках Пермского края за 2011 год: брошюра. Пермь, 2011. 73 с.
- Российская газета: регион Республика Башкортостан. 2010. № 129 (5208). С. 2.
- Hemery Y., Rouau X., Lullien-Pellerin V. *et al.* Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality // J. Cereal Sci. 2007. No. 46. P. 327–347.
- Nakamura T., Yamamori M., Hidaka S. *et al.* Expression of HMW *Wx* protein in Japanese common wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars // Jpn. J. Breed. 1992. V. 42. P. 681–685.
- Nakamura T., Yamamori M., Hoshino H. *et al.* Identification of three *Wx* proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Biochem. Genet. 1993. 31. P. 75–86.
- Nakamura T., Yamamori M., Hirano H. *et al.* Production of waxy (amylose-free) wheats // Mol. Gen. Genetics. 1995. V. 248. P. 253–259.
- Nakamura T., Vrinten P., Saito M. *et al.* Rapid classification of partial waxy wheats using PCR-based markers // Genome. 2002. V. 45. P. 1150–1156.
- Saito M., Vrinten P., Nakamura T. DNA markers for identifying waxy mutations and improving noodle quality in wheat // JARQ. 2010. No. 44 (2). P. 109–115.
- Shure M., Wessler S., Fedoroff N. Molecular identification and isolation of *waxy* locus in maize // Cell. 1983. V. 35. P. 225–233.
- Torres A.M., Weeden N.F., Martin A. Linkage among sozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba* // Theor. Appl. Genet. 1993. V. 5. P. 937–945.
- Vanzetti L.S., Pflüger L.A., Rodriguez-Quijano M. *et al.* Genetic variability for *waxy* genes in Argentinean bread wheat germplasm // Electronic J. Biotechnol. 2009. V. 12. P. 1–9.
- Vrinten P., Nakamura T., Yamamori M. Molecular characterization of waxy mutations in wheat // Mol. Gen. Genetics. 1999. V. 261. P. 463–471.
- Yamamori M., Nakamura T., Endo T.R. *et al.* Waxy protein deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat // Theor. Appl. Genet. 1994. V. 89. P. 179–184.
- Yamamori M., Quynh N.T. Differential effects of *Wx-A1*, *-B1* and *-D1* protein deficiencies on apparent amylase content and starch pasting properties in common wheat // Theor. Appl. Genet. 2000. V. 100. P. 32–38.

ALLELIC VARIANTS OF *WAXY* GENES IN *TRITICUM AESTIVUM* L. CULTIVARS GROWN IN THE PERM REGION AND BASHKIRIA

I.V. Boboshina^{1,2}, S.V. Boronnikova^{1,2}

¹ Perm State University, Perm, Russia, e-mail: coccinela@yandex.ru;

² Institute of Natural Science of Perm State University, Perm, Russia

Summary

Molecular marker-based identification of allelic variants of *Waxy* genes has been performed in a collection of 30 common wheat varieties grown in the Perm region and Bashkiria. Genotyping with two molecular marker sets shows that all these cultivars bear the wild-type allele of the *Wx-A1* gene; cvs. Bashkirskaya 4, Bashkirskaya 26, and 'Bashkirskaya 28 possess the functional allele of the *Wx-B1* gene, *Wx-B1e*; and Ul'yanovskaya 100 is heterozygous, possessing *Wx-B1a* and *Wx-B1e*. No varieties with null-alleles of *Wx-B1* have been found. Only wild-type alleles are present in the *Wx-D1* locus.

Key words: *Triticum aestivum* L., common wheat, cultivars, molecular markers; *Waxy* genes.

УДК 631.527.5:633.11«324»:631.524.85

АГРОТЕХНИЧЕСКИЕ И СЕЛЕКЦИОННЫЕ СЛАГАЕМЫЕ УСПЕХА ВНЕДРЕНИЯ МИРОНОВСКИХ СОРТОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ В СССР КАК ОСНОВА ДЛЯ РАБОТЫ ПО ВНЕДРЕНИЮ В СИБИРИ ВНОВЬ СОЗДАНЫХ СОРТОВ, ЗИМОСТОЙКИХ В УСЛОВИЯХ РЕГИОНА

© 2013 г. В.Е. Козлов

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

Поступила в редакцию 29 июля 2013 г. Принята к публикации 14 августа 2013 г.

На основе междисциплинарного подхода к исследованию признака зимостойкости у пшеницы в Институте цитологии и генетики СО РАН в лаборатории под руководством В.М. Чекурова было получено обширное генетическое разнообразие форм пшеницы. Образцы пшеницы сочетали высокую выраженность как признака зимостойкости, так и других хозяйственно ценных признаков, присущих сортам. Поэтому ряд образцов получил статус сортов, которые в настоящее время высеваются в Сибири. Как показал опыт Мироновского института селекции и семеноводства пшеницы (НИИССП) в СССР, громадный масштаб применения созданных в институте сортов был обеспечен как увеличенным потенциалом зимостойкости, так и разработкой сортовой агротехники в зависимости от природной зоны, типа почв, разных севооборотов, характера увлажнения почвы и т. д. По нашему мнению, расширение площадей, занимаемых вновь созданными сортами, серьезно сдерживает отсутствие такой агротехники для условий Сибири. В статье обсуждаются основные рекомендации, выработанные коллективом авторов из Мироновского института, и необходимость их адаптации для условий региона.

Ключевые слова: озимая пшеница, зимостойкость, сортовая агротехника.

Расширение знаний о механизмах формирования признака зимостойкости у растений в конечном счете приводит к получению более зимостойких сортов сельскохозяйственных культур. Это, в частности, произошло в итоге исследований зимостойкости пшеницы на основе междисциплинарного подхода, которые проводились под руководством Виктора Михайловича Чекурова в Институте цитологии и генетики СО АН СССР (ныне ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск). Было получено обширное генетическое разнообразие образцов озимой пшеницы, обладающих высокой выраженностью как зимостойкости, так и остальных хозяйственно ценных признаков, присущих сортам. На этой основе получены такие высокозимостойкие в условиях Сибири сорта, как Лютесценс 4, Багратионовская, Кулундинка, Иркутская озимая, Заларинка, Новосибирская 32,

Новосибирская 40, Новосибирская 51. Все они нашли свое практическое применение. Так, по данным «Россельхозцентра» по Новосибирской области осенью 2012 г. высеяно около 14 тыс. га озимой пшеницы. Конечно, это небольшая доля площадей, занимаемых пшеницей в области. Но, несомненно, интерес к озимой пшенице существует благодаря ряду ее преимуществ по сравнению с яровой. Во-первых, в среднем в Советском Союзе озимые были вдвое урожайнее яровых. Во-вторых, уборка озимых, как правило, происходит в теплую сухую погоду конца лета, это позволяет убирать зерно с наименьшими затратами ресурсов. В то же время яровые созревают позднее, и их уборка происходит нередко в дождливую погоду, что может сопровождаться потерей части урожая и качества. В-третьих, озимые являются удобным элементом севооборота,

так как позволяют уменьшить пиковые нагрузки в сельском хозяйстве в период уборки и сева, которые возникают, если весь посевной клин занимают яровые культуры.

Хотя созданные за последнее время сорта озимой пшеницы, как показывает опыт успешного их возделывания в разных частях Западной Сибири, обладают довольно высоким уровнем зимостойкости, отсутствие научно обоснованных рекомендаций по их сортовой агротехнике серьезно сдерживает их внедрение в практику. Об этом говорят результаты неудачных попыток посева озимой пшеницы в отдельных хозяйствах. Еще более наглядно видна важность не только создания самих сортов, но и разработки агротехники этих сортов озимой пшеницы на примере стремительного роста площадей, занятых озимой пшеницей в европейской части Советского Союза в послевоенный период. В первую очередь этот успех связан с деятельностью таких селекционеров, как П.П. Лукьяненко и В.Н. Ремесло и возглавляемых ими коллективов. Впечатляет успех, например, распространения мироновских сортов озимой пшеницы в Советском Союзе. Так, в 1971 г. примерно из 20,4 млн га сортовых посевов озимой пшеницы в стране 48 % площадей занимали мироновские сорта (Ремесло, Говорун, 1972). Безусловно, в первую очередь это было связано с увеличенным уровнем зимостойкости этих сортов. Но не меньший вклад в успех внесли селекционеры Мироновского института по разработке агротехники возделывания этих сортов в разных почвенно-климатических условиях, в разных севооборотах. Поэтому их опыт заслуживает самого пристального внимания в настоящее время применительно к природным условиям Сибири, для которых уже создан ряд сортов озимой пшеницы. И, как показывают многолетние наблюдения, у них достаточно высокий уровень зимостойкости для того, чтобы устойчиво по годам перезимовывать и формировать высокий урожай зерна в производственных условиях.

И, хотя зимостойкость мироновских сортов оказалась недостаточной для условий Сибири, для нас важны принципы сортовой агротехники, которые выработаны этими коллективами. Ведь цель такой агротехники – создание наиболее благоприятных условий для перезимовки посевов озимой пшеницы и формирования наибольшего урожая продовольственного зерна

высокого качества. Конечно, в нашем случае используются другие сорта, и агроклиматические условия Сибири существенно жестче, чем на Украине, для которой наиболее детально были проработаны, систематизированы и опубликованы приемы сортовой агротехники. Но есть все основания полагать, что эти приемы остаются справедливыми и для условий Сибири. В анализе этих приемов будем опираться на монографию «Мироновские пшеницы», изданную в 1972 г. под руководством академика ВАСХНИЛ В.Н. Ремесло и написанную коллективом авторов из Мироновского НИИ селекции и семеноводства пшеницы.

Цель этой статьи – дать общее описание тех задач, которые необходимо решить применительно к конкретным климатическим и почвенным условиям разных зон Сибири и даже хозяйств, где предполагается высевать озимую пшеницу.

Следует отметить, что основное внимание уделяется вопросам агротехники, так как они важны, в первую очередь, для практического применения сортов, созданных для условий Сибири. Вопросы селекции на повышение зимостойкости и высокую выраженность остальных хозяйственно ценных признаков представляют в большей степени научный интерес. Поэтому они здесь практически не затрагиваются. Цитаты из каждого рассматриваемого раздела монографии в тексте статьи выделены курсивом.

Логично начать наш анализ монографии «Мироновские пшеницы» с раздела, посвященного агротехнике, написанного В.К. Блажевским. Он считает, что для получения высоких и устойчивых урожаев озимой пшеницы необходимо высевать высококачественные семена районированных сортов и применять сортовую агротехнику, которая определяет в первую очередь, место озимой пшеницы в севообороте.

1. АГРОТЕХНИКА ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ МИРОНОВСКИХ СОРТОВ (БЛАЖЕВСКИЙ, 1972)

1.1. Место в севообороте

Это важно, потому что, как показывает опыт, озимая пшеница более требовательна к предшественникам, чем другие культуры. Наиболее благоприятные условия для развития посевов и

формирования высокого уровня зимостойкости создаются по чистым и занятым парам и менее благоприятные – после непаровых предшественников. Это связано с тем, что после чистого пара почва мелкокомковая, что обеспечивает наилучшее накопление осадков и нитрификацию. Добиваться такого состояния на разных типах почв и в разных климатических зонах приходится комплексом приемов, т. е., как считает автор, в каждой почвенно-климатической зоне должна быть своя агротехника озимой пшеницы. Более того, нередко в пределах одного хозяйства существуют разные типы почв. Поэтому, по мнению В.К. Блажеского, «в каждом хозяйстве целесообразно выращивать не один, а два и даже три районированных сорта, чтобы полнее использовать их биологические и хозяйственно ценные свойства» и природные условия. Например, использовать разные сроки созревания разных сортов, неодинаковую влагообеспеченность полей с разными типами почв и, соответственно, разную засухоустойчивость сортов, неодинаковую зимостойкость посевов разных сортов на разных типах почв, неодинаковое накопление снега на полях, различие в сроках его схода и т. д.

Но чистые пары – достаточно «дорогое удовольствие». И хотя они позволяют получать наибольшие урожаи озимой пшеницы, в хозяйствах зачастую озимую пшеницу сеют по занятым парам и непаровым предшественникам. Как показывает опыт, приемами агротехники удается приблизить плодородие полей после занятых паров и полей после непаровых предшественников к плодородию чистых паров. В результате, как замечает автор, не более 5 % площади обрабатываемой земли в лесостепи и даже в южных лесостепных районах Украины остается под чистым паром.

«Урожай озимой пшеницы по чистому пару значительно выше, чем по занятым парам и непаровым предшественникам только в степных, наиболее засушливых районах. В лесостепи, даже в районах неустойчивого и необеспеченного увлажнения, урожай после занятых паров и непаровых предшественников бывает в большинстве случаев достаточно высоким». Достигается это более ранней уборкой предшествующих культур и своевременной и правильной обработкой почвы, что позволяет

пополнить запасы влаги в почве и при внесении удобрений пополнить запасы питательных веществ.

Как отмечено выше, озимая пшеница требовательна к предшественникам и поэтому к их выбору следует подходить внимательно. *«Например, размещение посевов озимой пшеницы после кукурузы, убранной в молочно-восковой степени, при благоприятных условиях увлажнения и своевременной подготовке почвы обеспечивает получение высоких урожаев этой культуры. Когда же с подготовкой почвы запыздывают, урожаи резко снижаются, а в неблагоприятные годы посевы нередко погибают. Поэтому, если техническая вооруженность хозяйства не позволяет вовремя убрать урожай кукурузы и подготовить почву за 20–25 дней до начала сева озимой пшеницы, то хотя бы часть площадей ее целесообразно разместить по другим предшественникам, которые убирают в более ранние сроки, даже стерневым».*

Этот пример показывает, что выбор предшественника во многом определяется возможностью заблаговременной подготовки почвы под посев озимой пшеницы. И именно размещение посевов по так называемым непаровым предшественникам часто *«приводит к получению невысоких, а главное, неустойчивых урожаев. Положение усложняется еще и тем, что почти ежегодные пересевы приводят к нарушению севооборотов».*

Объяснение гибели посевов озимой пшеницы сокращением площадей под чистыми парами справедливо лишь для степных засушливых районов». В других районах гибель посевов происходит зачастую на площадях, которые после предшественников обработаны плохо и в поздние сроки.

Ранние же посевы после хороших предшественников часто повреждаются скрытостебельными вредителями.

В целом величина и стабильность урожаев озимой пшеницы зависят от системы обработки почвы, удобрений, сроков посева, качества и норм посева семян и др.

1.2. Обработка почвы

«Урожай озимой пшеницы мироновских сортов зависит прежде всего от того, насколько

тщательно после каждого предшественника обработана почва. Лучшими предшественниками являются те, после которых можно своевременно и качественно подготовить почву. При этом чем раньше и в более короткий срок обработана почва, тем лучше. В ней больше накапливается влаги и усвояемых элементов питания, лучше разлагаются пожнивные остатки, гибнут вредители и возбудители болезней, она хорошо оседает, уплотняется до посева озимых».

1.2.1. Обработка чистых паров

В лесостепных и даже южных лесостепных районах Украины под чистым паром занято не более 5 % общей площади обрабатываемой земли.

Обработку черного пара начинают сразу же после уборки предшественников. После зерновых и пропашных культур – подсолнечника, кукурузы и др. – проводят лушение, измельчающее пожнивные остатки и улучшающее качество последующей вспашки. Затем разбрасывают навоз и проводят вспашку. Глубина ее должна быть 20–25 см и даже 30 см, если позволяет мощность пахотного слоя.

Ранней весной проводят закрытие влаги. Когда почва хорошо созреет, культиваторами проводят первую обработку на глубину 12–14 см. При последующих культивациях глубину уменьшают на 2–3 см. В годы с нормальным увлажнением проводят 4–5 культиваций с боронованием. В засушливые годы число обработок меньше, во влажные – больше.

1.2.2. Обработка занятых паров

Парозанимающие культуры нужно как можно раньше убрать и провести сразу же обработку почвы. С этого начинается парование поля. В пахотном слое начинается накопление влаги даже за счет водяных паров, разложение корней и пожнивных остатков. При этом микроорганизмы начинают потреблять азот из почвы. Происходит денитрификация. По мере разложения органических остатков предшествующей культуры микроорганизмы, их разлагающие, начинают отмирать, и азот начинает переходить в доступные для растений формы. Происходит

обратный процесс – процесс нитрификации. Поэтому чем раньше и качественнее проведена обработка занятых паров, тем интенсивнее к началу сева озимой пшеницы в почве проходит процесс нитрификации.

Важное значение имеет при этом способ обработки почвы. В годы, благоприятные по увлажнению, наибольший урожай был получен после вспашки, а в неблагоприятные – по дискованию, но качество зерна пшеницы снижалось в последнем случае. Одной из причин, вызывающих такие различия в урожайности, могла быть более высокая уплотненность почвы пахотного слоя после поверхностной обработки. Она сохранялась и в период колошения и сопровождалась ослаблением нитрификации, снижением содержания нитратного азота. Последнее обстоятельство, вероятно, объясняет, почему после гороха урожай был всегда выше по вспашке.

Внесение удобрений перед посевом озимой пшеницы всегда давало при посеве более высокий урожай по вспашке, чем по дискованию. Без удобрений урожай по вспашке был выше только при ранних и оптимальных сроках посева. Для поздних неудобренных посевов лучшей была поверхностная обработка почвы.

Опираясь на опыт Мироновского института и опыт хозяйств, В.К. Блажевский пришел к выводу, что невозможно разработать наилучшую единую систему подготовки почвы под озимую пшеницу после занятых паров. *«Приемы обработки изменяются в зависимости от конкретных условий: сроков уборки предшественника, влажности почвы, ее механического состава, засоренности и др.*

Для предупреждения пересыхания верхнего слоя почвы обязательным приемом нужно считать лушение. Вслед за внесением удобрений нужно пахать. Глубина вспашки в пределах пахотного слоя полезней та, при которой достигается лучшее крошение почвы.

Вслед за вспашкой надо проводить первое рыхление культиваторами с экстирпаторными лопатами в агрегате с боронами или кольчатошпоровыми катками.

Первичная подготовка почвы под озимые считается оконченной только тогда, когда поверхность ее доведена до мелкокомковатого состояния, пригодного для посева. После этого

проводят еще 2–3 рыхления лаповыми культиваторами и боронами на глубину 6–7 и 5–6 см после каждого дождя или прорастания сорняков».

1.2.3. Обработка почвы после пропашных культур

«Отличие их от занятых паров в том, что здесь резко сокращается период от уборки урожая до наступления лучших сроков посева и мало остается времени для хорошей подготовки почвы».

Пропашные культуры – кукуруза, убираемая на силос и зеленый корм, картофель, подсолнечник.

Вслед за уборкой предшественника проводят лущение дисковыми орудиями и сразу же вспашку на глубину 22–25 см при наличии влаги. При недостатке влаги вместо вспашки применяют дополнительную обработку почвы дисками до получения рыхлого слоя глубиной 6–7 см. При достаточном увлажнении преимущество должно отдаваться вспашке с прикатыванием. Прикатывание придает почве мелкокомковатую структуру и осаждаст ее.

1.2.4. Обработка почвы после стерневых предшественников

«Озимую пшеницу во всех зонах страны на части площади сеют повторно по пшенице, которая размещалась после чистых или занятых паров, реже после зерновых или крупяных культур. Наибольшие неудачи при повторных посевах или при размещении пшеницы после других стерневых бывают тогда, когда в них возникает необходимость непосредственно перед посевом». Например, возникает необходимость использовать под посев озимой пшеницы зябь, поднятую после стерневых, которую обычно поднимают без боронования. В результате поверхностный слой зачастую оказывается сухим, с недостаточным количеством элементов питания, так как пожнивные остатки еще не перегнили. «Как правило, озимая пшеница на таких площадях дает низкие урожаи или погибает. Между тем повторные посевы озимых, как и посевы после других стерневых, могут давать не только удовлетворительные, но и высокие урожаи».

Это возможно достичь при учете двух обстоятельств. Во-первых, «Опытами, проведенными в Харьковском сельскохозяйственном институте, установлено, что в соломе злаков к концу вегетации накапливаются вещества, обладающие свойствами ингибиторов. К ним, в первую очередь, относятся фенолы, количество которых достигает в листьях 22,6 мг на 100 г сухого вещества. На четвертый день после посева озимой пшеницы на контроле получено 17,5 % всходов, а при внесении 5 г муки, приготовленной из соломы, на 1 кг почвы, – 2,5 %».

Таким образом, неперегнившие пожнивные остатки очень сильно угнетают развитие посевов озимой пшеницы. Это, в свою очередь, ведет к изреживанию посевов, снижению их зимостойкости и снижению урожая или даже гибели.

Во-вторых, «Ингибиторы, накапливающиеся в почве при запарке стерни, через 15 дней при благоприятных температурных условиях и оптимальной влажности, как установлено А.М. Можейко (1967), исчезают». Поэтому при подготовке почвы под посев озимых по стерне одним из важнейших условий является наиболее ранняя вспашка. «Этим же объясняется повышение урожая озимой пшеницы при сжигании стерни при запоздалой вспашке.

Вспаханная почва должна подвергаться поверхностному рыхлению, чтобы своевременно уничтожат всходы сорных растений, падалицы, вредителей и возбудителей болезней, накапливать влагу и элементы питания».

Успешным примером посевов озимой пшеницы по стерневым являются опыты Мироновского института, где на 40-м году бессменного посева пшеницы по пшенице в 1969 г. сорт Мироновская 808 дал урожай 40,9 ц/га. Для этого вслед за уборкой предшественника взлущили стерню, на второй день внесли удобрения N_{60} P_{60} K_{60} и провели вспашку с прикатыванием, культивацию и боронование. Далее почва поддерживалась в чистом от сорняков и рыхлом состоянии. Посев провели 10 сентября (в середине оптимальных сроков). В 1971 г. в таких же условиях опыта урожай Мироновской 808 достиг 42,4 ц/га.

Очевидно, что залогом таких урожаев стала, в частности, подготовка под посев освобожденных полей без малейшей задержки.

«В Украинском научно-исследовательском институте зернового хозяйства (Баранов, 1956; Тарасенко, 1967) исследовали влияние сроков вспашки стерни: при вспашке 21 июля получили 24,7 ц/га, при вспашке 16 августа – 19,1 ц/га, а 3 сентября – 16,9 ц/га».

В условиях Украины уборка озимой пшеницы и следовательно, вспашка и дальнейшая подготовка освобождающихся полей под посев озимой пшеницы приходится на вторую декаду июля. Это примерно совпадает со сроками уборки озимой пшеницы в условиях, например, лесостепи Новосибирской области. Близки также и сроки посева – вторая половина сентября, – которые были рекомендованы В.М. Чекуровым (ИЦиГ СО РАН). Такое совпадение по срокам уборка–подготовка почвы–посев озимой пшеницы открывает принципиальную возможность, по крайней мере, в лесостепи Новосибирской области, высевать созданные сорта озимой пшеницы не только по чистым парам, но и по озимой пшенице, как это было показано опытами Мироновского института.

Итак, одно из важнейших условий подготовки почвы под посев озимой пшеницы после стерневых предшественников – добиться перегнивания пожнивных остатков. Это требование исключает возможность использования незапаханной стерни для снегозадержания на посевах озимой пшеницы. Известные случаи использования такого приема в хозяйствах Сибири заканчивались гибелью посевов.

1.2.5. Предпосевная обработка почвы

Семена озимой пшеницы при посеве должны быть заделаны на одинаковую глубину и положены на уплотненное ложе. Поэтому предпосевную обработку почвы проводят в день посева, чтобы не допустить потери влаги. Эта обработка также выравнивает почву, уничтожает проростки сорняков. Для этой цели подходят культиваторы с плоскими лапами в агрегате с боронами, а при излишней рыхлости почвы – с катками.

В условиях достаточной влажности, даже если почва рыхлая, предпосевная культивация обязательна, так как без нее озимь быстро покрывается сорняками. Интенсивность роста и развития растений озимой пшеницы определяется качеством подготовки почвы. Поэтому

в зависимости от ее состояния необходимо решить, каким сортом занимать поля. Если почва хорошо подготовлена и в ней достаточно влаги, то выше урожай могут дать сорта, устойчивые к полеганию. В худших условиях целесообразно использовать более выносливые, пластичные сорта с большой энергией осеннего и весеннего кущения.

1.3. Удобрения

При урожае зерна 40 ц/га и соответствующем количестве соломы на серых оподзоленных почвах Винницкой опытной станции вынос из почвы составил 108 кг азота, 38 кг фосфорной кислоты и 44 кг окиси калия. На слабо оподзоленных черноземах Мироновского института при таком же урожае вынос азота составил около 120 кг, фосфора – 45 и калия – 48 кг/га. Значительная часть усвояемых растениями элементов питания остается в корневых и пожнивных остатках. Установлено, что такого количества элементов в легкодоступной форме в почве почти никогда не бывает. Поэтому для получения высоких урожаев под озимую пшеницу необходимо вносить удобрения. И чем беднее почва, тем удобрения эффективнее.

«Д.Н. Прянишников (1940) указывал, что максимальные урожаи достигаются при комбинированном внесении навоза и минеральных удобрений. Преимущество смешанного фона по сравнению с минеральным создается за счет органического вещества – источника энергии для почвенных микроорганизмов, продукты жизнедеятельности которых используются высшими растениями».

Повышению урожайности и, следовательно, эффективности вносимых удобрений способствуют известкование кислых и гипсование щелочных почв. При этом в первый год и органические, и минеральные удобрения используются не полностью. *«А.И. Колоша (1965) вывел средние ориентировочные коэффициенты: в первый год азот минеральных удобрений используется на 65 %, фосфор – на 25 и калий – на 60 %».*

«В условиях лесостепи Украины (Вьшинский, Лазурский, 1966) от 20 т навоза урожай озимой пшеницы увеличивался на 4,9 ц/га, а от 4,7 ц минеральных удобрений – на 5,6 ц/га.

Рост урожайности озимой пшеницы от удобрений связан с более интенсивным первоначальным развитием растений, повышением их зимостойкости, увеличением густоты продуктивного стеблестоя, улучшением структуры урожая.

При этом зимостойкость значительно возрастала только при внесении навоза или полного удобрения. В бессменных посевах (пшеница по пшенице) она была ниже, чем в севообороте, но также возрастала при внесении удобрений».

Для повышения эффективности применения полных минеральных удобрений следует подбирать для конкретных почв оптимальное соотношение элементов питания и дозу (вес каждого компонента). Так, для мощных слабовыщелоченных черноземов Мироновки очень хорошее соотношение – 1 : 1 : 1 при дозе 40 кг/га.

В условиях достаточного увлажнения эффективность удобрений повышается.

1.3.1. Сорт и удобрения

Разные сорта по-разному отзываются повышением урожайности в ответ на одни и те же дозы минеральных удобрений. Как отмечено выше, при этом важно учитывать характер почв и подбирать соотношение и дозу каждого из компонентов в полном удобрении. И лучше их вносить в сочетании с навозом.

«Так, дерново-подзолистые почвы очень бедны азотом. И для получения на них высоких урожаев озимой пшеницы необходимо вносить полное минеральное удобрение, а еще лучше в сочетании с навозом.

При исследовании на серых оподзоленных почвах разных форм азотных удобрений на фоне внесения суперфосфата и 40 %-й калийной соли установлено, что все они – аммиачная селитра, сульфат аммония, мочевины и хлористый аммоний – при внесении до посева значительно повышали урожай примерно с одинаковой эффективностью».

1.3.2. Подкормка озимой пшеницы

«Исследования, проведенные в разных почвенно-климатических зонах, показывают, что

минеральные удобрения высокоэффективны даже в небольших дозах при внесении в виде подкормки. На серых оподзоленных почвах в среднем за 1961–1964 гг. получен прирост урожая зерна от 10 кг азота, внесенного весной, 4,2 ц/га; при внесении 20 кг – 6,8, а от полного удобрения в дозе N_{20}, P_{20}, K_{20} – 8,4 ц/га, что составило 31,2 %».

Эта прибавка урожая была обеспечена увеличением продуктивной кустистости растений, длины колоса и веса зерна с колоса. На тех же серых оподзоленных почвах более высокий урожай был обеспечен внесением полного удобрения перед посевом и проведением весенней подкормки.

Существует практика переноса весенней подкормки посевов с весны на осень. Так, в Мироновском институте в 1968–1969 гг. на мощном слабо выщелоченном черноземе показано, что наибольший прирост урожая получен при внесении удобрений (N_{30}, P_{30}, K_{30}) в подкормку осенью, в начале кущения, до прекращения осенней вегетации. А разбрасывание удобрений при возобновлении весенней вегетации обеспечило такой же прирост урожая, что и при внесении их осенью в лучшие сроки.

Этот агрономический прием заслуживает самого пристального внимания и исследования в условиях Сибирского региона, потому что осенью до прекращения осенней вегетации озимых, как правило, технически гораздо проще осуществить подкормку посевов озимой пшеницы, нежели весной. Более того, не будет задержки с подкормкой посевов весной (из-за неравномерного схода снега с полей, например). Конечно, осеннюю подкормку могут серьезно осложнить сильные дожди. В этом случае подкормку можно провести непосредственно перед выпадением снега. Хотя все эти вопросы требуют проработки.

1.3.3. Припосевное удобрение

«Высокую эффективность проявляют минеральные удобрения, внесенные при посеве в рядки». Такой способ внесения более эффективен, чем вразброс, под запашку, что объясняется меньшим связыванием элементов питания в трудно растворимые формы, доступностью для развивающейся корневой системы растений.

Лучшая форма удобрения для внесения – нитрофоска, ее вносят комбинированными сеялками, заделывая несколько глубже семян.

1.3.4. Известкование

На кислых почвах внесение извести с удобрениями повышает эффективность последних, так как растения пшеницы очень чувствительны к кислотности почв.

На Украине в известковании нуждаются дерново-подзолистые почвы Полесья и светло-серые почвы лесостепи. Наибольший прирост урожая озимой пшеницы дает заплата извести непосредственно под эту культуру. При недостатке извести ее можно внести совместно с удобрениями в количестве, нейтрализующем кислотность последних, т. е. 4–5 ц/га.

1.4. Посев

Посев высококачественными семенами зимостойких сортов при оптимальных сроках и нормах высева и глубине заделки семян в правильно подготовленную почву способен обеспечить получение высокого урожая зерна озимой пшеницы.

1.4.1. Качество семян

«Хорошие сортовые семена можно получить только на высоком агрофоне. Для посева нужно отбирать выровненные средней крупности семена, так как мелкие, даже имея высокую лабораторную всхожесть, менее урожайны. Установлено, что самые крупные семена больше травмируются, чем средние, и чаще поражаются фузариозом, снижая энергию роста и даже всхожесть».

1.4.2. Нормы высева семян

Норму высева нужно уточнять в зависимости от сорта и сроков посева. Так, например, в лесостепи Украины при оптимальных сроках посева Мироновской 808 по занятым парам лучшей нормой посева семян является 4 млн всхожих зерен на 1 га. Для Мироновской Юбилейной на мощных малогумусных черноземах после гороха – 5,5 млн.

1.4.3. Способы посева

Узкорядный способ посева целесообразно применять только в условиях, при которых тщательно подготовлена почва и достаточно влаги для получения всходов. В остальных случаях используется рядовой способ посева с междурядием 15 см.

1.4.4. Глубина заделки семян

«Она имеет важное значение для полноты всходов озимой пшеницы, глубины залегания узла кущения, зимостойкости и урожайности культуры». Ее следует подбирать для конкретных агроклиматических условий. Так, ряд исследователей, работавших в Нечерноземной полосе, рекомендовали заделку семян на глубину 3–5 см. Исследователи с Юга и Юго-Востока рекомендовали более глубокую заделку из-за частого пересыхания верхнего слоя почвы.

«В районах неустойчивого и недостаточного увлажнения, даже в годы, когда верхний слой почвы к началу посева хорошо увлажнен, заделывать семена мельче, чем 6–7 см, опасно, так как он быстро иссушается». При этом нужно учитывать, что каждый сантиметр почвы над узлом кущения растения ослабляет силу мороза, достигающую поверхности почвы, примерно на 3 °С. Но более глубокая заделка удлиняет период «посев–всходы», растения затрачивают больше энергии до выхода на поверхность, и снижается всхожесть.

«При достаточном увлажнении почвы приемлемая заделка семян на глубину 5–6 см, при недостаточной влажности ее можно увеличить до 7 см и даже 9 см, но при посеве крупными семенами. При позднем посеве глубина заделки семян не должна превышать 6–7 см, так как дальнейшее заглубление ослабляет растения. На легких по механическому составу почвах углубление менее опасно, чем на тяжелых, склонных к заплыванию и образованию корки».

1.4.5. Сроки сева

Для получения высокого урожая они не менее важны, чем качество подготовки почвы и удобрения. *«Лучшие сроки посева озимой пшеницы мироновских сортов в большинстве».*

зон страны наступают, когда устанавливается среднесуточная температура воздуха 14–16 °С. Но их нужно уточнять для каждого сорта, почвенно-климатической зоны, в каждом хозяйстве и даже для отдельного поля в севообороте, в зависимости от конкретных условий года».

При ранних сроках посева растения озимой пшеницы после всех предшественников сильнее поражаются бурой листовой ржавчиной, повреждаются скрытостебельными вредителями, с осени зарастают сорняками. Эти негативные последствия были сильнее всего выражены после стерневого предшественника. Соответственно, снижался урожай зерна. Как показал опыт Мироновского института, в лесостепной зоне Украины наивысшие урожаи дает пшеница мироновских сортов при посевах от 5 до 15 сентября. Причем у каждого сорта, известного в 1970-е годы, эти сроки были различны как по продолжительности, так и по датам. Сроки посева влияли и на сроки прохождения фаз развития растений. Однако, если период от первого и до последнего срока посева составлял 45 дней, то разрыв в созревании не превышал 4–5 дней для одного и того же сорта. Но с учетом того, что более ранние посевы зачастую ощутило страдали от вредителей и болезней, более предпочтителен был посев во II декаду сентября. Тем более что наблюдалась тенденция – при более поздних сроках посева повышалось содержание протеина в зерне. Отметим еще раз, что в середине сентября в районе Мироновки происходит переход среднесуточной температуры воздуха через 15 °С, т. е. происходит переход от лета к осени.

Из мироновских сортов своей пластичностью особо выделяется Мироновская 808: этот сорт слабее других сортов из Мироновского института снижает урожайность от посева в неоптимальные сроки.

Заслуживает внимания такое наблюдение: «на кислых почвах Полесья на Украине после непаровых предшественников интенсивность роста растений озимой пшеницы резко снижается с понижением температуры». Вероятно, при отработке технологии возделывания озимой пшеницы на кислых почвах, каких немало на территории Новосибирской области, это обстоятельство следует учесть.

Помимо величины и стабильности по годам сборов урожая зерна озимой пшеницы важно качество собираемого зерна. Этот вопрос рассматривается в специальном разделе монографии.

2. КАЧЕСТВО ЗЕРНА МИРОНОВСКИХ ПШЕНИЦ И ПУТИ ЕГО УЛУЧШЕНИЯ (БЛОХИН, 1972)

2.1. Причины снижения качества зерна озимой пшеницы

«Одно из основных требований, предъявляемых к высококачественному зерну пшеницы, – его высокая питательная ценность, которая зависит от содержания белка и аминокислотного состава. Мука из такого зерна в процессе замеса поглощает большое количество воды, тесто должно мало изменять свои реологические свойства при механической обработке и длительном брожении, обладать хорошей формоустойчивостью и давать высокий объемный выход хлеба с мелким, тонкопористым, эластичным мякишем. Последние свойства зависят от физической структуры клейковинных белков, от их вязкости, упругости и эластичности».

Известно, что все перечисленные технологические качества обусловлены сортом, условиями года, местом выращивания и агротехникой.

И старые, и современные сорта в засушливые годы формируют низкий урожай с повышенным содержанием белка в зерне, а при высокой влагообеспеченности – высокий урожай с низкой белковостью.

Под влиянием неблагоприятных условий выращивания современные сорта озимой пшеницы более резко снижают качество зерна, чем старые сорта. Это вызвано тем, что новые сорта интенсивного типа превосходят существенно сорта старой селекции по урожайности и поэтому выносят ежегодно из почвы с урожаем зерна азота на 20–30 кг/га больше. Следовательно, «при низкой агротехнике, недостаточном азотном питании новые сорта испытывают азотное голодание, особенно в период формирования зерна, и формируют достаточно высокий урожай, но с резко сниженным содержанием клейковины».

Но, «если растения пшеницы хорошо обеспечены азотом на протяжении всей вегетации,

то они формируют хороший урожай с высоким содержанием белка». При недостаточной обеспеченности азотом на всем протяжении развития растений формируется низкий урожай с пониженным содержанием белка. «Если же в начальный период развития растений снабжение азотом хорошее, а в период колошения–созревания зерна ощущается его недостаток, урожай зерна остается высоким, но содержание белка снижается, и, наоборот, при недостатке азота в ранние фазы развития растений и хорошей обеспеченности в поздние – урожай снижается, но содержание белка повышается».

Таким образом, наряду с высокой зимостойкостью посевов озимой пшеницы, обеспеченность азотом на всем протяжении развития растений является залогом получения высоких урожаев высококачественного продовольственного зерна.

2.2. Сохранение и улучшение качества зерна районированных сортов

Как показала практика Мироновского института, мероприятия по получению высококачественного товарного зерна должны начинаться на самых первых этапах семеноводства при производстве семян элиты, которые поступают в хозяйства. «Как показывают данные большого числа исследователей, а также данные Мироновского института, технологические качества зерна районированных сортов озимой пшеницы можно значительно улучшить в процессе семеноводческой работы путем улучшающего отбора. Это становится возможным потому, что в семенном питомнике после внутрисортного скрещивания (обычный прием, применяемый институтом при производстве семян элиты) качество зерна семей одного и того же сорта сильно колеблется». Качество зерна оценивают по содержанию сырой клейковины, а силу муки – методом седиментации в семьях семенных питомников 1-го и 2-го года размножения. Более подробно этот вопрос рассматривается в разделе, посвященном семеноводству.

«Поэтому при семеноводческой работе с районированными и перспективными сортами целесообразно наряду с сортовыми признаками

и урожайностью учитывать и технологические достоинства зерна».

2.3. Влияние условий выращивания на качество зерна

«Технологические свойства зерна изменяются под влиянием условий возделывания. Потенциальные возможности сорта по этим признакам проявляются только в условиях высокой культуры земледелия».

2.3.1. Зависимость качества зерна озимой пшеницы от предшественников

«Из всего комплекса агротехнических мероприятий существенное влияние на качество зерна оказывает предшествующая культура. Многочисленные данные научно-исследовательских учреждений показывают, что в большинстве случаев наилучший предшественник, обеспечивающий получение высокого урожая с хорошим качеством, – черный пар. При этом пшеница, размещенная на черном пару, не только накапливает больше белка, но также проявляет более высокие хлебопекарные качества».

«По данным Госкомиссии по сортоиспытанию сельскохозяйственных культур (Коданев, 1970), черный пар в центрально-черноземной зоне обеспечивал получение зерна озимой пшеницы, имеющего стекловидность на 19 % выше, содержащего на 1,6 % больше белка и на 3,9 % клейковины с силой муки на 33 джоуля выше, чем посева после кукурузы».

Такие преимущества черного пара обусловлены тем, что в этом случае накапливается больше влаги и нитратов в слое почвы 0–100 см, и они более равномерно распределены в этом слое.

«Однако, по данным некоторых исследователей, черный пар не всегда имеет такое преимущество перед другими предшественниками. В зонах достаточного увлажнения такие культуры, как горох и кукуруза, убранная в ранние фазы, также обеспечивают высокий урожай посеянной после них пшеницы с хорошим качеством зерна».

С учетом этого обстоятельства следует подбирать для каждой зоны свои лучшие предшественники. Так, «Л.И. Максимчук, И.Я. Самолевский (1967) рекомендуют для полу-

чения высокого урожая с хорошим качеством зерна в лесостепной зоне Украины для подзоны с достаточным увлажнением ранние занятые пары и многолетние травы, а для подзоны с неустойчивым или недостаточным увлажнением – чистые пары и многолетние травы.

Из непаровых предшественников одним из лучших для лесостепной зоны Украины являются многолетние травы, а в годы с хорошим увлажнением – зернобобовые культуры. Например, качество зерна озимой пшеницы было выше при выращивании после клевера, чем после гороха.

Худшими предшественниками для получения высококачественного зерна являются поздно убираемая кукуруза и зерновые колосовые культуры».

2.3.2. Влияние срока посева

«При современном насыщении севооборотов зерновыми и пропашными культурами проблему повышения качества зерна пшеницы только размещением ее по лучшим предшественникам решить нельзя.

Существенное влияние на урожай и качество зерна пшеницы оказывают сроки ее посева. Многие исследователи отмечают, что наиболее благоприятное сочетание высокой урожайности с лучшим качеством зерна обеспечивают оптимальные для каждой зоны страны сроки посева. Отклонения от них приводят или к резкому недобору урожая и качества зерна, или же к значительному недобору урожая при незначительном изменении качества. Так, по данным Н.А. Федоровой (1960), при более поздних сроках посева озимой пшеницы содержание белка и клейковины в зерне увеличивалось по сравнению с оптимальными, но значительно снижался урожай и ухудшались хлебопекарные достоинства муки.

Таким образом, посев озимой пшеницы в оптимальные сроки способствует наилучшему сочетанию высокого урожая и хороших технологических качеств зерна».

2.3.3. Влияние органических и минеральных удобрений

«Одним из эффективных приемов повышения качества зерна озимой пшеницы является

внесение органических и минеральных удобрений. Значение их возрастает в связи с внедрением в производство высокоурожайных сортов и размещением пшеницы в некоторых районах по непаровым предшественникам.

Из всех видов удобрений наиболее полноценным в снабжении растений пшеницы питательными веществами является навоз. Под его влиянием значительно повышается урожай и улучшаются все основные показатели зерна пшеницы. При добавлении к нему минеральных удобрений эти показатели еще больше возрастали».

В опытах Мироновского института использование одних минеральных удобрений в дозе $N_{30} P_{40} K_{40}$ в севообороте и $N_{120} P_{60} K_{120}$ при бессменной культуре озимой пшеницы ежегодно значительно улучшало качество зерна.

«При применении минеральных удобрений особое внимание следует уделять видам, дозам и срокам внесения. Как показывает опыт, наиболее действенное влияние на качество зерна оказывают азотные удобрения. Дозы и соотношения минеральных удобрений следует подбирать исходя из запасов легкодоступных растениям питательных веществ в почве и потребности в них растений данного сорта для формирования планируемого урожая зерна высокого качества. При этом следует учитывать также условия года, предшественник и сортовую специфику».

Действительно, небольшие дозы азота N_{15-20} , внесенные осенью или весной, расходуются на усиленное кущение растений пшеницы и накопление вегетативной массы, и к началу формирования зерна растения на удобренных участках могут сильнее страдать от недостатка азота по сравнению с неудобренными. В результате качество зерна снизится.

«Поэтому для эффективного улучшения качества зерна озимой пшеницы доза азота должна быть достаточно высокой, чтобы обеспечить формирование высокого урожая и накопления протеина до уровня сильных пшениц». И лучше эту дозу внести дробно, 1/2 или 1/3 всего количества азота внести в период «колошение–цветение», потому что, по данным ряда авторов, азот, внесенный ранней весной и во время выхода растений в трубку, расходует на рост вегетативной массы, которая определяет

величину урожая, а в более поздние сроки – на улучшение качества зерна. Причем доза азота, предназначенная для улучшения качества зерна, оказывала большее влияние, если была разделена на две обработки.

«Однако поздние подкормки, по свидетельству многих исследователей, заметно улучшая качество зерна, не увеличивают общий урожай. Поэтому для получения высокого урожая озимой пшеницы с хорошими технологическими качествами зерна такие подкормки следует применять на фоне достаточной обеспеченности растений азотом в ранние фазы развития».

По данным Мироновского института, самый лучший результат был достигнут на полях института при внесении осенью $N_{40} P_{40} K_{40}$ под посев + N_{20} весной + N_{20} в фазе колошения + N_{20} при формировании зерна.

Но поздние корневые азотные подкормки могут оказаться малоэффективными из-за высохшего верхнего слоя почвы. Поэтому в таких случаях широко используют некорневые подкормки. Опыт их применения свидетельствует о том, что наиболее подходящим для них видом удобрения является мочевины. Ее раствор обладает нейтральной реакцией и позволяет избежать ожога листьев при использовании довольно высоких концентраций. А высокое содержание в ней азота (46 %) позволяет вносить на 1 га значительно меньше раствора, чем при применении других видов азотных удобрений в той же концентрации раствора. Известны случаи успешного применения 20-, 30- и 58 %-го раствора мочевины для этих целей. По мнению ряда исследователей, амидная форма азота способна непосредственно вступать в цикл азотистых превращений, т. е. быстрее других видов азотных удобрений включается в метаболизм.

Но, по-видимому, при использовании мочевины в качестве азотных подкормок озимой пшеницы следует соблюдать некоторую «осторожность». Так, по некоторым данным, мочевины, внесенная в ранние фазы развития растений, вызывает усиление оттока азотистых веществ в корни и значительную их потерю. *«При внесении же раствора мочевины в фазе формирования зерна активизация гидролиза белковых веществ в листьях усиливает отток азотистых веществ в колос и в формирующуюся зерновку».*

С учетом всего этого, вероятно, наиболее предпочтителен следующий вариант применения азотных удобрений на посевах озимой пшеницы: $N_{40} P_{40} K_{40}$ под посев + N_{20} весной (не мочевины, корневая подкормка) + N_{20} в фазе колошения (не мочевины и, возможно, в виде корневой подкормки, если почва влажная) + N_{20} при формировании зерна (мочевины – некорневая подкормка).

Как показывает опыт применения некорневых подкормок, результат зависит от условий года.

Любая технология возделывания озимой пшеницы должна опираться на биологические и хозяйственно ценные свойства семян. Одним из важнейших из них является полевая всхожесть.

3. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫЕ СВОЙСТВА СЕМЯН (МАНЖОС, 1972)

3.1. Полевая всхожесть

«В процессе создания урожая для получения своевременных, дружных и сильных всходов должной густоты, а также их сохранения полевая всхожесть семян является первым и важнейшим фактором».

3.2. Влияние температуры на всхожесть семян

Минимальная температура прорастания для большинства сортов озимой пшеницы составляет 2–3 °С, оптимальная – 18–25 °С, а максимальная – 40–45 °С.

Всхожесть семян принято описывать двумя показателями: лабораторной и полевой всхожестью. Лабораторная всхожесть оценивает долю жизнеспособных зерен в условиях лаборатории. Полевая всхожесть, как правило, всегда ниже лабораторной по ряду причин. Во-первых, у незначительной части семян из-за преждевременного разрыва колеоптиля ростки не выходят из почвы. Во-вторых, часть проросших семян загнивает. И чем ниже температура, тем меньше доля загнивших семян, по-видимому, из-за снижения активности микроорганизмов.

Особенностью озимой пшеницы является зависимость развития ее проростков от темпера-

туры. *«При пониженных температурах озимая пшеница накапливает сухое вещество ростков и корешков более равномерно, и соотношение между их весом приближается к единице».* При более высоких температурах более активно нарастает надземная масса проростков. Это обстоятельство вносит свой вклад в формирование избыточной надземной массы на ранних посевах озимой пшеницы, которая нередко сопровождается истощением растений в ходе зимовки и поражением их снежной плесенью и, наоборот, служит дополнительным аргументом в пользу более поздних посевов.

3.3. Влажность почвы и полевая всхожесть семян

«Растения, которые в период посева до всходов развивались в условиях недостаточного увлажнения, были ослаблены, с узкими листовыми пластинками и недостаточно развитой корневой системой: прохождение фенологических фаз у них задерживалось. В связи с иссушенностью верхних горизонтов почвы растения не образовывали узловых корней».

Как показал анализ, у таких растений к зиме накапливалось значительно меньше углеводов, чем у выращенных при нормальной влагообеспеченности. Они плохо переносили неблагоприятные зимние условия и к весне сильно ослабевали. Выживаемость их в полевых условиях была низкой, что приводило к изреживанию посевов».

Одной из причин снижения полевой всхожести семян является наличие травм, происходящих при обмолоте и доведении их до посевных кондиций. Даже небольшие трещины в оболочке семян снижают полевую всхожесть по сравнению с лабораторной на 10–15 %. Причина в том, что в условиях определения лабораторной всхожести травмированные семена защищены от заражения грибными паразитами и микроорганизмами, присутствующими в почве. Поэтому семена с различной степенью повреждения имеют такую же лабораторную всхожесть, что и неповрежденные.

Но не все травмированные семена погибают в почве после посева и дают всходы. *«Всходы от травмированных семян значительно отстают от нормальных растений по высоте,*

ширине листьев, кустистости и накоплению органических веществ. Нетравмированные семена в опыте почти не заражались грибными и бактериальными заболеваниями. У растений, выращенных из сильно травмированных семян, процент больных достигал 31,4 % (Куперман, 1950)».

Поэтому при уборке посевов на семена следует минимизировать насколько это возможно травмирование семян, например, используя комбайны с двухбарабанными молотильными аппаратами. При этом первый барабан регулируют на малые обороты и увеличенные молотильные зазоры. Это позволяет вначале обмолотить наиболее крупное зерно с наименьшими механическими повреждениями. Второй барабан регулируют на полный вымолот остального зерна. Этой же цели способствует уборка непересохшего в валках зерна. На току также следует регулировать в механизмах зазоры, через которые проходят семена.

3.4. Влияние крупности семян на их посевные и урожайные качества

«Одним из существенных показателей, влияющих на формирование биологических свойств семян последующих поколений, является их крупность (вес 1000 зерен)».

Многими исследованиями показано преимущество крупных семян в отношении как урожайности, так и зимостойкости. Но семена средней фракции, составляющие основную массу в данной партии, нельзя считать неполноценными. Тем более что и выравненность, и крупность семян зависят от сорта, года урожая, дозы удобрений и других факторов. Так, например, для партии семян сорта Мироновская 808 с весом 1000 зерен 33,5 г, которая сходила на 100 % по решетку с отверстиями 2,0 мм, на решетке с отверстиями 2,5 мм можно было получить на сходе с решета партию семян с весом 1000 зерен 36,9 г и выходом около 84,8 %. На решетке с отверстиями 2,75 мм выход семян составил только 20 %, но вес 1000 зерен составлял 44,3 г. *«Конечно, такой низкий выход семян приемлем только в исключительных случаях при избытке семенного материала».*

В то же время более крупные семена не всегда сопутствуют более высокому урожаю.

Так, «в годы, когда длительный срок, особенно в фазе колошения или налива зерна, бывает засуха [лето 2012 г. в Новосибирской области], урожай от средних семян получают более высокий, чем от крупных. Это объясняется тем, что в первые фазы роста растения от крупных семян более интенсивно развивают надземную массу, чем корневую систему. В таких условиях растения от крупных семян, имея развитую надземную часть и сравнительно слабую корневую систему, оказываются в худших условиях, чем растения от средних семян с меньшей надземной массой и более развитой корневой системой».

Но, как было отмечено выше, при более поздних сроках посева такой «дисбаланс» в развитии у растений озимой пшеницы надземной массы и корневой системы сглаживается.

3.5. Зависимость биологических свойств семян от их спелости

«В производственных условиях нередко приходится иметь дело с незрелыми семенами, которые обнаруживаются в посевах. Таких семян обычно мало, но не принимать их во внимание нельзя. Установлено, что семена озимой пшеницы, убранные в конце молочной–начале восковой спелости, имеют преимущество в сравнении с убранными в другие сроки.

Такие семена способны давать урожай значительно выше, чем семена полной спелости, и, кроме того, с большим весом 1000 зерен.

Эта закономерность наблюдалась в разные годы и на всех изучавшихся сортах».

Но в практике предпочтительна уборка прямым комбайнированием в стадию восковой спелости.

Еще один важный раздел монографии «Мионовские пшеницы» посвящен семеноводству и написан М.А. Говоруном и Д.М. Манжосом.

4. СЕМЕНОВОДСТВО (ГОВОРУН, МАНЖОС, 1972)

4.1. Требования к качеству семян

Гарантией использования потенциальных возможностей сорта являются качественные семена и высокая агротехника. Качество семян

принято оценивать по сортовым и посевным показателям. Сортовую чистоту семенных посевов определяют при апробации, согласно стандартам: элитные посева – сортовая чистота 99,8%; посева 1-й категории – не менее 99,5%, 2-й категории – 98% и 3-й категории – 95%.

Посевные качества семян оценивают по всхожести, засоренности, влажности и весу 1000 зерен. Важнейшее из них – всхожесть, потому что «при посеве семенами с пониженной всхожестью много растений гибнет еще до колошения, а часть отстаёт в росте и даёт щуплое зерно; в результате – снижение урожая на несколько центнеров».

Но еще более опасно снижение энергии прорастания – процента зерен, прорастающих не позднее чем на 3-й день при определении лабораторной всхожести семян, так как «снижение энергии прорастания означает, что в полевых условиях появление всходов растягивается на более продолжительное время. А это увеличивает угрозу поражения их грибными болезнями и повреждения вредителями, что приводит к повышенной гибели проростков и изреживанию посевов. Поэтому, чем меньше разрыв в показателях между лабораторной всхожестью и энергией прорастания, тем семена лучше.

На основании многолетнего опыта установлено, что семена, прорастающие позже, чем на третий день, по сути, балласт, растения из них бывают на 15–22% менее продуктивны и многие погибают, не достигнув плодоношения. В то же время семена с хорошей энергией прорастания дают более дружные и ровные всходы, чем семена одинаковой с ними лабораторной всхожести, но с пониженной энергией прорастания».

4.2. Методы получения высокоурожайных семян

«Создание высококачественного посевного материала включает два этапа: выращивание высококачественных семян элиты с ежегодным улучшением их урожайных качеств и репродуцирование семян с сохранением породных свойств сорта.

Элита – это высококачественные семена с наилучшими показателями, характерными для данного сорта. Существует несколько методов

ее получения в зависимости от биологических особенностей сорта.

В Мироновском институте производство элиты озимой пшеницы, в частности сорта Мироновская 808, начинается с внутрисортного скрещивания. Доказано, что семена, получаемые от внутрисортного скрещивания, имеют более высокую энергию прорастания, растения интенсивнее растут, дают более высокий урожай. Этот эффект наблюдается в 1-м, 2-м и 3-м поколениях. Однако оцутимый положительный эффект от внутрисортного скрещивания получают не по всем сортам озимой пшеницы и только при определенных условиях».

Успех такого способа получения семян сорта Мироновская 808 связан с продолжительным в течение дня открытым цветением и высоким процентом открытоцветущих цветков. Поэтому для каждого сорта требуется оценка эффективности применения внутрисортного скрещивания в его семеноводстве.

4.3. Влияние репродукций на качество семян

Опытами показано, что урожай репродукций после элиты снижается, особенно после 3-й репродукции. А степень поражения посевов бурой ржавчиной, напротив, возрастает. «Снижение урожайности происходит из-за некоторой изреженности посевов, уменьшения длины колоса и количества зерен в нем». Также значительно снижаются сила муки и водопоглотительная способность. Это означает, что в репродукциях после элиты технологические качества муки и хлеба снижаются. Поэтому «Мироновский институт рекомендует ежегодно проводить в хозяйствах замену на элиту семян озимой пшеницы на участках размножения с таким расчетом, чтобы товарные посевы засеивались семенами не ниже 3-й репродукции».

4.4. Пути ускоренного внедрения новых сортов в производство

Помимо задач возделывания какого-либо одного сорта возникает необходимость сортосмены.

«Опыт Мироновского института показывает, что сортосмену озимой пшеницы через

два года на третий можно провести лишь при ежегодном обеспечении хозяйств семенами элиты для посева на участках размножения. На семенных участках хозяйств следует выращивать собственные сортовые семена второй репродукции с таким расчетом, чтобы все производственные площади засеивать этими семенами (не ниже второй репродукции), а зерновую продукцию с них использовать как товарную (третья репродукция).

При таком подходе требуется не так уж много семян элиты для ежегодного обеспечения хозяйств, входящих в зону обслуживания производителя элиты.

«Площадь участков определяют исходя из полной потребности 1-й репродукции на семеноводческий посев по следующей формуле:

$$V = \frac{П}{K},$$

где V – площадь участка размножения; $П$ – вся площадь производственных посевов пшеницы в хозяйстве; K – коэффициент размножения семян.

Коэффициент размножения семян неодинаков даже для отдельных хозяйств и изменяется в основном в зависимости от урожая, тогда как норма посева семян колеблется незначительно. Так, для хозяйств Мироновского района при норме высева пшеницы 2 ц/га и при урожае чистых семян 16,2 ц/га коэффициент размножения составляет 8,1, а участок размножения при площади производственных посевов $П = 16858$ га равен 256 га; на эту площадь при норме высева 1,9–2,0 ц/га требуется ежегодно 500 ц семян элиты».

Такой подход позволяет внедрять в производство новые сорта через два года на третий. Но он требует наличия в каждом хозяйстве производства высококачественных семян 1-й и 2-й репродукций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В монографии «Мироновские пшеницы» дано общее описание тех требований агротехники, выполнение которых позволило сортам озимой мягкой пшеницы Мироновского института занять громадные площади в СССР. Но уровень зимостойкости сортов той поры не позволил им продвинуться в восточные районы страны, за

Урал. В настоящее время уже созданы сорта, способные устойчиво по годам зимовать в условиях Сибири. И, следовательно, для их успешного и широкого внедрения в производство нужно проработать все те положения агротехники, которые выработал коллектив Мироновского института, но уже в почвенно-климатических условиях Сибири. Это позволит использовать потенциальные возможности как уже существующих сортов, так и вновь создаваемых. В их числе ряд сортов, созданных под руководством В.М. Чекурова (ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск) на основе полученного им исходного материала. Это Лютесценс 4, Кулундинка, Багратионовская, Заларинка, Новосибирская 32, Новосибирская 40, Новосибирская 52 и еще ряд селекционных образцов, не получивших статус сортов: Бийская озимая, Филатовка, Новосибирская 9, Иркутская озимая, хотя они вполне заслуживают этого. Например, Бийская озимая проявляет высокую устойчивость к возвратным весенним заморозкам; Филатовка способна давать высокий урожай на тяжелых суглинистых черноземах на гривах Северной Кулунды в условиях малоснежья, без кулис, при почти полном отсутствии весенне-летних осадков.

В целом следует отметить, что упомянутые выше исходный материал и сорта из него прошли отбор на высокую зимостойкость как в условиях высокого снежного покрова, наблюдаемого на полях в лесостепи, так и в бескулисных посевах при малоснежье на гривах в степи Северной Кулунды (Северо-Кулундинская опытная станция, р.п. Баган, Новосибирская область).

Успех внедрения этих сортов зависит как от уровня их зимостойкости, так и от их биологических особенностей, которые позволяют вписать их в уже сложившиеся севообороты, в сложившуюся систему землепользования. И, следовательно, сортовая агротехника, которую необходимо разработать применительно к агроклиматическим условиям разных природных зон, должна быть экономически состоятельной при сложившейся системе землепользования у сельхозпредприятий разной направленности.

Например, семеноводческое хозяйство, которое продает свою продукцию по очень высокой цене, может позволить себе использовать чистые пары и ранние сроки сева конца августа. При благополучной зимовке таких

посевов, слабом поражении снежной плесенью можно получить повышенный урожай высокого качества. Хотя в случае затяжной теплой осени, как, например, в Новосибирской области в 2012 г., это может потребовать 1–2 обработки посевов ядохимикатами для защиты растений от энтомофитов. Конечно, используемые при этом средства защиты, зачастую искусственного происхождения, загрязняют окружающую среду и урожай.

В то же время хозяйство, продающее свое зерно как рядовую продукцию по существенно более низкой цене, вынуждено будет использовать занятый пар, поля, освобождаемые в сезон посева от предшествующих более ранних культур. И, соответственно, из-за необходимости созревания почвы для посева озимой пшеницы, требующего не менее 20–25 дней со дня вспашки и начала парования полей до дня посева, хозяйство должно ориентироваться на более поздние сроки сева середины сентября. Указанные выше сорта способны успешно зимовать при таких поздних сроках сева и давать довольно высокие урожаи зерна. Следует отметить, что в этом случае посева осенью не поражаются энтомофитами и слабо либо вовсе не поражаются снежной плесенью.

Почва в Сибири бедна азотом, доступным для растений. Поэтому более высокий урожай озимой пшеницы по сравнению с яровой и потребность в высоком качестве урожая требуют применения удобрений на посевах озимой пшеницы. Их дозы, сроки внесения зависят от почв, экономических возможностей конкретного хозяйства, его технической оснащенности. Поэтому разработка сортовой технологии возделывания озимых сортов в разных природных зонах Сибири, разных хозяйствах потребует как проведения специальных исследований на эту тему, так и систематизации уже накопленного опыта, полученного в ряде хозяйств региона.

Первым шагом в решении такой задачи является издание руководства по возделыванию озимых в условиях Западной Сибири, написанного коллективом авторов ГНУ СибНИИРС и ГНУ СибНИИЗиХ Россельхозакадемии (Технология возделывания ..., 2013). Оно систематизирует в основном результаты возделывания озимой пшеницы ранних посевов конца августа в условиях лесостепи Новосибирской области.

Особенно детально рассмотрено применение средств защиты растений, приведен их широкий перечень для различных ситуаций. Но, вероятно, итогом таких исследований должно стать руководство, состоящее из двух частей. Первая из них, по-видимому, должна быть построена по принципу монографии «Мироновские пшеницы» с достаточным количеством конкретных примеров. Вторая часть, написанная в виде развернутого реферата первой части, должна предложить варианты технологии возделывания озимой пшеницы в зависимости от сорта, природной зоны, типа почв, сроков сева, предшественников, величины планируемого урожая, определяющей дозу и способ применения минеральных удобрений. Эффективность каждого такого варианта технологии, судя по всему, должна оцениваться стабильностью по годам сборов урожая, его величиной и качеством получаемого зерна.

При наличии такой информации при посеве будет легче осознанно сделать выбор в пользу конкретных сортов и вписать озимую пшеницу

в свой севооборот. При этом необходимо подчеркнуть, что семеноводство должно вестись на высоком агрофоне, так как в этом случае получаемые семена элиты будут в состоянии реализовать потенциал сорта.

ЛИТЕРАТУРА

- Блажевский В.К. Агротехника озимой пшеницы мироновских сортов // Мироновские пшеницы / Под общ. ред. В.Н. Ремесло. М.: Колос, 1972. С. 127–195.
- Блохин Н.Т. Качество зерна мироновских пшениц и пути его улучшения // Мироновские пшеницы / Под общ. ред. В.Н. Ремесло. М.: Колос, 1972. С. 196–250.
- Говорун М.А., Манжос Д.М. Семеноводство // Мироновские пшеницы / Под общ. ред. В.Н. Ремесло. М.: Колос, 1972. С. 271–286.
- Манжос Д.М. Биологические и хозяйственно ценные свойства семян // Мироновские пшеницы / Под общ. ред. В.Н. Ремесло. М.: Колос, 1972. С. 251–270.
- Ремесло В.Н., Говорун М.А. Сорт и урожай // Мироновские пшеницы / Под общ. ред. В.Н. Ремесло. М.: Колос, 1972. С. 5–12.
- Технология возделывания озимых зерновых культур в Западной Сибири. Руководство. Новосибирск: ГНУ СибНИИРС, 2013. 29 с.

AGRICULTURAL AND BREEDING PREREQUISITES FOR SUCCESSFUL INTRODUCTION OF MIRONOVKA WINTER WHEAT VARIETIES IN THE USSR AS THE BASE FOR INTRODUCING NEW VARIETIES RESISTANT TO SIBERIAN WINTER

V.E. Kozlov

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

Summary

A broad gene pool has been obtained at the Institute of Cytology and Genetics on the base of the comprehensive study of frost resistance in wheat supervised by Dr. V.M. Chekurov. The wheat accessions demonstrate both great manifestation of winter resistance and other commercial traits characteristic of cultivars. Therefore, many accessions have been certified as cultivars. They are grown in Siberia. As shown by the experience of the Mironovka Institute of wheat selection and seed production in the USSR, the large scale of the use of varieties raised at the Institute was determined by their winter resistance and the development of variety-oriented technologies, depending on the climatic belt, soil, rotation of crops, watering mode, etc. In our opinion, extensive growing of the new varieties is greatly hampered by the absence of such technologies for Siberia. Recommendations developed by scientists of the Mironovka Institute and the need for their adaptation to Siberian regions are discussed.

Key words: winter wheat, winter resistance, variety-oriented technology.

УДК 577.152.277:633.71

РОЛЬ АУТО- И ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ РИБОНУКЛЕАЗ СЕМЕЙСТВА III В МЕХАНИЗМАХ УСТОЙЧИВОСТИ К ПАТОГЕНАМ И РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

© 2013 г. И.В. Жирнов^{1,2}, Е.А. Трифонова¹, А.В. Кочетов^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия;

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия, e-mail: zh_lk@list.ru

Поступила в редакцию 27 августа 2013 г. Принята к публикации 2 сентября 2013 г.

В статье рассмотрены современные представления о биологической роли растительных рибонуклеаз семейства III (DCL-рибонуклеаз), и в частности об их взаимосвязи с молекулярными механизмами защиты от фитопатогенов.

Ключевые слова: генная инженерия, рибонуклеазы семейства III, растения, патогены, генетический сайленсинг.

ВВЕДЕНИЕ

Семейство РНКазы III включает в себя группу эндорибонуклеаз, катализирующих гидролиз 3',5'-фосфодиэфирных связей двуцепочечных форм РНК (дцРНК). Рибонуклеазы данного семейства представлены у широкого спектра организмов: вирусов, бактерий, грибов, растений и животных (MacRae, Doudna, 2007; Mukherjee *et al.*, 2012).

Согласно данным рентгеноструктурного анализа, молекулы белков семейства РНКазы III образованы одной полипептидной цепью, которая содержит от ~ 200 до ~ 2 тыс. аминокислотных остатков и характеризуется обязательным наличием двух глобулярных доменов: мотива связывания с дцРНК (dsRNA-binding domain, dsRBD) и каталитического домена РНКазы III (RNase III). В соответствии с наличием указанной каталитической активности различные представители семейства РНКазы III участвуют в процессинге предшественников рибосомной РНК, малых ядерных и ядрышковых РНК, а также играют ключевую роль в генетическом сайленсинге, представляющем собой процесс

инактивации (репрессии, замолкания) экспрессии генов и/или трансгенов, характерный для многих эукариот (MacRae, Doudna, 2007; Bozorov *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2012).

Инактивация экспрессии трансгена/гена может осуществляться как на транскрипционном (transcriptional gene silencing, TGS), так и на посттранскрипционном (posttranscriptional gene silencing, PTGS) уровнях. Во всех случаях, за исключением некоторых вариантов TGS, процесс генетического сайленсинга опосредован образованием различных типов малых РНК, отличающихся по биогенезу. У высших растений выделены следующие основные классы малых РНК: микроРНК (microRNAs, miRNAs, или miРНК); малые интерферирующие РНК (small interfering RNAs, siRNAs, или siРНК); трансдействующие siРНК (trans-acting siRNAs, ta-siRNAs, или ta-siРНК); siРНК, ассоциированные с повторами (repeat-associated siRNAs, ra-siRNAs, или ra-siРНК). Ферментами, связанными с биогенезом данных малых РНК в процессах TGS/PTGS, являются DCL-рибонуклеазы (Dicer-like dsRNases, DCLs), характерные для высших растений и представляющие собой

гомологи белка Dicer млекопитающих (Dunoyer *et al.*, 2005; Mlotshwa *et al.*, 2008; Bozorov *et al.*, 2012; Udriste *et al.*, 2012).

Показано участие различных рибонуклеаз DCLs в процессах, связанных с защитой клеточного генома от транспозонов, супрессии амплификации вирусов/виридов, регуляции экспрессии собственных генов, репрессии трансгенов (Bozorov *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2012). Некоторые экспериментальные данные дают основание выдвинуть предположение о возможности использования продукции трансгенными растениями гетерологичных рибонуклеаз семейства III для повышения устойчивости к фитопатогенным вирусам/виридам. Так, экспрессия в трансгенных растениях генов гетерологичных про- или эукариотических РНКаз, участвующих в деградации двуцепочечных форм РНК, способствовала повышению устойчивости полученных трансформантов к ряду указанных патогенов (Watanabe *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2001). В то же время было показано (Kreuze *et al.*, 2005), что некоторые вирусные рибонуклеазы, принадлежащие к семейству РНКазы III, могут выступать в роли супрессоров РНК-интерференции (RNA interference, RNAi). В целом применительно к противовирусному иммунитету растений роль рибонуклеаз, деполимеризующих дцРНК, изучена мало, что свидетельствует о необходимости более детального изучения их функций в молекулярных механизмах устойчивости к фитопатогенным вирусам.

Целью данной работы является обобщение имеющейся к настоящему времени информации относительно роли ауто- и гетерологичных рибонуклеаз семейства III в защитных системах высших растений.

DCL-РИБОНУКЛЕАЗЫ

У растений гены, кодирующие DCLs, представлены семейством с различным числом генов среди разных видов. Так, геном *Arabidopsis thaliana* содержит 4 различных гена *DCL*,

Populus trichocarpa – 5, *Oryza sativa* – 6 и *Solanum lycopersicum* – 7 генов (Margis *et al.*, 2006). Функции всех четырех DCLs *A. thaliana* охарактеризованы. DCL1 участвует в биогенезе различных miРНК, которые играют ключевую роль в подавлении экспрессии генов (посредством расщепления транскриптов этих генов или за счет блокирования трансляции мРНК), принимает участие в контроле уровня накопления цитоплазматической мРНК как клеточного, так и вирусного происхождения. DCL2 задействован в процессе индуцируемого вирусами РНК-сайленсинга (гомолог белка DCL2 *A. thaliana* был идентифицирован и у *Nicotiana tabacum*). DCL3 участвует в РНК-направленном метилировании ДНК и гистонов. Функция DCL4 связана с образованием трансдействующих siРНК (trans-acting siRNAs, ta-siRNAs, или ta-siРНК), которые обладают функциональным сходством с miРНК и направляют деградацию в RISC (RNA-induced silencing complex) мРНК-мишени, происходящей из локуса, отличного от такового ta-siРНК. Гены *DCL1*, *DCL2*, *DCL3* и *DCL4* представлены в геноме единственной копией. Мутации в гене *DCL1* оказались летальными для растений – гибель зародышей происходит уже на стадии глобулы, в то время как инактивация генов *DCL2–DCL4* не оказывала существенного влияния на жизнеспособность *A. thaliana* (Henderson *et al.*, 2006; Margis *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009; Bozorov *et al.*, 2012).

В типичном случае рибонуклеаза DCL включает в себя несколько функциональных доменов (рис. 1): N-терминальный домен DE×D/H (предположительно, выполняет ингибиторную функцию, уменьшая скорость гидролиза 3',5'-фосфодиэфирных связей дцРНК), домен с неизвестной функцией DUF283, PAZ-домен (функции описаны ниже), две копии домена РНКазы III и С-терминальный домен, содержащий dsRBD-мотив связывания с дцРНК (Schwarz *et al.*, 2003; Mlotshwa *et al.*, 2008).

Процесс деградации двуцепочечных форм РНК проходит в несколько этапов. Посредством dsRBD-мотива DCL осуществляется начальное

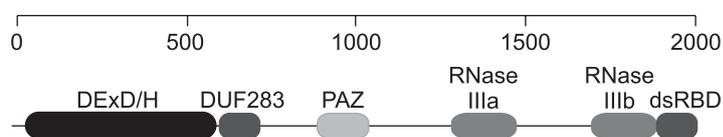


Рис. 1. Доменная структура DCL. Масштабная линейка проградуирована в единицах аминокислотных остатков.

связывание фермента с дцРНК. Домен PAZ обеспечивает специфический контакт с двумя неспаренными 3'-концевыми нуклеотидами дцРНК, образованными в результате первого акта взаимодействия DCL с мишенью (показано, что наличие 3'-концевого одноцепочечного выступа в 2–3 нуклеотида способствует увеличению активности фермента в отношении данного субстрата). На заключительном этапе два домена РНКазы III, взаимодействуя друг с другом и образуя «внутренний димер», катализируют гидролиз 3',5'-фосфодиэфирных связей каждой цепи дцРНК в двух сайтах, отстоящих друг от друга на расстоянии в 2 нуклеотида. В результате описанного процесса деградации мишени происходит образование коротких двуцепочечных фрагментов, называемых малыми РНК (miРНК/siРНК), длиной 21–25 нуклеотидов, с 5'-концевой фосфатной группой и одноцепочечным выступом (оверхенгом) в 2–3 нуклеотида на 3'-конце. Протяженность образующего спиральную структуру неконсервативного района между доменами PAZ и РНКазы III, по-видимому, является основным фактором, определяющим размер образующихся малых дцРНК (Goldbach *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003; Voinnet, 2005; Mlotshwa *et al.*, 2008).

DCL1

РНК-сайленсинг, известный также как пост-транскрипционный сайленсинг генов, представляет собой процесс, который играет ключевую роль в регуляции экспрессии генов многих эукариот. У высших растений важной компонентой PTGS является miРНК-опосредованная регуляция активности генов, осуществляемая с обязательным участием рибонуклеазы DCL1 (Voinnet, 2009).

Класс miРНК включает в себя эндогенные некодирующие РНК, которые играют основополагающую роль в инактивации экспрессии генов или посредством деградации транскриптов этих генов, или за счет прямого блока трансляции мРНК (Llave *et al.*, 2002; Palatnik *et al.*, 2003). Мишенями для miРНК являются гены, контролирующие метаболизм, транспорт ионов, процессы передачи сигналов, стрессовый ответ (Dugas, Bartel, 2004; Sunkar, Zhu, 2004). Значительной частью мишеней являются мРНК,

кодирующие транскрипционные факторы, причем, как правило, одна miРНК регулирует экспрессию нескольких транскрипционных факторов, принадлежащих к одному семейству (Kidner, Martienssen, 2005). Отметим, что мишенями miРНК также оказались мРНК DCL1 и белка AGO1 (см. ниже). Это в свою очередь свидетельствует о существовании механизма обратной связи, посредством которого осуществляется определение miРНК уровня своей собственной продукции (Du, Zamore, 2005).

Гены, кодирующие miРНК растений, расположены в межгенных промежутках и достаточно удалены от белок-кодирующих генов, что указывает на их независимую транскрипцию (Bartel B., Bartel D., 2003; Parizotto *et al.*, 2004). Биогенез miРНК осуществляется в клеточном ядре в несколько стадий. На первом этапе происходит катализируемый РНК-полимеразой II синтез первичных кэпированных и полиаденилированных транскриптов (primary miRNAs, pri-miRNAs, или pri-miРНК), обладающих характерной шпильчатой вторичной структурой. На следующей стадии биогенеза под действием рибонуклеазы DCL1 из pri-miРНК-предшественника (~ 1 тыс. нуклеотидов) осуществляется последовательное образование длинной pre-miРНК и ее более короткой формы (short pre-miРНК), имеющей длину от 64 до 303 нуклеотидов и формирующей будущий 3'-конец зрелой miРНК. На третьем, последнем, этапе биогенеза в результате катализа DCL1 происходит расщепление короткой pre-miРНК по 5'-концу зрелой формы miРНК длиной 20–24 нуклеотида (Bonnet *et al.*, 2006; Vazquez, 2006). Наряду с DCL1 необходимым фактором завершения биогенеза miРНК является активность еще двух локализованных в ядре белков: дцРНК-связывающего белка HYL1 (hyponastic leaves 1) и метилтрансферазы HEN1 (HUA enhancer 1), осуществляющей метилирование по 2'-гидроксильной группе 3'-концевых остатков рибозы (Yu *et al.*, 2005). Интересным представляется факт, что наиболее эффективные вирусные супрессоры RNAi (см. ниже), образуя комплекс с малыми РНК, способны блокировать метилирование (Yu *et al.*, 2006).

Перемещение зрелой miРНК из ядра в цитоплазму у растений осуществляется под контролем белка HASTY (HST), представля-

ющего собой гомолог экспортина-5 (exportin-5) животных (Bollman *et al.*, 2003). В цитоплазме miРНК вступают во взаимодействие с белком AGO1 (семейство Argonaute), обладающим активностью РНКазы Н и являющимся каталитическим элементом мультибелкового комплекса RISC. Конечным результатом описанного взаимодействия является деградация мРНК-мишени (Vaucheret, 2008). Следует отметить, что для растений достоверно известен только один случай трансляционной репрессии – это взаимодействие miРНК *A. thaliana* miR172 и мРНК гена *APETALA2* (Chen, 2004).

DCL2

Геномы большинства фитопатогенных вирусов представлены одноцепочечной РНК, однако в ходе жизненного цикла этих патогенов в составе репликативных интермедиатов происходит формирование двуцепочечной РНК. Помимо этого, образование протяженных дцРНК также может быть обусловлено транскрипцией экспрессируемой трансгеном оцРНК вирусной или растительной РНК-зависимой РНК-полимеразой (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP). Естественной молекулярной составляющей устойчивости, ответственной за селективное распознавание протяженных дцРНК (в частности вирусного и/или вириоидного происхождения) и их последующую деградацию, у высших растений является система RNAi. Индуцируемый вирусами РНК-сайленсинг, таким образом, может рассматриваться как работающая на уровне нуклеиновых кислот и характеризующаяся высокой специфичностью форма иммунной системы (Vazquez, 2006; Mlotshwa *et al.*, 2008).

К настоящему времени общепринятой является модель, в соответствии с которой механизм РНК-сайленсинга можно представить следующим образом. На первом этапе в результате индукции активности рибонуклеазы DCL2 происходит деградация дцРНК, образованной посредством любого из вышеописанных механизмов. Гидролитическое расщепление протяженной двуцепочечной РНК, катализируемое DCL2, в конечном итоге приводит к образованию коротких двуцепочечных фрагментов, называемых siРНК, длиной 21–26 нуклеотидов, с 5'-концевой фосфатной группой и оверхенгом

в 2–3 нуклеотида на 3'-конце (Goldbach *et al.*, 2003; Mlotshwa *et al.*, 2008).

В последующем шаге RNAi за счет активности АТФ-зависимой РНК-геликазы происходит разделение обеих цепей образованных ранее siРНК. Одна из цепей (характеризующаяся меньшей термодинамической стабильностью 5'-конца) остается в составе зрелого комплекса RISC, где осуществляется ее связывание с мРНК-мишенью (Schwarz *et al.*, 2003; Mlotshwa *et al.*, 2008). Белок AGO1, являющийся каталитической компонентой комплекса RISC, проявляет эндонуклеазную активность по отношению к мРНК, комплементарной связанному фрагменту siРНК (Vaucheret, 2008; Wang *et al.*, 2011). Комплементарные участку мРНК-мишени одноцепочечные фрагменты siРНК могут быть использованы в качестве праймеров для растительной RdRP, которая достраивает вторую цепь, используя РНК-мишень как матрицу (эффект ограничен расстоянием ~300–500 нуклеотидов в 5'-направлении от сайта первоначального расщепления). Показано, что триггерами повторного цикла RNAi могут являться только siРНК длиной 22 нуклеотида, в то время как наиболее типичные siРНК, имеющие длину в 21 нуклеотид, не способны к подобной индукции. В ходе осуществляемой рибонуклеазой DCL2 деградации вновь синтезированных дцРНК происходит образование новых siРНК, которые называют вторичными. Таким образом осуществляется амплификация сигнала (Lipardi *et al.*, 2001; Mlotshwa *et al.*, 2008). Вторичные siРНК в дальнейшем могут не только участвовать в прямой деградации мРНК-мишени в составе RISC, но и транспортироваться между клетками по плазмодесмам в качестве сигнальных молекул. Подобный симпластный транспорт является белок-опосредованным (в частности, достоверно идентифицирован белок, избирательно транспортирующий siРНК длиной 25 нуклеотидов) (Yoo *et al.*, 2004).

DCL3

Как уже было отмечено, инактивация экспрессии трансгенов/генов может осуществляться также и на транскрипционном уровне. Известны 3 основных механизма TGS: РНК-опосредованное метилирование ДНК (RNA-

dependent DNA methylation, RdDM), метилирование ДНК, не связанное с участием малых РНК, и модификация хроматина. RdDM, характерным признаком которого является метилирование промотора гена-мишени в области гомологии с *ta*-siРНК, представляет собой наиболее изученный механизм репрессии транскрипции ДНК (Маренкова, Дейнеко, 2010).

Одним из источников появления протяженных дцРНК в данном случае могут быть транскрипты, считываемые РНК-полимеразой II с инвертированных повторов и образующие двуцепочечную структуру по сайтам комплементарности. Другим источником возникновения протяженных дцРНК могут являться высоко- или низкоповторяющиеся метилированные последовательности (включая мобильные элементы), которые транскрибируются ДНК-зависимой РНК-полимеразой IV или ДНК-зависимой РНК-полимеразой V и далее переводятся в двуцепочечную форму в результате катализа уникальной для растений РНК-зависимой РНК-полимеразой RdRP2 или RdRP6 (Baulcombe, 2004; Vazquez, 2006; Маренкова, Дейнеко, 2010). Образование *ta*-siРНК, имеющих размер 24 нуклеотида, осуществляется под действием рибонуклеазы DCL3. В цитоплазме *ta*-siРНК вступает во взаимодействие с комплексом RISC, включающим в себя белки AGO4 или AGO6. На конечном этапе данный эффекторный комплекс направляет специфическое метилирование ДНК-мишени и компактизацию хроматина (Qi *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2007).

DCL4

У мхов и покрытосеменных растений был идентифицирован еще один класс малых РНК, получивших название трансдействующих siРНК. Класс *ta*-siРНК включает в себя эндогенные некодирующие РНК, которые обладают функциональным сходством с miРНК и направляют деграцию в RISC мРНК-мишени, происходящей из локуса, отличного от такового *ta*-siРНК (Allen *et al.*, 2005; Talmor-Neiman *et al.*, 2006).

Найдено 5 генов, в результате транскрипции которых образуются полиаденилированные и кэпированные предшественники *ta*-siРНК (*pre*-*ta*-siРНК): TAS1a, TAS1b, TAS1c, TAS2

и TAS3 (Yoshikawa *et al.*, 2005). *Pre*-*ta*-siРНК TAS1a, TAS1b, TAS1c и TAS2 не консервативны (найжены только у *A. thaliana*). В противоположность этому, TAS3 РНК обнаружена у многих цветковых растений, хотя сходство предполагаемых гомологов сохраняется только в пределах фрагмента, дающего начало (см. ниже) зрелой форме *ta*-siРНК (Vazquez *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2012).

Все TAS-РНК служат мишенями miРНК, которые направляют следующий этап биогенеза *ta*-siРНК: TAS1a, TAS1b, TAS1c и TAS2-РНК взаимодействуют с miРНК miR173, а TAS3 РНК – с miR390. Результатом подобного взаимодействия является гидролитическое расщепление TAS РНК, которое приводит к образованию более короткой формы *ta*-siРНК-предшественника, представляющей собой 5'-концевой (в случае TAS3) или 3'-концевой (для TAS1a, TAS1b, TAS1c и TAS2) фрагменты первичного транскрипта. Образовавшиеся на этом этапе одноцепочечные фрагменты далее переводятся в двуцепочечную форму РНК-зависимой РНК-полимеразой RdRP6. На последнем этапе биогенеза в результате катализа DCL4 происходит расщепление этих дцРНК-фрагментов с образованием зрелой формы *ta*-siРНК длиной 21 нуклеотид (Allen *et al.*, 2005; Yoshikawa *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2012).

Мишенью продуктов процессинга TAS3-РНК служат мРНК транскрипционных факторов ARF2, ARF3 и ARF4 (auxin response factors). Мишенями остальных *ta*-siРНК являются несколько генов с неидентифицированными к настоящему времени функциями (Vazquez *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2012).

СУПРЕССОРЫ РНК-САЙЛЕНСИНГА

Наиболее эффективной стратегией, выработанной фитопатогенными вирусами в ходе эволюции и позволяющей им преодолевать действие RNAi, является блокирование генетического сайленсинга посредством специфических белков-супрессоров. Большинство вирусных белков, известных в настоящее время как супрессоры РНК-сайленсинга, изначально были идентифицированы как факторы патогенности, так как их экспрессия во многом определяла образование и выраженность симптомов

вирусной инфекции (деформацию и мозаику листьев, некрозы, карликовость, замедление темпов роста и пр.). В большинстве случаев экспрессия указанной группы белков не является обязательным фактором для осуществления репликации генома инфекционного агента, однако вирусные супрессоры RNAi являются необходимыми для эффективной аккумуляции вирионов в тканях растения и их дальнейшей диссеминации (Scholthof, 2005; Li, Ding, 2006; Scholthof, 2007).

Одним из наиболее известных супрессоров РНК-сайленсинга является протеаза HC-Pro (helper component proteinase), найденная у представителей семейства Potyviridae, в частности вируса картофеля Y (potato virus Y, PVY). Протеаза HC-Pro является классическим примером вирусного мультифункционального белка, задействованного в многочисленных процессах: репликации геномной РНК, протеолитическом процессинге продукта трансляции полицистронной вирусной РНК, межклеточном транспорте вирионов, – однако наиболее важной функцией HC-Pro является участие в супрессии RNAi (Ebhardt *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2006; Scholthof, 2007). Механизм действия HC-Pro до конца не изучен, однако на модели *A. thaliana* было показано, что экспрессия данного белка приводит к дефектам в процессах роста и дифференцировки растений, что, предположительно, может быть связано с ингибированием miРНК-ассоциированного гидролиза мРНК транскрипционных факторов. Кроме того, супрессия РНК-сайленсинга протеазой HC-Pro может быть обусловлена связыванием образующихся siРНК, а также снижением их стабильности, так как было обнаружено, что HC-Pro препятствует функциональному метилированию siРНК и miРНК (Lakatos *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2006). Довольно интересным также представляется факт взаимодействия протеазы HC-Pro с белком rgsCaM, который является эндогенным супрессором RNAi в растениях (Shiboleth *et al.*, 2007).

Белок P19, являющийся важным фактором патогенности у представителей семейства Tombusviridae, обладает максимальным сродством к siРНК и miРНК длиной в 21 нуклеотид независимо от наличия 3'-концевых оверхенгов (Scholthof, 2006; Hsieh *et al.*, 2009). Эффектив-

ность связывания белком P19 siРНК/miРНК значительно снижается при увеличении длины указанных малых РНК даже на один нуклеотид. Как и в случае с HC-Pro, было показано, что P19 препятствует функциональному метилированию siРНК и miРНК, снижая, таким образом, их стабильность (Omarov *et al.*, 2007; Pantaleo *et al.*, 2007).

В отличие от большинства известных вирусных супрессоров RNAi, транспортный белок 2b (обнаружен у представителей семейства Cucumoviridae) непосредственно взаимодействует *in vitro* и *in vivo* с AGO1, который обладает слайсерной активностью (slicer activity) и представляет собой каталитический центр RISC (Zhang *et al.*, 2006). Показано, что результатом подобного взаимодействия между 2b и AGO1 является специфическое ингибирование ферментативного гидролиза мРНК-мишени. Кроме того, на модели *A. thaliana* было продемонстрировано сопряженное с экспрессией 2b существенное уменьшение пула всех типов siРНК (Diaz-Pendon *et al.*, 2007; Goto *et al.*, 2007).

Интересная особенность механизма супрессии РНК-сайленсинга была показана для капсидного белка P38 вируса морщинистости турнепса (turnip crinkle virus, TVC), принадлежащего к семейству Carmoviridae. В отличие от описанных выше вирусных супрессоров HC-Pro, P19 или 2b, белок P38 TVC обладает способностью связывания двуцепочечных форм РНК вне зависимости от размера молекул (Qu *et al.*, 2003). Следствием данной особенности P38 может являться уменьшение доступности дцРНК-субстрата для DCL-рибонуклеаз, что, в свою очередь, ингибировало бы продукцию siРНК. Интересно, что хотя подобная зависимость была продемонстрирована для DCL4 *A. thaliana*, белок P38 TVC не оказывает ингибирующего воздействия на активность DCL2 (Thomas *et al.*, 2003; Merai *et al.*, 2006).

Супрессоры RNAi уже идентифицированы у представителей по меньшей мере 15 семейств ДНК- и РНК-содержащих вирусов растений. Обнаружение вирусных супрессоров RNAi в целом согласуется с идеей о том, что РНК-сайленсинг скорее является естественным механизмом противовирусной защиты растений, чем исключительно способом контроля экспрессии собственных генов. Показано, что супрессия

РНК-сайленсинга осуществляется по различным механизмам, однако большая часть изученных вирусных супрессоров RNAi оказывает свое действие, связываясь с двуцепочечными формами РНК. Было высказано предположение, что связывание дцРНК может быть общей стратегией супрессии РНК-сайленсинга, которую используют фитопатогенные вирусы. Так, было показано, что геном вируса хлоротичной карликовости батата (sweet potato chlorotic stunt virus, SPCSV) содержит ген РНКазы III, которая является синергистом белка-супрессора РНК-сайленсинга P22 SPCSV. Гомологи данной РНКазы III так же, как и примеры использования двух кооперативно действующих белков для супрессии RNAi, у других РНК-содержащих вирусов (в том числе и внутри семейства Closteroviridae, к которому принадлежит SPCSV), найдены не были. Интересно, что гомологи РНКазы III SPCSV были обнаружены у *A. thaliana* и *O. sativa*, однако их функции в растениях остаются неизвестными (Kreuze *et al.*, 2005; Cuellar *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2012).

ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РИБОНУКЛЕАЗ СЕМЕЙСТВА III

Геномы большинства фитопатогенных вирусов представлены оцРНК, однако в ходе их жизненного цикла, а именно на этапе репликации, происходит формирование дцРНК. Предполагается, что знание механизма экспрессии в трансгенных растениях генов гетерологичных РНКаз, способных к гидролизу подобных репликативных дцРНК-интермедиатов, может лечь в основу разработки перспективной стратегии создания вирусоустойчивых форм растений (Watanabe *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2001).

Было показано, что трансгенные растения *N. tabacum*, экспрессирующие ген *PAC1 Schizosaccharomyces pombe* (кодирует внутриклеточную рибонуклеазу, катализирующую гидролиз двуцепочечных форм РНК), демонстрировали устойчивость к нескольким инфекционным агентам: PVY, вирусу мозаики огурца (cucumber mosaic virus, CMV), а также вирусу мозаики томатов (tomato mosaic virus, ToMV). Во всех указанных случаях устойчивость трансформантов выражалась в задержке развития

симптомов вирусного поражения (Watanabe *et al.*, 1995). В дальнейших исследованиях было продемонстрировано, что продукция трансгенными растениями РНКазы PAC1 также способна индуцировать формирование устойчивости к ряду инфекций вирусной этиологии. Было показано, что для трансформантов *Solanum tuberosum*, экспрессирующих ген *PAC1*, в случае заражения виридом веретеновидности клубней картофеля (potato spindle tuber viroid, PSTVd) были характерны супрессия инфекции и снижение накопления соответствующей инфекционной РНК в тканях (Sano *et al.*, 1997). Продукция PAC1 трансгенными растениями *Dendranthema grandiflorum* способствовала развитию повышенной устойчивости к вириду карликовости хризантем (chrysanthemum stunt viroid, CSVd) и вирусу пятнистого увядания томатов (tomato spotted wilt virus, TSWV) (Ogawa *et al.*, 2005).

Отметим, что экспрессия в трансгенных растениях генов, кодирующих гетерологичные рибонуклеазы, может быть сопряжена с рядом фенотипических отклонений, обусловленных выраженным цитотоксическим действием ферментов данной группы. Так, трансгенные растения *N. tabacum*, экспрессирующие мутантную форму гена *rnc Escherichia coli*, кодирующего внутриклеточную РНКазу III, оказались устойчивыми к вирусу кольцевой пятнистости перца (pepper ringspot virus, PerRSV), вирусу некротической пятнистости бальзамина (impatiens necrotic spot virus, INSV), вирусу гравировки табака (tobacco etch virus, TEV), вирусу мозаики люцерны (alfalfa mosaic virus, AMV), вирусу табачной мозаики (tobacco mosaic virus, TMV) и TSWV. Трансформанты *Triticum aestivum*, экспрессирующие ту же мутантную форму *rnc*, демонстрировали устойчивость к инфекции, вызываемой вирусом штриховатой мозаики ячменя (barley stripe mosaic virus, BSMV). Продукт мутантной формы гена имел замену Glu₃₉ → Lys₃₉ и не обладал соответствующей каталитической активностью при сохраненной способности к связыванию дцРНК. В эксперименте была показана одинаковая эффективность при использовании как нормальной, так и мутантной форм *rnc*, однако трансформанты *N. tabacum* и *T. aestivum*, экспрессирующие трансген дикого типа, характеризовались задержкой в развитии.

Помимо этого, было отмечено, что в случае использования конструкции, несущей нормальную форму трансгена, имело место существенное снижение эффективности агробактериальной трансформации растений (Langenberg *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2001).

Таким образом, к настоящему времени доказано участие различных рибонуклеаз семейства III как в индукции (DCL-рибонуклеазы), так и в супрессии (РНКза III SPCSV) РНК-сайленсинга. Этот факт, а также наличие данных о повышенной вирусоустойчивости трансгенных растений, экспрессирующих гетерологичные белки этого семейства, свидетельствуют о необходимости более детального изучения роли ауто- и гетерологичных рибонуклеаз семейства III в защитных системах высших растений.

Работа поддержана грантом РФФИ № 12-04-01478-а, Интеграционным проектом СО РАН – ДВО РАН и программой РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития»

ЛИТЕРАТУРА

- Маренкова Т.В., Дейнеко Е.В. Инактивирование генов у растений на уровне транскрипции // Генетика. 2010. Т. 46. С. 581–592.
- Allen E., Xie Z., Gustafson A.M., Carrington J.C. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants // Cell. 2005. V. 121. P. 207–221.
- Bartel B., Bartel D. MicroRNAs: at the root of plant development? // Plant Physiol. 2003. V. 132. P. 709–717.
- Baulcombe D. RNA silencing in plants // Nature. 2004. V. 431. P. 356–363.
- Bollman K.M., Aukerman M.J., Park M.Y. *et al.* HASTY, the *Arabidopsis* ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis // Development. 2003. V. 130. P. 1493–1504.
- Bonnet E., van de Peer Y., Rouze P. The small RNA world of plants // New Phytol. 2006. V. 171. P. 451–468.
- Bozorov T.A., Pandey S.P., Dinh S.T. *et al.* DICER-like proteins and their role in plant-herbivore interactions in *Nicotiana attenuata* // J. Integ. Plant Biol. 2012. V. 54. P. 189–206.
- Chen X. A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development // Science. 2004. V. 303. P. 2022–2025.
- Cuellar W.J., Tairo F., Kreuzer J.F., Valkonen J.P.T. Analysis of gene content in sweet potato chlorotic stunt virus RNA1 reveals the presence of the p22 RNA silencing suppressor in only a few isolates: implications for viral evolution and synergism // J. General Virology. 2008. V. 89. P. 573–582.
- Diaz-Pendon J.A., Li F., Li W.X., Ding S.W. Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in *Arabidopsis* is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs // Plant Cell. 2007. V. 19. P. 2053–2063.
- Du T., Zamore P.D. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA // Development. 2005. V. 132. P. 4645–4652.
- Dugas D., Bartel B. microRNA regulation of gene expression in plants // Curr. Opin. Plant Biol. 2004. V. 7. P. 512–520.
- Dunoyer P., Himber C., Voinnet O. DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal // Nature Genet. 2005. V. 37. P. 1356–1360.
- Ebhardt H.A., Thi E.P., Wang M.B., Unrau P.J. Extensive 3'-modification of plant small RNAs is modulated by helper component-proteinase expression // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 13398–13403.
- Goldbach R., Bucher E., Prins M. Resistance mechanisms to plants viruses: an overview // Virus Res. 2003. V. 92. P. 207–212.
- Goto K., Kobori T., Kosaka Y. *et al.* Characterization of silencing suppressor 2b of Cucumber mosaic virus based on examination of its small RNA-binding abilities // Plant Cell Physiol. 2007. V. 48. P. 1050–1060.
- Henderson I.R., Zhang X., Lu C. *et al.* Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning // Nature Genet. 2006. V. 38. P. 721–725.
- Hsieh Y.C., Omarov R.T., Scholthof H.B. Diverse and newly recognized effects associated with short interfering RNA binding site modifications on the tomato bushy stunt virus p19 silencing suppressor // J. Virology. 2009. V. 83. P. 2188–2200.
- Kidner C.A., Martienssen R.A. The developmental role of microRNA in plants // Curr. Opin. Plant Biol. 2005. V. 8. P. 38–44.
- Kreuzer J. F., Savenkov E. I., Cuellar W. *et al.* Viral class 1 RNase III involved in suppression of RNA silencing // J. Virology. 2005. V. 11. P. 7227–7238.
- Lakatos L., Csorba T., Pantaleo V. *et al.* Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors // EMBO J. 2006. V. 25. P. 2768–2780.
- Langenberg W.G., Zhang L., Court D.L., *et al.* Transgenic tobacco plants expressing the bacterial *rnc* gene resist virus infection // Mol. Breeding. 1997. V. 3. P. 391–399.
- Li F., Ding S.W. Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity // Annu. Rev. Microbiol. 2006. V. 60. P. 503–531.
- Lin J., Chun H.W., Yi L. Viral suppression of RNA silencing // Sci. China, Life Sciences. 2012. V. 55. P. 109–118.
- Lipardi C., Wei Q., Paterson B.M. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs // Cell. 2001. V. 107. P. 297–307.
- Liu Q., Feng Y., Zhu Z. Dicer-like (DCL) proteins in plants // Funct. Integr. Genomics. 2009. V. 9. P. 277–286.
- Llave C., Xie Z., Kasschau K., Carrington J. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis*

- miRNA // *Science*. 2002. V. 297. P. 2053–2056.
- MacRae I.J., Doudna J.A. Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2007. V. 17. P. 1–8.
- Margis R., Fusaro A.F., Smith N.A. *et al.* The evolution and diversification of Dicers in plants // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. P. 2442–2450.
- Merai Z., Kerenyi Z., Kertesz S. *et al.* Double-stranded RNA binding could be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing // *J. Virology*. 2006. V. 80. P. 5747–5756.
- Mlotshwa S., Pruss G.J., Vance V. Small RNAs in viral infection and host defense // *Trends Plant Sci.* 2008. V. 13. P. 375–382.
- Mukherjee K., Campos H., Kolaczowski B. Evolution of animal and plant Dicers: early parallel duplications and recurrent adaptation of antiviral RNA binding in plants // *Mol. Biol. Evol.* 2012. V. 30. P. 627–641.
- Ogawa T., Toguri T., Kudoh H. *et al.* Double-stranded RNA-specific ribonuclease confers tolerance against chrysanthemum stunt viroid and tomato spotted wilt virus in transgenic chrysanthemum plants // *Breeding Sci.* 2005. V. 55. P. 49–56.
- Omarov R., Ciomperlik J., Scholthof H.B. RNAi-associated ssRNA-specific ribonucleases in Tombusvirus P19 mutant-infected plants and evidence for a discrete siRNA-containing effector complex // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. P. 1714–1719.
- Palatnik J.F., Allen E., Wu X. *et al.* Control of leaf morphogenesis by microRNAs // *Nature*. 2003. V. 425. P. 257–263.
- Pantaleo V., Szittya G., Burgyan J. Molecular bases of viral RNA targeting by viral siRNA programmed RISC // *J. Virology*. 2007. V. 81. P. 3797–3806.
- Parizotto E., Dunoyer P., Rahm N. *et al.* *In vivo* investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA // *Genes Dev.* 2004. V. 18. P. 2237–2242.
- Qi Y., He X., Wang X.J. *et al.* Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation // *Nature*. 2006. V. 443. P. 1008–1012.
- Qu F., Ren T., Morris T.J. The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step // *J. Virology*. 2003. V. 77. P. 511–522.
- Sano T., Nagayama A., Ogawa T. *et al.* Transgenic potato expressing a double-stranded RNA-specific ribonuclease is resistant to potato spindle tuber viroid // *Nature Biotechnol.* 1997. V. 15. P. 1290–1294.
- Scholthof H.B. Plant virus transport: motions of functional equivalence // *Trends Plant Sci.* 2005. V. 10. P. 376–382.
- Scholthof H.B. Tombusvirus-encoded P19: from irrelevance to elegance // *Nat. Rev. Microbiol.* 2006. V. 4. P. 405–411.
- Scholthof H.B. Heterologous expression of viral RNAi suppressors: RISC management // *Plant Physiol.* 2007. V. 145. P. 1110–1117.
- Schwarz D.S., Hutvagner G., Du T. *et al.* Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex // *Cell*. 2003. V. 115. P. 199–208.
- Shibolet Y.M., Haronsky E., Leibman D. *et al.* The conserved FRNK box in plant viral suppressor of gene silencing HC-Pro is required for small RNA binding and mediates symptom development // *J. Virology*. 2007. V. 81. P. 13135–13148.
- Sunkar R., Zhu J. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2004. V. 16. P. 2001–2019.
- Talmor-Neiman M., Stav R., Klipcan L. *et al.* Identification of trans-acting siRNAs in moss and an RNA-dependent RNA polymerase required for their biogenesis // *Plant J.* 2006. V. 48. P. 511–521.
- Thomas C.L., Leh V., Lederer C., Maule A.J. Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana* // *Virology*. 2003. V. 306. P. 33–41.
- Udriste A.A., Stan V., Radu G.L. *et al.* Identification of a dicer homologue gene (DCL2) in *Nicotiana tabacum* // *Plant Biol.* 2012. V. 14. P. 980–986.
- Vaucheret H. Plant ARGONAUTES // *Trends Plant Sci.* 2008. V. 13. P. 350–357.
- Vazquez F. *Arabidopsis* endogenous small RNAs: highways and byways // *Trends Plant Sci.* 2006. V. 11. P. 460–468.
- Vazquez F., Vaucheret H., Rajagopalan R. *et al.* Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs // *Mol. Cell*. 2004. V. 16. P. 69–79.
- Voinnet O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections // *Nat. Rev. Genet.* 2005. V. 6. P. 206–220.
- Voinnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs // *Cell*. 2009. V. 136. P. 669–687.
- Wang X.B., Jovel J., Udornporn P. *et al.* The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell*. 2011. V. 23. P. 1625–1638.
- Watanabe Y., Ogawa T., Takahashi H. *et al.* Resistance against multiple plant viruses in plants mediated by a double stranded-RNA specific ribonuclease // *FEBS Lett.* 1995. V. 372. P. 165–168.
- Williams L., Carles C.C., Osmont K.S., Fletcher J.C. A database analysis method identifies an endogenous trans-acting short-interfering RNA that targets the *Arabidopsis* ARF2, ARF3, and ARF4 genes // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 9703–9708.
- Yoo B.C., Kragler F., Varkonyi-Gasic E. *et al.* A systemic small RNA signaling system in plants // *Plant Cell*. 2004. V. 16. P. 1979–2000.
- Yoshikawa M., Peragine A., Park M.Y., Poethig R.S. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis* // *Genes Dev.* 2005. V. 19. P. 2164–2175.
- Yu B., Chapman E.J., Yang Z. *et al.* Transgenically expressed viral RNA silencing suppressors interfere with microRNA methylation in *Arabidopsis* // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. P. 3117–3120.
- Yu B., Yang Z., Li J., Minakhina S. *et al.* Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis // *Science*. 2005. V. 307. P. 932–935.
- Zhang C., Ng D.W., Lu J., Chen Z.J. Roles of target site location and sequence complementarity in trans-acting siRNA formation in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2012. V. 69. P. 217–226.

- Zhang L.Y., French R., Langenberg W.G. Accumulation of barley stripe mosaic virus is significantly reduced in transgenic wheat plants expressing a bacterial ribonuclease // *Transgenic Res.* 2001. V. 10. P. 13–19.
- Zhang X., Yuan Y. R., Pei Y. *et al.* Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense // *Genes Dev.* 2006. V. 20. P. 3255–3268.
- Zheng X., Zhu J., Kapoor A., Zhu J.K. Role of *Arabidopsis* AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing // *EMBO J.* 2007. V. 26. P. 1691–1701.

ROLE OF AUTO- AND HETEROLOGOUS RIBONUCLEASE III FAMILY ENZYMES IN THE RESISTANCE TO PATHOGENS AND REGULATION OF GENE EXPRESSION IN HIGHER PLANTS

I.V. Zhirnov^{1,2}, E.A. Trifonova¹, A.V. Kochetov^{1,2}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia;

² Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia, e-mail: zh_ik@list.ru

Summary

The current view on the biological role of ribonuclease III family plant enzymes (Dicer-like dsRNAses) is considered. Emphasis is placed on their role in molecular mechanisms conferring resistance to pathogens.

Key words: genetic engineering, ribonuclease III family enzymes, plants, pathogens, gene silencing.

КЛАССИКИ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ГЕНЕТИКИ В ЗЕРКАЛЕ МИРОВОЙ СТАТИСТИКИ ЦИТИРУЕМОСТИ

© 2013 г. **И.А. Захаров-Гезехус**

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Санкт-Петербург, Россия,
e-mail: zakharov@vigg.ru

Поступила в редакцию 5 июля 2013 г. Принята к публикации 17 августа 2013 г.

При всей дискуссионности использования цитируемости публикаций как критерия эффективности работы научного сотрудника нельзя отрицать полезности этого показателя для определения вклада ученого в мировую науку, его признания и известности его трудов. Имея это в виду, я попытался определить цитируемость наиболее известных отечественных генетиков – основоположников генетики в нашей стране: Н.К. Кольцова, Ю.А. Филипченко, Н.И. Вавилова, С.С. Четверикова и А.С. Серебровского (годы их рождения – 1872–1892) и, можно сказать, следующего поколения ученых – Г.Д. Карпеченко, Н.В. Тимофеева-Ресовского, Н.П. Дубинина, Б.Л. Астаурова, И.А. Рапопорта, В.А. Струнникова и Д.К. Беляева (годы рождения – 1899–1917; кроме двух первых все члены Академии наук СССР). Для сравнения мною взяты данные, относящиеся также к нашему соотечественнику, работавшему в США, Ф.Г. Добржанскому, а также автору основополагающей в биологии публикации Г. Менделю. Ниже для большинства авторов приведены сведения, относящиеся к 3–4 наиболее цитируемым публикациям. Представленные здесь данные заимствованы из базы Google Scholar.

Примечательно, что по цитируемости Н.И. Вавилов превосходит Ф.Г. Добржанского. Из генетиков следующего поколения наиболее цитируемыми оказываются Д.К. Беляев и рано ушедший из жизни (расстрелянный) Г.Д. Карпеченко. Остальные, даже работавший за рубежом и публиковавшийся в зарубежных изданиях Н.В. Тимофеев-Ресовский, намного

им уступают. Труды создателей ленинградской и московской школ генетики – Ю.А. Филипченко и Н.К. Кольцова – практически не цитируются в современной зарубежной литературе, что, разумеется, не умаляет их важную роль в истории отечественной науки.

Г. Мендель

Mendel G. Versuche über Pflanzenhybriden // Verhandlungen des naturforschenden ..., 1866. **Цитируется: 1377.**

Н.И. Вавилов

Vavilov N.I., Freier F. Studies on the origin of cultivated plants. Acme Agency, Buenos Aires. 1951.

Цитируется: 804.

Vavilov N.I. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants // Chronica Botanica. 1950. **Цитируется: 727**

Vavilov N.I. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants // Soil Science. 1951. V. 72. Issue 6. **Цитируется: 689.**

Vavilov N.I. The law of homologous series in variation // Journal of Genetics. 1922. **Цитируется: 348.**

Ф.Г. Добржанский

Dobzhansky T. Speciation as a stage in evolutionary divergence // American Naturalist. 1940.

Цитируется: 576.

Dobzhansky T.H. Studies on hybrid sterility. II. Localization of sterility factors in *Drosophila pseudoobscura* hybrids // Genetics. 1936. **Цитируется: 397.**

Dobzhansky T., Wright S. Genetics of natural populations. X. Dispersion rates in *Drosophila pseudoobscura* // Genetics. 1943. **Цитируется: 269.**

Д.К. Беляев

Belyaev D.K. Destabilizing selection as a factor in domestication // Journal of Heredity. 1979. **Цитируется: 294.**

Belyaev D.K. Domestication of animals // Science Journal. 1969. **Цитируется: 83.**

Belyaev D.K., Ruvinsky A.O., Trut L.N. Inherited activation-inactivation of the star gene in foxes. Its bearing on the problem of domestication // Journal of Heredity. 1981. **Цитируется: 67.**

Г.Д. Карпеченко

Karpechenko G.D. Polyploid hybrids of *Raphanus sativus* L. × *Brassica oleracea* L. // Molecular and General Genetics. 1928. **Цитируется: 206.**

Karpechenko G.D. The production of polyploid gametes in hybrids // Hereditas. 1927. **Цитируется: 154.**

Karpechenko G.D. Hybrids of *Raphanus sativus* L. × ♂ *Brassica oleracea* L. // Journal of Genetics. 1924. **Цитируется: 73.**

Н.В. Тимофеев-Ресовский

Timoféeff-Ressovsky N.W., Zimmer K.G. Das Trefferprinzip in der Biologie // Hirzel. 1947. **Цитируется: 124.**

Timoféeff-Ressovsky N.W. Experimentelle Mutationforschung in der Vererbungslehre: Beeinflussung der erbanlagen durch Strahlung und andere Faktoren // Theodor Steinkopff Verlag. 1937. **Цитируется: 92.**

Timoféeff-Ressovsky N.W. Mutations and geographical variation // The New Systematics. 1940. **Цитируется: 88.**

Timoféeff-Ressovsky N.W. Zur analyse des polymorphismus bei *Adalia bipunctata* L. // Biol. Zbl. 1940. **Цитируется: 73.**

С.С. Четвериков

Chetverikov S.S., Barker M., Lerner I.M. On certain aspects of the evolutionary process from the standpoint of modern genetics // Proceedings of the American Philosophical Society. 1961. **Цитируется: 101.**

Chetverikov S.S. O nekotorych momentach evolyutsionnogo processa s tochki zrenija sovremennoj

genetiki // Zurnal Eksperimentalnoj Biologii. 1926. **Цитируется: 22.**

Chetverikov S.S. Some moments of the evolutionary process from the viewpoint of modern genetics // Byul. Mosk. O-va Ispyt. Prir. Otd. Biol. 1965. **Цитируется: 11.**

И.А. Рапопорт

Rapoport I.A. Carbonyl compounds and the chemical mechanism of mutations // Dokl. Akad. Nauk SSSR. 1946. **Цитируется: 98.**

Khokhlov A.S., Tovarova I.I., Borisova L.N., Pliner S.A., Schevehenko L.A., Kornitskaya E.Y., Ivkina N.S., Rapoport I.A. A-factor responsible for the biosynthesis of streptomycin by a mutant strain of *Actinomyces streptomycini* // Dokl. Akad. Nauk SSSR. 1967. **Цитируется: 95.**

Rapoport I.A. Action of ethyleneoxide glycides and glycols on genetic mutations // Dokl. Akad. Nauk SSSR. 1948. **Цитируется: 31.**

А.С. Серебровский

Serebrovsky A.S. A general scheme for the origin of mutations // The American Naturalist. 1929. **Цитируется: 76.**

Serebrovsky A.S. Crossing-over involving three sex-linked genes in chickens // American Naturalist. 1922. **Цитируется: 44.**

Serebrovsky A.S. «Somatic segregation» in domestic fowl // Journal of Genetics. 1925. **Цитируется: 32.**

Serebrovsky A.S. Genes scute and achaete in *Drosophila melanogaster* and a hypothesis of gene divergency // CR Acad. Sci. URSS. 1938. **Цитируется: 24.**

Н.П. Дубинин

Dubin N.P. On lethal mutations in natural populations // Genetics. 1946. **Цитируется: 75.**

Dubin N.P., Tiniakov G.G. Seasonal cycles and the concentration of inversions in populations of *Drosophila funebris* // The American Naturalist. 1945. **Цитируется: 58.**

Dubin N.P. Problems of radiation genetics. 1964. **Цитируется: 55.**

Dubin N.P., Sidoroff B.N. Relation between the effect of a gene and its position in the system // The American Naturalist. 1934. **Цитируется: 46.**

Б.Л. Астауров

Astaurov B.L. Experimental alterations of the developmental cytogenetic mechanisms in mulberry silkworms: artificial parthenogenesis, polyploidy, gynogenesis // *Advances in Morphogenesis*. 1967.

Цитируется: 74.

Astaurov B.L. Experimental polyploidy in animals // *Annual Review of Genetics*. 1969. **Цитируется: 47.**

Astaurov B.L., Golisheva M.D., Roginskaya I.S. Chromosome complex of Ussuri geographical race of *Bombyx mandarina* M. with special reference to the problem of the origin of the domesticated ... // *Cytology*. 1959. **Цитируется: 25.**

С.М. Гершензон

Muller H.J., Gershenson S.M. Inert regions of chromosomes as the temporary products of individual genes // *Proc. of the National Academy of Sciences USA*. 1935. **Цитируется: 48.**

Muller H.J., Raffel D., Gershenson S.M. A further analysis of loci in the so-called «inert region» of the X chromosome of *Drosophila* // *Genetics*. 1937. **Цитируется: 32.**

Gershenson S.M. Viruses as environmental mutagenic factors // *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. 1986. **Цитируется: 13.**

В.А. Струнников

Strunnikov V.A. Control over reproduction, sex, and heterosis of the silkworm. Harwood Academic. 1995. **Цитируется: 21.**

Terskaya E.R., Strunnikov V.A. Artificial meiotic parthenogenesis in mulberry silkworm // *Genetica*. 1975. **Цитируется: 9.**

Strunnikov V.A. On the prospects of using balanced sex-linked lethals for insect pest control // *Theoretical and Applied Genetics*. 1979. **Цитируется: 8.**

Ю.А. Филипченко

Filipchenko Y.A. *Genetika myagkikh pshenits (Genetics of Bread Wheats)*. 1979. **Цитируется: 5.**

Filipchenko Y.A. *Variability and Methods of Its Study*. M.: Nauka, 1978. **Цитируется: 4.**

Filipchenko Y.A. *Izmenchivost' i metody ee izucheniya*. 1929. **Цитируется: 4.**

Н.К. Кольцов

Koltsov N.K. *The cell structure*, Biomedgiz. Moscow, 1936. **Цитируется: 3.**

Kol'tsov N.K. *Hereditary Molecules. Izbrannye trudy (Selected Works)*. Moscow, 2006. **Цитируется: 3.**

