March 2015 • 19 • 1

Scientific Peer Reviewed Journal

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Founded in 1997

Март 2015 • 19 • 1

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Founders

Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Учредители

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН)

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Сибирское отделение Российской академии наук

Chief Editor

V.K. Shumny

Editorial board

N.A. Kolchanov (Deputy Editor-in- Chief),
I.K. Zakharov (Deputy Editor-in-Chief),
S.G. Inge-Vechtomov, S.V. Shestakov,
I.F. Zhimulev, L.V. Khotyleva, I.A. Tikhonovich,
V.P. Puzyrev, I.A. Zakharov-Gezekhus,
N.K. Yankovsky, V.N. Stegniy, D.P. Furman

Главный редактор

В.К. Шумный

Редакционная коллегия

Н.А. Колчанов (зам. главного редактора),
И.К. Захаров (зам. главного редактора),
С.Г. Инге-Вечтомов, С.В. Шестаков,
И.Ф. Жимулев, Л.В. Хотылева, И.А. Тихонович,
В.П. Пузырев, И.А. Захаров-Гезехус,
Н.К. Янковский, В.Н. Стегний, Д.П. Фурман

«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), Российский индекс научного цитирования, базу данных Urlich's Periodicals Directory.

Электронная версия журнала размещена на сайте http://www.bionet.nsc.ru/vogis/ и платформе Научной электронной библиотеки elibrary.ru.

Подписку на «Вавиловский журнал генетики и селекции» можно оформить в любом почтовом отделении России. Индекс издания 42153 по каталогу «Пресса России».

© ИЦиГ СО РАН, 2015
© Вавиловский журнал генетики и селекции, 2015
© Сибирское отделение Российской академии наук, 2015

Содержание

К 150-летию работы Г. Менделя «Опыты над растительными гибридами»

007 Грегор Мендель: мое время придет
Ю.М. Новиков

013 При царе горохе (*Pisum sativum* L.): непростая судьба первого генетического объекта
О.Э. Костерин

027 Мендель: подтверждение идеи бинарного кодирования признака методами статистической физики
О.В. Трапезов

039 История открытий на дрозофиле – этапы развития генетики
Н.Н. Юрченко, А.В. Иванников, И.К. Захаров

Генетика растений

050 Симбиотическая фиксация атмосферного азота у бобовых растений как генетико-селекционный признак
К.К. Сидорова, М.Н. Гляненко, Т.М. Мищенко, Е.Ю. Власова, В.К. Шумный

058 Наследование желтой окраски у сафлора красильного, *Carthamus tinctorius* L.
Т.В. Леус

063 Генетика клейстогамии при внутривидовой гибридизации вида *Gossypium barbadense* L.
Т.И. Мухиддинов, А.А. Абдуллаев, Э. Кучкаров, А.Х. Чориев, С.К. Жумаев

069 Генетический контроль ремонтантности в популяциях *Fragaria vesca* L. (Rosaceae) в Западной Сибири
С.О. Батурин

074 Идентификация генотипов яровой мягкой пшеницы Казахстанско-Сибирской сети питомников по составу субъединиц глютенина и глиадина
А.И. Абугалиева, А.И. Моргунов, Х. Пенья, Н.Б. Волковинская, Т.В. Савин

083 Интрогрессивные линии мягкой пшеницы с генетическим материалом *Agropyron glaucum*
Р.О. Давоян, И.В. Бебякина, Э.Р. Давоян, А.С. Зинченко, Ю.С. Зубанова, Д.С. Миков

091 Создание короткостебельных линий с вавилоидным типом колоса и их цитогенетическая характеристика
А.Дж. Алиева, С.П. Мехтиева, Р.К. Керимова

097 Отсутствие генетической интрогрессии между *Elymus ciliaris* и *E. pendulinus* (Triticeae: Poaceae) по результатам SDS-электрофореза белков эндосперма в связи с гипотезами происхождения *E. amurensis*
А.В. Агафонов, Е.В. Кобозева, С.И. Татьков

2015 • 19 • 1

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ
ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Селекция и биотехнология растений

104 Использование генофонда яблони: источники и доноры хозяйственно полезных признаков
Е.Н. Седов

111 Получение удвоенных гаплоидов у видов рода *Brassica* L.
Н.А. Шмыкова, Д.В. Шумилина, Т.П. Супрунова

121 Метаболомный подход к оценке сортовой специфичности семян *Brassica napus* L.
Г.Н. Смоликова, А.Л. Шаварда, И.В. Алексейчук, В.В. Чанцева, С.С. Медведев

Популяционная генетика

128 Некоторые ограничения использования гена *cytb* митохондриальной ДНК как молекулярного маркера для филогенетических и популяционно-генетических исследований на примере рода *Apodemus*
А.Г. Лапинский, М.В. Павленко, Л.Л. Соловенчук, В.В. Горбачев

Физиологическая генетика

136 Индукцию тирозинаминотрансферазы у мышей ингибируют активированные метаболиты орто-аминоазотолуола
В.И. Каледин, С.И. Ильницкая, Н.А. Попова, О.А. Коваль, И.А. Пышная, Л.Ф. Гуляева

Медицинская генетика

144 Эпигенетические «зонды» для мониторинга рака легкого: профиль метилирования элементов LINE-1 в циркулирующей ДНК крови
А.А. Пономарева, Е.Ю. Рыкова, Н.В. Чердынцева, А.А. Бондарь, А.Ю. Добродеев, А.А. Завьялов, С.А. Тузиков, Л.О. Брызгалов, Т.И. Меркулова, В.В. Власов, П.П. Лактионов

Content

On the 150th anniversary of Gregor Mendel's report "Experiments in plant hybridization"

007 Gregor Mendel: my time will come
Yu.M. Novikov

013 Pea (*Pisum sativum* L.): the uneasy fate of the first genetical object
O.E. Kosterin

027 Mendel: corroboration of the idea of binary trait coding by methods of statistical physics
O.V. Trapezov

039 The history of Drosophila studies: steps in the development of genetics
N.N. Yurchenko, A.V. Ivannikov, I.K. Zakharov

Plant genetics

050 Symbiotic nitrogen fixation in legumes as a genetic and selection trait
K.K. Sidorova, M.N. Glyanenko, T.M. Mishchenko, E.Yu. Vlasova, V.K. Shumny

058 Inheritance of yellow colour in safflower (*Carthamus tinctorius* L.)
T.V. Leus

063 Inheritance of cleistogamy in interspecific hybridization of *Gossypium barbadense* L.
T.I. Mukhiddinov, A.A. Abdullayev, E. Kuchkarov, A.H. Choriev, S.K. Jumaev

069 The genetic control of the day-neutral habit in populations of *Fragaria vesca* (Rosaceae) in Western Siberia
S.O. Baturin

074 Kazakhstan-Siberian spring common wheat identification according to glutenin and gliadin composition
A.I. Abugalieva, A.I. Morgunov, J.R. Pena, N.B. Volkovinskaya, T.V. Savin

083 Introgression of common wheat lines with genetic material of *Agropyron glaucum*
R.O. Davoyan, I.V. Bebyakina, E.R. Davoyan, A.N. Zinchenco, Y.S. Zubanova, D.S. Mikov

091 Raise of short-stemmed vaviloid branched spike lines and their cytogenetics
A.J. Aliyeva, S.P. Mehdiyeva, R.K. Kerimova

097 Absence of genetic introgression between *Elymus ciliaris* and *E. pendulinus* (Triticeae: Poaceae) as shown by endosperm protein SDS-electrophoresis in connection with hypotheses of *E. amurensis* origin
A.V. Agafonov, E.V. Kobozeva, S.I. Tatkov

2015 • 19 • 1

VAVILOV JOURNAL
OF GENETICS AND BREEDING

Plant breeding and biotechnology

104 Apple gene pool use, sources and donors of economically valuable traits
E.N. Sedov

111 Doubled haploid production in *Brassica* L.
N.A. Shmykova, D.V. Shumilina, T.P. Suprunova

121 The metabolomic approach to the assessment of cultivar specificity of *Brassica napus* L. seeds
G.N. Smolikova, A.L. Shavarda, I.V. Alekseichuk, V.V. Chantseva, S.S. Medvedev

Population genetics

128 Some limitations in the use of the mitochondrial DNA *cytb* gene as a molecular marker for phylogenetic and population genetic studies by the example of the *Apodemus* genus
A.G. Lapinski, M.V. Pavlenko, L.L. Solovenchuk, V.V. Gorbachev

Physiological genetics

136 Induction of tyrosine aminotransferase in mice is inhibited by activated metabolites of ortho-aminoazotoluene
V.I. Kaledin, S.I. Ilnitskaya, N.A. Popova, O.A. Koval, I.A. Pyshnaya, L.F. Gulyaeva

Medical genetics

144 Epigenetic «probes» for lung cancer monitoring: LINE-1 methylation pattern in blood-circulating DNA
A.A. Ponomaryova, E.Y. Rykova, N.V. Cherdyntseva, A.A. Bondar, A.Y. Dobrodeev, A.A. Zavyalov, S.A. Tuzikov, L.O. Bryzgalov, T.I. Merkulova, V.V. Vlassov, P.P. Laktionov

К 150-ЛЕТИЮ РАБОТЫ Г. МЕНДЕЛЯ «ОПЫТЫ НАД РАСТИТЕЛЬНЫМИ ГИБРИДАМИ»

Памятник Грегору Менделю в г. Брно (Чехия), созданный на средства международного научного сообщества в 1910 г.

Фотография взята с сайта http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mendel´s statue.JPG

Грегор Мендель: мое время придет

Ю.М. Новиков

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия

Грегор Мендель и его работы традиционно и заслуженно привлекают к себе внимание научной общественности. Исследованы предпосылки становления Г. Менделя как личности и ученого, мотивация его научных интересов и открытия, положившие начало возникновению генетики. Сравнительный анализ литературных источников указал на высокую мотивационную роль образа жизни в детстве, деятельности отца, владения тонкими приемами работы с растениями. Очевидными предпосылками развития Г. Менделя как личности стали его природная одаренность, любознательность и страсть к учению. Большое влияние на него оказало обучение у теоретика гибридизации и селекции профессора Франца Дибеля. Ключевую роль в становлении Менделя как исследователя и возникновении у него идеи о существовании единиц наследственности (Anlagen), передающихся следующему поколению посредством половых клеток, сыграли учеба в Венском университете и общение с ботаником и цитологом профессором Францем Унгером. Приведены описание опытов Г. Менделя и его интерпретация выявленных закономерностей. Сделан вывод о том, что воспроизводимость результатов на разных объектах и признаках, а также поддающаяся проверке интерпретация полученных данных придали исследованию объективность и устойчивость к критике. Механизмы, обеспечивающие реализацию числовых закономерностей наследования, выявленных Менделем, стали понятны после установления полного их соответствия строению и функциям аппарата наследственности. В заключение названы основные достижения Г. Менделя, которые легли в основу генетики и стимулировали развитие ряда направлений общей биологии.

Ключевые слова: Грегор Мендель, гибриды, генетика, наследование, наследственность.

Gregor Mendel: my time will come

Yu.M. Novikov

National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

Gregor Mendel and his work have traditionally attracted well-deserved attention of scientific society. The purpose of this article is to study the background and prerequisites of Mendel's formation as a personality and scientist, the motivation of his scientific interests and discoveries which marked a beginning to the emergency of genetics as a science. Comparative analysis of literature have pointed at the way of his life in childhood, father's work and mastering fine methods of handling plants as highly motivational factors. Obviously, Mendel's personality developed due to his natural gift, love of knowledge and passion for studying. He was greatly inspired by studying with the theorist of hybridization and selection Professor Franz Diebel. According to the author, studies at the university of Vienna and in particular Professor Franz Unger, a botanist and cytologist, played a key role in Mendel's becoming a scientist and developing the idea of hereditary factors (Anlagen) transmitted to the subsequent generation by gametes. The article gives description of Mendel's experiments and his interpretation of patterns revealed. A conclusion is made that the reproducibility of Mendel's experiments using different objects and traits, confirms his research objectivity and makes his results invulnerable to criticism. Mechanisms providing realization of numerical patterns discovered by Mendel got clarified after establishing of their complete correspondence with structure and function of heredity system. In conclusion, main achievements of Mendel which formed the basis of genetics and stimulated the development of several branches of general biology are mentioned.

Key words: Gregor Mendel, hybrids, genetics, inheritance, heredity.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Новиков Ю.М. Грегор Мендель: мое время придет. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):7-12.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Novikov Yu.M. Gregor Mendel: my time will come. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):7-12.

УДК 575(092)
Поступила в редакцию 02.02.2015 г.
Принята к публикации 24.02.2015 г.
© АВТОР, 2015

e-mail: kinhetus@gmail.com

Meine Zeit wird kommen.
Г. Мендель в беседе с Г. фон Нисслем

Иоганн Мендель родился 22 июля 1822 г. в северной Моравии (восточная Силезия), которая в то время входила в состав Австрийской Империи, в селении Хейнцендорф (Хинчице), расположенном в местности Кулендхен (Краваржско) близ городка Одрау (Одры) и невдалеке от старинного города Троппау (Опава) у самой границы с Польшей. Ганс был вторым ребенком и единственным сыном Антона Менделя и Розины Мендель, урожденной Швиртлих. Его старшей сестрой была Вероника, младшей – Терезия (Володин, 1968). Антон Мендель владел крестьянским хозяйством и помимо своих повседневных земледельческих дел с любовью занимался садоводством и пчеловодством. Он часто брал сына в сад и рано научил его приемам работы садовода. Любовь к земледелию, садоводству и пчеловодству, привитую отцом, Иоганн пронес через всю свою жизнь. От отца он унаследовал невысокий рост, трудолюбие и настойчивость. От матери мальчик унаследовал спокойный и мягкий характер. Образ жизни семьи и природа родных мест оказали большое влияние на формирование интересов и устремлений Иоганна. Немаловажную роль в определении его жизненного пути сыграло и то обстоятельство, что Моравия в то время была краем с процветающим сельским хозяйством и одним из европейских центров селекционной работы.

В соответствии с принятыми нормами в возрасте 11 лет Иоганн окончил одноклассную сельскую школу, проявив особый интерес к естествознанию и физике. Будучи от природы человеком одаренным и обладая страстным желанием учиться, он упросил родителей позволить ему продолжить образование. Согласию родителей благоприятствовали успехи сына и рекомендации учителя местной школы Томаша Макиты. В 1833 г. Иоганн стал учеником Коллегии искусств, наук и ремесел, находившейся в Лейпнике (Липнике). Здесь он также был отмечен учителями, и оценка «первый из отличившихся в классе» стала для него обычной. Блестяще окончив коллегию, юный Мендель по рекомендации учителей в декабре 1834 г. поступил в гимназию города Троппау. В это время с его отцом произошел несчастный случай и он потерял трудоспособность. Иоганн оказался практически без средств к существованию, однако под ударом судьбы не склонился. Одновременно с основными занятиями в гимназии он посещал особый курс для кандидатов в учителя и частных учителей в главной окружной школе Троппау и после сдачи экзаменов стал зарабатывать на жизнь частными уроками. Только крайнее напряжение сил позволяло Иоганну быть лучшим учеником гимназии. Весной 1839 г. переутомление и болезнь заставили его прервать обучение. Оправившись от болезни и окрепнув, в сентябре того же года он вернулся в гимназию и с отличием окончил ее в 1840 г. 18-летним юношей.

Жажда знаний и желание стать учителем, осуществление которого требовало полного среднего гуманитарного образования, привели Иоганна в Философские классы при университете в городе Ольмюце (Оломоуце), расположенном в центре Моравии. Большую часть преподавателей классов составляли католические священники. Это не было случайностью, поскольку католицизм являлся государственной религией Австрийской империи и среди важнейших компетенций католической церкви были образование и просвещение. В перечне предметов значились церковные дисциплины, философия, математика и физика. К физике, которую преподавал профессор прелат Фридрих Франц, Иоганн проявил наибольший интерес. Найти работу частного учителя в Ольмюце ему не удалось. Высокая нагрузка и постоянное недоедание подорвали его здоровье и вынудили вновь вернуться домой. Близкие Иоганна, желая помочь ему в достижении цели, пошли на существенные жертвы: родители продали хозяйство мужу старшей дочери Алоису Штурму, младшая сестра Терезия уступила ему часть средств из своего скромного приданого. Только благодаря поддержке родных в 1843 г. И. Мендель окончил Философские классы и его среднее образование было завершено (Володин, 1968).

Материальное положение Менделя делало невозможным его обучение в университете. По мнению Иоганна и членов его семьи, в особенности матери, занятие наукой и освобождение от постоянных забот о хлебе насущном ему мог обеспечить статус духовного лица. Иоганн принял решение. Опираясь на поддержку профессора Ф. Франца, в 1843 г. он испросил разрешения на вступление в монастырь святого Фомы (Томаша), основанного в 1322 г. Орденом августинцев в Альтбрюнне (Старое Брно) на юге Моравии. Его просьба была удовлетворена.

Старобрюннский Августинский монастырь славился великой культурной традицией. Настоятелем монастыря в то время был аббат Франц Цирил Напп, профессор лингвистики, образованный сторонник либерализма, выдающийся представитель научного и культурного общества Моравии. Аббат Ф.Ц. Напп принимал в число неофитов монастыря только талантливых людей, которым оказывал всяческую поддержку при углублении их образования. Кроме службы в монастыре и научных занятий (из 15 монахов, людей образованнейших и незаурядных, исключительно церковными делами занимались лишь двое, 13 работали преподавателями различных учебных заведений) монахи Августинского конвента наряду со Словом Божьим преподавали в моравских школах и гимназиях философию, математику, физику, химию, ботанику, зоологию, филологию, всемирную историю и музыку. Аббат Напп прилагал большие усилия для того, чтобы духовные лица монастыря кроме обучения названным предметам читали лекции по естествознанию и сельскому хозяйству. Пройдя нелегкое и ответственное конкурсное испытание перед капитулом монастыря, 9 октября 1843 г. Иоганн Мендель стал монастырским послушником, лицом высокого духовного сана и получил новое имя Грегор (по-чешски Ржегож). В этом же году в возрасте 21 года он овладел чешским языком. Его материальное положение

в корне изменилось. С 1844 по 1848 гг. Мендель изучал в богословской школе при монастыре теологию, древнееврейский, греческий, халдейский, сирийский и арабский языки. В Философском университете города Брюнн в 1846 г. Мендель прослушал лекции одного из крупнейших теоретиков гибридизации и селекции профессора Франца Дибеля по сельскому хозяйству, садоводству и виноградарству, которые произвели на него большое впечатление и оказали значительное влияние.

По окончании теологической школы в 1848 г. Г. Мендель получил приход, однако деятельность богослова его не удовлетворяла, и в следующем году он занял скромную должность исполняющего обязанности учителя в гимназии города Цнайм (Зноймо). Здесь в 1849 и 1850 гг. он преподавал математику, греческий и латинский языки (Володин, 1968). Коллеги и ученики относились к нему с неизменным уважением и симпатией. Право преподавания наиболее привлекательных для Менделя физики, минералогии и ботаники давал диплом учителя. Соискателю диплома следовало пройти аттестацию специальной государственной комиссией, состоящей из профессоров Венского университета. К аттестации на звание преподавателя гимназии Г. Мендель приступил 10 мая 1850 г. в возрасте 28 лет. Постигшую его неудачу на экзамене по биологии Мендель воспринял как провал, по этическим соображениям не счел возможным продолжать работу в гимназии и вернулся в монастырь. Однако уже в 1851 г. в течение двух месяцев Г. Мендель в должности супплента (внештатного преподавателя) Технического училища г. Брюнн читал лекции по естествознанию. В этом же году аббат Ф.Ц. Напп направил его учиться в Венский университет за счет монастыря. 27 октября 1851 г. Г. Мендель выехал в Вену и поступил в университет в качестве вольнослушателя. С 1851 по 1853 гг. на философском факультете Венского университета в течение четырех семестров Г. Мендель прослушал лекции по экспериментальной физике, высшей математике, химии, зоологии, ботанике, физиологии, фитопатологии, общей палеонтологии, энтомологии. Среди его учителей были блестящие ученые, известные профессора Кристиан Доплер (экспериментальная физика), Франц Унгер (ботаника и цитология), Винценц Коллар (энтомология). Великому физику, профессору К. Доплеру Мендель даже ассистировал на лекциях (Володин, 1968).

Решающее влияние на его последующие исследования оказал профессор Ф. Унгер, который читал лекции и по физиологии растений, – для того времени новой дисциплине. Профессор считал чрезвычайно важным изучение причин изменчивости в органической природе и призывал исследовать наименьшие элементы клеток, комбинирование которых, по его мнению, дает возможность объяснить изменчивость органического мира и его развитие.

Именно в университетской среде в результате соединения изученных точных методов исследований и личного эмпирического опыта по скрещиванию растений, приобретенного до поступления в университет, и под влиянием общения с профессором Ф. Унгером у Менделя возникла мысль о том, что изменчивость органической материи обусловливают комбинации наследственных единиц, передающихся из поколения в поколение посредством половых клеток.

5 января 1853 г. при содействии профессора В. Коллара Г. Мендель был принят в члены Венского зоолого-ботанического общества. Летом этого же года он, закончив обучение в университете, вернулся в монастырь, а в мае 1854 г. получил место помощника преподавателя (внештатного профессора) в Высшем реальном училище города Брюнн, начальником которого был профессор А. Завадски. Здесь Г. Мендель в течение 14 лет преподавал физику и природоведение вплоть до своего избрания аббатом в 1868 г. и одновременно заведовал естественно-историческими коллекциями. Свою работу он очень ценил, отличался исключительной порядочностью, добротой, мягкостью и справедливостью. За 14 лет работы в училище Г. Мендель не провалил на экзамене ни одного учащегося. Ученики его любили и считали большой наградой позволение прийти к нему в монастырь. В стенах монастыря Мендель вел с ними беседы о явлениях природы, рассказывал о своих опытах. В его комнате некоторое время жили серые и белые мыши, которых он скрещивал для установления наследования цвета шерсти, еж и лисенок. На своем опытном участке размером 35 × 7 м, расположенном во дворе монастыря, Мендель высаживал образцы культурных и диких растений, экземпляры необычной формы тех и других, проводил опыты по гибридизации растений. 14-летний период спокойной, приятной и плодотворной жизни был омрачен лишь в 1856 г. второй, также неудачной, попыткой пройти в Венском университете государственные испытания на звание преподавателя гимназии. По рассказам его коллег, Мендель разошелся во взглядах с одним из экзаменаторов, профессором ботаники, и решил оставить экзамены. В целом же это были лучшие годы его жизни, заполненные любимой работой, научными исследованиями, занятиями пчелами и садоводством. Г. Мендель внимательно следил за научной литературой, получал по подписке многие издания, прекрасно знал работы Ж.Б. де Ламарка и Ч.Р. Дарвина, интересовался энтомологией, метеорологией, вел наблюдения за солнечными пятнами, уровнем грунтовых вод, занимался ономастикой и впервые применил вероятностно-статистический метод в лингвистических исследованиях. Однако наибольшее значение для него имели исследования в области наследственности, результаты которых принесли ему мировую известность и славу.

Опыты по изучению закономерностей наследования признаков у растений Мендель начал, хорошо подготовившись. Он изучил работы своих предшественников-гибридизаторов, учел их достижения и методические упущения. Ученый сразу же поставил перед собой задачу – изучить проблему наследственности, но не вида.

Следовательно, по крайней мере, для основной работы он использовал садовые расы, но не видовые формы (Гайсинович, 1988). Его цель была ясной и конкретной: определить число форм в потомстве гибридов и по отдельным поколениям установить их численные отношения (Мендель, 1935. С. 25-66). Был у него и четкий план работы, составленный и продуманный еще во время учебы в университете. В качестве модельного объекта он избрал горох посевной (*Pisum sativum*), приоритет которого обусловили его самоопыляемость, обилие дискретных константных вариантов целого ряда признаков, легкость произвольного скрещивания, а также наличие результатов исследований предшественников: Томаса Эндрю Найта, Джона Госса, Александра Сетона. Г. Мендель выписал 34 сорта гороха и в течение двух лет (1854 и 1855 гг.), высеяв исходные образцы всех сортов, исследовал особи дочернего и следующего за ним поколений и далее использовал в опытах лишь те 22 сорта, которые сохраняли свою константность (Гайсинович, 1988). В 1856–1863 гг. он вырастил несколько десятков тысяч подопытных растений, 12 835 из которых были подвергнуты тщательному анализу по отдельным признакам. Особое значение, по-видимому, Мендель придавал опытам по моногибридному скрещиванию, в которых он вырастил и основательно проанализировал на протяжении 7 поколений 14 тыс. растений. В опытах по ди- и тригибридному скрещиваниям анализу были подвергнуты соответственно 814 и 5 743 растения. В своих наиболее изощренных опытах, поставленных для доказательства «гипотезы о наследственных единицах», Г. Мендель исследовал 650 растений (Мендель, 1935. С. 25–66, 1965). Завершив разработку метода гибридологического анализа, ученый установил числовые закономерности наследования константно различающихся вариантов 7 качественных признаков гороха в моно-, ди- и тригибридных кроссах и положил начало генетической символике. Воспроизводимость результатов опытов указала ему на присутствие фундаментальных биологических механизмов, обеспечивающих выявленные закономерности. Он описал их в виде нескольких допущений.

Для проверки закономерностей наследования, выявленных на горохе, в 1863 и 1864 гг. Мендель провел опыты по скрещиванию как видовых, так и внутривидовых форм (разновидностей, рас) целого ряда родов. Результаты, полученные в опытах на фасоли (*Phaseolus*), левкое (*Matthiola*), ночной красавице (*Mirabilis*), кукурузе (*Zea*), соответствовали тем, что были получены на горохе, в то время как результаты, полученные на представителях других родов (*Aquilegia*, *Antirrhinum*, *Calceolaria*, *Campanula*, *Carex*, *Cirsium*, *Cucurbita*, *Dianthus*, *Geum*, *Hieracium*, *Ipomoea*, *Lathyrus*, *Linaria*, *Lychnis*, *Pirus*, *Potentilla*, *Prunus*, *Sedum*, *Tropaeolum*, *Verbascum*, *Veronica*, *Viola*) различались (Weiling, 1970). Этим отклонениям Мендель объяснения не нашел, и у него начали возникать некоторые сомнения относительно общего характера закономерностей наследования (Фляксбергер, 1935). Были опубликованы результаты работы только на фасоли (Мендель, 1935. С. 25–66) и несколько позже – на ястребинке (Мендель, 1935. С. 67–74). Скрестив виды *Phaseolus vulgaris* и *Ph. nanus* во втором поколении, Мендель наблюдал то же расщепление потомства, что и на горохе. Используя в качестве родительских форм *Ph. nanus* и *Ph. multiflorus*, он фактически впервые в истории наблюдал кумулятивную полимерию, чем и объяснялось отклонение наследования от того, что теперь мы называем менделевским.

Общество естествоиспытателей г. Брюнн выросло из секции естествознания Моравско-Силезского общества по улучшению земледелия, естествознания и краеведения и стало самостоятельным в 1862 г. Среди 40 его членов были врачи, аптекари, коммерсанты и профессора учебных заведений, некоторые из них были известными учеными: физик и автор нескольких монографий по ботанике профессор Александр Завадски, крупный геолог и палеонтолог, профессор Высшего реального училища Александр Маковски, ботаник, математик и геофизик профессор Технического училища, секретарь Общества Густав фон Ниссль. Возглавлял общество в то время граф фон Митровски.

8 февраля и 8 марта 1865 г. на собраниях Общества естествоиспытателей города Брюнн, членом которого Г. Мендель являлся со дня его основания, он сделал два доклада о результатах своих опытов на горохе и особо отметил общий характер выявленных фактов и закономерностей: «В основных моментах не может быть принципиального различия, так как единство развития органической жизни стоит вне сомнения». Оба сообщения были выслушаны аудиторией, состоящей из 40 членов Общества, в полной тишине. Докладчику не задали ни одного вопроса, дискуссии не состоялось (Володин, 1968). К результатам отнеслись недоверчиво. Были сделаны замечания о необходимости контрольных опытов и проверки установленных положений на других видах растений, однако принято решение опубликовать доклады вместе в кратком виде в трудах Общества. В местной газете «Neuigkeiten» («Новости») от 9 февраля и 10 марта были опубликованы небольшие очерки по темам выступлений патера Менделя. Сборник трудов, датированный 1865 г., под влиянием обстоятельств, связанных с начавшейся австро-прусской войной, вышел в свет лишь в конце 1866 г. Его разослали в 120 библиотек университетов и обществ испытателей природы многих стран и городов, включая Вену, Прагу, Берлин, Мюнхен, Париж, Лондон, Филадельфию, Нью-Йорк, Санкт-Петербург и Москву. Работа Г. Менделя «Опыты над растительными гибридами» объемом в 47 страниц, ставшая впоследствии классической, была встречена холодно, с недоверием, разные авторы упомянули ее примерно в 10 обзорах и книгах по ботанике. В частности, в своей компиляции это сделал В. Фоке (Focke, 1881). Именно эта ссылка позволила научной общественности «открыть» Менделя как ученого (Фляксбергер, 1935). Только двое ученых: член Общества

естествоиспытателей г. Брюнн профессор Г. фон Ниссль и молодой русский ботаник И.Ф. Шмальгаузен – сразу же поняли ее и оценили по достоинству. Г. фон Ниссль считал, что выкладки патера Менделя допустимы, интересны и даже серьезны (Володин, 1968). И.Ф. Шмальгаузен в тексте своей магистерской диссертации, опубликованной в 1874 г., сделал реферат, который явился единственным серьезным научным откликом на работу Менделя (Гайсинович, 1988). Из 40 отдельных оттисков статьи одну часть автор подарил коллегам по Обществу, другую разослал известным ученым-ботаникам. В сопроводительном письме к профессору мюнхенского университета Карлу Вильгельму фон Негели от 31 декабря 1866 г. Г. Мендель написал: «Я согласился опубликовать работу после того, как еще раз просмотрел записи опытов разных лет и не обнаружил ни одного источника ошибки» (Мендель, 1965). Кроме этого, он сообщил в письме о своих опытах на многих видах растений, включая ястребинки (*Hieracium*). Между учеными завязалась переписка. В одном из писем К. Негели, отозвавшись о работе с горохом со скепсисом, посоветовал Г. Менделю продолжить эксперименты на разных видах, в особенности на представителях рода *Hieracium*, которыми он сам занимался, работая над проблемой вида и разновидности. Мендель принял предложение авторитетного ученого и далее для опытов использовал видовые формы ястребинок. Эта работа имела для Менделя исключительное значение, так как установлением закономерностей образования гибридов у ястребинок он мог добиться широкого признания результатов своего исследования (Гайсинович, 1988). Опыты с ястребинкой, начатые летом 1866 г., технически были довольно трудными: цветки ястребинки весьма мелки, их кастрация становится возможной только с использованием микроскопа и осветительных приборов. В результате напряженной работы у исследователя развилась продолжительная болезнь глаз.

К его глубокому разочарованию, наследование признаков у ястребинки противоречило закономерностям, установленным Менделем ранее на горохе: среди гибридов первого поколения, которых получалось очень мало, наблюдалось расщепление, в то время как во втором поколении все особи были одинаковы. Это обстоятельство впоследствии усилило сомнения Менделя в правильности своих обобщений. 9 июля 1869 г. он доложил противоречивые результаты своего исследования на заседании Общества естествоиспытателей г. Брюнн. Истинная причина несоответствия в картинах наследования признаков у гороха и ястребинки была выявлена лишь в 1903 г.: как и многим другим представителям семейства Астровых (Asteraceae), ей присуще образование семян без оплодотворения, посредством апогамии, о чем великому первооткрывателю, как и всем другим ученым, в то время известно не было. У одних видов *Hieracium* опыление отсутствует полностью, у других оно происходит только частично (Ostenfeldt, Raunkiær, 1903). Некоторые ее виды, вероятно, являются гибридами. Таким образом, непостоянство первого поколения можно объяснить.

30 марта 1868 г. Мендель был избран прелатом монастыря, и с этого момента все свои силы он отдавал новой должности. Времени и сил для работы с растениями у него не оставалось. В последнем письме к К. Негели (1873 г.) он пишет, что чувствует себя поистине несчастным оттого, что вынужден забросить свои растения и пчел. Однако Мендель продолжал исследовательскую работу в других областях науки. В трудах Общества естествоиспытателей г. Брюнн он опубликовал 3 работы по метеорологии, которой занимался до конца своих дней.

Став прелатом, Мендель не забыл доброты своих близких. Он проявил самое заботливое участие к семье своей младшей сестры Терезии и взял на себя все расходы по воспитанию и образованию ее детей. Благодаря его постоянной материальной поддержке двое из них, Алоис и Фердинанд, окончили университет и стали врачами.

На протяжении всей своей жизни Грегор Мендель являл собой пример глубоко порядочного, доброго, ответственного и весьма деятельного человека. Помимо исполнения своих должностных обязанностей, он постоянно работал в составе Общества естествоиспытателей города Брюнн, был членом Общества пчеловодов города Брюнн, Моравско-Силезского общества по улучшению обработки земли, естествознания и краеведения, Венского зоолого-ботанического общества. В период с 1862 по 1871 гг. Мендель неоднократно и с разными целями выезжал за рубеж. Он совершил путешествие по Германии, посетил Париж, Лондон, Киль, Рим, Флоренцию и Венецию. В последнее десятилетие жизни Г. Мендель занимал высокое общественное положение, участвовал в работе многих учреждений и общественных организаций г. Брюнн, был избран депутатом Моравского ландтага. В 1876 г. его назначили одним из директоров Моравского ипотечного банка (Володин, 1968).

Защищая интересы своего монастыря, прелат Грегор Мендель не подчинился закону «О регулировании расходов по содержанию католического культа», принятому в 1874 г. В соответствии с этим законом монастырям следовало платить религиозный налог. Г. Мендель считал такой налог несправедливым. Завязалась борьба между непокорным прелатом и властями. Многолетняя судебная тяжба, закончившаяся для монастыря поражением, разочарование в результатах научного исследования и состояние здоровья привели Менделя к отчуждению от внешнего мира. Однако в глубине души он был убежден в правильности своих научных построений. Об этом свидетельствует его речь при пострижении Ф. Баржины в монахи в 1883 г.: «Мои научные труды доставили мне много удовлетворения, и я убежден, что не пройдет много времени – и весь мир признает результаты этих трудов» (Володин, 1968. С. 244). 6 января 1884 г. пришла «естественная неизбежность» (так о смерти говорил сам Мендель): прелат Старобрюннского Августинского мо-

настыря, учитель, ботаник, метеоролог и великий ученый-гибридизатор Грегор Мендель умер от воспаления почек. В последний путь его провожали католическое духовенство, евангелический пастор и еврейский раввин, профессора и учителя школ, представители обществ, пожарные и множество бедного люда, которому он помогал.

Самые беспристрастные из судей, Время и Истина, вынесли свой вердикт: ОН ПРАВ. Весной 1900 г. мир был оповещен о рождении одной из самых замечательных наук – генетики. Его время пришло, его труд обрел признание.

Результаты опытов Менделя неоднократно проверены и подтверждены на разных объектах (Johannsen, 1926). Высказаны и некоторые критические соображения. Так, классик популяционной генетики Рональд Фишер заявил о вызывающей сомнение высокой близости численностей классов особей во втором поколении гибридов, полученных Менделем, к численностям, ожидаемым в соответствии с теорией вероятности (Fisher, 1936). Хотя его выводы и не были категоричными, их оспорили другие ученые (Weiling, Hat, 1966). Свойствами фундаментального исследования Менделя, в котором гениальная идея и ясная цель инициировали создание Метода, позволившего установить закономерности наследования признаков и доказать реальность существования их наследственных задатков, являются воспроизводимость результатов на разных объектах и признаках, а также их интерпретация, поддающаяся проверке. Эти свойства придали работе объективность и высокую устойчивость к критике, а также стали залогом ее торжества и мирового признания. Названные свойства стали понятны тогда, когда было установлено полное соответствие абстрактных числовых закономерностей наследования, выявленных Менделем, строению и функциям аппарата наследственности.

«Habent sua fata libelli» (Книги имеют свою судьбу), – написал некто на манускрипте работы Менделя, обнаружив его после 1900 г. в кипе монастырских бумаг, приготовленных к уничтожению. Манускрипт уцелел в 1884 г., когда новый аббат монастыря Ансельм Рамбоусек распорядился сжечь весь архив Грегора Менделя, однако был безвозвратно утерян в конце второй мировой войны.

Жизненный путь Грегора Менделя – достойный пример вдохновенного и бескорыстного служения науке и целенаправленного поиска истины. В его внутреннем мире нашли гармоничное и плодотворное сочетание разносторонние способности и деятельность, образованность и культура, знание биологических и точных наук, живой интерес к ключевым проблемам биологии и поиску путей их разрешения. Обладая путеводной идеей, зная результаты исследований некоторых гибридизаторов, предшествовавших ему, и осознав основные недостатки их методических приемов, он удивительно точно определил основную цель и достиг ее. В результате Мендель

1) создал метод гибридологического анализа, ключевым элементом которого стал его принцип точного учета соотношения классов потомков внутри потомств гибридных растений;

2) выявив строгие числовые отношения между разными классами потомков во втором поколении гибридов, установил закономерности наследования признаков;

3) доказав существование «наследственных задатков» (Anlagen), или «единиц наследственности», заложил основы теории гена и корпускулярной теории наследственности;

4) допустив парность задатков признаков, их сегрегацию при образовании половых клеток и независимость сегрегации задатков разных пар, предсказал диплоидность, редукционное деление клетки, сегрегацию хромосом и независимый характер сегрегации разных пар гомологичных хромосом;

5) объясняя закономерности расщепления потомств гибридов, допустил, что яйцеклетка при оплодотворении соединяется только с одной мужской половой клеткой, провел в доказательство экспериментальные опыления на ночной красавице (*Mirabilis jalapa*) и выявил, таким образом, один из важнейших элементов биологии оплодотворения;

6) опираясь на формальное сходство расщепления по полу у раздельнополых организмов с расщеплением в случае анализирующего скрещивания, предсказал генетическое определение пола;

7) сформировав научное представление о природе наследственности, сообщил мощный импульс развитию эволюциологии и селекции.

Уверенность великого естествоиспытателя в правоте его научных построений нашла всестороннее и полное подкрепление.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Володин Б.Г. Мендель (Vita aeterna). М.: Мол. гвардия, 1968.

Гайсинович А.Е. Зарождение и развитие генетики. М.: Наука, 1988.

Мендель Г. Опыты над растительными гибридами. М.: Сельхозгиз, 1935.

Мендель Г. Опыты над растительными гибридами. М.: Наука, 1965.

Фляксбергер К.А. Грегор Иоганн Мендель (биографический очерк). Мендель Г. Опыты над растительными гибридами. М.: Сельхозгиз, 1935:13-23.

Fisher R.A. Has Mendel's work been discovered? Ann. Sci. 1936; 1:115-137.

Focke W.O. Die Pflanzen-Mischlinge: Ein Beitrag zur Biologie der Gewächse. Berlin: Borntaeger, 1881.

Johannsen W. Elemente der exacten Erblichkeitslehre. Jena: Fisher, 1926.

Ostenfeldt C.H., Raunkiær C. Kastreringsforsøg med Hieracium og andre Cichorieae. Botanisk Tidsskrift. 1903;25:409-413.

Weiling F. Anmerkungen. Mendel G. Versuche über Pflanzenhybriden. Braunschweig: Vieweg, 1970:72-103.

Weiling F., Hat J.G. Mendel bei seinen Versuchen «zu genau» gearbeitet? Der Züchter, 1966;6:359-365.

При царе горохе (*Pisum sativum* L.): непростая судьба первого генетического объекта

О.Э. Костерин

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия; Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) является важнейшей зернобобовой, овощной и кормовой культурой и улучшает плодородие почв за счет симбиотической азотфиксации. Горох является первым генетическим объектом, поскольку именно на нем проводил опыты создатель генетики Г. Мендель. У гороха также была найдена первая в истории генетики транслокация. Время генерации гороха может быть сокращено до 35 суток, что сопоставимо с арабидопсисом. Однако небольшие трудноразличимые хромосомы затормозили развитие цитогенетики гороха, а рекомбинационные генетические карты вплоть до 1990-х гг. оставались не вполне адекватными и были исправлены лишь с применением молекулярных маркеров. До сих пор у гороха сосуществуют две разные нумерации – одна для групп сцепления, другая для хромосом как цитологических объектов. В последнее время к гороху с успехом был применен весь арсенал молекулярных маркеров – изоферменты, RAPD-, SSR-, RFLP-, AFLP-, STS-, CAPS-, sCAPS-, SNP-маркеры, а также методы обратной генетики, такие как тиллинг и вирус-индуцированный геномный сайленсинг; ожидается применение ассоциативного картирования. Проведен ряд транскриптомных исследований. В то же время полный ядерный геном гороха до сих пор не расшифрован; его расшифровка ожидается в 2016 г. Для разработки молекулярных маркеров у гороха активно используется синтения его генома с расшифрованным геномом *Medicago truncatula*. Генетическая трансформация гороха весьма затруднена. В качестве модельного генетического объекта горох был использован для исследования таких важных фундаментальных вопросов, как генетический контроль симбиоза с азотфиксирующими бактериями, влияние изменчивости генов гистона H1 на фенотип, механизм конфликта ядра и цитоплазмы в отдаленных скрещиваниях, возникновение B-хромосом у растений, генетический контроль морфологии сложного листа.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., горох; генетический объект, генетические карты, молекулярные маркеры.

Pea (*Pisum sativum* L.): the uneasy fate of the first genetical object

O.E. Kosterin

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia; Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Pea (*Pisum sativum* L.) is an important vegetable and forage crop capable of improving soils via symbiotic nitrogen fixation. It is of special importance in Russia as a crop adapted to high latitudes and an inexpensive source of plant protein. In addition, pea is the first genetical object used in famous G. Mendel's experiments. The first translocation in the history of genetics was also found in pea. Pea generation time can be shortened to 35 days, which is comparable with *Arabidopsis*. However, small and hardly recognizable chromosomes hampered the development of pea cytogenetics, while recombination genetic maps remained inadequate until 1990s, when they were improved only with the aid of molecular methods. Two different notations for pea linkage groups and chromosomes as cytological objects still coexist. Recently, the whole toolbox of modern molecular methods of genetic analysis was applied to pea, including isozymes, RAPD-, SSR-, RFLP-, AFLP-, STS-, CAPS-, sCAPS-, and SNP-markers, as well as methods of reverse genetics including TILLING and virus-induced genomic silencing. Application of association mapping. Several transcriptome studies have been carried out in pea. Meanwhile, we await the completion of pea nuclear genome sequencing in 2016. For working out new molecular markers in pea, the synteny of its genome to the sequenced genome of *Medicago truncatula* is extensively used. Genetic transformation of pea is very difficult. Pea has been used as an experimental model for investigation of the following fundamental issues: the genetic control of symbiosis with nitrogen fixing bacteria, influence of variation in the histone H1 gene on the phenotype, mechanism of nuclear-cytoplasmic conflict in remote crosses, origin of B-chromosomes in plants, and genetic control of compound leaf morphology.

Key words: *Pisum sativum* L., pea, genetic object, genetic map, molecular markers.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Костерин О.Э. При царе горохе (*Pisum sativum* L.): непростая судьба первого генетического объекта. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):13-26.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Kosterin O.E. Pea (*Pisum sativum* L.): the uneasy fate of the first genetical object. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):13-26.

УДК 575:633.358
Поступила в редакцию 30.01.2015 г.
Принята к публикации 24.02.2015 г.
© АВТОР, 2015

e-mail: kosterin@bionet.nsc.ru

Горох является одной из самых холодоустойчивых бобовых культур, возделываемых вплоть до русского Севера. Мировая продукция зернового гороха в 2009 г. составила 10,4 Мт, уступив только фасоли (Smýkal et al., 2012). При этом бобовые культуры являются почти единственным источником растительного белка, составляющего у гороха 23–25 % сухого веса семян (Bastianelli, 1998). Но и в будущем горох может приобрести важнейшее значение для продовольственной безопасности нашей самой большой в мире страны, поскольку территория России в основном расположена в высоких широтах.

Горох – уникальная культура, имеющая три важнейших применения: как овощная, зерновая и кормовая культура. Вернее было бы сказать, четыре применения, так как корни гороха, несущие азотфиксирующие клубеньки, являются прекрасным естественным удобрением и использование гороха в севообороте в определенной степени восстанавливает плодородие почвы.

Неудивительно, что горох является и одной из наидревнейших культур, и старейшим генетическим объектом. Удивительно другое: насколько генетические исследования гороха, хотя и были самыми первыми генетическими исследованиями в мире, отстали от изучения других организмов, догоняя их лишь в самое последнее время. Возможно, причина такого странного положения состоит в том, что начиная со второй половины XX столетия (точнее, после второй мировой войны) прогресс науки по преимуществу сместился в более низкие широты, на которых располагается территория Соединенных Штатов Америки, где в условиях более теплого климата горох в качестве источника растительного белка уступает по значению более продуктивным и кулинарно привлекательным фасоли и сое.

Горох как генетический объект

Когда широкообразованный (однако без диплома) августинский монах Грегор Мендель решил заняться гибридизацией и изучением наследования, он начал с внимательного выбора объекта исследования. В интернете можно найти информацию – правда, в качестве своего рода предания, первоисточники которого теряются, – о том, что у себя в келье Мендель устроил нечто вроде живого уголка. Там он скрещивал различные растения, а также мышей. По всей видимости, объект исследования он выбирал не спеша и очень вдумчиво (вслед за горохом объектами опытов Менделя по изучению наследования стали ястребинка (*Hieracium*) и медоносные пчелы). Знаменитые опыты с горохом, которые Мендель проводил 8 лет и в ходе которых вырастил не менее 12 980 растений (столько упомянуто в его эпохальной статье (Mendel, 1866)), хотя в действительности их наверняка было намного больше), он начал в 1856 г. Однако горох попал в сферу его внимания еще как минимум на два года раньше, так как в 1854 г. он писал своему преподавателю о том, что вредитель гороха гороховая зерновка (*Bruchus pisorum* L.) зимует в горошине, а не в почве, а яйца откладывает на молодой боб, а не в цветок. Так или иначе, объект, подходящий для поставленной Менделем задачи, был выбран весьма удачно: в наличии имелся ряд контрастных форм, проявляющих большое разнообразие внешних признаков, в отношении которых эти формы были устойчивы при разведении в себе, но при этом технически легко скрещивались друг с другом. Горох являлся однолетним растением, что позволяло получать одно поколение в год – большое преимущество перед многолетними растениями, в том числе деревьями и кустарниками, с которыми проводили свои гибридологические опыты предшественники и современники Менделя. Здесь можно заметить, что потенциал гороха как растительного объекта с коротким временем генерации в действительности оказался гораздо выше. Например, под руководством В.А. Бердникова выведена в качестве F23 от скрещивания образцов ВИР7036 (Непал) × сорт Аванти миниатюрная и скороспелая линия Спринт-1, время генерации которой в условиях микротеплицы составляет около 32–35 дней (Генетика – селекции растений, 1987), что сопоставимо с «растительной дрозофилой» – арабидопсисом (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh.).

Результат удачного выбора Менделем экспериментального объекта – гороха – хорошо известен: он позволил Менделю фактически в одиночку основать науку генетику (ястребинка же и пчелы оказались далеко не столь плодотворны, благодаря неизвестным Менделю особенностям своего размножения) (см. Nogler, 2006).

Горох послужил основой еще одного важного генетического открытия: именно у гороха впервые в истории генетики С. Хаммерлундом (Hammarlund, 1923) была найдена транслокация, причем чисто генетическими методами – на основе данных о сцеплении генов. Вскоре эта транслокация была визуализована в профазе мейоза А. Хаканссоном (Håkansson, 1929).

В дальнейшем генетические исследования с горохом затормозились. Одной из причин того были, как это ни странно в свете вышеупомянутого открытия, недостатки гороха в качестве цитогенетического объекта – его хромосомы очень невелики и бедны морфологическими особенностями.

Первый качественный анализ кариотипа гороха был сделан Г.А. Левицким (1931). Две из семи хромосом гаплоидного набора имеют спутники (Pellew, Sansome, 1932; Sansome, 1933), остальные пять не имеют характерных признаков и визуально очень похожи. С. Бликсту (Blixt, 1958) удалось на основе относительной длины (отношение к общей длине кариотипа) хромосом и их плеч предложить определительный ключ для всех семи митотических хромосом; в то же время две самые мелкие хромосомы, 1 и 2, не могут быть достаточно надежно идентифицированы (Hall et al., 1997). Мейотические хро-

мосомы не удается определить ранее второго деления, которое аналогично митозу. В связи с плохой различимостью цитогенетические исследования гороха проводились лишь с использованием транслокаций (Sansome, 1932, 1933, 1938; Lamm, 1951, 1977; Lamm, Miravalle, 1959), стандартный набор которых был предложен Робертом Ламмом (Lamm, 1951, 1977; Lamm, Miravalle, 1959). В середине 1980-х годов Дональду Фолькесону с большим трудом удалось применить к хромосомам гороха метод дифференциального окрашивания (Folkeson, 1984a), однако результат получился невпечатляющим – дифференциальная окраска была не очень отчетливой. Через полтора десятилетия к митотическим хромосомам гороха были применены FISH-технологии: на них были визуализованы кластеры рибосомальных РНК и микросателлиты (Fuchs at al., 1998; De Martino et al., 2000; Neumann et al., 2001).

Казалось бы, столь плодотворно замеченные Г. Менделем удачные свойства гороха как объекта для гибридологического анализа наследования внешних признаков, т. е. как стало принято говорить в дальнейшем – для классического генетического анализа, должны были довольно скоро привести к созданию подробных рекомбинационных генетических карт. Парадоксальным образом эта проблема оказалась решена лишь в 1990-е годы и только за счет привлечения молекулярных маркеров. Первая генетическая карта гороха, включавшая 6 групп сцепления, была составлена еще С. Веллензиком (Wellensiek, 1925). Однако ученым, сыгравшим главную роль в построении полной генетической карты, включавшей 7 групп сцепления (при $n = 7$), был Герберт Лампрехт (Lamprecht, 1948, 1953, 1954, 1955, 1957, 1961). Его генетическая карта к 1970-м годам была существенно пополнена генами с видимым фенотипическим проявлением, число которых достигло 169 и которые в результате покрывали ее достаточно густо, так что выглядела она весьма неплохо (Blixt, 1972).

Однако в 1980–1990-е годы выяснилось, что эта карта неадекватна. Различные ее фрагменты оказались неправильно объединенными в группы сцепления за счет переоценки надежности данных, якобы указывавших на дальнее сцепление, что в действительности было статистическим артефактом. Это было обнаружено, прежде всего, в работах вышеупомянутого Д. Фолькесона (Folkeson, 1984b, 1990a, b). Дальнейшая перестановка фрагментов карты Лампрехта была связана с локализацией Ианом Мёрфетом гена *gigas* (Murfet, 1990), а автором данного сообщения – генов *His7* (Kosterin, 1992, 1993) и *bulbosus* (Kosterin, Rozov, 1993).

Экспансия молекулярных методов

Вскоре генетическая карта гороха стала наполняться молекулярными маркерами, а именно:

генами, кодирующими изоферменты (Weeden, Marx, 1987; Hoey et al., 1996; Baranger et al., 2004);

полиморфными случайно апмлифицируемыми последовательностями ДНК (RAPD-маркеры – Random Amplified Polymorpic DNA) (Hoey et al., 1996; Lu et al., 1996; Laucou et al., 1998; Rameau et al., 1998; Cheghamirza et al., 2002; Baranger et al., 2004);

микросателлитными маркерами (SSR-маркеры – Simple Sequence Repeats) (Lu et al., 1996; Baranger et al., 2004; Loridon et al., 2005);

полиморфными по длине фрагментами рестрикции ДНК (RFLP-маркеры – Restriction Fragment Length Polymorphism);

такими же фрагментами, амиплифицированными после присоединения адаптеров (AFLP-маркеры) (Lu et al., 1996);

амплифицированными фрагментами ДНК со случайных праймеров, полиморфными по наличию сайтов рестрикции (STS-маркеры) (Lu et al., 1996; Weeden, Boone, 1999);

полиморфными сайтами встройки ретротранспозонов (RBIP-маркеры – Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism) (Ellis et al., 1998; Vershinin et al., 2003; Jing et al., 2010);

полиморфными по наличию сайтов рестрикции амплифицированными фрагментами кодирующих генов (CAPS-маркеры – Cleaved Amplified Polymorphic Sequences. Если они разрабатываются на основе EST-последовательностей, то иногда называются EST-маркерами, что усложняет «номенклатуру» маркеров) (Gilpin et al., 1997; Konovalov et al., 2005);

нуклеотидными заменами в конкретных позициях (SNP-маркеры – Single Nucleotide Polymorphisms) (Aubert et al., 2006; Deulvot et al., 2010; Bordat et al., 2011).

Дополним перечень обозначениями еще нескольких классов молекулярных маркеров, употреблявшихся в литературе по гороху: SSR-EST-маркеры – основаны на коротких тандемных повторах внутри кодирующих частей генов (Bordat et al., 2011; Decarie et al., 2012); SCAR- или STS-маркеры (sequence-charactersied amplified regions, sequence tagged sites) (Rameau et al., 1998) – основаны на RAPD-маркерах, но с дальнейшей разработкой праймеров, специфичных для конкретного фрагмента; dCAPS-маркеры (derived CAPS) (Aubert et al., 2006) – аналоги CAPS-маркеров, но сайт рестрикции отсутствует в анализируемой ДНК, находится в не вполне гомологичном праймере. Скорость прогресса молекулярной генетики столь велика, что терминология названий новых методов с трудом поспевает за их появлением.

В последние десятилетия в связи с развитием методов высокопроизводительного секвенирования, позволяющих проводить одновременный анализ практически любого количества маркеров в одном образце (Deulvot, 2010; Bordat et al., 2011), исследования, направленные на создание генетических карт как таковых и картирование локусов, связанных с хозяйственно ценными признаками, перешли на SNP-маркеры в кодирующих

последовательностях (Jing et al., 2007; Smýkal et al., 2012). Методики генетического картирования развиваются стремительно, и настоящий момент – не лучшее время для обобщений.

Количество молекулярных маркеров, локализованных на генетической карте гороха, возрастает лавинообразно. Генетическая карта гороха, построенная в 2000-х гг. (Loridon et al., 2005), включала 229 SSR-маркеров, из которых 13 находились внутри кодирующих генов, остальные же – в некодирующей ДНК. Карты, построенные коллективом французских ученых, с преимущественным использованием маркеров, связанных с кодирующими генами, включали последовательно 363 маркера (111 внутри кодирующих генов) (Aubert et al., 2006), 536 маркеров (214 в кодирующих генах) (Bordat et al., 2011) и наконец 2 070 маркеров (Duarte et al., 2014). Независимая группа испанских исследователей получила карту, включающую 416 маркеров в кодирующих генах (Carrillo et al., 2014).

Оценки общей длины рекомбинационной генетической карты гороха варьируют в полтора раза: 937 cM (Weeden et al., 1998), 1 132 cM (Carrillo et al., 2014), 1255 cM (Duarte et al., 2014), 1 389 cM (Bordat et al., 2011), 1 430 cM (Loridon et al., 2005), 1 458 cM (Aubert et al., 2006). Первая из оценок была признана соответствующей общему количеству хиазм, наблюдаемых цитологически, а разброс оценок объяснялся рядом артефактов (Knox, Ellis, 2001, 2002). Однако не следует сбрасывать со счетов возможные различия в общей интенсивности рекомбинации в зависимости от генотипа (Smýkal et al., 2012). Данных об изменчивости общего количества хиазм у гороха, по-видимому, не существует.

Преимущественное использование в последних работах SNP-маркеров, связанных с кодирующими генами, в какой-то мере возвращает ситуацию, когда на генетической карте были локализованы функциональные маркеры, имеющие фенотипическое проявление. Однако огромное количество маркеров само по себе затрудняет и графическое представление результатов картирования, и практическую работу с картой.

Заметим, что многие «молекулярные» рекомбинационные карты строились в отрыве от «классических». В скрещивания, от которых получались исследуемые популяции F2 и серии рекомбинационных инбредных линий, было вовлечено слишком мало маркеров с видимым фенотипическим проявлением. В связи с прогрессом и удешевлением (к сожалению, не в России) современных методов высокопроизводительного секвенирования возникла ситуация, когда разные группы исследователей для решения конкретных задач на основании своего конкретного материала (популяций второго или третьего поколения гибридов или, чаще, рекомбинантных инбредных линий) строят *de novo* весьма подробные генетические карты с густым покрытием многими сотнями маркеров. Такова, например, работа Карилло с соавт. (Carrillo et al., 2014), которые в целях картирования генов количественных признаков (QTL), связанных с устойчивостью к аскохитозу, проанализировали набор рекомбинантных инбредных линий от одного скрещивания и создали карту, включающую 416 маркеров, связанных с нуклеотидными заменами в кодирующих генах, из которых 117 было добавлено ими *de novo*.

Проблема интеграции новых данных по картированию с полученными ранее и создания универсальной генетической карты гороха осознавалась с самого начала использования молекулярных подходов. К ее решению прилагаются значительные усилия (Gilpin et al., 1997; Weeden et al., 1998; Aubert et al., 2006; Bordat et al., 2011; Decarie et al., 2012; Smýkal et al., 2012). Так, в работе Bordat с соавт. (2011) задействованы данные из 6 различных популяций рекомбинантных инбредных линий, полученных на основе скрещивания 6 образцов; а на приведенном в ней консенсусе генетической карты стоят 180 SSR-маркеров, 133 RAPD-маркера, 6 RFLP-маркеров, 214 маркеров, связанных с кодирующими генами, но всего 3 морфологических маркера. Последующая карта того же коллектива (Duarte et al., 2014), основанная на 4 популяциях RIL, включала 730 маркеров, картированных ранее.

На смену подходу, связанному с рекомбинационными инбредными линиями, приходит дорогостоящий и непрямой, но зато быстрый подход, впервые разработанный на таком неблагодарном генетическом объекте, как человек, и получивший название «ассоциативное картирование» (Zhu et al., 2008). Он предполагает непрямое картирование, не требующее скрещиваний и гибридных популяций, на основе анализа неравновесия по сцеплению изучаемых признаков и генетических маркеров на больших массивах генотипированного и фенотипированного материала. Этот подход ограничивают такие факторы, как родственность исследуемого материала и плотность имеющихся маркеров. На горохе таких работ пока не проводилось, но предварительная оценка имеющегося материала свидетельствует о его пригодности для такой программы (Jing et al., 2007).

Старые долги

Следует признать, что в настоящее время частная генетика гороха в ее классическом виде – постановка на универсальную для данного объекта генетическую карту генов с известной функцией или фенотипическим проявлением – пришла в упадок. Одним из проявлений этого упадка является сохранение в течение вот уже 19 лет прискорбной ситуации, когда группы сцепления рекомбинационной генетической карты и хромосомы как цитогенетические объекты имеют различную нумерацию. Эта проблема была сформулирована, и две системы параллельно использованы в статье С. Тёмных и Н. Видена (Temnykh, Weeden, 1993). Целесообразность сохранения такой ситуации на тот момент состояла в недостаточной

уверенности объединения некоторых фрагментов групп сцепления. Это обстоятельство было отражено в пунктирных участках и пробелах в группах сцепления I, IV и VII на генетической карте гороха, опубликованной в том же выпуске журнала «Pisum Genetics» (Ellis et al., 1993). Однако с тех пор, благодаря применению молекулярных маркеров, 7 групп сцепления гороха были надежно установлены. В то же время сохранялись затруднения в цитологической идентификации 2 наиболее мелких хромосом (Hall et al., 1997; Smýkal et al., 2012). Их идентификация возможна с помощью FISH-технологий, в частности с использованием зонда PisTR-B (Fuchs et al., 1998; Neumann et al., 2002). Между тем фактически соответствие двух систем нумерации – хромосом (традиционно обозначаемых арабскими цифрами) и групп сцепления (обозначаемых римскими цифрами) – давно выяснено: 1 = VI, 2 = I, 3 = V, 4 = IV, 5 = III, 6 = II, 7 = VII (Fuchs et al., 1998; Ellis, Poyser, 2002; Smýkal et al., 2012). Однако столь долгожданный акт перенумерации одной из этих систем по нумерации другой до сих пор не осуществлен, как можно понять, по причине невозможности прийти к консенсусу в проблеме, достойной Буриданова осла, – какую из двух нумераций выбрать (Smýkal et al., 2012).

При этом существование двух параллельных номенклатур порождает реальные проблемы. Так, Л. Фучжун и С.А. Гостимский (1998) обсуждают противоречие между собственными и литературными данными относительно того, какие хромосомы вовлечены в 7 транслокаций стандартного набора Ламма: «К сожалению, неточности в идентификации хромосом у транслокационных линий гороха привели к противоречиям в определении хромосом, участвующих в обменах» (Фучжун, Гостимский, 1998. С. 1269). Они не обратили внимание на то, что в большинстве случаев это было противоречие между двумя системами нумерации, а не между разными наборами данных, имеющих биологический смысл.

В ожидании расшифрованного генома

В настоящее время, когда расшифровка геномов оказывается едва ли не рутинной процедурой, ядерный геном гороха до сих пор не прочитан. Ирония момента состоит также в том, что геном гороховой тли *Acyrthosiphon pisum* был просеквенирован еще в 2010 г. (The International Aphid Genomics Consortium ..., 2010). Во многом отставание связано с тем, что геном достаточно велик – примерно 4,42 пг на гаплоидный геном (Greilhuber, Ebert, 1994), что соответствует 4,45 млрд пар оснований (Dolezel, Greilhuber, 2010). Примерно на 40–60 % он состоит из некодирующих повторенных последовательностей (Macas et al., 2007; Novák et al., 2010), причем 20–33 % приходится только на ретротранспозон *Ogre*, принадлежащий к семейству LTR-ретротранспозонов *Ty3/gypsy* (Novák et al., 2010), что существенно усложняет сборку полного генома. Заметим, что на фоне родственных бобовых из трибы Fabaeae, таких как конские бобы или чина посевная, геном гороха достаточно мал, что находит свое отражение в вышеупомянутом небольшом размере хромосом, делающем горох неудобным цитогенетическим объектом. Таким образом, геном гороха слишком мал для цитогенетики, но слишком велик для легкого полногеномного секвенирования.

Однако ситуация близка к исправлению. Создан международный консорциум, который намерен просеквенировать полный геном гороха к 2016 г., к 150-летней годовщине со дня выхода эпохальной статьи Менделя, давшей начало генетике как науке (Mendel, 1866). Для этой цели созданы две библиотеки BAC-клонов (bacterial artificial chromosomes): коммерческого сорта Камеор и образца PI269818 (Coyne et al., 2007). Последний был выбран в связи с его устойчивостью к вирусной мозаике (Keller et al., 1998) и фузариозу (Smýkal et al., 2012). Данные библиотеки уже используются для более частных целей: так, с их помощью были идентифицированы два гена, исследовавшихся еще Менделем, – *a* (Hellens et al., 2010) и *tl* (Hofer et al., 2009). В то же время геном будет просеквенирован только у сорта Камеор. Хлоропластный геном гороха был впервые расшифрован в 2010 г. (Magee et al., 2010), 4 года спустя он был ресеквенирован у 5 контрастных форм гороха (Bogdanova et al., 2015).

Пока полный ядерный геном гороха остается недоступным, разработка частной генетики гороха с использованием молекулярных маркеров, связанных с кодирующими генами, делается на основе 1) последовательностей генов родственных видов бобовых, у которых прочитаны полные геномы, и 2) имеющихся последовательностей транскриптов генов гороха. В частности, традиционно использовались библиотеки EST-последовательностей (Gilpin et al., 1997). В последние годы для этой цели начали использовать полные транскриптомы, которые возможно получать и в отсутствие референсной последовательности генома (Franssen et al., 2011; Duarte et al., 2014).

К настоящему времени полные геномы прочитаны у трех модельных видов бобовых с очень маленькими геномами: *Medicago truncatula* (вид рода Люцерна, русского названия не имеет, триба Trifolieae), *Lotus japonicus* (лядвенец японский, триба Loteae, родственная Trifolieae), *Cicer arietinum* (нут бараний, триба Cicereae, родственная Fabaeae) и одного культурного растения, *Glycyne max* (соя, триба Faseoleae). Несмотря на то что все эти растения принадлежат к другим трибам (хотя Cicereae является сестринской для трибы Fabaeae (см. Яковлев, 1991)), их геномы демонстрируют неплохую синтению с геномом гороха (Choi et al., 2004; Kaly, 2004; Aubert et al., 2006; Bordat et al., 2011), причем заметная синтения прослеживается даже с геномами таких совсем не родственных растений, как виноград, тополь и папайя. По-видимому, геномы как минимум всех бобовых в достаточной мере синтенны. Этим обстоятельством

можно воспользоваться, например, для разработки CAPS-маркеров, густо покрывающих определенные фрагменты генетической карты гороха. Для этого в геноме *M. truncatula* (или других вышеназванных видов с известными геномами) ищутся ортологи генов гороха, маркирующих соответствующий фрагмент карты, функциональная природа которых известна. Затем во фрагменте генома люцерны, соответствующем фрагменту генетической карты гороха, выявляются кодирующие гены, занимающие подходящие позиции. На основе их первичной структуры разрабатываются праймеры, с которыми проводится полимеразная цепная реакция с геномной ДНК гороха в качестве матрицы. Обычно гомология первичной структуры генов люцерны и гороха оказывается достаточно высокой, чтобы праймеры, разработанные на основании генов люцерны, позволяли амплифицировать фрагменты генов гороха. Затем в амплифицированных фрагментах генов гороха ищутся полиморфные позиции, создающие сайты узнавания тех или иных полимераз рестрикции. В случаях, когда такой сайт обнаруживается, в нужный участок генетической карты гороха удается поставить молекулярный маркер, связанный с кодирующим геном.

Используя этот подход, Ф.А. Коновалов с соавторами насытили CAPS-маркерами генетическую карту группы сцепления III (Konovalov et al., 2005). В.С. Богданова с коллегами проделали то же для небольших фрагментов групп сцепления III и V, содержащих обнаруженные и исследуемые ими гены *Scs1* и *Scs2*, вовлеченные в конфликт ядра и пластид в отдаленных скрещиваниях гороха (Bogdanova et al., 2012). Путем секвенирования фрагментов выбранных ортологов генов люцерны, амплицифированных с ДНК вовлеченных в опыт родительских форм гороха и поиска полиморфизма в полученных первичных последовательностях, в работах Aubert с соавт. (2006), Bordat с соавт. (2011), Duarte с соавт. (2014) на генетическую карту гороха были поставлены соответственно 77, 51 и 730 новых маркеров, связанных с кодирующими генами. Количество «мостов», связывающих генетические карты гороха и люцерны, со временем стремительно росло: в 2006–2007 гг. их было 45 (Aubert et al., 2006) и 56 (Choi et al., 2004), в 2011 г. – 140 (Bordat et al., 2011), а в 2014 г. уже 1 252 (Duarte et al., 2014).

В работе коллектива французских ученых (Bordat et al., 2011) в полной мере были использованы два источника маркеров гороха, связанных с кодирующими генами, – последовательности транскриптов гороха и геномов родственных видов. Было проанализировано 30 156 последовательностей ДНК гороха, доступных на тот момент в базах данных, что позволило распознать последовательности, относящиеся к 13 747 уникальным генам. Из них для 5 460 были выявлены ортологи в геноме *Medicago truncatula*, причем 140 из них стояли на полученной в той же работе консенсусной рекомбинационной карте гороха. С помощью анализа синтении геномов гороха, люцерны, лядвенца, сои и тополя для этих 5 460 генов были предсказаны преположительные позиции на консенсусной генетической карте гороха, на основе чего была разработана интерактивная база данных, позволяющая вводить произвольную последовательность гороха и с высокой вероятностью получать ее предположительную позицию на карте (http://www.thelegumeportal.net/pea_mtr_translational_toolkit). Такой подход получил название «translational genomics», которое в русском переводе обречено оказаться жертвой «ложных друзей переводчика», а именно на неверный перевод: «трансляционная геномика». В английском оригинале слово «translation» подразумевалось в обыденном значении: «перевод с одного языка на другой», а вовсе не в значении трансляции как молекулярно-биологического процесса. Подобная история произошла, например, с широко известным методологическим термином «фальсификация научных теорий», под которой подразумевалось не что иное, как просто «опровержение».

В дальнейшем тот же коллектив авторов в целях генетического картирования получил полный транскриптом гороха (Duarte et al., 2014). Он включал транскрипты 68 тыс. генов, из которых 41 тыс. была аннотирована на основе их ортологов в геноме люцерны; в 35 тыс. из них были найдены замены, 1 340 были впервые поставлены на консенсусную карту.

Чуть раньше, в 2011 г., независимо от предыдущего коллектива и вне задачи картирования, транскриптом из различных тканей гороха, включающий чуть более 80 тыс. генов, был получен немецко-американским коллективом авторов (Franssen et al., 2011).

Почти на 10 лет раньше транскриптома начал анализироваться протеом гороха, в частности при изучении онтогенеза надземных вегетативных органов (Schiltz et al., 2004), регуляции белкового состава семян (Bourgeois et al., 2009, 2011), симбиоза с азотфиксирующими бактериями (Saalbach et al., 2002), а также устойчивости к холодовому стрессу (Dumont et al., 2011), мучнистой росе (Curto et al., 2006), аскохитозу (Castillejo et al., 2010) и заразихе (Castillejo et al., 2004).

К «модным» современным подходам, успешно примененным к гороху, относятся несколько методов, объединяемых под еще одним излишне громким названием «обратная генетика». Один из таких подходов, осуществленных на горохе (Dalmais et al., 2008), называется «TILLING» и включает химическую индукцию большого числа мутаций и мутантных линий с последующей идентификацией участков ДНК, затронутых каждой из мутаций, а также фенотипирование полученных мутантных линий. Таким образом, исследователь может выбрать из всего пула таких линий мутации в необходимых ему генах, получить информацию о том, в чем именно состоят эти мутации на уровне ДНК и оценить их влияние на фенотип. К 2012 г. этот набор включал

4 817 линий, фенотип 1 840 из которых был охарактеризован и 464 мутации были идентифицированы на уровне ДНК (Smýkal et al., 2012). Другим подходом обратной генетики, реализованным на горохе, является вирус-индуцированный генный сайленсинг с использованием вируса раннего побурения (Constantin et al., 2004). В частности, с помощью этого подхода были идентифицированы гены гороха, ответственные за арбускулярную микоризу (Gronlund et al., 2010). К недостаткам гороха относится крайняя трудность его генетической трансформации с помощью агробактериальных плазмид, которая удается буквально в считанных лабораториях мира (Somers et al., 2003; Svabova et al., 2005).

В целом можно сказать, что в последнее время горох, несмотря на заметное отставание, наконец-то становится в один ряд с культурными растениями, хорошо изученными в молекулярно-генетическом отношении. Недостает лишь последнего штриха – расшифрованного полного ядерного генома. А пока горох оказывается на одном уровне изученности с пшеницей и, скорее всего, обгонит ее, ввиду ее огромного генома и амфиплоидной природы.

Научные плоды гороха

Создание генетики

Модельный генетический объект ценен не сам по себе, а как инструмент получения фундаментальных знаний о природе наследственности. Такова дрозофила, не имеющая практического значения (кроме некоторого вреда в виноделии), но позволившая подтвердить хромосомную теорию наследственности и подарившая нам генетические карты и др. (Юрченко и др., 2015). В этом отношении вклад гороха в развитие фундаментальных знаний беспрецедентен, так как он подарил нам саму генетику как науку, о чем знает любой школьник. В отличие от дрозофилы горох имеет огромное практическое значение, и развитие его генетики весьма востребовано в селекции. Однако любой генетический объект всегда имеет фундаментальное научное значение. Какие же еще общебиологические проблемы помог решить старейший из них?

С изучения гибридов гороха начались не только генетика, но и цитогенетика. Как уже отмечалось выше, у этого объекта была обнаружена первая транслокация в истории генетики (Hammarlund, 1923). В цитогенетике горох почти сразу же уступил пальму первенства дрозофиле, по счастливой случайности оказавшейся обладательницей политенных хромосом. Как следствие, в цитогенетическом отношении горох остался «недоисследованным».

Генетика симбиоза растения и бактерии

Среди всех модельных генетических объектов только горох обладает ярчайшим примером симбиоза между эукариотами и прокариотами – симбиотической азотфиксацией, которая осуществляется бактериальным симбионтом *Rhizobium leguminosarum* в специальных органах – клубеньках, развитие которых, однако, индуцируется симбионтом бактериальным. Горох также способен к образованию арбускулярной микоризы. Обе способности свойственны всем бобовым растениям, но среди них только горох является модельным генетическим объектом в полном смысле слова. В мире проведен огромный объем генетических и молекулярных исследований обоих участников симбиоза в их взаимодействии, эти работы хорошо известны. В России такие работы проводятся под руководством И.А. Тихоновича в Институте сельскохозяйственной микробиологии РАСХН, а также под руководством К.К. Сидоровой в Институте цитологии и генетики СО РАН. Любая попытка обзора этих работ привела бы к неоправданному увеличению объема данной статьи, поэтому ограничимся ссылкой на один краткий обзор ведущих мировых специалистов (Борисов и др., 2011). Эти исследования даже послужили основой для претензии на создание новой науки – симбиогенетики (Тихонович, Проворов, 2012).

Изменчивость генов гистона H1, ее влияние на фенотип и роль в эволюции

Горох оказался наилучшей моделью для изучения фенотипических эффектов изменчивости по такому облигатному компоненту эукариотического хроматина, как гистон H1, проводившегося коллективом под руководством В.А. Бердникова, результаты которого кратко рассмотрены ниже. В отличие от коровых гистонов, гистон H1 отличается большой эволюционной пластичностью, являясь одним из самых изменчивых белков эукариот. Эта изменчивость преимущественно приурочена к протяженному положительно заряженному С-терминальному гидрофильному домену, взаимодействующему с отрицательно заряженной линкерной ДНК и, тем самым, являющемуся важной функциональной частью молекулы. Высокий уровень изменчивости обеспечивается, в частности, присутствием в данном домене коротких повторов и мотивов, склонных генерировать делеции и дупликации, в том числе у гороха (Trusov et al., 2004; Kosterin et al., 2012; Zaytseva et al., 2012, 2015). Как обязательный и в то же время весьма лабильный компонент эукариотического хроматина гистон H1 является элементом молекулярной среды, в которой происходит действие всех, в том числе и специфических, генных активаторов и репрессоров. Изменения в структуре молекулы, влияющие либо на силу связывания гистона H1 с ДНК, либо на характер его взаимодействия с другими белками хроматина (в том числе и с другими, паралогичными субтипами того же гистона H1), могли бы влиять на дифференциальную экспрессию самых разных генов. Таким образом, изменчивость генов гистона H1 могла бы оказывать непредсказуемое влияние на самые разные количественные признаки организмов, определяемые

многими генами, делая эти гены «полигенами общего действия» (Berdnikov et al., 1993a, b).

Это предположение и было с успехом проверено на горохе, оказавшемся для этой цели идеальной экспериментальной моделью. Выяснилось, что горох имеет не менее 7 неаллельных субтипов гистона H1, кодируемых уникальными генами, каждый из которых проявляет аллельную изменчивость, регистрируемую даже на уровне электрофоретической подвижности их белковых продуктов (Berdnikov et al., 1993a; Kosterin et al., 1994). Наиболее подвижный субтип H1-7 характерен тем, что присутствует только в хроматине активно делящихся тканей, тогда как по мере старения дифференцированных тканей хроматин их клеток несколько обогащается наименее подвижным и наиболее обильным субтипом H1-1, а также субтипом H1-6 (Kosterin et al., 1994). Благодаря тому что горох является достаточно хорошо изученным генетическим объектом, эти гены были картированы в три генетических локуса на двух хромосомах; один из этих локусов представляет собой кластер генов субтипов H1-2–H1-6, расположенных в пределах 0,1 сМ (Розов и др., 1986; Kosterin et al., 1994). Путем беккроссов (в том числе на сверхскороспелую линию Спринт-1) либо путем отбора одного гетерозиготного растения в ряду поколений было создано несколько пар и серий почти изогенных линий, различающихся аллельными вариантами тех или иных субтипов H1, которые сравнивались по многим количественным признакам в выровненных условиях теплицы. Как и ожидалось, замена аллельных вариантов отдельных субтипов гистона H1 оказывала небольшой, но статистически значимый эффект на некоторые количественные признаки общего характера (Bogdanova et al., 1994, 2007; Berdnikov et al., 1999a). Эффекты на более конкретные признаки, которые в задействованных экспериментальных моделях были связаны с низким уровнем экспрессии по гомеозисным генам, контролирующим морфологию листа, оказались еще менее предсказуемыми: от 20 % эффекта в случае проявления гена *Tl* (в норме направляющего развитие парных органов терминального отдела листа в усики) в гемизиготе (Berdnikov et al., 1999a), до полного отсутствия эффекта в случае «подтекающей» мутации uni^{tac} гена *Uni* (в норме ответственного за развитие сложного листа с парными органами на рахисе).

Удалось проследить следующую закономерность: удлинение С-терминального домена, а следовательно, и усиление сродства с ДНК у субтипа H1-7, специфичного для активно делящихся тканей, оказывало положительный эффект на скорость роста растения (Bogdanova et al., 2007), тогда как его удлинение у субтипа H1-6, накапливающегося в хроматине неделящихся тканей, воздействовало на скорость роста отрицательно (Kosterin et al., 2012). Возможная интерпретация этого наблюдения довольно прозрачна: увеличение присутствия H1-7 в хроматине «омолаживает» его, способствуя экспрессии генов, обслуживающих митотический цикл, а увеличение присутствия H1-6 «старит» хроматин; аллельные же варианты каждого из субтипов различаются по сродству к ДНК и тем самым влияют на их представленность в хроматине.

Недостатком этих работ была существенная – до 20 сМ – теоретически рассчитанная длина участка вокруг генов гистона H1, не затронутая изогенизацией, которая заведомо включала десятки неизвестных генов помимо генов гистона H1, аллели которых могли нести различия, характерные для исходных линий. Данный недостаток был преодолен в опытах с использованием пар изогенных линий родственников гороха – чечевицы и чины посевной, у которых аномальный мутантный аллель гистона H1 имел недавнее мутантное происхождение (Berdnikov et al., 2003a).

На горохе было получено также свидетельство роли изменчивости гистона H1 в ходе «культурной эволюции» – эволюции культивируемого растения под действием естественного отбора в условиях примитивного традиционного земледелия вне влияния целенаправленной селекции (Бердников и др., 1989). Частота одного из аллельных вариантов субтипа H1-5 в региональных выборках примитивных культивируемых форм гороха обратно коррелировала с суммой температур вегетационного периода, так что наиболее обогащенными этим вариантом оказались выборки из Северной России, Таджикистана и Афганистана (Бердников и др., 1989; Berdnikov, 1993a). На уровне первичной структуры ДНК было обнаружено, что во всех региональных выборках, насколько бы они ни были удалены географически, присутствует идентичный аллель, по-видимому, распространившийся по Старому Свету в ходе миграции культур и поддержанный естественным отбором в регионах с холодным климатом (Zaytseva et al., 2012).

Эти исследования сопровождались получением попутных результатов: во-первых, привели к существенному уточнению рекомбинационной генетической карты гороха, во-вторых, способствовали расширению знаний об изменчивости генов гистона H1. Так, у бобовых растений трибы Fabaeae в гене субтипа H1-1, продукт которого составляет около половины всего гистона H1, была обнаружена регулярная зона, кодирующая совершенный тандемный повтор пентапептида Ala-Ala-Lys-Pro-Lys (с заменами в синонимичных позициях), число копий которого варьирует за счет явления, названного авторами внутригенной конверсией (Berdnikov et al., 2003a; Trusov et al., 2004). Достаточно неожиданным оказался тот факт, что значительная внутривидовая изменчивость по субтипам H1-1 и H1-6 не сопровождается столь же значительной межвидовой изменчивостью у видов из близких родов *Lathyrus*, *Vicia* и *Lens*. Таким образом, эта изменчивость выглядит возникающей *de novo* в одном и том же довольно широком диапазоне, разрешенном в трибе Fabaeae (Berdnikov

et al., 2003a; Trusov et al., 2004; Kosterin et al., 2012). В-третьих, гены гистонов H1 были протестированы на горохе в качестве новых молекулярных маркеров для реконструкции филогении (Zaytseva et al., 2012, 2015). Последовательность гена минорного субтипа H1-5 оказалась весьма информативной, успешно разрешив филогению рода *Pisum*, причем как на видовом, так и на внутривидовом уровнях (Zaytseva et al., 2012), тогда как ген специфичного для молодых тканей субтипа H1-7 оказался неэффективным в этом качестве, по-видимому, за счет более жестких функциональных ограничений на его продукт (Zaytseva et al., 2015).

Конфликт ядра и цитоплазмы

В скрещиваниях диких и культурных форм гороха посевного (*Pisum sativum* L.), а также *P. sativum* и *P. fulvum* Sibth et Smith был зафиксирован конфликт ядра и цитоплазмы, обычно проявляющийся в частичной стерильности гибридов первого поколения, но иногда имеющий и яркое фенотипическое проявление в виде мозаичного недоразвития листовых органов и хлорофилльной пигментации у гибридов первого поколения, полученных в одном из направлений реципрокных скрещиваний (Лутков, 1930; Ben-Ze'ev, Zohary, 1973; Bogdanova, Berdnikov, 2001; Kosterin, Bogdanova, 2014). В.С. Богдановой с коллегами был проведен детальный генетический анализ этого явления (Богданова, Костерин, 2006; Bogdanova, 2007; Богданова, Галиева, 2009; Bogdanova et al., 2009, 2012, 2014), а затем и сравнительный анализ пластидных геномов (Bogdanova et al., 2015). В результате данный конфликт удалось с высокой степенью вероятности связать с несколькими ядерными и одним пластидным генами, кодирующими субъединицы важнейшего ферментного комплекса – пластидной гетеромерной формы ацетил-коА-карбоксилазы (Bogdanova et al., 2015), который осуществляет первую стадию в биосинтезе жирных кислот. Ядерный ген *Scs1*, являющийся главным участником конфликта со стороны ядра, по-видимому, кодирует белок-переносчик биотина и карбоксила, а со стороны пластид в конфликте участвует ген *accD*, кодирующий β-субъединицу карбоксилтрансферазы (Sasaki, Nagano, 2004). При этом для гена *accD* характерен высокий уровень изменчивости, в частности, связанный с делециями и дупликациями коротких повторенных участков. Возможно, некоторые из них являются детерминантами функциональной связи с субъединицами, кодируемыми в ядре (Bogdanova et al., 2015).

Таким образом, впервые был открыт случай, когда конфликт ядерного и цитоплазматического геномов вызван нарушениями работы мультимерного ферментного комплекса, субъединицы которого кодируются разными клеточными геномами. Ранее такой механизм конфликта ядра и цитоплазмы признавался весьма вероятным, но описан не был (Burton et al., 2013). Тем самым, у гороха данный ферментный комплекс, пластидная гетеромерная ацетил-коА-карбоксилаза, оказывается уникальной генетической моделью. С одной стороны, она позволяет реконструировать молекулярные взаимодействия между субъединицами методами генетического анализа, с другой, на этой основе можно предсказывать совместимость ядерных и цитоплазматических генов от отдаленных форм гороха, что может быть важно для вовлечения генетического разнообразия диких форм гороха в селекционный процесс.

Возникновение В-хромосом у растений

Горох послужил экспериментальной моделью, воспроизводящей первые этапы возникновения сверхчисленных В-хромосом растений от третичных трисомиков, возникающих, согласно гипотезе В.А. Бердникова, вследствие неправильного расхождения хромосом в мейозе гетерозигот по реципрокным транслокациям (Berdnikov et al., 2003b). Теоретическая модель опирается на перекрестное опыление, а выбранная экспериментальная модель – горох – самоопылитель и предсказуемо не имеет В-хромосом. Однако эксперимент включал в себя контролируемый перекрест посредством скрещиваний. Тестируемая гипотеза предполагала, что в малых популяциях третичная трисомия могла спасать растения от летальных мутаций, возникших в районе генома, перекрытых добавочной хромосомой. В дальнейшем, в случае исключения кроссинговера с хромосомами основного набора добавочная хромосома теряет свое генетическое содержание вследствие диплоидизации при спонтанном мутировании лишних копий генов. (Под диплоидизацией понимается приближение к 2 средней дозы функциональных аллелей по локусам затронутого трисомией района генома – по мере мутационного «выключения» одного из трех аллелей, изначально имевшихся у трисомика.) На основе транслокации Хаммерлунда, дающей небольшую обменную хромосому, морфологической мутации *cri* и целенаправленно полученных спорофитных леталей, перекрытых дополнительной хромосомой, была создана стабильная, размножающаяся в чистоте, трисомная линия гороха Trust (Berdnikov et al., 1999b, 2003b). Отбор этой линии на повышение семенной продуктивности и жизненности растений оказался весьма эффективен (Костерин и др., 2008), как и предполагалось моделью, исходящей из того, что любая аморфная или гипоморфная мутация по генам, представленным в трех копиях, ведет к диплоидизации и уменьшает генный дисбаланс.

Эксперимент продолжается, причем для ускорения диплоидизации за счет индуцированных мутаций добавлен химический мутагенез. В качестве конечного результата предполагается получить генетически пустую «искусственную В-хромосому», которая могла бы спонтанно менять свою дозу в кариотипе. Насыщение ее генами устойчивости к патогенам методами генетической трансформации превратило бы ее в уникальный вектор,

способный в ответ на пресс патогенов накапливаться в кариотипе за счет естественного (!) отбора, действующего непосредственно в процессе культивирования (В.А. Бердников. Неопубл.). Заметим, что такой вектор можно создать на основе естественных В-хромосом у тех объектов, у которых таковые имеются, например у кукурузы и ржи.

Архитектоника сложного листа

Горох обладает непарноперистым сложным листом, структура которого дополнительно усложнена трансформацией дистальных парных и непарного терминального листочков в усики (потеря листовой пластинки, приобретение центральной жилкой способности обвивать предметы) и гипертрофией листовидных прилистников, которые по размеру превосходят листочки. В этом горох имеет огромное преимущество по сравнению с «растительной дрозофилой» – арабидопсисом, который имеет простые листья и не может служить генетической моделью для изучения генетической базы усложнения листовой морфологии, характерной для столь многих растений, включая культурные. Генетический контроль архитектоники сложного листа опирается на гены, относящиеся к гомеозисным, т. е. переключающие программы развития зачатков в направлении тех или иных органов (Gourlay et al., 2000). Так, мутации tl^w (Blixt, 1972) и *tl2* (Berdnikov, Gorel, 2001, 2005) формально превращают усики в листочки. Мутация *afila* заменяет листочки на ветвящиеся усики, соответствующие терминальным доменам нормального листа (Gourlay et al., 2000) (хотя часто упрощенно говорится, что она превращает листочки в усики). Мутации *coch* (Ferguson, Reid, 2005; Couzigou et al., 2012), *sil* (Husbands et al., 2003) и в особенности комбинация мутаций *sil* и *ins2* (Berdnikov, Gorel, 2004) превращают прилистник в самостоятельный сложный лист с парой прилистников и центральным рахисом, несущим парные органы, в результате чего каждый узел, по сути, получает мутовку из более чем одного сложного листа. Кроме того, мутация *coch* также приводит к эктопическому появлению корней на узелках. Аморфные мутации по всем генам, контролирующим развитие сложного листа, имеют яркие фенотипические проявления, а их различные сочетания приводят к неожиданным вариантам морфологии, далеко выходящим за пределы, характерные для семейства Fabaceae в норме (Blixt, 1972). Комбинацией мутаций tl^w и *ins2* удалось рекапитулировать у гороха дважды перистый лист без усиков (Berdnikov et al., 2000), считающийся характерным для предков порядка Fabales (Яковлев, 1991), а мутация *uni* приводит к формированию ложнопростого листа (Hofer, Ellis, 1996), подобного листу тополодочника однолистного (*Gueldenstaedtia monophylla* Fisch.). Некоторые локусы, контролирующие развитие сложного листа гороха, были впервые обнаружены в ИЦиГ СО РАН в исследованиях под руководством В.А. Бердникова: *adt* (*air dots*) (Gorel et al., 2002), *ins2* (*insecatus2*) (Berdnikov et al., 2000), *tl2* (*tendrilless2*) (Berdnikov, Gorel, 2001, 2005).

Оказалось, что многие гены, ответственные за архитектонику сложного листа, ортологичны гомеозисным генам, хорошо известным из генетики развития арабидопсиса и львиного зева. Так, ген *Uni* (*Unifoliata*), ответственный за развитие сложного листа, а именно за способность листовой меристемы порождать парные органы в акропетальной последовательности, оказался ортологом *FLORICAULA* львиного зева и *LEAFY* арабидопсиса – гомеозисных генов, экспрессия которых в апикальной меристеме этих растений переключает ее с развития в сторону побега на развитие в сторону цветка. Примечательно, что этот ген направляет развитие листа по сложному типу только у представителей так называемой IRLC-ветви бобовых (группа триб травянистых бобовых, куда относится и горох, утратившая инвертированный повтор в хлоропластном геноме).

В данной группе ген *Uni* перехватывает эту роль у генов класса *KNOTTED1*, выполняющих ее у остальных бобовых и прочих растений (Champagne et al., 2007). Ген *Tl* (*Tendril-less*) оказался гомеодомен-содержащим лейциновым зиппером класса 1, а его экспрессия стимулируется геном *Uni*, для чего он имеет вблизи точки инициации так называемый мотив связывания с *LEAFY* (Hofer et al., 2009). Ген *Coch* (*Cochleata*) ортологичен генам *BOP1* и *BOP2* (*BLADE-ON-PETIOLE1-2*) арабидопсиса (Couzigou et al., 2012). Аморфная мутация гена *Cri* (*Crispoid*) у гороха размывает границы домена прилистников, придавая рахису крылатость и снабжая его добавочными прилистничками у основания листочков, а также нарушает идентичность адаксиальной поверхности листочков. Этот ген оказался ортологичен гену *PHAN* (*PHANTASTICA*). Экспрессия этого гена необходима для развития листовой пластинки и идентичности ее адаксиальной поверхности у львиного зева, томата и арабидопсиса, но не у гороха (Tattersall et al., 2005).

Интересно, что развитие листа гороха как сложного зависит от ортолога *KNOTTED1* и не зависит от ортолога *PHAN*, в то время как у томата, имеющего ортологи тех же двух генов, дело обстоит ровно наоборот: не зависит от ортолога *KNOTTED1* и зависит от ортолога *PHAN*. Все эти результаты подчеркивают очень важное обстоятельство: в разных семействах сосудистых растений сходные конструктивные решения в архитектонике и развитии листа достигаются разными схемами взаимодействия одного и того же набора ортологичных гомеозисных генов.

Фенотипы, наблюдаемые в исследованиях по генетике архитектоники сложного листа гороха, являются одними из самых ярких и наглядных в генетике развития. При этом они демонстрируют более сложную картину взаимодействия генов (в частности, менее очевидное разделение кадастровой и селекторной функции генов),

чем гены знаменитого «ABC флорогенеза» – генетического контроля идентичности органов цветка. Кстати, у гороха этот контроль идентичен таковому арабидопсиса и львиного зева, тем самым подтверждая монофилию двудольных растений.

Исследования по генетике сложного листа получили неожиданное и весьма полезное практическое применение начиная с работ Б. Сноуда (Snoad, 1974). Благодаря этим работам, многие коммерческие сорта гороха в экономически развитых странах в настоящее время созданы на «безлистной» основе, имея генотип рецессивных мутаций *af* (*afila*, «листочки вместо усиков») и *le* (карликовость за счет укороченных междоузлий). Мутация *af* замещает листочки сложного листа на ветви рахиса, соответствующие его терминальному домену, несущему не листочки, а усики.

Как следствие, сложный лист несет на ветвящемся рахисе множество усиков, но лишен листочков. Влияние гена *afila* не распространяется на крупные листовидные прилистники, характерные для гороха (но не для других бобовых, за немногими исключениями). У таких растений прилистники берут на себя основную часть фотосинтеза. Продуктивность их не страдает, кроме того, «безлистный горох» имеет меньший удельный вес соломы и более устойчив к засухе.

Однако наиболее важно то, что он получает неожиданное агротехническое преимущество: клубок переплетенных усиков наподобие перекати-поля формирует упругий каркас, благодаря которому побеги располагаются вертикально и не полегают на поле. Таким образом, был преодолен «первородный грех» гороха – слабый стебель, неспособный самостоятельно поддерживать вес побегов. С таким фенотипом с изумлением столкнулись многие наши соотечественники, решившие вырастить эти семена гороха из США.

Благодарности

Работа поддержана бюджетным проектом VI.53.1.3 и грантом РФФИ 13-04-00516а. Автор благодарен И.К. Захарову за ценные замечания.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Бердников В.А., Богданова В.С., Розов С.М., Костерин О.Э. Формирование многообразия генов гистона H1 в ходе культурной эволюции гороха. Вавиловское наследие в современной биологии. М.: Наука, 1989:72-89.

Богданова В.С., Галиева Э.Р. Нарушения мейоза как проявление ядерно-цитоплазматической несовместимости при скрещивании подвидов посевного гороха. Генетика. 2009;45(5):711-716.

Богданова В.С., Костерин О.Э. Случай аномального наследования хлоропластов в скрещиваниях посевного гороха с участием одной из диких форм. Докл. АН. 2006;406(2):256-259.

Борисов А.Ю., Штарк О.Ю., Жуков В.А., Наумкина Т.С., Пинаев А.Г., Ахметова Г.А., Ворошилова В.А., Овчинникова Е.С., Рычагова Т.С., Цыганов В.Е., Жернаков А.И., Кузнецова Е.В., Гришина О.А., Сулима А.С., Федорина Я.В., Чеботарь В.К., Бисселинг Т., Лемансо Ф., Джианинази-Пирсон В., Ратэ П., Санхуан Х., Стоугаард Й., Берг Г., Макфи К., Эллис Н., Тихонович И.А. Взаимодействие бобовых с полезными почвенными организмами: от генов растений к сортам. С.-х. биология. 2011;3:41-47.

Генетика – селекции растений. Районированные сорта и перспективные формы сельскохозяйственных растений Института цитологии и генетики СО АН СССР за 30 лет. Проспект (Ред. В.К. Шумный). Новосибирск, 1987.

Даль В.И. Толковый словарь живого великорусского языка. М.: Рус. язык, 1955;1.

Костерин О.Э., Богданова В.С., Горель Ф.Л., Бердников В.А. Трисомики гороха (*Pisum sativum* L.) демонстрируют легкий ответ на отбор на повышение плодовитости. Докл. АН. 2008;423(3):417-420.

Левицкий Г.А. Морфология хромосом. Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1931;27:103-173.

Лутков А.Н. Межвидовые гибриды *Pisum humile* Boiss. × *Pisum sativum* L. Тр. Всесоюз. конгр. по генетике, селекции и семеноводству. Л., 1930;2:353-365.

Розов С.М., Богданова В.С., Бердников В.А. Различия в хромосомной локализации генов, кодирующих фракции гистона H1 гороха. Генетика. 1986;22:2159-2166.

Тихонович И.А., Проворов Н.А. Развитие подходов симбиогенетики для изучения изменчивости и наследственности надвидовых систем. Генетика. 2012;48:437.

Фучжун Л., Гостимский С.А. Исследования транслокаций у гороха. Генетика. 1998;34(9):1269-1276.

Юрченко Н.Н., Иванников А.В., Захаров И.К. История открытий на дрозофиле – этапы развития генетики. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):39-49.

Яковлев Г.П. Бобовые земного шара. Л.: Наука, 1991.

Aubert G., Morin J., Jacquin F., Loridon K., Quillet M.C., Petit A., Rameau C., Lejeune-Hénaut I., Huguet T., Burstin J. Functional mapping in pea, as an aid to the candidate gene selection and for investigating synteny with the model legume. Medicago truncatula. Theor. Appl. Genet. 2006;112:1024-1041.

Baranger A.G., Aubert G., Arnau G., Lainé A.L., Deniot G., Potier J., Weinachter C., Lejeune-Hénaut I., Lallemand J., Burstin J. Genetic diversity within *Pisum sativum* using protein – and PCR based markers. Theor. Appl. Genet. 2004;108:1309-1321.

Bastianelli D., Grosjean F., Peyronnet C., Duparque M., Regnier J.M. Feeding value of pea (*Pisum sativum*, L.). 1. Chemical composition of different categories of pea. Anim. Sci. 1998;67:609-619.

Berdnikov V.A., Bogdanova V.S., Gorel F.L., Kosterin O.E., Trusov Y.A. Large changes in the structure of the major histone H1 subtype result in small effects on quantitative traits in legumes. Genetica. 2003a;119:167-182.

Berdnikov V.A., Bogdanova V.S., Rozov S.M., Kosterin O.E. Geographic patterns of histone H1 allelic frequencies formed in the course of *Pisum sativum* L. (pea) cultivation. Heredity. 1993a;71:199-209.

Berdnikov V.A., Gorel F.L. A mutation, *tl2*, in pea (*Pisum sativum* L.) affects leaf development only in the heterozygous state. Theor. Appl. Genet. 2005;110:1086-1091.

Berdnikov V.A., Gorel F.L. Combination of mutations *sil* and *ins2* can cause conversion of stipules into compound leaves. Pisum Genet. 2004;36:3-5.

Berdnikov V.A., Gorel F.L. *Tl2*, a new locus resembling *Tl* in action. Pisum Genet. 2001;33:1-4.

Berdnikov V.A., Gorel F.L., Bogdanova V.S., Kosterin O.E. Interaction of a new leaf mutation *ins2* with *af, unitac* and tl^w. Pisum Genet. 2000;32:9-12.

Berdnikov V.A., Gorel F.L., Bogdanova V.S., Kosterin O.E., Trusov Y.A., Rozov S.M. Effect of a substitution of a short chromosome segment carrying a histone H1 locus on expression of the homeiotic gene *Tl* in heterozygote in the garden pea *Pisum sativum* L. Genet. Res. 1999a;70:93-109.

Berdnikov V.A., Gorel F.L., Kosterin O.E. Two simultaneously induced lethal mutations provide a system for automatic reproduction of a heterozygote for the Hammarlund translocation. Pisum Genet. 1999b;31:1-4.

Berdnikov V.A., Gorel F.L., Kosterin O.E., Bogdanova V.S. Tertiary trisomics in the garden pea as a model of B chromosome evolution in plants. Heredity. 2003b;91:577-583.

Berdnikov V.A., Rozov S.M., Temnykh S.V., Gorel' F.L., Kosterin O.E. Adaptive nature of interspecies variation of histone H1 in insects. J. Mol. Evol. 1993b;36:497-507.

Blixt S. Cytology of Pisum. II. The normal karyotype. Agr. Hortique Genet. 1958;16:221-237.

Blixt S. Mutation genetics in *Pisum.* Agr. Hortique Genet. 1972;30: 1-294.

Bogdanova V.S. Inheritance of organelle DNA markers in a pea cross associated with nuclear-cytoplasmic incompatibility. Theor. Appl. Genet. 2007;114:333-339.

Bogdanova V.S., Berdnikov V.A. Observation of the phenomenon resembling hybrid dysgenesis in a wild pea subspecies *Pisum sativum* ssp. *Elatius.* Pisum Genet. 2001;33:5-8.

Bogdanova V.S., Galieva E.R., Kosterin O.E. Genetic analysis of nuclear-cytoplasmic incompatibility in pea associated with cytoplasm of an accession of wild subspecies *Pisum sativum* subsp. *elatius* (Bieb.) Schmahl. Theor. Appl. Genet. 2009;118:801-809.

Bogdanova V.S., Galieva E.R., Yadrikhinskiy A.K., Kosterin O.E. Inheritance and genetic mapping of two nuclear genes involved in nuclear-cytoplasmic incompatibility in peas (*Pisum sativum* L.). Theor. Appl. Genet. 2012;124:1503-1512.

Bogdanova V.S., Kosterin O.E., Berdnikov V.A. Phenotypic effect of substitution of allelic variants for a histone H1 subtype specific for growing tissues in the garden pea (*Pisum sativum* L.). Genetica. 2007;130:61-72.

Bogdanova V.S., Kosterin O.E., Yadrikhinskiy A.K. Wild peas vary in their cross-compatibility with cultivated pea (*Pisum sativum* subsp. *sativum* L.) depending on alleles of a nuclear-cytoplasmic incompatibility locus. Theor. Appl. Genet. 2014;127:1163-1172.

Bogdanova V.S., Rozov S.M., Trusov Y.A., Berdnikov V.A. Phenotypic effect of substitutions of short chromosomal segments containing different alleles of histone H1 genes in garden pea (*Pisum sativum* L.). Genet. Res. 1994;64:35-41.

Bogdanova V.S., Zaytseva O.O., Mglinets A.V., Shatskaya N.V., Kosterin O.E. , Vasiliev G.V. Nucleic-cytoplasmic conflict in pea (*Pisum sativum* L.) is associated with nuclear and plastidic genes encoding Acetyl-CoA carboxylase subunits. PLoS One. 2015;10(3). 10.1371/journal.pone.0119835

Bordat A., Savois V., Nicolas M., Salse J., Chauveau A., Bourgeois M., Potier J., Houtin H., Rond C., Murat F., Marget P., Aubert G., Burstin J. Translational genomics in legumes allowed placing in silico 5460 unigenes on the pea functional map and identified candidate genes in *Pisum sativum* L. G3: Genes, Genomes, Genetics. 2011;1:93-103.

Bourgeois M., Jacquin F., Savois V., Sommerer N., Labas V., Henry C., Burstin J. Dissecting the proteome of pea mature seeds reveals the phenotypic plasticity of seed protein composition. Proteomics. 2009;9:254-271.

Bourgeois M., Jacquin F., Cassecuelle F., Savois V., Belghazi M., Aubert G., Quillien L., Huart M., Marget P., Burstin J. A PQL (protein quantity loci) analysis of mature pea seed proteins identifies loci determining seed protein composition. Proteomics. 2011;9:1581-1594.

Burton R.S., Pereira R.J., Barreto F.S. Cytonuclear genomic interactions and hybrid breakdown. Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst. 2013;44:281-302.

Carrillo E., Satovic Z., Aubert G., Boucherot K., Rubiales D., Fondevilla S. Identification of quantitative trait loci and candidate genes for specific cellular resistance responses against *Didymella pinodes* in pea. Plant Cell Rep. 2014;33:1133-1345.

Castillejo M.A., Amiour N., Gaudot E.D., Rubiales D., Jorrín J.V. A proteomic approach to studying plant response to crenate broomrape (*Orobanche crenata*) in pea (*Pisum sativum*). Phytochemistry. 2004;65:1817-1828.

Castillejo M.A., Curto M., Fondevilla S., Rubiales D., Jorrín J.V. Two-dimensional electrophoresis based proteomic analysis of the pea (*Pisum sativum*) in response to *Mycosphaerella pinodes.* J. Agric. Food Chem. 2010;58:12822-12832.

Champagne C.E.M., Goliber C.E., Wojciechowski M.F., Mei R.W., Townsley B.T., Wang K., Paz M.M., Geeta R., Sinha N.R. Compound leaf development and evolution in the legumes. Plant Cell. 2007;19:3369-3378.

Cheghamirza K., Koveza O., Konovalov F., Gostimsky S. Identification of RAPD markers and their use for molecular mapping in pea (*Pisum sativum* L.). Cell. Mol. Biol. Lett. 2002;7:649-655.

Choi H.K., Mun J.H., Kim D.J., Zhu H., Baek J.M., Mudge J., Roe B., Ellis N., Doyle J., Kiss G.B., Young N.D., Cook D. Estimating genome conservation between crop and model legume species. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004;101:15289-15294.

Constantin G.D., Krath B.N., MacFarlane S.A., Nicolaisen M., Johansen I.E., Lund O.S. Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. Plant J. 2004;40:622-631.

Couzigou J.M., Zhukov V., Mondy S., el Heba G.A., Cosson V., Ellis T.N., Ambrose M., Wen J., Tadege M., Tikhonovich I., Mysore T.S., Putterill J., Hofer J., Borisov A., Ratet P. *NODULE ROOT* and *COCHLEATA* maintain nodule development and are legume orthologs of *Arabidopsis BLADE-ON-PETIOLE* genes. Plant Cell. 2012;24:4498-4510.

Coyne C.J., McClendon M.T., Walling J.G., Timmerman-Vaughan G.M., Murray S., Meksem K., Lightfoot D.A., Shultz, J.L., Keller K.E., Martin R.R., Inglis D.A., Rajesh P.N., McPhee K.E., Weeden N.F., Grusak N.A., Li C.-M., Storlie E.W. Construction and characterization of two bacterial artificial chromosome libraries of pea (*Pisum sativum* L.) for the isolation of economically important genes. Genome. 2007;50:871-875.

Curto M., Camafeita E., Lopez J.A., Maldonado A.M., Rubiales D., Jorrín J.V. A proteomic approach to study pea (*Pisum sativum*) responses to powdery mildew (*Erysiphe pisi*). Proteomics. 2006;6: S163-S174.

Dalmais M., Schmidt J., Le Signor C., Moussy F., Burstin J., Savois V., Aubert G., Brunaud V., de Oliveira Z., Guichard C., Thompson R., Bedahmane A. UTILLdb, a *Pisum sativum* in silico forward and reverse genetics tool. Genome Biol. 2008;9:43. DOI: 10.1186/gb-2008-9-2-r43

De Martino T., Errico A., Lassandro A., Conicella C. Distorting segregation resulting from pea chromosome reconstruction with alien segments from *Pisum fulvum.* J. Hered. 2000;91:322-325.

Decarie J., Coyne C., Brumett S., Shultz J. Additional pea EST-SSR markers for comparative mapping in pea (*Pisum sativum* L.). Plant Breed. 2012;131:222-226.

Deulvot C., Charrel H., Marty A., Jacquin F., Donnadieu C., Lejeune-Hénaut I., Burstin J., Aubert G. Highly-multiplexed SNP genotyping for genetic mapping and germplasm diversity studies in pea. BMC Genomics. 2010;11.DOI: 10.1186/1471-2164-11-468

Dolezel J., Greilhuber J. Nuclear genome size. Are we getting closer? Cytometry. 2010;77:635-642.

Duarte J., Rivière N., Baranger A., Aubert G., Burstin J., Cornet L., Lavaud C., Lejeune-He′naut I., Martinant J.P., Pichon J.P., Pilet-Nayel M.L., Boutet G. Transcriptome sequencing for high throughput SNP development and genetic mapping in pea. BMC Genomics. 2014;Feb 12;15:126. DOI: 10.1186/1471-2164-15-126

Dumont E., Bahrman N., Goulas E., Valot B., Sellier H., Hilbert J.L., Lejeune-Hénaut I., Delbreil B. A proteomic approach to decipher chilling response from cold acclimation in pea (*Pisum sativum* L.). Plant Sci. 2011;180:86-98.

Ellis T.H.N., Hellens R.P., Turner L., Lee C., Domoney C., Welham T. On the pea lilnkage group. Pisum Genetics. 1993;25:5-12.

Ellis T.H.N., Poyser S.J. An integrated and comparative view of pea genetic and cytogenetic maps. New Phytol. 2002;153:17-25.

Ellis T.H.N., Poyser S.J., Knox M.R., Vershinin A.V., Ambrose M.J. Polymorphism of insertion sites of *Ty1-copia* class retrotransposons and its use for linkage and diversity analysis in pea. Mol. Gen. Genet. 1998;260:9-19.

Ferguson B.J., Reid J.B. *Cochleata*: getting to the root of legume nodules. Plant Cell Physiol. 2005;49:1583-1589.

Folkeson D. Assignment of linkage segments to chromosomes 3 and 5 in *Pisum sativum* L. Hereditas. 1990a;112:249-255.

Folkeson D. Assignment of linkage segments to chromosomes 4 and 7 in *Pisum sativum* L. Hereditas. 1990b;112:257-263.

Folkeson D. The use of BSG-staining in making a more detailed nomenclature possible for interchange systems in *Pisum sativum* L. Hereditas. 1984a;101:119-122.

Folkeson D. Free segregation between a (3S-7S) interchange and genes within linkage group VII in *Pisum sativm* L. Hereditas,1984b;101:127-133.

Franssen S.U., Shrestha R.P., Brätigam A., Bronberg-Bauer E., Wever A.P.M. Comprehensive transcriptome analysis of the highly complex *Pisum sativum* genome using next generation sequencing. BMC Genomics. 2011;12:277.

Fuchs J., Kühne M., Schubert I. Assignment of linkage groups to pea chromosomes after karyotyping and gene mapping by fluorescent *in situ* hybridization. Chromosoma. 1998;107:272-276.

Gilpin B.J., McCallum J.A., Frew T.J., Timmerman-Vaughan G.M. A linkage map of the pea (*Pisum sativum* L.) genome containing cloned sequences of known function and expressed sequence tags (ESTs). Theor. Appl. Genet. 1997;95:1289-1299.

Gorel F.L., Berdnikov V.A., Kosterin O.E. Mutation *air dots (adt)* with slight uni^{tac}-like effect on the leaf. Pisum Genet. 2002;34:1-2.

Gourlay C.W., Hofer J.M.I., Ellis T.H.N. Pea compound leaf architecture is regulated by interactions among the genes *UNIFOLIATA, COCHLEATA, AFILA*, and *TENDRIL-LESS.* Plant Cell. 2000;12:1279-1294.

Greilhuber J., Ebert I. Genome size variation in *Pisum sativum.* Genome. 1994;37:646-655.

Gronlund M., Olsen A., Johansen I.E., Jakobsen I. Protocol: Using virus-induced gene silencing to study the arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Pisum sativum.* Plant Methods. 2010;6. DOI: 10.1186/1746-4811-6-28

Hall K.J., Parker J.S., Ellis T.H. The relationship between genetic and cytogenetic maps of pea. I. Standard and translocation karyotypes. Genome. 1997;40:744-754.

Håkansson A. Chromosomenringe in *Pisum* und ihre Mutmassliche Genetische Bedeutung. Hereditas. 1929;12:1-10.

Hammarlund A. Über einen Fall von Koppelung und freie Kombination bei Erbsen. Hereditas. 1923;4:235-238.

Hellens R.P., Moreau C., Lin-Wang K., Schwinn K.E., Thomson S.J., Fiers M.W.E.J., Frew T.J., Murray S.R., Hofer J.M.I., Jacobs J.M.E., Davies K.M., Allan A.C., Bendahmane A. Identification of Mendel's white flower character. PLoS One. 2010;5. Art. e1323. DOI: 10.1371/journal.pone.0013230

Hoey B.K., Crowe K.R., Jones V.M., Polans N.O. A phylogenetic analysis of *Pisum* based on morphological characters, and allozyme and RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 1996;92:92-100.

Hofer J., Turner L., Moreau C., Ambrose M., Isaac P., Butcher S., Weller J., Dupin A., Dalmais M., Le Signor C., Bendahmane A., Ellis N. Tendril-less regulates tendril formation in pea leaves. Plant Cell. 2009;21:420-428.

Hofer J.M.J., Ellis T.H.N. The effect of *Uni* on leaf shape. Pisum Genet. 1996;28:21-22.

Husbands A., Emirzade T., DeMason D. Stipulae morphologies of the *sinuate leaf (sil)* mutants. Pisum Genet. 2003;35:6-9.

Jing R., Johnson R., Seres A., Kiss G., Ambrose M.J., Knox M.R., Ellis T.H.N., Flavell A.J. Gene-based sequence diversity analysis of field pea (*Pisum*). Genetics. 2007;177:2263-2275.

Jing R., Vershinin A., Grzebota J., Shaw P., Smýkal P., Marshall D., Ambrose M.J., Ellis T.H.N., Flavell A.J. The genetic diversity and evolution of field pea (*Pisum*) studied by high throughput retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP) marker analysis. BMC Evol. Biol. 2010;10. Art. 44

Kaló P., Seres A., Taylor S.A., Jakab J., Kevei Z., Kereszt A., Endre G., Ellis T.H.N., Kiss G.B. Comparative mapping between Medicago sativa and Pisum sativum. Molecular and General Genomics. 2004;272:235-246.

Keller K.E., Johansen E., Martin R.R., Hampton R.O. Potyvirus genome-linked protein (VPg) determines pea seed-borne mosaic virus pathotype-specific virulence in *Pisum sativum.* Mol. Plant-Microbe Interactions. 1998;11:124-130.

Knox M.R., Ellis T.H.N. Stability and inheritance of methylation states at *PstI* sites in *Pisum.* Mol. Genet. Genomics. 2001;265: 497-507.

Knox M.R., Ellis T.H.N. Excess heterozygosity contributes to genetic map expansion in pea recombinant inbred populations. Genetics. 2002;162:861-873.

Konovalov F.A., Toshchakova E., Gostimsky S. A CAPS marker set for mapping in linkage group III of pea *(Pisum sativum* L.). Cell. Mol. Biol. Lett. 2005;10:163-171.

Kosterin O.E. Mapping of the third locus for histone H1 genes in peas. Pisum Genet. 1992;24:56-59.

Kosterin O.E. Genes *a* and *d* may not be in the same linkage group. Pisum Genet. 1993;25:23-26.

Kosterin O.E., Bogdanova V.S. Reciprocal compatibility within the genus *Pisum* L. as studied in F1 hybrids: 1. Crosses involving *P. sativum* L. subsp. *Sativum.* Genet. Res. Crop Evol. 2014. DOI: 10.1007/s10722-014-0189z (E-pub ahead of print).

Kosterin O.E., Bogdanova V.S., Gorel F.L., Rozov S.M., Trusov Yu.A., Berdnikov V.A. Histone H1 of the garden pea (*Pisum sativum* L.): composition, developmental changes, allelic polymorphism and inheritance. Plant Sci. 1994;101:189-202.

Kosterin O.E., Bogdanova V.S., Kechin A.A., Zaytseva O.O., Yadrikhinskiy A.K. Polymorphism in a histone H1 subtype with a short N-terminal domain in three legume species (Fabaceae, Fabaeae). Mol. Biol. Rep. 2012;39:10681-10695.

Kosterin O.E., Rozov S.M. Mapping of the new mutation *blb* and the problem of integrity of linkage group 1. Pisum Genet. 1993;25: 27-31.

Lamm R. Cytogenetical studies on translocations in *Pisum.* Hereditas. 1951;37:356-372.

Lamm R. Transpositions in *Pisum.* Pisum Newslett. 1977;9:28-29.

Lamm R., Miravalle R.J. A translocation tester set in *Pisum.* Hereditas. 1959;45:417-440.

Lamprecht H. The variation in linkage and course of crossingover. *A*gr. Hortique Genet. 1948;6:10-48.

Lamprecht H. Further studies on the interchange between the chromosomes III and V of *Pisum.* Agr. Hortique Genet. 1953;11:141-148.

Lamprecht H. Die Koppelung des Gens *wsp* und die Genenkarte von Chromosom VII von *Pisum*. Agr. Hortique Genet. 1954;12:115-120.

Lamprecht H. Ein Interchange zwischen den Chromosomen I and VII von *Pisum.* Agr. Hortique Genet. 1955;13:173-182.

Lamprecht H. Die Genenkarte von Chromosom VI und das Interchange der Chromosomen IV/VI von Pisum. Agr. Hortique Genet. 1957;15:115-141.

Lamprecht H. Die Genenkarte von *Pisum.* Agr. Hortique Genet. 1961;19:360-401.

Laucou V., Haurogne K., Ellis N., Rameau C. Genetic mapping in pea. I. RAPD-based linkage map of *Pisum sativum.* Theor. Appl. Genet. 1998;97:905-915.

Loridon K., McPhee K.E., Morin J., Dubreuil P., Pilet-Nayel M.L., Aubert G., Rameau C., Baranger A., Coyne C.J., Lejeune-Hénault I., Burstin C. Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). Theor. Appl. Genet. 2005;111:1022-1031.

Lu J., Knox M.R., Ambrose M.J., Brown J.K.M., Ellis T.H.N. Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP- and PCR-based methods. Theor. Appl. Genet. 1996;93:1103-1111.

Macas J., Neumann P., Návratilová A. Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) genome: Comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Medicago truncatula.* BMC Genomics. 2007;8. Art. 427

Magee A.M., Aspinall S., Rice D.W., Cusack B.P., Sémon M., Perry A.S., Stefanović S., Milbourne D., Barth S., Palmer J.D., Gray J.C., Kavanagh T.A., Wolfe K.H. Localized hypermutation and associated gene losses in legume chloroplast genomes. Genome Res. 2010;20:1700-1710.

Mendel G. Versuche über Plflanzenhybriden. Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn. Bd. IV für das Jahr1865 (Abhandlungen). 1866;3-47.

Murfet I.C. The *gi* locus shows linkage with *gp*, *r* and *tl.* Pisum Newstlett. 1990;22:38-40.

Neumann P., Nouzová M., Macas J. Molecular and cytogenetic analysis of repetitive DNA in pea (*Pisum sativum* L.). Genome 2001;44:716-728.

Neumann P., Pozárková D., Vrána J., Dolezel J., Macas J. Chromosome sorting and PCR-based physical mapping in pea (*Pisum sativum* L.). Chromosome Res. 2002;10:63-71.

Nogler G.A. The lesser-known Mendel: his experiments on *Hieracium.* Genetics. 2006;172:1-6.

Novák P., Neumann P., Macas J. Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. BMC Bioinformatics. 2010;11:378. DOI:10.1186/1471-2105-11-378

Pellew C., Sansome E.R. Genetical and cytological studies on the relation between Asiatic and European varieties of *Pisum sativum*. I. Partial Sterility in hybrids of a Thibetian and a European variety (by C. Pellew). II. Chromosome association in *Pisum* (by E.R. Sansome). J. Genet. 1932;25:25-54.

Rameau D., Dénoue D., Fraval F., Haurogné H., Josserand J., Lacuou L., Batge S., Murfet I.C. Genetic mapping in pea. 2. Identification of RAPD and SCAR markers linked to genes affecting plant architecture. Theor. Appl. Genet. 1998;97:916-928.

Saalbach G., Erik P., Wienkoop S. Characterisation by proteomics of peribacteroid space and peribacteroid membrane preparations from pea (*Pisum sativum*) symbiosomes. Proteomics. 2002;2: 325-337.

Sansome E.R. Segmental interchange in *Pisum sativum.* Cytologia. 1932;2:200-219.

Sansome E.R. Segmental interchange in *Pisum sativum*. II. Cytologia. 1933;5:15-30.

Sansome E.R. Segmental interchange lines in *Pisum sativum.* Nature. 1938;142:674-675.

Sasaki Y., Nagano Y. Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2004;68:1175-1184.

Schiltz S., Gallardo K., Huart M., Negroni L., Sommerer N., Burstin J. Proteome reference maps of vegetative tissues in pea. An investigation of nitrogen mobilization from leaves during seed filling. Plant Physiol. 2004;135:2241-2260.

Smýkal P., Aubert G., Burstin J., Coyne C.J., Ellis N.T., Flavell A.J., Ford R., Hýbl M., Macas I., Neumann P., McPhee K.E., Redden R.J., Rubiales D., Weller J.L., Warkentin T.D. Pea (*Pisum sativum* L.) in the genomic era. Agronomy. 2012;2:74-115.

Snoad B. A preliminary assessment of 'leafless peas'. Euphytica. 1974;23:257-265.

Somers D.A., Samac D.A., Olhoft P.M. Recent advances in legume transformation. Plant Physiol. 2003;131:892-899.

Svabova L., Smýkal P., Griga M., Ondrej V. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Pisum sativum in vitro* and *in vivo.* Biol. Plant. 2005;49:361-370.

Tattersall A.D., Turner L., Knox M.R., Ambrose M.J., Ellis T.H.N., Hofer J.M.I. The mutant crispa reveals multiple roles for PHANTASTICA in pea compound leaf development. Plant Cell. 2005;17:1046-1060.

Temnykh S.V., Weeden N.F. A brief synopsis of the current status of pea cytogenetics. Pisum Genet. 1993;25:1-4.

The International Aphid Genomics Consortium. Genome sequence of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum.* PLoS Biol. 2010;8:e1000313. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000313

Trusov Y.A., Bogdanova V.S., Berdnikov V.A. Evolution of regular zone of histone H1 in Fabaceae plants. J. Mol. Evol. 2004;59: 546-555.

Vershinin A.V., Allnutt T.R., Knox M.R., Ambrose M.J. Transposable elements reveal the impact of introgression, rather than transposition, in *Pisum* diversity, evolution, and domestication. Mol. Biol. Evol. 2003;20:2067-2075.

Weeden N.F., Boone W.E. Mapping the *Rb* locus on linkage group III using long PCR followed by endonuclease digestion. Pisum Genet. 1999;31:36.

Weeden N.F., Ellis T.H.N., Timmerman-Vaughan G.M., Swiecicki W.K., Rozov S.M., Berdnikov V.A. A consensus linkage map for *Pisum sativum.* Pisum Genet. 1998;30:1-3.

Weeden N.F., Marx G. Further genetic analysis and linkage relationships of isozyme loci in the pea: Confirmation of the diploid nature of the genome. J. Hered. 1987;78:153-159.

Wellensiek S.J. Genetic monograph on *Pisum.* Bibliographia Genetica.1925;2:343-476.

Zaytseva O.O., Bogdanova V.S., Kosterin O.E. Phylogenetic reconstruction at the species and intraspecies levels in the genus *Pisum* (L.) (peas) using a histone H1 gene. Gene. 2012;504:192-202.

Zaytseva O.O., Gunbin K.V., Mglinets A.V., Kosterin O.E. Divergence and population traits in evolution of the genus *Pisum* L. as reconstructed using genes of two histone H1 subtypes showing different phylogenetic resolution. Gene. 2015;556:235-244.

Zhu C., Gore M., Buckler E.S., Yu J. Status and prospects of association mapping in plants. Plant Genome. 2008;1:5-20.

Мендель: подтверждение идеи бинарного кодирования признака методами статистической физики

О.В. Трапезов

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

Статья августинского монаха Грегора Менделя «Опыты над растительными гибридами» 150 лет назад определила рождение новой науки – генетики. В ней были сформулированы законы, которые гласят, что любой признак определяется двумя факторами. С одной стороны, менделевская идея двоичного кодирования признака объясняется влиянием школы знаменитого физика Христиана Доплера, на кафедре которого Мендель консультировался в течение семи лет.
С другой – закономерности, открытые Менделем, подтвердили интуитивные восприятия высшего начала природы с рациональными принципами жившего в VI в. до нашей эры Пифагора, который первым указывал на духовную подоплеку природного бытия: мир создан числом, а число есть нематериальная, неощутимая реальность. Все исследователи до Менделя, разрабатывая проблему наследственности, прослеживали в ряду поколений судьбу признака, Мендель же для понимания механизма наследственности проследил в ряду поколений судьбу не признака, а двух невидимых факторов-детерминант, определяющих признак. Есть основание считать, что бинарная комбинаторика и математические вероятностные варианты возникли у Менделя в ходе длительных раздумий – в мысленном эксперименте. Эксперименты с горохом использовались Менделем лишь для подтверждения размышлений о существовании конструкции из невидимых двоичных детерминант наследственности. Опыты по скрещиванию гороха требовались лишь только для того, чтобы проверить такое чисто умозрительное предположение. С помощью методов, взятых из статистической физики, Менделю удалось расшифровать процесс, происходящий в модельном эксперименте на горохе: судьба признака определяется действием двух невидимых факторов.

Ключевые слова: 150 лет рождения генетики, Иоганн Грегор Мендель.

Mendel: corroboration of the idea of binary trait coding by methods of statistical physics

O.V. Trapezov

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

The paper by the Augustinian friar Gregor Johann Mendel "Experiments on Plant Hybridization" laid the foundation of the new field of knowledge, genetics, 150 years ago. It claimed that any character was determined by two factors. On the one hand, the Mendelian idea of binary coding of a character was inspired by Christian Doppler, with whose department Mendel was contacting for seven years. On the other hand, the regularities discovered by Mendel confirmed the intuitive notion of the divine principle based on rational foundations. Pythagoras was the first to point to the spiritual grounds of being. The world had been created by the number, and the number is a nonmaterial and insensuous entity. All students of heredity before Mendel traced the fate of a character in a succession of generations. Instead, to unveil the heredity mechanism, Mendel traced the fates of two invisible factors that determined the character. Probably, the ideas of binary combinations and mathematical probabilistic variants arose from Mendel's long meditation and an imaginary experiment. Experiments on pea crosses were undertaken just in order to test the idea of a set of invisible determinants. Methods borrowed from statistical physics allowed Mendel to decrypt the process occurring in experiments with the pea model: The fate of a character was determined by action of two invisible factors.

Key word: 150th anniversary of genetics, Johann Gregor Mendel.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Трапезов О.В. Мендель: подтверждение идеи бинарного кодирования признака методами статистической физики. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):27-38.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Trapezov O.V. Mendel: corroboration of the idea of binary trait coding by methods of statistical physics. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):27-38.

УДК 575.1(092):519.115.8
Поступила в редакцию 12.01.2015 г.
Принята к публикации 26.02.2015 г.
© АВТОР, 2015

e-mail: trapezov@bionet.nsc.ru

В истории мировой науки чрезвычайно редко можно отметить случаи, когда одна статья порождает целую область исследований и открывает программу работ на многие десятилетия вперед. Таковой была статья чешского монаха Иоганна Грегора Менделя (1822–1884) «Опыты над растительными гибридами», заложившая 150 лет назад, в 1865 г., первый камень в знание о наследственности и определившая рождение новой науки – генетики!

В 1822 г. в Моравии, в деревушке Хинчицы (Ханцендорф), в крестьянской семье Менделя родился второй ребенок – мальчик Иоганн. С детства Иоганн привык к крестьянскому труду. Как пригодились ему в дальнейшем навыки, приобретенные в детстве!

Менделю было 11 лет, когда его перевели из деревенской школы в четырехклассное училище ближайшего городка, а затем в гимназию в городе Опаве. Платить за учебу и содержать сына родителям было трудно. В 1840 г. Иоганн окончил гимназию и одновременно школу кандидатов в учителя. Как пишет он сам, это обеспечило ему скромное существование.

Преодолевая трудности, Мендель продолжает учебу. Сначала в философских классах в городе Оломеуц, где кроме философии преподают также математику и физику, а в 1844–1848 гг. – в Брюннском богословском институте. В 21 год, постригшись в монахи, он принимает новое имя Грегор.

Учась в Венском университете, он побывал в Риме (где представлялся Папе) на научных съездах и флористических экскурсиях.

В мартовские дни 1853 г., будучи вольнослушателем Венского университета, он учился окрашивать препараты в лаборатории знаменитого цитолога Франца Унгера – одного из первых цитологов мира. Занятия в лаборатории не ограничивались только приготовлениями препаратов. Наряду с проблемами микроскопического плана профессора Унгера занимали вопросы о движущих силах эволюции, и он пытался очертить путь развития жизни от примитивных существ до человека, опубликовав свои изыскания в «Weiner Zeitung» (Венской газете) в форме «Семнадцати ботанических писем».

На протяжении 8 лет (1856–1863 гг.) Мендель проводил свои знаменитые эксперименты на модельном объекте – посевном горохе (*Pisum sativum*) и сформулировал законы, которые гласят, что любой признак определяется двумя факторами, эти факторы Мендель назвал *elementen – задатки*, *зачатки*.

Можно ли считать, что у Менделя были предшественники?

Предшественники-теоретики

Сложилось представление, что предшественники были! Прежде всего, это умозрительные гипотезы о материальных основах наследственности – представление об «идиоплазме» – выдвигавшиеся в 1860-х годах мюнхенским ботаником Карлом Негели; об особых «физиологических единицах» английского философа Герберта Спенсера; «временная гипотеза пангенезиса», первоначально выдвинутая Чарлзом Дарвиным, а затем, в противопоставление им, поддержанная немецким зоологом и теоретиком эволюционного учения Августом Вейсманом. При всей несхожести, а в некоторых случаях принципиальной несовместимости этих гипотез их объединяла одна существенная черта – стремление найти *материальные* основы наследственности в виде взаимодействия элементарных биологических единиц. Негели называл их *мицеллами*, Спенсер – *физиологическими единицами*, Дарвин – *геммулами*, *крупинками*.

К. Негели своими представлениями об идиоплазме пытался обосновать свою «механо-ламаркистскую теорию» эволюции. Он полагал, что передача наследственных свойств осуществляется мицеллами (молекулами кристаллической формы), совокупность которых представлена заключенной в половых клетках идиоплазмой. Плазма соматических клеток («трофоплазма») не обладает, по мнению Негели, способностью к наследственности, поэтому вызываемые в ней под воздействием внешней среды изменения оказываются ненаследственными («модификации»). Идиоплазма может наследственно реагировать как в результате доходящих до нее внешних факторов, так и самопроизвольно, спонтанно, в силу внутренних (автогенетических) причин (Нэгели, 1866).

Г. Спенсер выдвинул также, по сути, механо-ламаркистскую гипотезу «физиологических единиц», которые содержатся как в соматических, так и в зародышевых клетках и претерпевают изменения под воздействием внешней среды (Спенсер, 1899).

Согласно представлениям Ч. Дарвина, особые саморазмножающиеся корпускулы наследственного вещества (геммулы), отделяясь всеми клетками организма, образуют его наследственную основу, концентрируясь в воспроизводящих органах и подвергаясь изменениям под воздействием среды.

Предшественники-экспериментаторы

Догадки о закономерностях наследственности возникли уже в XVIII в. у первых гибридизаторов растений. Впервые в европейской литературе гибридологические эффекты были описаны немецким ботаником Йозефом Готлибом Кёльрейтером в опытах по скрещиванию китайской и махровой гвоздик, а также разных сортов табака. Кёльрейтер наблюдал явления единообразия признаков гибридов в первом поколении и появление родительских форм в последующих. Им было показано, что при скрещивании или перекрестном опылении двух разных сортов гвоздик в первом поколении потомство отчетливо приобретало признаки одного из родителей – махровый цветок. Но во втором поколении,

полученном уже от самоопылившихся гибридов, у части растений выявлялись признаки другого исходного сорта – китайской гвоздики. Это явление Кёльрейтер педантично регистрировал так: признаки исходных сортов не исчезают в потомстве, они лишь по неким причинам то не проявляются, то проявляются, словно бы конкурируя друг с другом (Koelreuter, 1766; Кёльрейтер, 1940). Однако он ошибочно истолковал это как постепенное «возвращение» к исходным родительским видам, которые считал неизменными.

Вслед за Кёльрейтером преобладание признаков одного из родителей в первом поколении гибридов и выявление признаков другого родителя во втором и последующем поколениях регистрировал английский селекционер-растениевод Томас Эндрю Найт (Thomas Andrew Knight). Проводя скрещивание различных сортов гороха, Найт сделал важное наблюдение – он обнаружил неделимость мелких признаков при различных скрещиваниях. Дискретность наследственного материала, провозглашенная еще в древности, получила в его исследованиях первое научное обоснование.

Еще до Менделя, в середине XIX в., скрещивая разные сорта из семейства тыквенных, французские ботаники Огюстен Сажрэ (Augustin Sageret) и Шарль Нодэн (Charles Victor Naudin) обнаружили, что все гибриды первого поколения похожи друг на друга. Крупнейшим достижением Сажрэ явилось обнаружение феномена доминантности. При скрещивании сортов овощных культур он нередко наблюдал подавление признака одного родителя признаком другого. Это явление в максимальной степени проявляется в первом поколении после скрещивания, а затем «подавленные» признаки снова выявлялись у части потомков следующего поколения. Тем самым, Сажрэ удалось подтвердить, что элементарные наследственные признаки при скрещивании не исчезают.

К этому выводу пришел и Ш. Нодэн, который, однако, пошел еще дальше, приступив к количественному изучению перекомбинации наследственных задатков при скрещиваниях. Но на этом пути его ждало разочарование. Неверный методический прием – одновременное изучение большого количества признаков – привел к большой путанице в результатах, и он вынужден был отказаться от своих опытов. Именно эти недостатки в опытах Нодэна учел Г. Мендель, прежде чем выбрать в качестве модельного объекта для подтверждения своих размышлений горох (*Pisum sativum*).

Парижская академия наук в 1861 г. объявила конкурс на тему: «Изучить растительные гибриды с точки зрения их плодовитости, постоянства или непостоянства их признаков». В задачу конкурса входило «проделать ряд точных исследований» и в числе прочих ответить на вопрос: сохраняют ли гибриды, размножающиеся самооплодотворением в течение ряда поколений, признаки неизменными ... или же, наоборот, они всегда возвращаются к формам их предков? Победителем конкурса была признана работа Ш. Нодэна «Новые исследования над гибридностью у растений».

На вопросы, поставленные конкурсной комиссией, в 200-страничной работе Нодэна содержались довольно определенные ответы, а именно: 1) в первом поколении гибридов наблюдаются сходство всех потомков и их единообразие; 2) начиная со второго и последующих поколений происходит «разложение гибридных форм» на исходные родительские типы; 3) возврат к родительским формам и появление новых комбинаций связаны с разъединением сущностей (наследственных задатков).

Каждый, кто знаком с основами генетики, понимает, что выводы Нодэна в принципе соответствуют закономерностям наследования признаков, установленным в работе Менделя. Неслучайно с Нодэном переписывался и его цитировал сам Ч. Дарвин. В первой главе «Происхождения видов …», рассматривая трудности при различении разновидностей, он пишет: «Потомство от первого скрещивания двух чистых пород (как я убедился на голубях) достаточно, а порою и вполне однородно в своих признаках, и все кажется крайне простым; но как только скрещивают эти помеси между собой в течение нескольких поколений, едва ли два из них похожи между собой, и тогда только обнаруживается вся трудность этой задачи» (Дарвин, 1991. С. 34).

Итак, принято считать, что предшественники менделевских экспериментов были! Но следует сказать, что с работой Менделя могли ознакомиться и другие исследователи. Ссылки на нее были во многих изданиях, включая «Британскую энциклопедию» 1881–1885 гг. (статья «Гибридизм»).

В конце декабря 1866 г. «Труды Общества естествоиспытателей Брюнна» с конспектом доклада Менделя вышли в свет. Они поступили в 120 библиотек университетов и обществ естествоиспытателей Вены, Праги, Берлина, Мюнхена, Лондона, Парижа, Санкт-Петербурга, Нью-Йорка..., и еще 40 оттисков своей статьи Мендель разослал по частным адресам – друзьям и крупным исследователям-ботаникам. Но только три экземпляра были развернуты читателями, а ответ он получил лишь от знаменитого ботаника, профессора мюнхенского университета Карла Вильгельма Негели (Carl Wilhelm von Nägeli, 1817–1891), который отнесся к работе Менделя скептически, не оценив всей простоты и изящества его экспериментов. В своем письме Менделю он указал, что поверит в его открытие лишь в том случае, если Мендель сумеет воспроизвести свои эксперименты на ястребинке (*Hieracium*), с которой Негели работал в то время, и получит аналогичные результаты. Последовав совету Негели, Мендель занялся скрещиванием ястребинок и получил результаты, отличавшиеся от тех, которые наблюдал у гороха. Ни Негели, ни Мендель (равно как и никто другой в то время) не знали, что у ястребинки семена образуются бесполым путем. Лишь только позже выяснилось, что для ястребинки характерно факульта-

тивно-апомиктическое размножение, чем и объяснялось расщепление в первом и отсутствие расщепления во втором поколении гибридов. Таким образом, Негели в силу своего профессионализма и высочайшего авторитета поставил барьер, который оказался непреодолимым для идей Менделя.

В России работа Менделя получила высокую оценку еще в 1874 г., когда ее процитировал в магистерской диссертации и включил в свои лекции профессор Московского университета Иван Федорович Шмальгаузен (Иван Федорович – отец автора теории стабилизирующего отбора Ивана Ивановича Шмальгаузена, заведовавшего кафедрой дарвинизма биологического факультета МГУ до августовской сессии ВАСХНИЛ 1948 г.).

Даже три «переоткрывателя» менделевских законов наследственности: голландский ботаник и эволюционист Гуго Мари де Фриз (Hugo de Vries), проводивший опыты с маком, энотерой и дурманом (он был первым); немецкий доцент Карл Эрих Корренс (Carl Erich Correns), изучавший расщепление признаков у кукурузы, и австрийский ботаник Эрих Чермак фон Зейзенегг (Erich Tschermak von Seysenegg), анализировавший наследование признаков у гороха, знали работу Менделя задолго до 1900 г., но не сразу поняли и оценили ее глубинный смысл. Все они самостоятельно сформулировали *закон расщепления и закон независимого комбинирования признаков.* Почему же так произошло? Почему не понималась и не усваивалась идея Менделя, его опубликованная работа? Голландский историк науки О. Мейер допускает, что это было «чтение без понимания» (Meijer, 1985). Почему это имело место, более определенно выразился философ-эволюционист Ю.В. Чайковский: «… законы Менделя мало на чем были видны, но они легли в основу генетики. Точно так же закон Ома безупречно работает всюду, но попробуйте открыть его в телевизоре, где он маскируется множеством иных законов» (Чайковский, 2008. С. 510–511).

Справедливо ли утверждение, что законы Менделя переоткрывались?

Мировая слава... через 35 лет после открытия

Сложилось так, что датой рождения генетики принято считать 1900 г., когда независимо друг от друга Де Фриз, Корренс и Чермак повторили работу Менделя. Почему работа Менделя была востребована после так называемого «переоткрытия»? Есть мнение, что в 1900 г. первым послал в печать свою статью знаменитый к тому времени открыватель мутационного процесса Гуго де Фриз. Следом за ним в печать послали свои статьи Корренс и Чермак.

Де Фриз послал свою статью в научный журнал без всяких ссылок на работу Менделя, но рецензентом в этом журнале оказался его «конкурент» Корренс. Он не мог признать того, что Де Фриз сделал открытие раньше него, нашел ссылку на работу Грегора Менделя и противопоставил ее работе Де Фриза. В своих воспоминаниях К. Корренс писал, что он узнал о работе Менделя лишь после 1899 г., когда раздумывал над своими опытами по скрещиванию, проведенными в период с 1896 г. по 1899 г. Однако при исследовании рабочих журналов Корренса была обнаружена запись с кратким рефератом работы Менделя, датированная апрелем 1896 г.! В этой записи обращено внимание на соотношение 3 : 1 во втором поколении гибридов. Видимо, для Корренса понимание значимости соотношения 3 : 1 пришло лишь после знакомства с работой Гуго де Фриза.

Американский генетик А. Стертевант, касаясь «переоткрытия» работы Менделя в 1900 г., справедливо замечает, что *была переоткрыта лишь сама статья* Г. Менделя, но смысл и глубина его законов не были поняты сразу полностью ни одним переоткрывателем (Sturtevant, 1965).

Если предшественники были, то почему, несмотря на солидный запас наблюдений по скрещиваниям, основоположником гибридологического анализа все же по праву считается Иоганн Грегор Мендель?

Почему основателем генетики считается Грегор Мендель, а не лауреат научного конкурса Парижской академии наук Шарль Нодэн? Ведь экспериментальная работа Нодэна более солидна, чем работа Менделя, в ней сообщаются данные по многим видам растений, а у Менделя взят, казалось бы, частный случай, один вид – горох. Более того, Шарль Нодэн установил много интересных и важных фактов и ряд закономерностей раньше Менделя. Этому есть обоснование.

1. Все исследователи до Менделя, разрабатывая проблему наследственности, прослеживали в ряду поколений судьбу *признака.* Мендель же для понимания механизма наследственности проследил в ряду поколений судьбу не признака, а *двух невидимых факторов-детерминант*, определяющих признак (1 : 2 : 1). Тех «невидимых факторов», которые позже, в 1910 г., по предложению датского ботаника Вильгельма Людвига Иогансена назовут генами, от лат. «*gennao*» – рождаю.

2. Мендель, используя статистические расчеты, показал, что невидимых факторов-детерминант должно быть *два*, т. е. *признак кодируется бинарно*!

Николай Владимирович Тимофеев-Ресовский в своих лекциях отмечал, что главным моментом открытия Менделя была «нахальная гипотéза» о том, что есть *два начала*, одно из которых – доминантно (Константинов, 1993).

Аналогию можно провести с примером классификации периодических элементов. Общеизвестны неудачные попытки группировки элементов по химическим свойствам, предпринимавшиеся до «однофамильца» Менделя – Менделеева Гениальность великого химика

заключалась именно в том, что в основу системы элементов был положен их атомный вес. Именно атомный вес элементов, а не их масса! У Менделеева, как и у Менделя, были некоторые предшественники. С одной стороны, это они были «практики», которые создавали системы классификации, но замыкались на частных проблемах и не доводили дело до конца, т. е. не видели или не обосновали существование периодического закона. Составленные ими таблицы использовались в эмпирических исследованиях. С другой стороны, были и теоретики. Ближе всех к открытию периодической системы подошли Бёгюе де Шанкуртуа (Alexander Emil Beguter de Chancourtois) и Джон Ньюлендс (John Alexander Reina Newlands). Де Шанкуртуа даже частично построил ряд элементов в порядке возрастания атомной массы.

Можно ли считать идеологическим предшественником работы Менделя о невидимых детерминантах наследственности христианского мыслителя Августина Блаженного[1]?

«Математичность» работы Г. Менделя не воспринималась коллегами. Он даже заработал добродушное прозвище – «наш ботанический математик». А иные говорили между собой, что, кажется, патера Грегора потянуло к мистическим числам натурфилософов Окена и Шеллинга, и от этих «наследственных задатков» весьма сильно попахивает «зародышевыми причинами» – («rationes seminales») из сочинений святого Августина – покровителя монастыря, во дворе которого Мендель выращивал свои гибриды. Заметим, что Г. Мендель родился спустя 14 веков после Августина (Володин, 1969). Это дает основание допускать, что размышления августинского монаха Г. Менделя о кодировании видимого признака невидимыми факторами-детерминантами, можно трактовать по-иному, чем это представлено в литературе.

Со времен Платона в науке господствовали представления, которые английский философ Карл Раймунд Поппер назвал *эссенциализмом*: мир состоит из ограниченного числа неизменяемых сущностей (идей, по терминологии Платона), а изменчивые проявления видимого мира – лишь неполные и неточные отражения этих сущностей. В соответствии с этой точкой зрения истинное изменение может произойти только при появлении новой сущности, возникающей в результате либо акта Творения, либо спонтанного скачка (мутации).

Придерживавшийся традиций неоплатонизма (дохристианского способа философствования) Августин Блаженный считал, что Творец создал этот мир не в завершенном виде – он заложил в нем появление новых существ и предметов – «мир, подобно беременной матери, чреват причинами всего, чему предстоит народиться». Он предлагает теорию зародышей (*rationes seminales*), согласно которой вещи, обретшие бытие после первоначального творения мира Господом, присутствовали с самого начала в форме невидимых скрытых возможностей, которые актуализируются только с течением времени. Эти «rationes seminales» (он полагал их также постижимыми) заложены Богом в материю, и из них-то и возникают живые твари.

Игра ума Августина Блаженного была поистине удивительной. Познание он разделил на два рода: «scientia» – разумное познание объективного мира, позволяющее людям пользоваться вещами, и «sapientia» – познание вечных божественных дел и духовных объектов. По Августину, они не противоречат друг другу. Наука сама по себе необходима, потому что человек вынужден жить в телесном мире. А поскольку Богом создан и телесный мир, и зародышевые причины, и познающий человек, то познавая телесный мир и движущие его силы, человек познает мудрость Господа (Герье, 1910. С. 13).

На похожий подход к методологии совместных теолого-научных изысканий указывает специалист по теории познания, философии и методологии науки профессор МГУ А.В. Яковлев, обращаясь к исследованиям известного физика современности Я. Барбэра (Jan Barbour), который ставит вопрос**:** «В то же время, хотя наука многое объясняет из того, что существует в мире, есть такие проблемы и вопросы, которые выходят за пределы возможностей науки в принципе. Например, такой глубоко метафизический[2] вопрос: *почему вообще существует мир*?» (Barbour, 1990; Яковлев, 2013. С. 9).

Я. Барбэр и другой физик современности Бертран Рассел (Bertrand Russell) склоняются к необходимости формирования общей методологии теологических и научных исследований, считая, что и в науке, и в религии всегда сосуществуют конкурирующие доктрины, ведутся дискуссии, в каждой сфере есть свои эксперты, которые оценивают предлагаемые новации с точки зрения их претензии на разумность и истинность (Barbour, 1990; Russell, 2003).

Допускается, что христианство открывало возможность особого подхода к познанию сотворенного мира, о чем свидетельствует тот факт, что в Китае, где уже в XIII в. использовались многозарядные ракетные установки и развитие технологий вообще обгоняло западноевропейские технологии вплоть до XV столетия, *так и не вывели второго закона Ньютона*. Ньютоновская астрономия была не лучше, чем астрономия Птолемея, но глубоко религиозный Ньютон в 1687 г. издал грандиозный трактат «Математические начала натуральной философии»,

[1] Августин Блаженный (лат. Augustinus Sanctus, полное имя Аврелий Августин, 354–430) – крупнейший христианский мыслитель конца античности, придерживавшийся традиций неоплатонизма – дохристианского способа философствования, при котором метафизическая картина мира допускает присутствие сущностей, недоступных научному исследованию (идеи Платона, монады Г. Лейбница, дух Г. Гегеля) (Горан, 1999; Головко, 2007).

[2] «Метафизика – попытка постичь мир как целое с помощью мысли». Б. Рассел.

в котором дал иное математическое объяснение движения планет, и затем оно в течение столетий показало себя более успешным (Гейзенберг, 1989. С. 164).

В этом же контексте выделим британского математика и философа Роджера Пенроуза (Roger Penrose) в его попытке составить математическую модель устройства мироздания. В представленной модели Пенроуз утверждает, что «Богом данные» математические идеи существуют как бы вне времени и независимо от людей (Яковлев, 2013. С. 12). Так, особенности современной математики заключаются в том, что она, на первый взгляд, изучает искусственно изобретенные объекты. Ведь мы не наблюдаем в природе многомерных пространств, групп, полей и колец, свойства которых активно изучают математики. Но всякая строгая математическая теория рано или поздно находит применение. Для чего столько лет нужно было биться над доказательством гипотезы Пуанкаре? «Формулой Вселенной» называют утверждение Пуанкаре из-за его важности в понимании процессов мироздания и из-за того, что оно дает ответ на вопрос о форме Вселенной. По какой орбите, например, полетит космический корабль к созвездию Псов? Какие препятствия встретит на своем пути?

Возможно, в этом скрыты причины того, что в России первый анализ работы Г. Менделя, выполненный ботаником Иваном Парфеньевичем Бородиным, – одним из организаторов Русского ботанического общества и «Ботанического журнала», академиком Императорской Санкт-Петербургской академии наук, – появился в 1903 г. не в «Ботаническом журнале», а в журнале «Мир божий» (Бородин, 1903а–в).

Возможный мысленный эксперимент Менделя в идее двоичного кодирования признака и его подтверждение методами, взятыми из статистической физики

Предполагается, что мысленные эксперименты дают нам знания о мире. Откуда рождаются (приходят) эти знания? Взгляд на мысленное экспериментирование, основанное на интуиции, относят к форме платонизма через априорные знания о природе. Концепция ментальных моделей предполагает манипулирование мысленными моделями вместо моделей физических. С философской точки зрения проблема мысленного эксперимента состоит в том, что он связывает нас с реальным эмпирическим миром. Но ведь согласно очень популярной позиции, источником нового знания является реальный эксперимент. По Канту, именно эмпирический опыт (в частном случае – эксперимент) является источником нового знания. Возможно ли познать реальность только посредством мышления без эмпирических данных? Примеров совсем немного: мысленные эксперименты Галилея о независимости скорости падения тел от их веса; Ньютона – с вращающимся ведром, обосновывающие наличие абсолютного пространства; эйнштейновский опыт в лифте, моделирующий свободно падающую в гравитационном поле систему отсчета; шрёдингеровский кот в темной комнате, иллюстрирующий неполноту квантовой механики при переходе от субатомных систем к макроскопическим.

Перечисленные эксперименты следует отнести к типу «платоновских», поскольку считается, что источником получаемого в них нового знания является *интуиция платоновского типа*, позволяющая созерцать мысленным взором непосредственно абстрактные объекты математики и законы природы. И все же мысленный эксперимент требует одного условия – правдоподобия (Kuhn, 1977. P. 242; Sorensen, 1992).

Не удивительно, что предметом научно-философского исследования сегодня выступает вопрос: почему спустя тысячелетия в теории математического программирования наиболее применим оказался бинарный принцип счисления и почему математики, создававшие первые компьютеры, в качестве базового принципа обратились к арифметическому архетипу – математике Древнего Египта, построенной на принципе двоичности?! Эта математика возникла раньше греческого и вавилонского исчислений, радикально от них отличается, и примечательно, как современные вычислительные машины используют в своей основе наиболее архаичный древнеегипетский «двоичный» принцип.

Как ни удивительно, но этот математический архетип был выбран из-за его простоты и надежности. В бинарной системе счисления быстро и легко выполняются все арифметические действия, существенно упрощаются все логические операции.

Можно допустить, что рассуждения Менделя находились во власти идеи архетипа[3] двоичности (бинарности) мироустройства, и структура устройства жизненных форм является достоверно познаваемой, когда невидимый платоновский мир диктует двоичные правила устройства миру видимому.

Идея двоичности мироустройства порой была трагичной. Пример – судьба этой идеи в 1760-е гг. в Российском государстве, когда Патриарх Никон, человек жестокий и властный, накануне воссоединения Украины с Россией решил реформировать церковь: многое изменить в церковных книгах, обрядах, и как символ реформ – заменить бинарный архетип: двоеперстие на троеперстие, что привело к уходу трети населения России

[3] Архетипы, по Карлу Юнгу, «архе» – прообразы или первообразы, первоначала, возникшие в далеком прошлом. В космологических учениях выступают в качестве универсального символа мировой гармонии, отображающего геометрически упорядоченную картину мира – символическое выражение Космоса, победившего первичный Хаос. Архетип, связанный со стремлением человека к упорядочиванию хаоса внешнего мира, Юнг усматривает в понятии числа. «Число, – писал он, – больше, чем что-либо другое помогает навести порядок в хаосе видимости. Оно – это инструмент, изначально предназначенный либо для создания порядка, либо для постижения уже существующего, но еще неведомого порядка, устройства или упорядоченности» (Архетип и символ, 1991).

в Раскол, в «сотрясшее» русское государство «Соловецкое сидение», и отметилось в истории восстанием Степана Разина и Стрелецким бунтом.

Закономерности, открытые Менделем, подтвердили интуитивные восприятия высшего начала природы с рациональными принципами жившего в VI в. до н. э. Пифагора, который первым указывал на духовную подоплеку природного бытия: мир создан числом, а число есть нематериальная, неощутимая реальность. Именно в пифагорейской школе установлена взаимосвязь между религией и математикой, которая начиная с того далекого времени оказала сильнейшее влияние на человеческое мышление (Гейзенберг, 1989. С. 33).

И все же, вероятнее всего, идея двоичного кодирования признака объясняется влиянием школы знаменитого физика Христиана Доплера, на кафедре которого Мендель консультировался в течение семи лет. Нельзя исключить и то, что в основе двоичного кодирования признака им была использована Булева алгебра с двоичной системой счисления. Во всяком случае, есть основание считать, что бинарная комбинаторика («AaBbCc» и «аавсс») и математические вероятностные варианты (1 : 2 : 1) возникли у Менделя в ходе длительных раздумий – в мысленном эксперименте, в котором проигрывалось существование идеальных невидимых объектов в возможном мире.

Какие организмы нужно было взять в скрещивание для проверки этих размышлений? Вывод один: работать надо только с самоопылителями, и Мендель выбирает опыты с горохом английского селекционера Томаса Эндрю Найта. Оценивая этот выбор Менделя, Карл Корренс писал впоследствии, что успех Менделя был обусловлен тем, что он выбрал для своих опытов именно этот объект, так как цветки гороха опыляются почти исключительно своей собственной пыльцой. Никакие чужие половые клетки не могли нарушить своим вмешательством чистоту опыта.

До начала скрещиваний Мендель перебрал 34 сорта гороха и оставил для опытов только 7 пар сортов. Каждая пара отличалась друг от друга только по одному признаку. У одного сорта семена были гладкими, у другого – морщинистыми; стебель одного сорта был высокий (до 2 м), другого – едва дотягивал до 60 см; окраска венчика цветка в одном сорте была пурпурной, в другом – белой. В течение трех лет Мендель аккуратно следил за семенами и растениями всех 7 пар сортов, чтобы убедиться в том, что это чистые от загрязнения другими семенами сорта. Убедившись в том, что его сорта действительно «свободны от примесей», Мендель приступил к межсортовым скрещиваниям.

Подчеркнем, что гибридизационные эксперименты с горохом использовались Менделем лишь для подтверждения размышлений о существовании конструкции из невидимых двоичных детерминант наследственности. Опыты по скрещиванию гороха в небольшом (35 × 7 м) палисаднике под окнами монастырской трапезной требовались лишь только для того, чтобы проверить чисто умозрительное предположение. Подтверждения существования неких двух невидимых факторов, определяющих проявление видимого признака, открывались в модельном эксперименте в 8-летних статистических подсчетах многих тысяч горошин. Объект для моделирования был не только продуман, но и выбран идеальным. Оставалось только косвенно измерить с помощью статистики вероятностные варианты (1 : 2 : 1). А эти статистические методы уже накапливались в особой области физики – статистической физике, которая изучает свойства и поведение частиц, состоящих из огромного количества отдельных частиц – молекул, атомов, электронов.

Статистика в биологии до Менделя отсутствовала. К статистическим выкладкам Менделя многие относились скептически, их неоднократно изучали и тщательно проверяли. В большинстве случаев было установлено, что данные его наблюдений абсолютно совпадают с вероятностным ожиданием. Отклонений удивительно мало! (Weiling, Hat, 1966).

Принцип хранимой в памяти программы, представленной в двоичном коде, позволяет не только производить вычисления, направляя команду в устройство управления, а данные в арифметическое устройство, но и преобразовывать сами команды, например в зависимости от результатов вычислений, используя для форматирования коды команд и оперируя с ними как с данными.

Единственное неудобство, связанное с использованием как египетской непозиционной, так и компьютерной позиционной бинарной системы счисления, – это громоздкая запись значений. Приведем пример, как число из десятичной системы переводится в электронную бинарную систему счисления:

$$45 = 22 \times 2 + 1$$
$$22 = 11 \times 2 + 0$$
$$11 = 5 \times 2 + 1$$
$$5 = 2 \times 2 + 1$$
$$2 = 1 \times 2 + 0$$
$$1 = 0 \times 2 + 1$$

Следовательно, электронная бинарная запись числа 45 – это 101101. Здесь, как и в египетской математике, действие умножения сводится к многократным прибавлениям множимого, а деление – к вычитанию. Именно использование единого математического принципа древними египтянами и создателями современной вычислительной техники очевидно (Литовка, 2006, 2008).

Вероятностные представления о живом в 1865 г. явились совершенной новостью и особенно для описания биологической картины мира

Мендель понимал, что в подсчетах признаков на выбранном модельном объекте должно работать *одно из основных положений теории вероятности – закон больших чисел*, когда совокупное действие большого числа подсчетов и измерений приводит к достаточно надежному статистическому результату, почти не зависящему от стихии случая. Ведь в ходе экспериментальной верификации расчетов, по замечанию самого Менделя, у него всходили не все саженцы. В одном случае было прямо указано, что из 539 зерен было получено 529 растений, в другом – 639 из 687 и т. д. Зерна могли склевать птицы, их могла повредить зерноедка и т. д. и т. п.

В отдельных же семьях, т. е. в малых выборках, Мендель наблюдал значительную вариацию в распределении признаков среди потомков. Так, он привел данные о десяти растениях, у которых наблюдались различные соотношения, в том числе такие как 28 : 6, т. е. 3,29 : 0,71, и 19 : 10, т. е. 2,72 : 1,38 (Рокицкий, 1978. С. 5).

Г. Мендель не только дает точную количественную оценку явления, но и впервые применяет для анализа биологических процессов метод вероятностей. В своих «Опытах над растительными гибридами» (1865) он пишет о том, что по теории вероятности в среднем каждая форма пыльцы *A* и *a* соединяется одинаковое число раз с каждой формой зачатковой клетки *A* и *a*; поэтому одна из пыльцевых клеток *A* встречается при оплодотворении с зачатковой клеткой *A*, другая – с зачатковой клеткой *a*; таким же образом одна пыльцевая клетка *a* соединяется с зачатковой клеткой *A*, другая – с *a*. Численные же соотношения в потомстве отражали, говоря современным языком, вероятности. Во всяком случае, до Менделя этим методом никто в биологии не пользовался.

Теория вероятностей рассматривается как математическая (абстрактная) наука о закономерностях массовых случайных событий – наука о случайном. Случайность в буквальном ее понимании означает отрицание закономерности. Иногда даже утверждается, что случайное событие есть такое событие, которое происходит с некоторой вероятностью (Сачков, 2006).

Датой рождения теории вероятности часто называют 1654 г., когда религиозный мыслитель Блез Паскаль и математик Пьер Ферма, анализируя азартные игры, закладывают основы теории вероятностей, указав независимо друг от друга на правильное решение так называемого парадокса раздела ставки. Уже одно название «исчисление вероятностей» представляет собой парадокс: вероятность противоположна достоверности; вероятность – это то, чего мы не знаем и поэтому, казалось бы, не можем вычислять. В этом содержится противоречие, по крайней мере, кажущееся. Разбираясь в этом противоречии, великий Галилей решил одну из первых задач так называемой комбинаторики – важного инструмента расчета вероятностей. В дальнейшем Якоб Бернулли показал, что равные результаты при равных шансах наблюдаются тем точнее, чем длиннее серия событий, превратив тем самым случайное в необходимое – в закон Бернулли. Там, где счет идет на миллиарды событий, вероятностные предсказания становятся достоверными. Закон Бернулли лег в основу важного раздела естествознания – статистической физики.

Проблема соотношения необходимости и случайности, детерминизма и вероятности остается одной из сложнейших в современном естествознании; уже сама случайность подчиняется определенным законам необходимости, без чего не было бы теории вероятности.

Идея вероятности привела к радикальным преобразованиям в базовых моделях мироздания и его познания, в переходе от ньютоновской парадигмы устройства Вселенной к вероятностной. Вместе с тем раскрытие природы вероятности во многом остается загадкой. Как отмечал несостоявшийся отец атомной бомбы физик и философ с мировым именем Карл фон Вейцзеккер, вероятность представляет собой один из выдающихся примеров «эпистемологического парадокса», когда мы можем успешно применять наши базовые понятия, не имея их реального понимания (Weizsacker, 1973).

Можно сказать, что именно вероятность утвердила существование гена как дискретной единицы наследственности и позволила проникнуть в интимные механизмы процессов наследования[4].

В работе Менделя проявилось осознание связи между ошибкой, метафизикой и методологией

Мендель был не только математик, он был еще и священнослужитель, а потому он глубоко верил (впрочем, как и глубоко религиозный Ньютон), что божественный план устройства видимого мира постижим человеческим разумом, нельзя было только ошибиться в расчетах в познании этого плана. Прошедший физическую школу Доплера, Мендель хорошо знал о проблеме экспериментальной ошибки. Ему нужно было исключить саму возможность появления в расчетах ошибки и предпринять (с позиции понимания проблемы) соответствующие меры предосторожности, ведь любая ошибка, даже незначительная, в подсчетах могла помешать в его статистическом поиске свидетельств наличия невидимых бинарных факторов, определяющих видимое проявление признаков в ряду поколений.

[4] Видимо, не случайно в новосибирском Академгородке в 1960-е годы генетик Д.К. Беляев поддержал инициативу математика А.А. Ляпунова, физиолога М.Г. Колпакова и физика по образованию В.А. Ратнера о создании в Новосибирском государственном университете специализации по математической биологии. В итоге это направление, возглавляемое сегодня академиком Н.А. Колчановым, стало одной из характерных особенностей профиля Института цитологии и генетики СО РАН.

Поскольку случайности и ошибки в его поиске, естественно, имели право на существование, отсюда следует и ответ на вопрос: почему Менделю потребовались такие огромные выборки и такая щепетильность в постановке опыта? Нужно было проверить предположения на помехоустойчивость, и поэтому Мендель привлекает к работе незаинтересованных помощников – монаха патера Линденталя и патера Винкельмайера, и еще садовника Мареша.

Тематизированная форма записи, которую вначале не поняли ни биологи, ни математики

Из всего рабочего архива Менделя сохранился лишь один-единственный, да и то пострадавший от чьих-то рук, лист с расчетами. Но известно: впервые для осмысления закономерностей кодирования конкретного признака двумя невидимыми факторами Мендель применил математическую символику. Мы не знаем сейчас, на каком этапе работы он пришел к осознанию целесообразности именно этого способа решения своей задачи. Неизвестно, как он обрабатывал свои данные поначалу. Но он искал принципы кодирования признака, а принципиальные схемы всегда абстрактны.

В этом он, скорее всего, использовал идею немецкого философа-идеалиста и математика Готфрида Вильгельма Лейбница (1646–1716), мечтавшего в своей работе «Mathesis universalis» распространить алгебраический символизм на все области познания. Буквы у Лейбница служили для того, чтобы именовать действие основных логических операций. Например, запись: $a > b$ означает, что высказывание «*a*» больше высказывания «*b*». Философия Лейбница концентрируется вокруг двух основных идей, тесно связанных между собой – идеи универсальной символики и логического исчисления. Эти две идеи легли в основу современного математического анализа и современной символической логики.

Символизация в научной сфере – это переход от естественного языка как средства выражения наших мыслей к языку искусственному (Люсый, 2009). К примеру, Ньютон сообщил Лейбницу такую анаграмму: *aaaaabbbeeeeii* и т. д., в которой он попросту хотел сказать, что он умеет образовывать (по способу неопределенных коэффициентов) степенной ряд, формально удовлетворяющий предложенному уравнению (Пуанкаре, 1983. С. 303). И в чем-то похожую буквенно-алгебраическую символику впервые для обозначения невидимых наследственных факторов (по предложению датского ботаника В. Иогансена впоследствии названных генами) использовал Мендель.

Нормальные, не измененные мутацией наследственные факторы, формирующие стандартный фенотип или норму, были обозначены знаком «плюс» (+). Факторы, измененные вследствие мутации, записаны латинскими буквами: «*a*», «*b*», «*c*» и т. д. Для обозначения доминирования одного фактора над другим у Лейбница позаимствованы символы «>» (больше) и «<» (меньше). Символы между собой связываются по определенным правилам, как в математике: $+ > a$, означает, что нормальный признак доминирует над мутантным признаком.

Следует сделать оговорку о том, что буквенная символика впервые была предложена в 1766 г. Кёльрейтером при описании признаков у гибридов китайской и махровой гвоздик, а также у разных сортов табака. Однако Мендель придал ей совершенно иное понимание. Введение Менделем двоичной буквенной символики объясняло характер наследования признаков и анализа закономерностей расщепления. Что он имел в виду, когда записывал, например, *AA* или *Aa*? Один наследственный фактор пришел от отца, а другой – от матери. На основе буквенной символики возникла математизированная форма биологической записи, которую вначале не поняли ни биологи, ни математики. Позже это будет интерпретироваться как передача в цепи поколений наследственной информации, алгебраичной по своей природе (Петухов, 2012. С. 86).

О несовершенстве человеческой логики и попытке создать легенду об удачливом дилетанте-монахе

В работе Менделя, прошедшего физическую школу Христиана Доплера, господствовала логика физического наблюдения, и каждый из выводов в «Опытах над растительными гибридами» был сформулирован им с предельной завершенностью, например, так: «В этом поколении наряду с доминирующими признаками вновь появляются также рецессивные со всеми их особенностями и притом в ясно выраженном среднем отношении 3 : 1». Каждому из выводов предшествовали тщательные статистические выкладки.

Поэтому в 1936 г. последователь Менделя, выдающийся английский математик и генетик Рональд Фишер (ученик Френсиса Гальтона – двоюродного брата Ч. Дарвина), проводя ревизию менделевской статистики, в своей статье «Переоткрыты ли труды Менделя?» указывал на то, что Мендель получил подозрительно хорошее совпадение своих результатов с теоретически ожидаемыми, в то время как, согласно распределению χ^2, вероятность этого результата слишком низка. Фишер высказал тогда подозрение: а не обманывали ли Менделя садовники аббатства? Не могло так быть, что они округляли свои подсчеты, чтобы сделать патеру Грегору приятное? (Fisher, 1936).

В 1965 г. вышла работа другого английского исследователя, Гевина де Бира, отстаивавшего те же взгляды, что и Р. Фишер. В следующем, 1966, году появилась в той же тональности работа Ф. Вейлинга (Не слишком ли «точным» был Мендель в своих опытах? – Исследование по χ^2-тесту и его значению для оценок генетических

механизмов расщепления. – *Пер. О. Трапезова*) (Weiling, Hat, 1966).

Еще более подробно это противостояние сторонников учения Менделя и его критиков освещается в вышедшей в 1970 г. в издательстве Чикагского университета книге У.Б. Провайна «Теоретические основы популяционной генетики», в разделе «Дарвиновский отбор: полемика 1900–1918 гг.» (Provine, 1970).

Даже в 2006 г. в журнале «Вестник Российской академии наук» доктор психологических наук А.В. Юрьевич написал: «Можно предположить, что с тех пор как возникла наука, сформировалась и область феноменов, которые можно причислить к теневой науке, хотя характер и выраженность этих феноменов менялись с течением времени. Например, А. Кон в книге с красноречивым названием «Ложные пророки: обман и ошибки в науке и медицине» (Kohn, 1986) приводит «доказательства» того, что уже основатели науки Нового времени, Ньютон, Кеплер, Галилей и др., регулярно грешили подделкой научных данных. Широкую огласку получил случай Г. Менделя, после того как математик Р. Фишер доказал [Не доказал?! – *О. Трапезов*], что количественные данные, приводившиеся «великим монахом» в подтверждение открытых им законов генетики, в принципе невозможно было получить» (Юрьевич, 2006).

Почему такое мнение время от времени «возникает»?

Эта атака на Менделя ставила и до сих пор ставит конкретную цель – создать легенду об удачливом дилетанте-монахе, которому «просто случайно» посчастливилось стать отцом генетики. Но тем не менее проверки «дела Менделя – Фишера» с привлечением компьютерной обработки менделевских опытов показали, что они лишь чуть лучше, чем у исследователей, которые повторяли его эксперименты, и потому должны быть признаны абсолютно достоверными (Володин, 1969).

Священнику Менделю полагалось служить мессы. Но, сняв монашеское облачение и положив на отведенное место требник, каноник превращался в естествоиспытателя. Он, прошедший школу Доплера и цитолога Унгера, знал, что наука живет по другим законам: наука – это царство логики, эксперимента, повторения результатов опыта независимыми экспериментаторами.

Менделю требовался эксперимент, чтобы с помощью статистики на большом массиве данных расшифровать процесс, происходящий в «черном ящике». И прослеженное в модельном эксперименте на горохе подтверждало его размышления: судьба признака определяется действием двух невидимых факторов. Восьмилетние статистические расчеты подтвердили – родители передают своим детям не признаки, а нечто другое, то, что эти признаки обуславливает. Это другое может реализоваться немедленно, а может не реализоваться до какой-то поры, передаваться от поколения к поколению, ничем себя не проявляя. Это другое (информация) не исчезает и не возникает вновь, как не исчезает втуне и не возникает «из ничего» материя.

И, получив экспериментальное подтверждение своим размышлениям, Мендель вводит в представление о наследственности особое понятие – «Elementen»/«Anlagen»/«зачатки»/«наследственные задатки» – носители информации о признаках; информации, вступающей в скрытый от глаз исследователя процесс и в нем перерабатывающейся.

Из этого понятия, «Elementen» («Anlagen»), и возникнет генетика. Дальнейший ход мысли Менделя таков. …Каждому признаку соответствует материальный субстрат – «наследственный задаток», содержащийся в половых клетках организма. Каждая половая клетка несет в себе полный набор задатков по числу признаков будущего растения. При слиянии мужской и женской клеток в зиготу в ней окажется по два задатка для каждого признака. Когда развившееся из этого оплодотворенного яйца новое существо произведет половые клетки, два задатка снова разойдутся и в гамете – яйцеклетке или сперматозоиде – набор будет одинарным. Наследственное вещество дискретно, поэтому комбинации невидимых задатков варьируют по законам математических перестановок, и у будущих растений возникнут новые видимые комбинации признаков. Эти комбинации и математически вероятностные варианты были предсказаны им в расчетах и для экспериментальной проверки были взращены в палисаднике под окнами монастырской трапезной.

Ни Менделю, ни его учителю-цитологу Унгеру, и никому из естествоиспытателей в начале 60-х гг. XIX в. не было еще ведомо, что в клеточных ядрах накануне деления клетки выявляются окрашивающиеся тельца-хромосомы, что они удваиваются в числе, а удвоившись, расходятся к полюсам клетки и образуют два ядра двух будущих новых клеток. И тогда никто не знал, что половые клетки (пыльца растений, яйцеклетки и спермии животных, икра рыб и земноводных, яйца птиц и рептилий) проходят особый путь формирования, при котором хромосомы не удваиваются, а лишь расходятся к разным полюсам клетки-предшественницы. И в каждой из двух половых клеток, из нее образованных, оказывается половинное, а точнее, одинарное число хромосом. Лишь при слиянии их, при оплодотворении яйцеклетки набор снова становится парным. Эти процессы были замечены в исследовательских программах двух американских ученых: аспиранта Колумбийского университета Уильяма Сэттона (1876–1916) и эмбриолога Томаса Ханта Моргана (1866–1945), которого чаще называют автором хромосомной теории наследственности. В 1902 г. Сэттон сопоставил менделевские законы наследственности с поведением хромосом и усмотрел параллелизм между наследованием генов и хромосом и сформулировал «хромосомную теорию»: факторы, определяющие наследственность, т. е. гены, находятся в хромосомах.

За создание хромосомной теории в 1933 г. Морган был удостоен Нобелевской премии.

И конечно, еще никем ни разу не было произнесено слово «ген», которым обозначают единицу наследственного вещества, ответственную за элементарное различие. И никто еще не отождествлял понятие «наследственное вещество» со словом «ДНК», обозначающим удивительное вещество хромосом, дезоксирибонуклеиновую кислоту, в которой сочетаниями азотистых оснований записаны формулы белковых молекул, порядок их синтеза и пространственная упаковка (Володин, 1969).

Г. Мендель исследовал «черный ящик» (термин из физики и кибернетики). Он знал только, какая «информация» входит в этот «ящик» со сходящимися и расходящимися алгебраическими рядами невидимых наследственных задатков *AaBBcC* и *аавсс* и что получается после того, как эта «информация» прошла сквозь цепь невидимых глазу событий. Мендель предложил своим читателям сразу воспринять идею «черного ящика», и потому не оказалось тех, кто был способен понять его. На 47 страницах «Опытов над растительными гибридами» предлагалась особая система понятий, вводящих в неведомый невидимый мир, в котором говорят на особом языке. Видимо, по этой причине в 117 библиотеках из 120, в которые был разослан том трудов со статьей Менделя, он простоял на полках, тронутый разве одними библиотечными мышами. Лишь три из этих 120 экземпляров были развернуты. Это потом, лишь через 35 лет после опубликования его работы и через 16 лет после его смерти стала складываться и бурно развиваться новая наука. Мендель так рассчитывал найти поддержку. Он полагал, что его результаты будут подкреплены другими исследованиями.

В своей книге «Мендель» Б.Г. Володин напишет: «Мендель так и не отправил оттиска своей работы единственному, который мог бы более чем кто-либо понять его, – Дарвину, который интересовался трудами по гибридизации. В 1862 г. Мендель был в Лондоне. Он не знал английского языка и полный текст книги Дарвина «Происхождения видов …» проштудировал лишь год спустя, когда ее издали на немецком языке. Но содержание труда было ему известно… по полемике, развернувшейся в средствах массовой информации. Младший, четвертый, сын Дарвина – Леонард провел специальное расследование: не был ли Мендель в их доме? Не был» (Володин, 1969).

Имя Грегора Менделя естествоиспытатели узнали из книги В. Фоке «Pflanzenmischlingen» (Foke, 1881), в которой автор добросовестно и педантично составил обзор всех трудов по проблеме гибридизации. Фоке упоминает имя Менделя в монографии 15 раз. Благодаря добросовестности Фоке мир обязан тому, что к «отцу генетики» через 16 лет после его смерти пришла заслуженная слава. Ведь именно из книги Фоке о Менделе узнают и Корренс, и Чермак, и автор мутационной теории голландский ботаник Гуго Мари де Фриз.

Что касается одновременности переоткрытия работы Менделя в 1900 г. тремя биологами – Г.М. де Фризом, К.Э. Корренсом, Э. Чермаком фон Зейзенеггом, – то американский генетик А. Стертевант справедливо заметил, что одновременно была переоткрыта лишь сама статья Г. Менделя, но смысл и глубина его законов не были поняты сразу полностью ни одним переоткрывателем (Sturtevant, 1965).

Благодарности

Работа выполнена на средства федерального бюджета, выделенные на выполнение государственного задания (Проект: VI.53.2.1.).

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Архетип и символ: Сб. работ Юнга. М., 1991.

Бородин И.П. Очерки по вопросам оплодотворения в растительном царстве. Мир Божий. 1903а;4:257-272.

Бородин И.П. Очерки по вопросам оплодотворения в растительном царстве. Мир Божий. 1903б;11:199-210.

Бородин И.П. Очерки по вопросам оплодотворения в растительном царстве. Мир Божий. 1903в;12:255-274.

Володин Б.Г. Мендель (vita aeterna). 1969.

Гейзенберг В. Понимание в современной физике. Физика и философия. Часть и целое: Пер. с нем. М.: Наука, 1989.

Герье. В. Блаженный Августин. Герье Владимир Иванович. М.: Т-во Печатня С.П. Яковлева, 1910.

Головко Н.В. Картина мира и методологический реализм: теоретические и операционные ограничения в эпистемологии. Новосибирск: Параллель, 2007.

Горан В.П. Переломные этапы истории европейской философии: теоретико-методологические проблемы исследования. Философия науки. 1999;1(5):1-19.

Дарвин Ч. Происхождение видов путем естественного отбора или Сохранение благоприятных рас в борьбе за жизнь. СПб.: Наука. С.-Петербургское отд-ние, 1991.

Кёльрейтер Й.Г. Учение о поле и гибридизации растений. М.; Л.: ОГИЗ–Сельхозгиз, 1940.

Константинов Н.Н. Размышления о Тимофееве-Ресовском. Николай Владимирович Тимофеев-Ресовский: Очерки. Воспоминания. Материалы. М.: Наука, 1993.

Литовка И.И. История протонауки и теоретические модели развития науки. Философия науки. 2008;4:31-48.

Литовка И.И. Математика древнего Египта: парадоксы двоичного счисления. Философия науки. 2006;1(28):61-86.

Люсый А.П. Сквозь символы. Диалектика символизации/десимволизации как фундаментальное основание прикладной культурологии. Вопросы философии. 2009;10:48-59.

Мендель Г. Опыты над растительными гибридами. Тр. Бюро по прикл. ботанике. 1910;3(11):479-529.

Нэгели К. Происхождение естественно-исторического вида и понятие о нем. М.: тип. Лазаревского инст., 1866.

Петухов С.В. Гиперкомплексные числа, генетическое кодирование и алгебраическая биология. Метафизика. 2012;3(5):64-86.

Пуанкаре А. О науке. М.: Наука, 1983.

Рокицкий П.Ф. Введение в статистическую генетику. Минск: Вышэйш. шк., 1978.

Сачков Ю.В. Вероятность как загадка бытия и познания. Вопр. философии. 2006;1:80-94.

Спенсер Г. Основания биологии. 1899;II.
Чайковский Ю.В. Активный связный мир. Опыт теории эволюции жизни. М.: Тов-во науч. изданий КМК, 2008.
Юрьевич А.В. Теневая наука. Вестник РАН. 2006;3:234-241.
Яковлев В.А. Метафизика: эвристические программы и принципы науки. Философия науки. 2013;1(56):3-19.
Barbour J. Religion in an age of science: The Gifford Lectures, 1989–1991. N.Y., 1990;1:3-30;66-92.
Fisher R.A. Has Mendel's Work Been Rediscovered? Ann. Sci. 1936;1(2).
Foke V. Pflanzenmischlingen. 1881.
Kölreuter's J.G. Vorläufige Nachricht von einigen das Geschlecht der Pflanzen betreffenden Versuchen und Beobachtungen. Leipzig: in der Gleditschischen Handlung, 1766.
Kohn A. False Prophets: Fraud and Error in Science and Medicine. Oxford: Oxford Univ. Press, 1986.
Kuhn T.S. A Function for Thought Experiments, reprinted in T. Kuhn, The Essential Tension, Chicago: Univ. of Chicago Press, 1977:240-265.
Meijer O.G. Hugo de Vries no Mendelian? Ann. Sci. 1985;42:189-232.
Provine W.B. The Origin of Theoretical Population Genetics. Chicago; London: Chicago Univ. Press, 1970;90-129.
Russel R.J., Wegter-McNell K. Science and Theology: Mutual Interaction. Bridging Science Religion (Ed. T. Peters, G. Bennett). L., 2003:19-34.
Sorensen R.A. Thought experiments and the epistemology of laws. Can. J. Philosophy. 1992;22:15-44.
Sturtevant A. The History of Genetics. N.Y.: Harper and Row, 1965.
Weiling F., Hat J.G. Mendel bei seinen Versuchen «zu genau» gearbeitet? – Der χ^2 test und seine Bedentung für die Beurteilung genetischer Spaltungsverhältnisse. Der Züchter. 1966;36(8).
Weizsacker C.F. von. Probability and Quantum Mechanics. Brit. J. Phil. Sci. 1973;24:321.

История открытий на дрозофиле – этапы развития генетики

Н.Н. Юрченко[1], А.В. Иванников[1], И.К. Захаров[1, 2]

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия; [2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Экспериментальная генетика дрозофилы ведет свое начало с обнаружения Т.Х. Морганом в 1910 г. сцепленной с полом мутации «белые глаза» – *white*. С этого началось преобразование «наследственных факторов» Г.И. Менделя в более конкретные, но от этого не менее таинственные, «гены» В.Л. Иогансена. Благодаря своим биологическим характеристикам дрозофила оказалась универсальным модельным объектом исследований среди эукариот в исследованиях по генетике, эмбриологии, морфологии, физиологии, молекулярной и клеточной биологии. В сущности история открытий на видах рода *Drosophila* отражает основные этапы развития генетики. Результаты изучения дрозофилы заложили основы представлений генетики о природе гена, генетического сцепления, сегрегации хромосом при митозе и мейозе, механизмов мутагенеза и рекомбинации, генетической нестабильности и о мобильных генетических элементах, о закономерностях онтогенеза и генетики индивидуального развития, микроэволюционных процессов в популяциях. В работе рассмотрены этапы и ключевые моменты развития генетики на примерах американской и русской генетических школ. Для американской генетики был характерен «редукционизм», в то время как для русской генетики присущ «космизм»: через процессы микроэволюции в природных популяциях дрозофилы стремление понять закономерности макроэволюции. Благодаря простоте формально-генетического изучения в сочетании с существующей гомологией по генам-ортологам и по фундаментальным метаболическим путям эукариот, исследования на дрозофиле стали полигоном для испытания новых генетических методов и продолжают оказывать значительное влияние на биомедицинские исследования. Обозначены некоторые из приоритетных направлений в современных исследованиях, проводимых на дрозофиле.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster,* ген, генетика, мутации, мутагенез, хромосомная теория наследственности, дупликации, транслокации, кроссинговер, эффект положения, дозовая компенсация, нестабильность генома, мобильные генетические элементы, популяция, эволюция, Т.Х. Морган, А.Г. Стертевант, К. Бриджес, Г. Меллер, С.С. Четвериков, Н.П. Дубинин, Ф.Г. Доб(р)жанский, редукционизм, русский космизм.

The history of Drosophila studies: steps in the development of genetics

N.N. Yurchenko[1], A.V. Ivannikov[1], I.K. Zakharov[1, 2]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia, [2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Experimental genetic studies of Drosophila were initiated by T.H. Morgan in 1910, when he discovered the sex-linked white-eyed mutation, *white*. This discovery commenced the transformation of Mendel's "hereditary factors" to more specific but no less enigmatic W.L. Johanssen's "genes". Owing to Drosophila's biologic features, it became a universal eukaryotic model for genetic, embryological, morphological, physiological, molecular, and cellular studies. Actually, the history of discoveries done on *Drosophila* species reflects the course of genetics development. That was Drosophila studies to lay foundation for genetic notions of the nature of genes, genetic linkage, mitotic and meiotic chromosome segregation, mechanisms governing mutagenesis and recombination, genetic instability, mobile genetic elements, regularities and genetics of individual development, and microevolutionary processes in populations. The paper considers steps and milestones of genetics development by examples of the American and Russian genetic schools. The American genetics was characterized by "reductionism", whereas the Russian genetics was inclined to "cosmism", where emphasis was placed on the understanding of macroevolutionary processes. Drosophila has become a test ground to try new genetic methods, and its studies contribute much to biomedical science. The paper outlines several top priority fields in modern Drosophila studies.

Key words: *Drosophila melanogaster*, gene, genetics, mutations, mutagenesis, chromosome theory of heredity, duplications, translocations, crossover, positional effect, dose compensation, genome instability, mobile genetic elements, population, evolution, T.H. Morgan, A.G. Sturtevant, C.B. Bridges, H.J. Meller, S.S. Chetverikov, N.P. Dubinin, T.G. Dobzhansky, reductionism, Russian cosmism.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Юрченко Н.Н., Иванников А.В., Захаров И.К. История открытий на дрозофиле – этапы развития генетики. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):39-49.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Yurchenko N.N., Ivannikov A.V., Zakharov I.K. The history of drosophila studies: steps in the development of genetics. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):39-49.

УДК 575.1:575.8:575.17:576.316
Поступила в редакцию 05.02.2015 г.
Принята к публикации 26.02.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: yurchen@bionet.nsc.ru

На протяжении более чем века *Drosophila melanogaster* занимает центральное место в генетических исследованиях, она была и остается главным модельным объектом в экспериментальной биологии. История открытий на дрозофиле – это, по сути, концентрированная история генетики, ее основных этапов развития. Разумеется, генетика конечной целью своего приложения видит человека, но в силу биологических и, прежде всего этических, ограничений человек не может рассматриваться объектом генетического эксперимента начиная с организменного уровня, не говоря уже о популяционном и эволюционном уровнях. Отметим, что без генетических знаний невозможно понять фундаментальные основы функционирования как отдельного индивидуума, так и человеческого сообщества в целом, необходимые для фундаментальной медицины и, следовательно, для сохранения генетического здоровья нации.

Исследования на дрозофиле заложили основы представлений генетики о природе гена, генетического сцепления, сегрегации хромосом при митозе и мейозе, механизмов мутагенеза и рекомбинации, генетической нестабильности и микроэволюционных процессов в популяциях. Эти исследования проводились учеными, которые жили, творили и делали открытия в определенном социокультурном окружении и испытывали все превратности судьбы: взлеты и падения, и когда из строя выбивали одних, ошельмованных и затравленных, то на их место неизменно вставали новые Прометеи, чтобы дальше нести факел научной истины и прогресса.

Школа Т.Х. Моргана

Обнаруженная Томасом Хантом Морганом мутация «белые глаза» – *white* положила начало экспериментальной генетике дрозофилы (Morgan, 1910). Им было показано, что мутантный ген находится в Х-хромосоме. Это первая статья по генетике локуса *white*, изучение которого в течение более века дарит генетике множество открытий (Юрченко, Голубовский, 1988). В пионерской работе Моргана 1910 г. была осуществлена первая в истории генетики локализация реального гена на конкретной хромосоме. С этого началось преобразование довольно абстрактных и гипотетических наследственных факторов Г.И. Менделя в более конкретные, но от этого не менее таинственные «гены» В.Л. Иогансена (Morgan, 1909). Результаты анализа потомков от скрещивания белоглазого самца с красноглазыми самками привели Т.Х. Моргана к выводу, что наследование признака белого цвета глаз можно объяснить типичной мейотической сегрегацией половых хромосом, наблюдаемой в световом микроскопе. Это явилось первым конкретным доказательством ведущей роли хромосом в наследственности, как это уже теоретически предвидели почти за 10 лет до этого У. Саттон и Т. Бовери – творцы хромосомной теории наследственности (Green, 1996, 2010). К 1913 г. Т.Х. Морганом был обнаружен уже целый ряд мутаций дрозофилы, приводящих к измененной окраске глаза и морфологии крыла. Открытые им следующие пять мутаций оказались также сцеплены с полом. Одна из них, *eosin eye color*, не отделялась рекомбинацией от гена *white*, т. е. была его аллелем; другие удалось отделить от гена *white* рекомбинацией.

А.Г. Стертевант, студент, а впоследствии аспирант Т.Х. Моргана, используя частоту рекомбинации в качестве меры генетического расстояния, построил линейную генетическую карту 6 сцепленных с полом мутаций (Sturtevant, 1913). Верность порядка генетически картированных генов была подтверждена после того, как были вовлечены в цитологический анализ политенные хромосомы дрозофилы – своеобразный «подарок исследователям», преподнесенный природой. Им же были открыты явления супрессии в 1920 г. и эффекта положения гена в 1925 г., а также влияние инверсий на кроссинговер в 1926 г. Он также внес огромный вклад в исследования по систематике и сравнительной цитогенетике видов рода *Drosophila*.

Первый номер журнала «Genetics» за 1916 г. открывался статьей «Нерасхождение как доказательство хромосомной теории наследственности» еще одного студента Т.Х. Моргана – К. Бриджеса (Bridges, 1916). В этой работе Бриджес представил цитологические доказательства того, почему в скрещивании белоглазых самок с красноглазыми самцами наряду с обычным появлением в потомстве красноглазых самок и белоглазых самцов наблюдались редкие случаи выщепления белоглазых самок и красноглазых самцов. Как оказалось, такие исключения были связаны с редкими случаями нерасхождения двух Х-хромосом у белоглазых самок во время мейоза, что приводит к образованию яйцеклетки с двумя Х-хромосомами, которая при оплодотворении отцовским Y-несущим спермием приводит к образованию XXY-самок. И, наоборот, если обе Х-хромосомы случайно попали в полярное тело, то образуется яйцеклетка без Х-хромосом, которая при оплодотворении спермием с Х-хромосомой приведет к образованию красноглазых патрилинейных самцов Х0. Позднее К. Бриджесом было показано, что нерасхождение хромосом не является уникальным явлением для Х-хромосом: оно также присуще небольшой хромосоме 4 (Bridges, 1921).

В пионерских работах Т.Х. Моргана, А.Г. Стертеванта, Г. Меллера и К. Бриджеса были заложены основы классической генетики (Morgan et al., 1915). В 1927–1931 гг. Т.Х. Моргана избирают президентом Национальной академии наук США. Он был также избран председателем Шестого международного генетического конгресса в Итаке (США, штат Нью-Йорк) в 1932 г. Нобелевская премия по физиологии и медицине «За открытия, связанные с ролью хромосом в наследственности» ему была присуждена в 1933 г. (Морган, 1968). Особо отметим, что Т.Х. Морган был избран иностранным членом-корреспон-

дентом Российской академии наук в 1923 г. и иностранным почетным членом Академии наук СССР в 1932 г.

Другой выдающийся ученик Т.Х. Моргана – Герман Мёллер – был непосредственно связан с советской генетикой. Впервые в Россию Мёллер приезжал еще в 1922 г. по личному приглашению Николая Ивановича Вавилова. В 1932 г. из-за финансовых затруднений после краха фондового рынка он даже пытался покончить жизнь самоубийством. В 1933 г. Г. Мёллер с женой и сыном приехал в Ленинград. С собой в Институт генетики он привез не только оборудование, необходимое для своей работы, но и, что особенно ценно, – коллекцию дрозофил, которая насчитывала около 250 линий. В 1934 г. Институт генетики переехал в Москву. В Советском Союзе Г. Мёллер с 1934 по 1938 гг. руководил большой и успешной лабораторией проблем гена и мутагенеза Института генетики АН СССР. В 1933 г. он был избран членом-корреспондентом АН СССР. После того как И.В. Сталин прочитал перевод его книги «Выход из мрака» (Out of the Night) по евгенике и она ему не понравилась, по совету Н.И. Вавилова Г. Мёллер покинул Советский Союз. В знак протеста против преследования генетики в СССР в сентябре 1948 г. Мёллер направил в адрес Академии наук СССР письмо с отказом от звания члена-корреспондента АН СССР. В январе 1949 г. он был лишен звания, однако через 40 лет, в 1990 г., звание было восстановлено. За работы в области мутагенного действия рентгеновских лучей Г. Мёллеру была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине за 1946 г. (Мёллер, 1968).

Феодосий Добржанский и школа популяционной генетики в США

Счастливо сложилась научная судьба Феодосия Григорьевича Добржанского. Ученик Ю.А. Филипченко, яркий представитель ленинградской генетической школы и отечественной популяционной биологии, впитавший в себя русский эволюционизм, он по праву занимает место в ряду классиков генетики и эволюционной биологии (Голубовский, 2000б). В 1927 г. Ю.А. Филипченко воспользовался случаем (была выделена Рокфеллеровская стипендия) послать своего аспиранта Ф. Добржанского на стажировку в США в лабораторию Т.Х. Моргана (до 1929 г. лаборатория была в Колумбийском университете (Нью-Йорк), а с 1929 г. она переезжает в Калифорнию). Лаборатория Моргана в конце 1920-х–начале 1930-х годов становится мировым центром притяжения генетиков. Кроме Добржанского, в лаборатории Моргана проходили стажировку или ее посещали и другие генетики из СССР – М.С. Навашин, Г.Д. Карпеченко и А.Р. Жебрак. В период 1927–1929 гг. на стажировку в Калифорнийский университет в Беркли (США) по приглашению Э. Бэбкока – убежденного сторонника Моргана, был командирован М.С. Навашин (Babcock, Navashin, 1930). С октября 1929 г. по февраль 1931 г. в качестве рокфеллеровского стипендиата в лаборатории Э.Б. Бэбкока работал Г.Д. Карпеченко (Вишнякова, Гончаров, 2009). В 1930–1931 гг. в Колумбийском университете у Л. Денна в Калифорнийском технологическом институте и у Т.Г. Моргана стажировался А.Р. Жебрак. В 1928 г. Ф.Г. Добржанский принимает решение остаться работать в США (У истоков академической генетики…, 2002). Здесь он создает собственную научную школу популяционной и эволюционной генетики. В своих популяционных исследованиях Добржанский стал широко использовать сравнительный анализ рисунка дисков (по сути – порядка генов и генных комплексов) гигантских политенных хромосом дрозофилы. Его научное мировоззрение и развернутые им и его многочисленными учениками экспериментальные работы в области популяционной и эволюционной биологии по генетике природных популяций легли в основание и способствовали развитию и укреплению синтетической теории эволюции. Его труд «Genetics and Origin of Species» (Dobzhansky, 1937) вместе с работами выдающихся эволюционистов – ботаника Ледьярда Стеббинса и зоолога Эрнста Майра (Stebbins, 1950; Майр, 1947) – обобщили и показали возможность приложения популяционно-генетических данных к решению проблем видообразования.

Известное крылатое высказывание «Nothing in biology makes sense except in the light of evolution» (Dobzhansky, 1973) продолжает оставаться руководящим принципом для исследователей современной биологии всех уровней.

Московская школа эволюционной генетики

Если для американской генетики был характерен «редукционизм», то для русской генетики был характерен «космизм», т. е. попытка через популяционную генетику дрозофилы понять закономерности эволюционных процессов (Бабков, 1985; Музрукова, 2002).

Николаем Константиновичем Кольцовым была организована Лаборатория генетики на базе Института экспериментальной биологии под руководством Сергея Сергеевича Четверикова, имеющего первоначальную квалификацию систематика-натуралиста и морфолога. В 1925–1926 гг. проводилось первое в мире широкомасштабное экспериментальное исследование насыщенности природных популяций дрозофилы наследственными изменениями – мутациями. Наряду с С.С. Четвериковым и его женой А.И. Четвериковой в этой работе участвовало 10 его ближайших учеников и сотрудников, входивших в состав лаборатории генетики: Б.Л. Астауров, Е.И. Балкашина, Н.К. Беляев, С.М. Гершензон, А.Н. Промптов, П.Ф. Рокицкий, Д.Д. Ромашов, Н.В. Тимофеев-Ресовский, Е.А. Тимофеева-Ресовская, С.Р. Царапкин (Бабков, 1985; Фандо, 2005).

В 1926 г. в «Журнале экспериментальной биологии» С.С. Четвериков опубликовал статью «О некоторых моментах эволюционного процесса с точки зрения совре-

менной генетики». Она ознаменовала новый подход к теории Ч. Дарвина, который в своих эволюционных построениях опирался на понятие приспособленности. Вид рассматривается как совокупность особей, наделенных различной приспособленностью, эта приспособленность наследуется, а благодаря действию естественного отбора выживают и дают определяющий вклад в следующее поколение наиболее приспособленные особи. В этом и состоит механизм эволюции по Дарвину. Однако экспериментальная проверка этого умозрительно-логического построения невозможна по ряду причин. Прежде всего, нельзя непосредственно измерить величину приспособленности конкретных особей в популяции. Это затруднение было преодолено с развитием математических моделей эволюции С. Райтом, Дж.Б. Холдейном и Р. Фишером. Представителям английской биометрической школы Карла Пирсона удалось показать, что в природных популяциях на самом деле наблюдается варьирование по любому морфометрического признаку, но при этом количественный анализ не привел к вскрытию механизма наследования. Характеристики признаков потомков, полученных в скрещиваниях крайних вариантов, сводятся к среднепопуляционным. Наследственность как бы «разбавляется» – закон регрессии или кошмар Дженкинса. А если теория Ч. Дарвина верна, то необходимо было показать, что особи в популяции имеют разную наследуемую приспособленность. С.С. Четвериков обошел эти, казалось бы, непреодолимые преграды: им было экспериментально показано, что популяции «насыщены» гетерозиготными особями по всему спектру морфологических признаков. Следовательно, этот вывод можно экстраполировать и на такой комплексный признак, как приспособленность. И, наконец, если возможно создать гомозиготные линии с устойчивым наследованием морфологических признаков по менделевскому типу наследования, то по аналогии также может наследоваться и приспособленность.

Первые генетики не придавали особого значения наличию генетической вариации во всех без исключения линиях живых организмов. В.Л. Иогансен выдвинул теорию «чистых линий», в которых, по определению, не возможен отбор/селекция. Но дело в том, что ничто не может остановить спонтанный мутационный процесс, поэтому создание идеальной чистой линии невозможно – в любой линии неизбежно накапливаются в том числе и невидимые в гетерозиготном состоянии рецессивные мутации. С открытием же индуцированного мутагенеза – радиационного, химического, а после обнаружения мобильных генетических элементов – инсерционного мутагенеза стали понятны причины, почему мутабильность может увеличиваться значительно, а в последнем случае и направленно (Muller, 1930, 1932; Green, 1988; Рапопорт, 1993; Иосиф Абрамович Рапопорт …, 2001).

С.С. Четвериковым была создана оригинальная научная школа популяционной и эволюционной генетики. Им были найдены мотивирующие сотрудников методы общения в неформальной, непринужденной атмосфере, так называемые СООРы («современные орания»). Прием новых членов СООРа требовал согласия всех членов семинара. Во второй половине 1920-х гг. члены СООРа опубликовали ряд оригинальных генетических работ, выполненных преимущественно на дрозофиле, которые публиковались главным образом в «Журнале экспериментальной биологии» и частично за рубежом, в Германии.

Весной 1924 г. началась «показательная травля» С.С. Четверикова на собраниях в Институте экспериментальной биологии и в Московском университете. В центральной печати в сатирическом журнале «Чудак» от 24 апреля 1929 г. был помещен фельетон, осуждающий С.С. Четверикова, а 31 июля в газете «Комсомольская правда» была напечатана подборка статей под общим заголовком «Классовый враг в научных институтах», в которых под подозрение брались СООРы, которые газета пренебрежительно обозвала «Союз орущих». В заключение высказывалось недвусмысленное требование к Наркомздраву об изгнании Четверикова из Института. Вся эта кампания завершилась арестом С.С. Четверикова, почти двухмесячным заключением в Бутырской тюрьме и последующей административной ссылкой его в Свердловск на 3 года. В результате травли, ареста и ссылки руководителя коллектив лаборатории распался. При этом многие из начатых исследований остались незавершенными, а некоторые из подготовленных к печати рукописей были безвозвратно утрачены. Когда летом 1935 г. истек срок ограничения для Четверикова права свободного выбора местожительства, открылась возможность пригласить его на биологический факультет Горьковского госуниверситета, в котором в 1932 г. была организована кафедра генетики. Эту кафедру временно возглавляла доцент Зоя Софроньевна Никоро, которая при поддержке декана биологического факультета И.И. Пузанова обратилась к С.С. Четверикову с предложением возглавить кафедру генетики (Никоро, 2005). После августовской сессии ВАСХНИЛ 1948 г. и постановления о перестройке преподавания биологических наук в духе ее решений Приказом Министерства высшего образования СССР от 23 августа 1948 г. № 1208 «О состоянии преподавания биологических дисциплин в университетах и о мерах по укреплению биологических факультетов квалифицированными кадрами биологов-мичуринцев» С.С. Четвериков был освобожден от работы с формулировкой «как проводивший активную борьбу против мичуринцев и мичуринского учения и не обеспечивший воспитания советской молодежи в духе передовой мичуринской биологии». С.С. Четвериков был вынужден покинуть университет, не считая возможным отказаться от своих научных воззрений. Трагически сложилась и судьба многих его учеников. Но самая тяжелая потеря для отечественной биологической науки заключалась

в том, что были запрещены и на десятилетия преданы забвению его замечательные работы 1920-х гг., положившие начало двум новым научным направлениям – популяционной и эволюционной генетике.

Категорически нельзя согласиться с высказываемыми в последнее время утверждениями «ревизорами истории советской генетики» и тиражируемыми средствами массовой информации – печатными изданиями, радио и телевидением, что трагические судьбы генетиков в период лысенковщины в биологии в СССР есть всего лишь «частные трагедии».

И все же на протяжении развития мировой генетики виды рода *Drosophila* были и остаются ключевыми модельными объектами для исследования в области общей и молекулярной генетики, генетики популяций, молекулярных и хромосомных основ видообразования и эволюции. Здесь же отметим только некоторые из биологических достоинств дрозофилы, позволившие использовать ее в качестве генетического объекта: эукариотический организм с коротким циклом развития; необщественное насекомое; удобен для контролируемого скрещивания; достаточно прост и дешев при разведении в лабораторных условиях; малое число хромосом и наличие политенных хромосом; хорошая генетическая изученность; выделены и поддерживаются в фондах множество мутаций и линий; наличие многочисленных видов рода *Drosophila*, занимающих различные экологические ниши (от узкоспециализированных эндемиков до синантропных видов *D. melanogaster*, *D. mercatorum*, которые имеют обширный ареал).

Исследования в области популяционной генетики, заложенные С.С. Четвериковым в Кольцовском институте, были продолжены под руководством Николая Петровича Дубинина. Областью научных интересов Н.П. Дубинина были общая и эволюционная генетика, цитогенетика. Им были организованы и выполнены экспериментальные и теоретические работы в области популяционной генетики. В серии экспериментальных работ было показано наличие в популяциях дрозофил генетического груза – летальных и сублетальных мутаций. Н.П. Дубинину и Д.Д. Ромашову принадлежит описание такого основополагающего понятия в популяционной генетике, как генетико-автоматические процессы или дрейф генов. Вместе с А.С. Серебровским в работах по ступенчатому аллеломорфизму гена *scute* были показаны «делимость» гена и явление комплементарности. Им был опубликован ряд важных научных работ по структуре и функциям хромосом. В частности, в классическую мировую науку вошли работы Н.П. Дубинина и В.В. Хвостовой по цитологическому анализу эффекта положения на уникальной модели *cubitus interruptus D. melanogaster*. При транслокациях самой маленькой хромосомы 4 на аутосомы или Х-хромосомы наблюдалось изменение характера фенотипического проявления признака в зависимости от места транслокации – активный или инертный район (Дубинин, Хвостова, 1935; Хвостова, 1939; Эффект положения …, 1992). Создание атомной бомбы потребовало разработок в области влияния радиационного излучения на наследственнось, и Дубинин активно включился в работы по радиационной генетике. С началом активного освоения космоса в СССР – запуском летательных аппаратов – Н.П. Дубинин стоял у истоков космической генетики (Дубинин, 1966).

В 1957 г. Н.П. Дубинин, являясь авторитетнейшим ученым и неформальным лидером советских генетиков, был основателем, назначен и избран директором-организатором Института цитологии и генетики Сибирского отделения АН СССР в Новосибирске. Института, положившего начало возрождению генетики в СССР после ее фактической ликвидации в период лысенковщины в советской биологической науке и образовании. Института, в котором были заложены и получили свое развитие многие направления генетики. ИЦиГ СО РАН до сих пор остается самым крупным академическим институтом биологического профиля. Директором ИЦиГ СО АН СССР Н.П. Дубинин был до конца 1959 г. Однако по личному указанию Н.С. Хрущева он был снят с этой должности. Это был удар, который Н.П. Дубинину предстояло пережить. Ему представилась возможность в 1966 г. основать еще один институт – Институт общей генетики АН СССР.

В ИЦиГ СО АН СССР Н.П. Дубинин пригласил ряд видных генетиков – А.Н. Луткова, Ю.П. Мирюту, Р.П. Мартынову и в их числе и генетиков-дрозофилистов – Ю.Я. Керкиса и З.С. Никоро (которые, однако, в Новосибирске с дрозофилой уже не работали). В последующие годы по приглашению директора ИЦиГ СО АН СССР Д.К. Беляева в Институт приехали Р.Л. Берг и В.В. Хвостова. Р.Л. Берг работала под руководством Г. Меллера во время обучения в ЛГУ. В Новосибирске Р.Л. Берг организовала лабораторию генетики популяций (Колосова и др., 2003). При исследовании природных популяций *Drosophila melanogaster* Р.Л. Берг и другими представителями советской школы популяционной генетики также было показано, что мутационный процесс в них не равномерен: при изучении в течение длительного периода времени динамики частоты видимых мутаций и мутационного процесса в природных популяциях *Drosophila melanogaster* были обнаружены периоды вспышек мутабильности и повышенной концентрации по ряду сцепленных с полом генов *yellow, white* и *singed*, а выделяемые при этом аллели этих генов были нестабильны, что указывало на их инсерционную природу (Берг и др., 1941; Гершензон, 1941; Дусеева, 1948; Берг, 1961; Иванов, Голубовский, 1977; Golubovsky et al., 1977; Захаров, Голубовский, 1985; Голубовский и др., 1987). В настоящее время активно высказывается гипотеза о возможности горизонтального межвидового переноса мобильных элементов *P* и *hobo*, которые распространились в инфицированных ими природных

популяциях и привели к ген-специфическим вспышкам мутабильности (Blackman, Gelbart, 1989; O' Hare et al., 1998; Zakharov et al., 2010). Так, при анализе мутации *singed-weak* В. Энгельсом было показано, что ее нестабильные свойства обусловлены внедрением *P*-элемента, который распространился в американских популяциях *Drosophila melanogaster* сравнительно недавно и способен вызывать гибридный дисгенез (Berg et al., 1980; Engels, 1989). Если эти данные экстраполировать на популяцию человека, то, возможно, вирусные инфекционные болезни или смешение геномов, происходящие при переселении народов, приводят к вспышке мутабильности и в популяциях человека (Berg, 1982).

При исследованиях на дрозофиле впервые был обнаружен ряд важных результатов о природе наследования генов и генетических феноменов. Ниже рассмотрим некоторые из них.

Гетерохроматин и эффект положения

Г. Меллер в своем докладе по мутагенезу, индуцированному рентгеновским облучением, отмечал, что радиационные мутации ничем не отличались от мутаций спонтанного происхождения за одним исключением: появлением варьирующих по окраске или пятнистых фасеточных глаз *Drosophila melanogaster* с геном *white* (Muller, 1930). Цитологический анализ показал, что такое варьирование окраски глаза было неизменно связано с образованием хромосомных инверсий или транслокаций, при которых нормальный по фенотипу ген *white* был либо перемещен при образовании инверсии в Х-хромосоме в район центромерного гетерохроматина, либо транслоцирован на аутосому. А. Гриффин и В. Стоун при облучении Х–IV-транслокации аллеля *white-mottled*-5 (w^{m-5}) обнаружили фенотипическую реверсию к нормальному состоянию – w^+. Оказалось, что причиной фенотипической реверсии послужило образование новой транслокации, при которой ген *white* оказался перемещен из гетерохроматинового района в эухроматиновый (Griffen, Stone, 1940). В другом эксперименте Б. Джадд с помощью рекомбинации перенес аллель $white^{m258-21}$ из транслоцированной Х-хромосомы гетерозиготных самок $T(1,4)w^{m258-21}/w^+$ (т. е. из гетерохроматинового окружения) в хромосому с обычной последовательностью генов и таким образом восстановил нормальный фенотип (Judd, 1955).

Наконец, Е. Новицкий при анализе хроматин-ассоциированной инверсии *roughest*-3 (rst^3) в Х-хромосоме получил точную реинверсию (восстановление нормального фенотипа) при рентгеновском облучении самок дрозофилы, гетерозиготных по нормальной Х-хромосоме и хромосоме с инверсией (Novitski, 1961).

В целом эти эксперименты показали, что функция/экспрессия нормального гена может изменяться при его переносе к гетерохроматиновому району без нарушения физической целостности гена.

Дозовая компенсация

У дрозофилы почти не наблюдается фенотипического различия между самками с двумя копиями сцепленных с полом мутантных генов и самцами только с одной такой копией. Г. Меллер ввел в генетику термин «дозовая компенсация» для описания этого феномена (Muller, 1932). Дозовая компенсация характерна для подавляющего большинства сцепленных с полом мутаций. Однако существует одно исключение: цвет глаз гомозиготных самок *white-apricot* (w^a/w^a) не отличается от гемизиготных самцов w^a/Y, тогда как цвет глаз гомозиготных *white-eosin*-самок (w^e/w^e) заметно темнее, чем цвет глаз самцов w^e/Y. Это фенотипическое отличие распространяется на самок с делецией по гену *white.* Так, самки $w^a/w^{deletion}$ и w^a/w^a фенотипически идентичны, в то время как у самок $w^e/w^{deletion}$ цвет глаз заметно светлее, чем у самок w^e/w^e. Эта разница коррелирует с внутригенным картированием: w^a и другие аллели гена *white* с дозовой компенсацией картируются в одном сайте карты, а w^e и все другие некомпенсируемые мутации – в другом сайте (Green, 1959). Согласно современным представлениям, дозовая компенсация связана с удвоенной транскрипционной активностью у самцов по сравнению с уровнем активности у самок.

Мобильные генетические элементы

Барбара МакКлинток сделала одно из самых неожиданных открытий XX века в генетике – открытие ДНК-контролирующих элементов у кукурузы, получивших впоследствии название «мобильные генетические элементы», или «транспозоны» (McClintock, 1950). Имея в своем арсенале исключительно гибридологические и цитологические методы, она показала, что в линиях кукурузы с фенотипически нестабильными мутациями образуются хромосомные аберрации – мосты и транслокации в мейозе. Этот феномен мог бы быть объяснен как эффект положения гена, наблюдаемый у дрозофилы, – перенос гена окраски зерен початка из эухроматина в гетерохроматиновую область, что приводит к пятнистости зерен (а у дрозофилы – к мозаичности окраски фасеток глаза). Однако Б. МакКлинток была выдвинута непостижимая, если не сказать сумасшедшая, для того времени гипотеза о существовании и способности перемещаться из одного хромосомного сайта в другой гипотетических контролирующих элементов.

На протяжении почти двух десятилетий существование мобильных генетических элементов у кукурузы так и оставалось уникальной, не вызывающей ничего, кроме скептицизма, гипотезой. Судьбы признания, вернее было бы сказать, непризнания в течение нескольких десятилетий двух величайших открытий в биологии – законов наследственности Г. Менделя и генетической нестабильности Б. МакКлинток – оказались поразительным образом сходными (Fedoroff, 1989; Голубовский, 2000а, 2001, 2011).

Впервые нестабильные мутации *miniature wing* были обнаружены М. Демереком у *Drosophila virilis* в 1930-х годах (Demerec, 1929, 1941). Однако феномен генетической нестабильности многие десятилетия воспринимался генетиками как курьез неравномерности скорости спонтанного мутационного процесса, а механизм генетической нестабильности так и остался бы непонятым!

Однако в 1965 г. М. Грин обнаружил нестабильные мутации в гене *white* у *D. melanogaster* (Green, 1967). Это открытие было сделано в эксперименте по определению частоты реверсии мутации *white-ivory* (w^i) при рентгеновском облучении. При этом происходила реверсия от w^i к w^+ и была найдена одна самка, фенотип которой представлял собой частичную реверсию, т. е. цвет ее глаз был темнее, чем у w^i, но отличался от нормального фенотипа. Этот частичный ревертант получил обозначение *white-crimson* (w^c). Эта исключительная самка была со сцепленными Х-хромосомами: содержала одну w^c- и одну w^i – Х-хромосомы. При кроссинговере среди потомства этой самки были получены гомозиготные самки по w^c. При анализе потомства w^c/w^c были найдены несколько самок с неожиданным фенотипом: w^+ и w^i. Эти самки содержали маркерный ген, что исключало случайное загрязнение линии и доказывало их происхождение от исходной линии. Сцепленные Х-хромосомы были разъединены, и была получена линия, гомозиготная по w^c, со свободными Х-хромосомами. Эти гомозиготные самки так же, как и w^c-самцы, оказались мутационно нестабильными, что приводило к образованию как w^i, так и нормального по фенотипу потомства. Кроме того, у w^c-самок с низкой частотой происходило спонтанное образование двух классов неперекрывающихся делеций: с началом в локусе *white* и распространением вправо или влево от него. Аналогично делеции такого же типа индуцировались и контролирующими элементами у кукурузы в исследованиях Б. МакКлинток. Кроме того, были обнаружены транспозиции аллеля w^c из Х-хромосомы на хромосому 3 (Green, 1969). На основании этих данных был сделан вывод, что нестабильность аллеля w^c вызывается тем же фактором, который первоначально был внедрен в аллель w^i, подобным контролирующим элементам у кукурузы. При использовании методов молекулярной биологии была доказана правильность этого предположения (Collins, Rubin, 1982): причиной наблюдаемой генетической нестабильности является последовательность так называемой «foldback»-ДНК в составе локуса w^i. Вслед за этой работой последовал «взрыв» исследований по генетической нестабильности, в которых было обнаружено, что геном *D. melanogaster*, как, впрочем, и геномы других видов животных и растений, содержит широкий спектр различных классов мобильных генетических элементов, на долю которых приходится значительная часть генома (Ананьев, 1984; Mobile DNA, 1989).

Тандемные дупликации и неравный кроссинговер

Мутация *Bar* (*B*) – полосковидные глаза, найденная в 1912 г. у *Drosophila melanogaster*, является широко используемым доминантным маркером Х-хромосомы и включена в целый ряд балансерных линий. Вначале она привлекала внимание исследователей из-за варьирования экспрессии в ответ на изменение температуры окружающей среды. Ее замечательным свойством было и то, что она спонтанно либо ревертировала к нормальному фенотипу, либо мутировала к состоянию/аллелю с более выраженным мутантным фенотипическим проявлением – *ultra Bar* (B^u). Выяснение механизма мутирования *Bar* принадлежит А. Стертеванту (Sturtevant, 1925). Он заметил, что прямое и обратное мутирование *Bar* происходит только у гомозиготных *Bar*-самок, но никогда не бывает у гемизиготных *Bar*-самцов. Так как мейотический кроссинговер происходит только у самок дрозофилы и отсутствует у самцов, то из этого логически вытекало, что мутирование *Bar* может быть связано с обменом материала между Х-хромосомами в мейозе. Действительно, в классических экспериментах, которые часто цитируются в учебниках по генетике, А. Стертевант, используя фланкирующие маркеры для обнаружения кроссинговера у гомозиготных по *Bar* самок, показал, что мутирование *Bar* сопровождалось и обменом маркерами. Поскольку мутирование происходит у гомозиготных *Bar*-самок, он пришел к заключению, что *Bar* не является «точковой» мутацией, а представляет собой протяженную тандемную дупликацию; мутация B^u является трипликацией, а реципрокная к ней B^+ – нормальная последовательность Х-хромосомы. С наступлением эры цитологии политенных хромосом выводы А. Стертеванта были подтверждены цитологически независимо друг от друга К. Бриджесом и Г.Дж. Меллером, которые показали, что в линии *Bar* сегмент Х-хромосомы, включающий район 16А1-7 политенной хромосомы, действительно тандемно повторен (Bridges, 1936; Меллер и др., 1936). При этом механизм, по которому спонтанно возникала мутация *Bar*, оставался загадочным. В то время еще не были найдены аналогичные случаи такого феномена. Разрешение этой загадки крылось в особенностях тонкой генетической структуры этого района Х-хромосомы, а именно обнаружении в нем мобильных генетических элементов (Goldberg et al., 1983).

Согласно модели Стертеванта, в том случае, если мутация *Bar* возникла по вышеописанному механизму, то копии мобильного элемента должны быть локализованы по краям двух тандемных дупликаций. Действительно, у *Bar*-мутантов копии *B104*-элемента лежат в смежных с дупликацией районах (Tsubota et al., 1989). Для образования мутации *Bar* спаривание должно произойти между элементом *B104*, лежащим в диске 16А1, и его гомологом в диске 16А7, расстояние между которыми превышает 60 т.п.н. Реципрокная делеция является ле-

тальной мутацией из-за большой протяженности удаляемого генетического материала. Спаривание двух копий мобильных элементов *B104* относится к чрезвычайно редким событиям, и поэтому спонтанное образование мутации *Bar* наблюдается с низкой частотой.

Клонирование гена *white*

То, что аллель w^a оказался обусловлен внедрением мобильного элемента *copia*, сыграло решающую роль в том, что ген *white* оказался первым клонированным геном у *Drosophila melanogaster*. Первыми, кто показал с помощью *in situ*-гибридизации, что w^a-линии содержат *copia*-элемент в районе локализации гена *white* на Х-хромосоме, были У. Геринг и Р. Паро (Gehring, Paro, 1980). П. Бингхэм и Б. Джадд нашли однозначную генетическую связь между аллелем w^a и мобильным элементом *copia*, что получило прямое подтверждение при молекулярном клонировании ДНК мух линии с w^a-аллелем (Bingham, Judd, 1981; Bingham et al., 1981; Davis et al., 1987).

Современное состояние исследований на дрозофиле

С самого начала внедрения технологии рекомбинантной ДНК, с 1970-х гг., ДНК дрозофилы была одной из первых, которая была клонирована и охарактеризована в исследованиях, где была показана прямая связь между молекулярными повреждениями в геноме и мутантным фенотипом у многоклеточного организма.

В течение нескольких десятилетий исследования с использованием дрозофилы проложили путь к пониманию центральных регуляторных механизмов, лежащих в основе развития животных (Nüsslein-Volhard, Wieschaus, 1980; Arias, 2008). При этих исследованиях был обнаружен ряд сигнальных систем, таких как *Notch*, *Wnt* и *hedgehog*, нарушения в которых в настоящие время признаны главными факторами возникновения широко распространенных человеческих болезней, в перечень которых входят онкологические, сердечно-сосудистые заболевания и неврологические расстройства (Вайсман, Захаров, 2002; Вайсман, 2004; Hansson, Edfeld, 2005).

В 1995 г. Эрик Вишаус вместе с Эдвардом Льюисом и Кристианой Нюсляйн-Фольхард получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине за открытия генетического контроля эмбрионального развития (Cohen, 1995; Connor, 1995; Etcheverry, 1995; Vennström, Lagerkrantz, 1995; Raju, 2000).

Работы Э. Льюиса в области генетики развития, выполненные на *Drosophila melanogaster*, заложили основание современному пониманию универсальных эволюционно закрепленных правил, контролирующих развитие животного организма.

Работа Эрика Вишауса на *Drosophila melanogaster* была сфокусирована на изменениях, которые происходят на ранних этапах развития в эмбрионе. Большинство продуктов генов, которые участвуют в развитии эмбриона, присутствуют уже на стадии неоплодотворенного яйца и синтезируются в организме матери во время оогенеза. Однако небольшая часть генных продуктов образуется самим эмбрионом. Э. Вишаус исследовал именно эти активные гены эмбриона, так как считал, что временной и пространственный профили транскрипции являются тем пусковым механизмом, который определяет эмбриональное развитие.

Исследования на дрозофиле играют ключевую роль в понимании фундаментальных биологических процессов, которые непосредственно связаны со здоровьем человека, таких как васкулогенез, врожденный иммунный ответ, дифференциация и сохранение стволовых клеток, клеточная и тканевая полярность, регуляция роста, образование морфологических структур, обучение и память, нейронные сети и межсинаптическая передача, циркадные ритмы, продолжительность жизни.

Дрозофила служит наиболее близкой и естественной генетической моделью при исследовании насекомых *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* и *Culex pipiens*, которые являются переносчиками опасных инфекционных болезней человека: малярии, лихорадки Денге, желтой лихорадки и лихорадки Западного Нила. Результаты исследований, полученные на дрозофиле, также дают ключ к пониманию генетических процессов, выявляемых при изучении важных для сельского хозяйства насекомых, таких как пчелы и тутовый шелкопряд, и насекомых-вредителей, к которым относятся саранча, многие виды жуков и тлей.

Дрозофила представляет собой уникальную, удобную модель для изучения и понимания молекулярно-генетических основ сложных признаков, проливающих свет на важность межгенных и генно-средовых взаимодействий, а также для выявления генов и генных сетей, имеющих отношение к генам-аналогам (ортологам) комплексных признаков человека.

Особенностью *D. melanogaster* является уникальное сочетание легкости ее формально-генетического изучения со сложным строением ее тела и главных органов и тканей, которые имеют фундаментальную гомологию биохимическим и метаболическим, физиологическим и поведенческим признакам человека.

Современные методы генной инженерии позволяют исследователям успешно манипулировать с геномом дрозофилы с точностью, намного превышающей точность, достигаемую на других многоклеточных генетических модельных объектах: начиная на молекулярном уровне от точной замены отдельных пар оснований до получения видимых в световой микроскоп хромосомных дупликаций, делеций и транслокаций. Это возможно и благодаря хорошей генетической изученности дрозофилы.

Получение копии транспозона в случайном месте генома уже давно являлось рутинной методикой в работе

с дрозофилой, однако в последнее время появилась возможность направленного мутагенеза – адресного внедрения транспозона в заранее выбранное место генома.

После успешного секвенирования геномов ряда видов рода *Drosophila* появилась возможность для изучения эволюционно консервативных регуляторных сетей, что позволило получить идеальную модель для системной биологии.

Таким образом, исследования на дрозофиле остаются ключевыми для понимания биологии человека и происхождения болезней и являются стартовой площадкой для новых генетических технологий. Они явились своеобразным полигоном для испытания новых генетических методов и продолжают оказывать значительное влияние на биомедицинские исследования.

Можно выделить следующие приоритетные направления в исследованиях, проводимых на дрозофиле. Укажем на некоторые из направлений, успешно развиваемых в последнее десятилетие, согласно http://flybase.org/:

Завершены секвенирование генома *D. melanogaster* при упорядочивании локализации некоторых высокоповторенных последовательностей в эухроматине; сборка теломерных последовательностей на хромосоме 4 и X-хромосоме. Достигнут прогресс в завершении секвенирования и сборки умеренно повторенного фрагмента гетерохроматина размером 15 Mb.

Существенно обновлена генная аннотация *D. melanogaster*.

Оказались полезными для понимания организации и эволюции гена и генома short gun-метод секвенирования геномных последовательностей и их дальнейшая сборка, выравнивание и аннотация эухроматиновых последовательностей у 11 видов рода *Drosophila: D. simulans*, *D. sechellia*, *D. yakuba*, *D. erecta*, *D. ananassae*, *D. pseudoobscura*, *D. persimilis*, *D. willistoni*, *D. mojavensis*, *D. virilis* и *D. grimshawi.*

Расширена библиотека полных кДНК и их производных, включая библиотеку клонов открытых рамок считывания в рекомбинантных векторах.

В десятки раз увеличено число линий культур клеток дрозофилы, доступных для изучения.

Продолжено успешное изучение РНК-интерференции (iRNA) в культурах клеток. Развитие iRNA-технологий в культурах клеток и на целом организме, в том числе расширение библиотеки для тканеспецифичной *in vivo* iRNA почти для всех генов дрозофилы.

Создана коллекция хромосомных делеций, практически полностью перекрывающих геном; картированы тонкие подразделения генома, ограниченные точками разрывов.

Налажено производство и распределение белковых ловушек на GFP-основе и энхансерных ловушек в 900 генах.

Получило развитие phiC31 интеграз-опосредованное сайт-специфическое встраивание трансгенов для минимизации эффекта положения и надежности интегрирования ДНК в геном. Созданы геномные библиотеки для phiC31 интеграз-опосредованного сайт-специфического встраивания больших фрагментов ДНК, позволяющие выделить почти любую мутацию у дрозофилы.

Создание транскрипционного профиля полного жизненного цикла и многих типов тканей дрозофилы.

Достигнут прогресс в получении полногеномных матричных массивов и платформ для секвенирования нового поколения, создания тотального транскрипционного профиля и картирования белковых сайтов связывания в геноме с помощью чипов {ChIPов}.

Прогресс в исследованиях поддерживается постоянным усовершенствованием генетических методов, таких как направленный мутагенез генов и возможности интеграции больших фрагментов ДНК в геном дрозофилы.

Любой живой организм может стать объектом изучения. Все зависит от поставленных задач. С развитием и усовершенствованием генетических, молекулярных и цитологических методов и их доступности выбор объекта исследования еще более упростился. В становлении и развитии генетики сыграли решающую роль и внесли вклад исследования на множестве видов организмов: микроорганизмы, грибы, растения, животные (Genetic nomenclature …., 1998) – список огромный. Каждый модельный генетический объект обладает спецификой как в отношении своего строения и организации, так и степени удобства его изучения. Многие из них имеют трудности и ограничения, связанные с уникальностью их биологии или полной истории их изучения. Например, горох посевной – по праву первый генетический объект – на многие десятилетия уступил пальму первенства полноты исследований другим растениям и животным (например, см.: Костерин, 2015). Вековой путь генетики сопровождается постоянным расширением международных коллекций линий дрозофил, которые насчитывают более 100 тыс. доступных для исследователей линий. Создаются и постоянно обновляются интегральные базы данных геномных и генетических ресурсов дрозофилы. Также невозможно перечислить все отрасли биологии, в которых проводятся исследования на дрозофиле. И все же следует подчеркнуть еще раз, что среди эукариот именно *Drosophila melanogaster* оказалась универсальным модельным объектом исследований для многих направлений биологии, позволившим открыть многие ключевые механизмы генетики.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетным проектом № VI.53.2.1.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Ананьев Е.В. Молекулярная цитогенетика мобильных генетических элементов *Drosophila melanogaster*. Итоги науки и техники. Молекулярная биология. М.: ВИНИТИ, 1984;20:65-105.

Бабков В.В. Московская школа эволюционной генетики. М.: Наука, 1985.

Бабков В.В. Путевые письма и микроэволюция Ф.Г. Добржанского. Информационный вестник ВОГиС. 2007;11(2):463-469.

Берг Р.Л. Мутация «желтая» (yellow) в популяции *Drosophila melanogaster* г. Умани. Вестн. Ленингр. ун-та. 1961; Сер. биология. 1:3:77-89.

Берг Р.Л., Бриссенден Э.Б., Александрийская В.Т., Галковская К.Ф. Генетический анализ двух природных популяций *Drosophila melanogaster.* Журн. общ. биологии. 1941;2(1):143-158.

Вайсман Н.Я. Сигнальные пути клеток в онтогенезе животных на примере *Notch* каскада у *Drosophila melanogaster.* Журн. общ. биологии. 2004;65(4):322-333.

Вайсман Н.Я., Захаров И.К. Мутация *Notch* и судьба плодовой мушки *Drosophila melanogaster*. Усп. соврем. биологии. 2002; 121(1):95-108.

Вишнякова М.А., Гончаров Н.П. Георгий Дмитриевич Карпеченко. К 110-летию со дня рождения (03.05.1899–28.07.1941). Информационный вестник ВОГиС. 2009;13(1):7-25.

Гершензон С.М. Новые данные по генетике природных популяций *Drosophila fasciata.* Сб. работ по генетике. Киев: Ин-т зоологии АН УССР. 1941:4/5.

Голубовский М.Д. Век генетики: эволюция идей и понятий. Санкт-Петербург: Борей Арт, 2000а.

Голубовский М.Д. Добжанский в двух мирах. Информационный вестник ВОГиС. 2000б;12:9-15.

Голубовский М. Парадоксы непризнания: Мендель и МакКлинток. Вестник. 2001;7(266). http://www.vestnik.com/issues/2001/0327/win/golubovsky.htm

Голубовский М.Д. Нестабильность генов и мобильные элементы: к истории изучения и открытия. Историко-биологические исследования. 2011;3(4):60-78.

Голубовский М.Д., Захаров И.К., Соколова О.А. Анализ нестабильности аллелей гена *yellow*, выделенных из природной популяции дрозофил в период вспышки мутабильности. Генетика. 1987;23(9):1595-1603.

Дубинин Н.П. Эволюция популяций и радиация. М.: Атомиздат, 1966.

Дубинин Н.П., Хвостова В.В. Механизм образования сложных хромосомных реорганизаций. Биол. журнал. 1935;4(6):935-975.

Дусеева Н.Д. О распространении высокой мутабильности в популяциях *Drosophila melanogaster*. Докл. АН СССР. 1948;59(1):151-153.

Захаров И.А. Генетика в XX веке. Очерки по истории генетики. М.: Наука. 2003.

Захаров И.К., Голубовский М.Д. Возвращение моды на мутацию *yellow* в природной популяции *Drosophila melanogaster* г. Умани. Генетика. 1985;21(8):1298-1305.

Иванов Ю.Н., Голубовский М.Д. Повышение мутабильности и появление мутационно нестабильных аллелей локуса *singed* в популяциях *Drosophila melanogaster.* Генетика. 1977;13(4):655-666.

Иосиф Абрамович Рапопорт – ученый, воин, гражданин: Очерки, воспоминания, материалы. М.: Наука, 2001.

Колосова Л.Д., Малецкий С.И., Захаров И.К. Раиса Львовна Берг: к 90-летию со дня рождения. Информационный вестник ВОГиС. 2003;24/25:11-17.

Костерин О.Э. При царе горохе: непростая судьба первого генетического объекта. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):13-26.

Майр Э. Систематика и происхождение видов. М.: Иностр. литра, 1947.

Меллер Г. Образование мутаций. Нобелевская лекция, 1946 г. И. Гершкович. Генетика. М.: Наука, 1968;562-575.

Меллер Г.Г., Прокофьева-Бельговская А.А., Косиков К.М. Неравный кроссинговер у мутантов *Bar* как результат удвоения участка хромосомы. Докл. АН СССР. 1936;1:87-88.

Морган Т. Значение генетики для физиологии и медицины. Нобелевская лекция, 1934 г. И. Гершкович. Генетика. М.: Наука, 1968;559-561.

Музрукова Е.Б. Т.Х. Морган и генетика. Научная программа школы Т.Х. Моргана в контексте развития биологии XX столетия. М.: Грааль, 2002.

Никоро З.С. Это моя неповторимая жизнь. Воспоминания генетика. Изд-во «Academia», 2005.

Рапопорт И.А. Открытие химического мутагенеза. Избр. тр. М.: Наука, 1993.

У истоков академической генетики в Санкт-Петербурге. С.-Петербург: Наука, 2002.

Фандо Р.А. Формирование научных школ в отечественной генетике в 1930–1940-е гг. М.: Изд. дом И.И. Шумиловой, 2005.

Фандо Р.А., Музрукова Е.Б. Взаимопроникновение медицинских и биологических воззрений в проблему наследственности человека: историко-научный анализ. Информационный вестник ВОГиС. 2008;12(3):474-482.

Хвостова В.В. Роль инертных частей хромосом в эффекте положения гена c*ubitus interruptus* у *Drosophila melanogaster*. Изв. АН СССР. Сер. биол. 1939;4:541-574.

Четвериков С.С. О некоторых моментах эволюционного процесса с точки зрения современной генетики. Журн. эксперим. биологии. Сер. А. 1926;2(1):3-54.

Эффект положения гена в исследованиях В.В. Хвостовой. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 1992.

Юрченко Н.Н., Голубовский М.Д. Современная генетика локуса *white* у *Drosophila melanogaster*. Генетика. 1988;24(4):581-591.

Arias A.M. *Drosophila melanogaster* and the development of biology in the 20th century. Methods Mol. Biol. 2008;420:1-25.

Babcock E., Navashin M. The genus *Crepis*. Bibliographia. Genetica. 1930;6:1-90.

Berg R.L. Studies in mutability in geographically isolated populations of *Drosophila melanogaster*. Mutation in Population. Proc. Mendel Memorial Symp., August 1965. Prague. 1966:61-70.

Berg R.L. Mutability changes in *Drosophila melanogaster* populations of Europe, Asia and North America and probable mutability changes in human populations of the USSR. Japan J. Genet. 1982;57:171-183.

Berg R., Engels W., Kreber R. Site-specific X-chromosome rearrangements from hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster.* Science. 1980;210:427-429.

Bingham P.M., Judd B.H. A copy of the *copia* transposable elements is very tightly linked to the w^a allele at the *white* locus of *D. melanogaster*. Cell. 1981;25:705-711.

Bingham P.M., Levis R., Rubin G.M. Cloning of DNA sequences from the *white* locus of *D. melanogaster* by a novel and general method. Cell. 1981;25:693-704.

Blackman R.K., Gelbart W.M. The transposable element *hobo* of *Drosophila melanogaster*. Mobile DNA (Ed. D.E. Berg, M.M. Howe). Amer. Soc. of Microbiology Publication. Washington. D.C. 1989: 523-529.

Blackman R.K., Gelbart W.M. The transposable element *hobo* of *Drosophila melanogaster*. Mobile DNA (Ed. D.E. Berg, M.M. Howe). Amer. Soc. of Microbiology Publication. Washington. D.C. 1989: 523-530.

Bridges C.B. Non-disjunction as proof of the chromosome theory of heredity. Genetics. 1916;1:1-52,107-163.

Bridges C.B. The «*bar*» gene a duplication. Science. 1936;83:210-211.

Bridges C.B. Genetical and cytological proof of non-disjunction of the fourth chromosome of *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl Acad. Sci. USA.1921;7:186-192.

Cohen B. Nobel committee rewards pioneers of development studies in fruitflies. Nature. 1995;377(6549):465.

Collins M., Rubin G.M. Structure of the Drosophila mutable allele, *white-crimson* and its *white-ivory* and *wild-type* derivatives. Cell. 1982;30:71-79.

Connor S. Nobel prize given for work on fruit flies. BMJ. 1995; 311(7012):1044.

Davis P.S., Shen M.W., Judd B.H. Asymmetrical pairings of transposons in and proximal to the *white* locus of Drosophila account for four classes of regularly occurring exchange products. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1987;84:174-178.

Demerec M. Genetic factors stimulating mutability miniature-gamma wing character of *Drosophila virilis*. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1929;15:834-838.

Demerec M. Unstable genes in Drosophila. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. V. 9. N.Y.: Cold Spring Harbor, L. 1. 1941.

Dobzhansky T. Nothing in biology makes sense except in the light of evolution. Am. Biol. Teach. 1973;35:125-129.

Dobzhansky Th. Genetics and Origin of Species. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1937.

Engels W.R. *P* elements in *Drosophila melanogaster*. Mobile DNA (Ed. D.E. Berg, M.M. Howe). Amer. Soc. of Microbiology Publication. Washington. D.C., 1989:437-484.

Etcheverry G.J. Nobel prize of physiology or medicine 1995: Edward B. Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard, Eric Wieschaüs. The flies and the keys of the embryonic development. Medicina (B Aires). 1995;55(6):715-717.

Fedoroff N.V. Maize transposable elements. Mobile DNA (Ed. D.E. Berg, M.M. Howe). Amer. Soc. of Microbiology Publication. Washington. D.C., 1989:375-412.

Gehring W.J., Paro R. Isolation of a hybrid plasmid with homologous sequences to a transposing element of *Drosophila melanogaster*. Cell. 1980;19:897-904.

Genetic nomenclature guide with information on Websites. Trends Genet. 1998.

Goldberg M.L., Shien J-Y, Gehring W.J., Green M.M., Unequal crossing-over associated with asymmetrical synapsis between nomadic elements in *Drosophila melanogaster* genome. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1983;80:5017-5021.

Golubovsky M.D., Ivanov Y.N., Green M.M. Genetic instability in *Drosophila melanogaster*: putative multiple insertion mutants at the *singed bristle* locus. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1977;74:2973-2975.

Green M.M. Spatial and functional properties of pseudo-alleles at the *white* locus in *Drosophila melanogaster*. Heredity. 1959a;13: 302-315.

Green M.M. The genetics of the mutable gene at the *white* locus of *Drosophila melanogaster*. Genetics. 1967;56:467-482.

Green M.M. Controlling element mediated transpositions of the *white* gene in *Drosophila melanogaster*. Genetics. 1969;61:429-441.

Green M.M. Mobile DNA elements and spontaneous gene mutation. Eukaryotic Transposable Elements as Mutagenic Agent (Ed. M.E. Lambert, J.F. McDonald, I.B. Weinstein). Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. 1988:41-50.

Green M.M. The «Genesis of the white-eyed mutant» in *Drosophila melanogaster*: a reappraisal. Genetics. 1996;142:329-331.

Green M.M. A Century of Drosophila genetics through the prism of the *white* gene. Genetics. 2010;184(1):3-7.

Griffen A.B., Stone W.S. The w^{m5} and its derivatives. Univ. Texas Publ. 1940;4032:190-200.

Hansson G.K., Edfeldt K. Toll to be paid at the gateway to the vessel wall. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2005; 25:1085-1087.

http://flybase.org/

Judd B.H. Direct proof of a variegated-type position effect at the *white* locus in *Drosophila melanogaster*. Genetics. 1955;40:739-744.

McClintock B. The origin and behavior of mutable loci in maize. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1950;36:334-355.

McClintock B. Chromosome organization and gene expression. Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol. 1951;18:162-184.

Mobile DNA (Ed. D.E. Berg, M.M. Howe). Amer. Soc. of Microbiology Publication. Washington. D.C., 1989.

Morgan T.H. What are «factors» in Mendelian explanations? Proc. Am. Breed. Assoc. 1909;5:365-368.

Morgan T.H. Sex-limited inheritance in Drosophila. Science. 1910;32:120-122.

Morgan T.H., Sturtevant A., Muller H., Bridges C. The Mechanism of Mendelian Heredity. N.Y. Henry Holt & Co., 1915.

Muller H.J. Types of visible variations induced by X-rays in Drosophila. J. Genet. 1930;22:299-334.

Muller H.J. Further studies on the nature and causes of gene mutations. Proc. of the 6th Int. Congr. of Genetics. 1932;1:213-255.

Novitski E. The regular reinversion of the roughest-3 inversion. Genetics. 1961;46:711-717.

Nüsslein-Volhard C., Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. Nature. 1980;287(5785):795-801.

O'Hare K., Tam J.L.-Y., Lim J.K., Yurchenko N.N., Zakharov I.K. Rearrangements at a *hobo* element inserted into the first intron of the *singed* gene in the unstable sn^{49} system of *Drosophila melanogaster*. Mol. Gen. Genet. 1998;257(4):452-460.

Raju T.N. The Nobel chronicles. 1995: Edward B Lewis (b 1918), Christiane Nüsslein-Volhard (b 1942), and Eric Francis Wieschaus (b 1947). Lancet. 2000;356(9223):81.

Stebbins L. Variation and Evolution in Plant. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1950.

Sturtevant A.H. The linear arrangement of six sex-linked factors in Drosophila as shown by their mode of association. J. Exp. Zool. 1913;14:43-59.

Sturtevant A.H. The effects of unequal crossing-over at the *Bar* locus in Drosophila. Genetics. 1925;10:117-147.

Sturtevant A.H. Reminiscences of T.H. Morgan. Genetics. 2001;159:1-5.

Tsubota S.I., Rosenberg D., Szostak H., Rubin D., Schedl P. The cloning of the *Bar* region and the B breakpoint in *Drosophila melanogaster*: evidence for a transposon-induced rearrangement. Genetics. 1989;122:881-890.

Vennström B., Lagerkrantz H. The 1995 Nobel Prize in medicine or physiology – awarded Edward B. Lewis, Christiane Nusslein-Volhard and Eric Wieschaus. Ugeskr. Laeg. 1995;157(50):6999-6702.

Zakharov I.K., Ilinsky Yu.Yu., Vaulin O.V., Sinyansky Ya.Ya., Bocherikov A.M., Koromyslov Y.A., Ivannikov A.V., Voloshina M.A., Zakharenko L.P., Kovalenko L.V., Cheresiz S.V., Yurchenko N.N. Dynamic processes shaping the gene pools in the natural populations of *Drosophila melanogaster*. Тр. Междунар. науч. конф. «Чарльз Дарвин и современная биология» (21–23 сентября 2009 г., Санкт-Петербург). Нестор-история: Санкт-Петербург, 2010.

Симбиотическая фиксация атмосферного азота у бобовых растений как генетико-селекционный признак

К.К. Сидорова[1], М.Н. Гляненко[1], Т.М. Мищенко[1], Е.Ю. Власова[1], В.К. Шумный[1, 2]

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия; [2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Обобщены результаты многолетних исследований по симбиогенетике и селекции зернобобовых культур на примере гороха *Pisum sativum* L. С использованием метода химического и радиационного мутагенеза на разных сортах гороха создана и генетически изучена коллекция симбиотических мутантов. Установлены разные *sym*-гены. Из большой группы симбиотических мутантов для селекционных целей выделено два типа – супер- и гиперклубеньковые. Суперклубеньковые мутанты – рецессивные, а гиперклубеньковые – доминантные. Среди изученных сортов гороха выделены гиперклубеньковые мутанты, в основном среди стародавних сортов. Однако сорта резко различались между собой по степени гипернодуляции. Для разработки селекционных методов на повышение азотфиксации выбраны формы, маркированные рецессивными генами супернодуляции (*nod4*) и доминантными генами гипернодуляции (*Nod5*). Разработан рекуррентный метод использования симбиотических мутантов в селекции гороха на повышение азотфиксации. Лучшие результаты получены при объединении в одном генотипе гороха двух *sym*-генов – доминантного гена гипернодуляции *Nod5* и рецессивного гена супернодуляции *nod4*. Создана серия рекуррентных линий, одновременно маркированных этими двумя генами. В настоящее время эти линии используются в селекции как доноры на повышение азотфиксации при хорошей продуктивности. Кроме того, это хорошие предшественники для последующих культур. После уборки таких форм в почве накапливается большое количество корневой и бактериальной биомассы с повышенным содержанием азота. Причем этот азот пролонгируется на несколько лет, тогда как минеральный – быстро вымывается дождями и снегом. Эндемичные формы гороха, происходящие из разных регионов, можно с успехом использовать в качестве исходного материала в селекции на повышение азотфиксации. Лучшие результаты получены в опытах с формами из Египта и Сирии. Проведена оценка по нодуляции и активности азотфиксации 7 сортов трех перспективных линий гороха селекции СибНИИРС.

Ключевые слова: симбиогенетика, горох *Pisum sativum* L., нодуляция, *sym*-гены, азотфиксация, селекция.

Symbiotic nitrogen fixation in legumes as a genetic and selection trait

K.K. Sidorova[1], M.N. Glyanenko[1], T.M. Mishchenko[1], E.Yu. Vlasova[1], V.K. Shumny[1, 2]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia; [2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

The results of long-term studies on legume symbiogenetics and breeding are summarized by the example of pea *Pisum sativum* L. A collection of symbiotic mutants was developed by chemical and radiational mutagenesis of pea varieties and genetically characterized. Various *sym* genes were recognized. From the large set, supernodulating (proved to be recessive) and dominant hypernodulating types of symbiotic mutants were chosen for breeding programs. Varieties differed dramatically in hypernodulation degree. Aiming at nitrogen fixation intensification, accessions bearing recessive genes for supernodulation (*nod4*) and dominant genes for hypernodulation (*Nod5*) were selected. The recurrent method of symbiotic mutants utilization in pea breeding for nitrogen fixation intensification was developed. The best results were obtained by combining two *sym* genes in one pea genotype: the dominant hypernodulation gene *Nod5* and the recessive supernodulation gene *nod4*. A set of recurrent lines tagged with both these genes was raised to use in breeding programs as donors of intense nitrogen fixation combined with good performance. In addition, they are good preceding crops. After their harvesting, soil accumulates large amounts of nitrogen-rich root and bacterial biomass. The nitrogen is preserved for years, whereas mineral nitrogen is rapidly washed out with precipitation. Endemic pea accessions originated from various regions can be successful starting material in breeding for nitrogen fixation intensification, accessions from Egypt and Syria having provided best results. Nodulation and nitrogen fixation intensities were assessed in seven cultivars derived from three promising pea lines raised at the Siberian Research Institute of Plant Breeding and Selection.

Key words: symbiogenetics, pea *Pisum sativum* L., nodulation, *sym* genes, nitrogen fixation, breeding.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Сидорова К.К., Гляненко М.Н., Мищенко Т.М., Власова Е.Ю., Шумный В.К. Симбиотическая фиксация атмосферного азота у бобовых растений как генетико-селекционный признак. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):50-57.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Sidorova K.K., Glyanenko M.N., Mishchenko T.M., Vlasova E.Yu., Shumny V.K. Symbiotic nitrogen fixation in legumes as a novel genetic and selection trait. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):50-57.

УДК 633.358:631.527:581.557.2
Поступила в редакцию 04.12.2014 г.
Принята к публикации 06.02.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: sidorova@bionet.nsc.ru

Для обеспечения эффективного развития сельского хозяйства и сохранения окружающей среды необходимо проведение исследований, целью которых является повышение фиксации экологически чистого и экономически дешевого азота из атмосферы за счет бобово-ризобиального симбиоза. Долгое время генетика и селекция гороха и других бобовых культур были ориентированы только на надземные признаки: стебель, листья, цветки, бобы, семена, вегетационный период и др. Генетика симбиотических признаков макросимбионта стала приоритетным научным направлением только с 1980-х гг. (Jacobsen, Nijdam, 1983; Kneen, La Rue, 1988; Duc, 1989; Gresshoff, 1993). С этого же времени активные исследования по генетике азотфиксации ведутся в Институте цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) (Сидорова и др., 1987, 2001), а также в Институте сельскохозяйственной микробиологии РАСХН (г. Санкт-Петербург) (Тихонович и др., 1987). Следует отметить, что направления исследований по симбиотической азотфиксации у бобовых культур в ИЦиГ СО РАН и в Институте сельскохозяйственной микробиологии РАСХН существенно различаются. В ИЦиГ СО РАН основное внимание уделено изучению симбиотических индуцированных мутантов гороха *Pisum sativum* L. и выявлению генов, контролирующих нодуляцию и азотфиксацию у гороха. В Институте сельскохозяйственной микробиологии РАСХН ведутся глубокие исследования по эндосимбиотическим системам – бобово-ризобиальный симбиоз + арбускулярная микориза. Микоризация ведет к улучшению роста растений, однако широкое использование этого симбиоза ограничено сложностью приготовления препаратов микоризных грибов (Штарк и др., 2006; Борисов и др., 2011; Тихонович, Проворов, 2011).

Первым этапом работы в ИЦиГ СО РАН было создание коллекции индуцированных симбиотических мутантов гороха с использованием метода химического мутагенеза. Для выявления симбиотических генов проведен генетический анализ путем скрещивания мутантов с их исходными сортами, фенотипически сходные мутанты проверяли на аллелизм (Сидорова, Шумный, 1999, 2003).

Выделены следующие группы симбиотических мутантов: 1 – бесклубеньковые (nod–); 2 – клубеньков нет или они малочисленные (nod–/+); 3 – неэффективные клубеньки (nod+ fix–); 4 – слабоэффективные клубеньки; 5 – число клубеньков и активность азотфиксации сильно варьируют; 6 – повышенное количество крупных клубеньков, гипернодуляция и повышенная азотфиксация (Nod+ fix++); 7 – суперклубеньковые, огромное количество мелких клубеньков, активная азотфиксация (nod++ fix++).

Для селекционных целей несомненный интерес представляют супер- и гиперклубеньковые мутанты. С использованием суперклубенькового мутанта К301, индуцированного из сорта Рамонский 77, был идентифицирован и локализован на хромосомной карте гороха новый ген *Nod4–nod4*, рецессивный аллель которого контролирует супернодуляцию (Сидорова, Ужинцева, 1994).

При скрещивании трех суперклубеньковых мутантов, индуцированных из сорта Рондо (К10, К11 и К12), установлено, что все они аллельны по мутантному гену, определяющему супернодуляцию. Все три мутанта оказались аллельными с суперклубеньковым мутантом nod3 из иностранной коллекции. Следует отметить, что наши суперклубеньковые мутанты К10, К11 и К12 были индуцированы на 4 года раньше, чем мы получили мутант nod3 иностранного происхождения.

Два других мутанта (К21 и К22) аллельны между собой, но неаллельны с мутантами nod3 и nod4. Мутация обозначена символом *nod6* (Sidorova et al., 2003).

У суперклубеньковых мутантов выявлена важная физиологическая особенность. У сорта Рамонский 77 в фазу 7–8-й узел стебля содержание ауксина в корнях было 117 ± 37 нг/г сырой массы; у суперклубенькового мутанта – 257 ± 11. В фазу цветения, соответственно, у сорта – 15 ± 2 нг/г; у мутанта – 154 ± 35 нг/г (Холодарь и др., 2001).

Для селекционной цели особую ценность представляет идентифицированный нами ген гипернодуляции *Nod5–nod5*. В отличие от суперклубеньковых форм с мелкими клубеньками этот ген в доминантном состоянии контролирует более крупные клубеньки, высокую азотфиксацию и, что особенно важно, не вызывает снижение продуктивности растения (рис. 1) (Сидорова, Шумный, 1997; Сидорова и др., 1999). Отметим, что доминантный аллель гена *Nod5–nod5* обнаружен нами у некоторых стародавних российских и иностранных сортов гороха.

Разработка метода использования симбиотических мутантов в селекции гороха на повышение азотфиксации

В качестве источника высокой азотфиксации были использованы супер- и гиперклубеньковые мутанты, а также сорта, маркированные геном гипернодуляции *Nod5*. Различие нодуляции у этих типов видно на рис. 1.

Была поставлена задача – выяснить, можно ли снизить отрицательное влияние супернодуляции на продуктивность растения при переносе гена супернодуляции в другую генотипическую среду. Установлено, что растения с супернодуляцией, выщепившиеся в гибридных популяциях F_2, были более продуктивны по сравнению с исходным суперклубеньковым мутантом, но по продуктивности в большинстве случаев уступали сортам.

При более тщательном анализе гибридов было установлено, что все-таки есть возможность получить формы с супернодуляцией и хорошей продуктивностью при скрещивании рецессивных суперклубеньковых мутантов с сортами гороха, несущими доминантный ген *Nod5* (Сидорова и др., 2010а, 2012; Sidorova, 2011).

Рис. 1. Корневая система симбиотических мутантов гороха. *1* – супернодуляция; *2* – гипернодуляция (Sidorova, 2011).

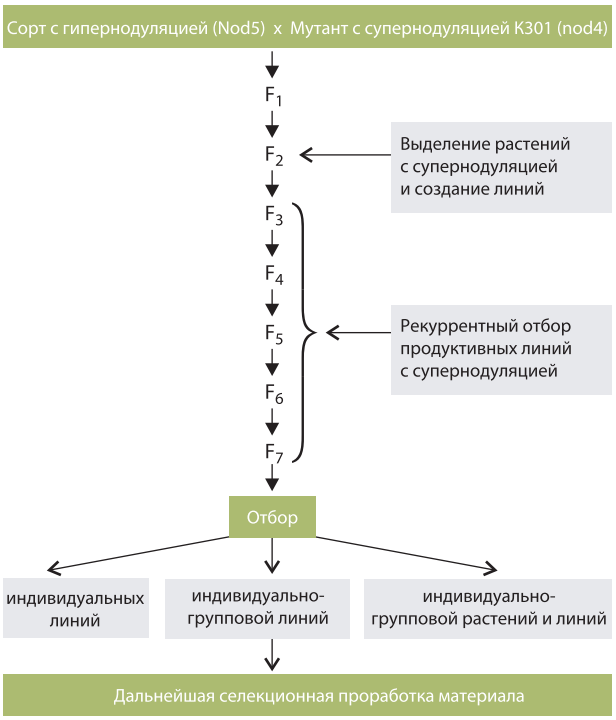


Рис. 2. Схема селекционного процесса на повышение азотфиксации у гороха *Pisum sativum* L.

Проведен опыт, целью которого было повышение нодуляции и азотфиксации у двух возделываемых сортов кормового гороха – Дружная и Новосибирская 1. В исследовании участвовали сотрудники ИЦиГ СО РАН и СибНИИРС РАСХН.

В генотипе обоих сортов есть доминантный ген *Nod5*. Сорта скрещивали с суперклубеньковым мутантом К301 (*nod4*), индуцированным из сорта Рамонский 77. В F_2 были выделены растения с супернодуляцией. На основе каждого растения с супернодуляцией создана индивидуальная линия. Линии изучали до седьмого поколения, применяя рекуррентный отбор линий по продуктивности и симбиотическим показателям. На рис. 2 представлена схема рекуррентной селекции на повышение нодуляции, азотфиксации и урожайности.

По каждому сорту выделено по 7 лучших линий по этим показателям. На рис. 3 дана характеристика по продуктивности рекуррентных линий. У всех рекуррентных линий нодуляция была более сильной, чем у суперклубенькового мутанта (рис. 4). Азотфиксация, измеряемая по активности нитрогеназы, у всех рекуррентных линий была выше, чем у сортов (табл. 1).

Бобовые культуры – хорошие предшественники для последующих культур. В наших опытах у всех рекуррентных линий отмечено сильное разрастание корневой системы и бактериальной биомассы с высоким содержанием в ней азота (рис. 5). Внедрение таких культур в производство будет способствовать улучшению плодородия почв и сокращению использования минеральных удобрений, что является важным с точки зрения экологии и энергосбережения.

Различия по активности азотфиксации у сортов и местных эндемичных сортов гороха

В настоящее время важной задачей является расширение биоразнообразия бобовых культур. Одним из источников может быть привлечение к возделыванию местных эндемичных (малоокультуренных) и стародавних сортов и форм. Кроме того, целесообразно использовать коллекции индуцированных мутантов, которые были созданы в период активных исследований по экспериментальному мутагенезу.

До сих пор селекция бобовых ведется без учета симбиотических признаков. Это привело к обеднению генофонда бобовых генетическими факторами, контролирующими симбиотропное питание. Тем не менее, как показали результаты исследований на горохе, сортовые различия по нодуляции и азотфиксации могут проявляться при выращивании растений в одинаковых условиях. Нами выделены сорта: Фаленский 6321, Торсдаг, Челябинский 24, Омский 7, которые проявили высокую азотфиксацию по сравнению с другими сортами отечественного и иностранного происхождения (Биологическая фиксация азота, 1991).

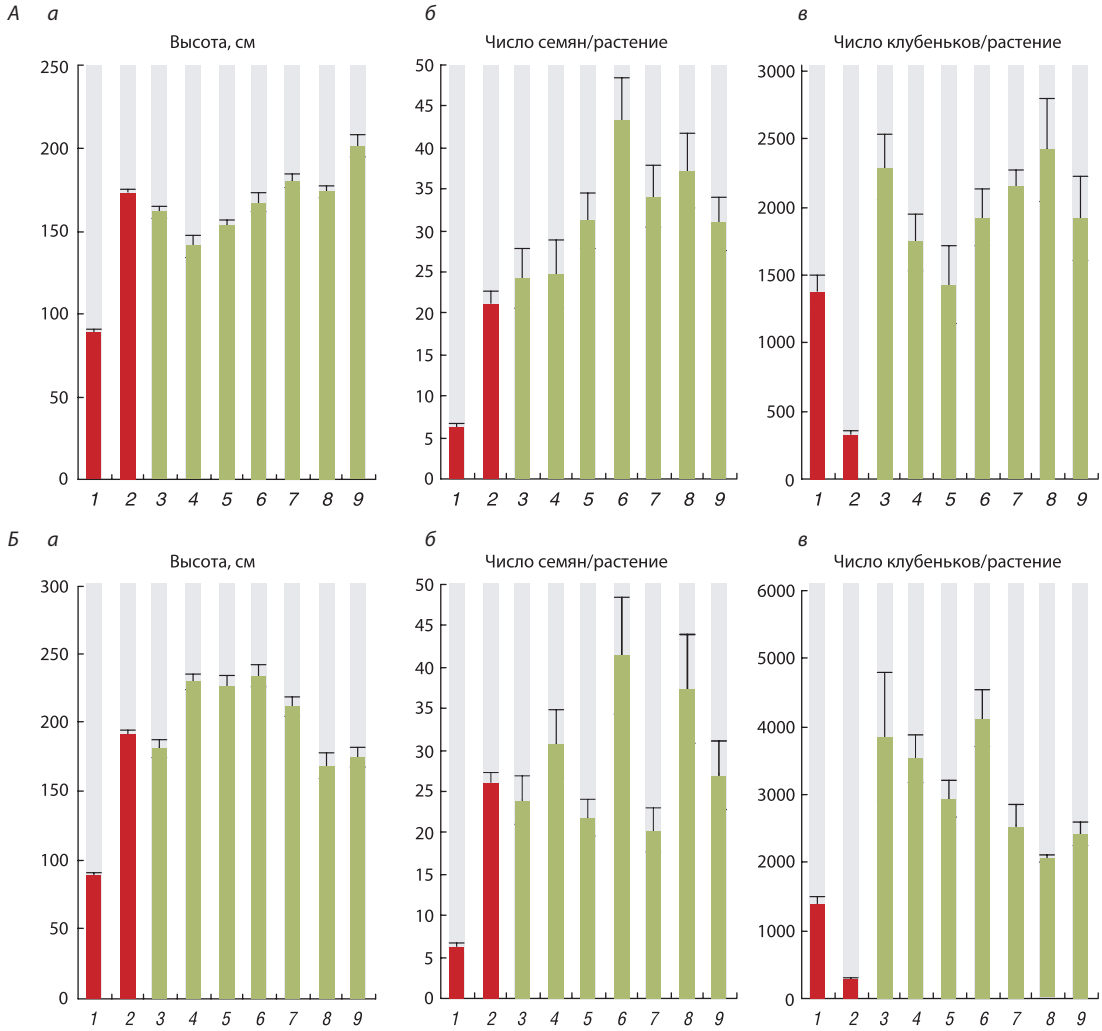


Рис. 3. Характеристика рекуррентных линий, полученных при скрещивании сортов Дружная (*А*) и Новосибирская1 (*Б*) с суперклубеньковым мутантом К301.
Высота растений (*а*), число семян (*б*) и число клубеньков (*в*). *1* — мутант К301, *2* — сорта Дружная (*А*), Новосибирская1 (*Б*), *3–9* — рекуррентные линии, полученные от скрещивания мутанта и соответствующего сорта.

Специальный опыт был проведен с сортами гороха коллекции СибНИИСХ (Омск). Были изучены симбиотические признаки – количество клубеньков и активность нитрогеназы у 6 сортов и 2 перспективных линий на фоне разных доз минерального азота (Омельянюк и др., 2013). Выявлены существенные сортовые различия по активности азотфиксации (табл. 2).

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).

При выращивании растений в условиях низкой дозы азота в субстрате (керамзит) у всех сортов активность азотфиксации была значительно выше, чем на фоне полной нормы азота (табл. 2).

Для выявления возможностей использования в исследованиях по генетике и селекции местных, эндемичных форм гороха проведен опыт, в который были включены эндемичные формы из коллекции ВИР: из Египта – К3429, Сирии – К7006, Афганистана – К1881 и Палестины – К320 (Сидорова, Шумный 2014; Сидорова и др., 2014).

При скрещивании эндемичных форм гороха, происходящих из Сирии и Египта, с суперклубеньковым мутантом К301(*nod4*) у всех рекуррентных линий F5 поколения показатели по нодуляции и азотфиксации были высокими. Однако продуктивность семян у всех линий была низкая. Положительный результат был получен, когда при скрещивании заменили материнскую форму и вместо мутанта К301 (*nod4*) скрещивали с рекуррентной линией F7 поколения, маркированной тем же геном супернодуляции (*nod4*). Линия была получена при скрещивании кормового гороха сорта Дружная с суперклубеньковым мутантом К301 (*nod4*) (табл. 4).

Рис. 4. Корневая система гороха.
1 – сорт Новосибирская-1(*Nod5*); *2* – суперклубеньковый мутант К301а (*nod4*); *3* – рекуррентная линия К730а ультрасупер (*nod4 Nod5*) (Сидорова и др., 2010б).

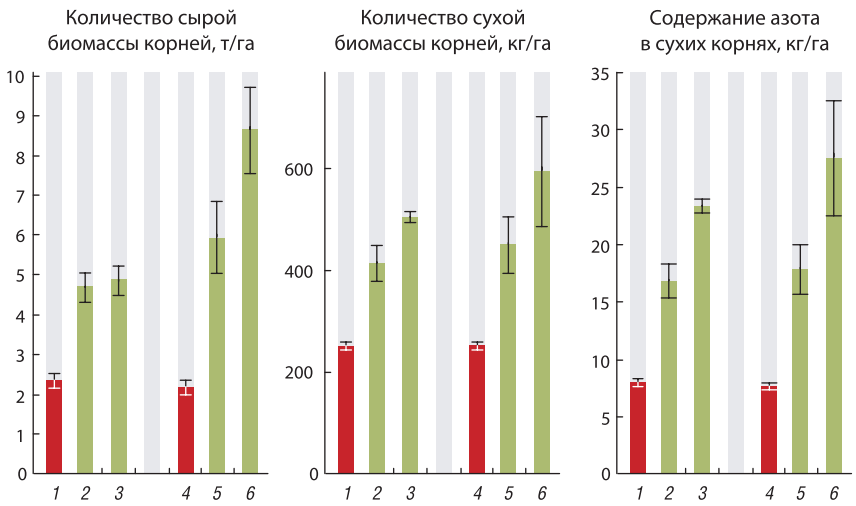


Рис. 5. Накопление сырой и сухой биомассы корней, а также содержание в них азота у растений *Pisum sativum* L.
1 – сорт Дружная; *2*, *3* – рекуррентные линии, полученные от сорта Дружная; *4* – сорт Новосибирская 1; *5*, *6* – рекуррентные линии, полученные от сорта Новосибирская 1. (Расчеты выполнены по общепринятой методике: 1,8 млн растений/га). Растения выращивали в ИЦиГ СО РАН, азот определяли в СибНИИРС в 2009 г.

Результаты проведенных нами исследований позволяют утверждать, что суперклубеньковые симбиотические мутанты можно с успехом использовать в селекции на повышение активности азотфиксации. Лучшие результаты получаются при сочетании в генотипе разных аллелей двух разных генов: *nod4* (супернодуляция) и *Nod5* (гипернодуляция).

Эндемичные формы, происходящие из разных регионов, можно с успехом использовать в качестве исходного материала в селекции гороха. Это позволит существенно расширить биоразнообразие одной из основных зернобобовых культур нашей страны. Не менее важно учитывать способность бобовых накапливать в почве большое количество бактериальной биомассы, что повышает плодородие почвы.

Результаты многолетних исследований по симбиогенетике гороха *Pisum sativum* L. свидетельствуют о том, что включение в селекционный процесс бобовых нового признака – симбиотической фиксации азота из атмосферы практически возможно. На примере гороха *Pisum sativum* L. показано, что в его генотипе есть достаточно много генов, контролирующих симбиотические признаки. Для селекции особенно важны гены супер- и гипернодуляции.

Впервые разработан метод рекуррентной селекции на повышение активности азотфиксации. Наилучшие результаты получены при сочетании в одном генотипе двух разных генов – рецессивного аллеля гена супернодуляции (*nod3* или *nod4*) и доминантного аллеля гена гипернодуляции (*Nod5*). Такое сочетание генов обеспечивает высокую нодуляцию и азотфиксацию и, что особенно важно, – высокую продуктивность. Кроме того, растения с такими генами имеют сильное разрастание корневой системы и бактериальной биомассы с высоким содержанием в ней азота. Внедрение в производство таких сортов будет способствовать улучшению плодородия почв.

Таблица 1. Активность азотфиксации у сортов и рекуррентных линий

Мутант, сорт	Активность нитрогеназы, нмоль C_2H_4/ растение/ч	Рекуррентные линии	Активность нитрогеназы, нмоль C_2H_4/ растение/ч
Суперклубеньковый мутант К301	1242	К301 × Дружная	1123–1226
		Дружная × К301	2312–2380
Сорт Дружная	424	К301 × Новосибирская 1	1235–2107
Сорт Новосибирская 1	463	Новосибирская 1 × К301	2399–2702

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

Сорт, линия	Высота, фаза начала цветения, см	Корневые клубеньки, шт./растение	Активность нитрогеназы, нмоль C_2H_4/растение/ч	Высота, фаза полного созревания, см	Семена, шт./растение
Омский 9, стандарт	152,2	511,4	127,0	194,2	20,2
Омский 7	152,6	335,0	66,1	267,5	89,6
Демос	65,0	211,4	1210,7	70,7	7,5
Благовест	96,0	188,8	654,2	166,1	18,0
Бонус	76,4	294,0	361,4	88,9	11,1
Сибур	144,8	333,2	46,8	244,8	40,5
Зауральский 3	117,4	251,6	522,5	155,3	26,1
Л 37/03	121,0	288,8	307,5	190,6	27,3
Л 32/05	137,4	207,2	277,5	253,1	19,5
Л 38/05	67,6	271,2	1028,7	80,9	7,0
$НСР_{05}$	11,5	112,1	384,7	21,9	12,2

Таблица 3. Симбиотические признаки – нодуляция и активность азотфиксации у сортов и линий гороха – при выращивании растений в сосудах

Сорт, линия	Высота, фаза начала цветения, см	Корневые клубеньки, шт./растение	Активность нитрогеназы, нмоль C_2H_4/растение/ч
Омский 9, стандарт	96,9	311,3	7618
Омский 7	113,0	317,4	3388
Демос	41,5	193,6	6536
Благовест	81,6	130,8	2843
Бонус	47,5	246,3	4836
Сибур	103,3	222,5	7506
Л 32/05	111,5	137,8	6286
Л 38/05	49,9	195,3	2527
$НСР_{05}$	6,2	90,1	1210

Для расширения биоразнообразия в селекционный процесс целесообразно включать местные эндемичные формы гороха, а также стародавние сорта, которые, как показали исследования, нередко имеют ген *Nod5*. Впервые проведена оценка по нодуляции и активности азотфиксации у сортов и перспективных линий гороха селекции СибНИИСХ, ведущего центра по селекции зернобобовых культур (горох, соя) в Сибири. Из изученных местных эндемичных форм гороха по активности азотфиксации лучшие результаты показали формы из Египта и Сирии.

Благодарности

Работа поддержана бюджетным проектом № VI.53.1.1.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Таблица 4. Симбиотические показатели и продуктивность у эндемичных форм из Египта, Сирии и рекуррентных линий поколения F_5, полученных при скрещивании по схеме: рекуррентная линия F_7 поколения, маркированная геном супернодуляции (*nod4*), полученная при скрещивании сорта Дружная с суперклубеньковым мутантом К301(*nod4*) × эндемичная форма

Вариант	Показатели на одно растение			
	число клубеньков	активность нитрогеназы, нмольC_2H_4/ч	высота, см	число семян
Эндемичная форма из Египта	196 ± 32	71 ± 27	192,2 ± 3,1	36,5 ± 7,1
Рекуррентные линии**				
к6ед	3224 ± 389*	4492 ± 684*	218,7 ± 12,9	65,7 ± 13,1*
к7ед	2308 ± 100*	3836 ± 671*	214,1 ± 10,4	40,5 ± 5,8
к12ед	2561 ± 343*	3734 ± 202*	254,6 ± 5,3*	113,0 ± 12,1*
к26ед	2001 ± 289*	8912 ± 1155*	194,8 ± 9,0	48,2 ± 5,8
Эндемичная форма из Сирии	133 ± 16	1097 ± 113	160,7 ± 4,5	43,8 ± 4,6
Рекуррентные линии**				
к2сд	2485 ± 223*	5803 ± 845*	205,6 ± 14,6*	89,1 ± 14,9*
к11сд	1368 ± 131*	9468 ± 1540*	190,0 ± 5,5*	54,2 ± 3,8

* Разница с родительской эндемичной формой достоверна ($p < 0,05$); ** номер у рекуррентных линий указан по каталогу ИЦиГ СО РАН.

Список литературы

Биологическая фиксация азота (Отв. ред. В.К. Шумный, К.К. Сидорова). Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние СССР, 1991.

Борисов А.Ю., Штарк О.Ю., Жуков В.А., Неманкин Т.А., Наумкина Т.С., Пинаев А.Г., Ахтемова Г.А., Ворошилова В.А., Овчинникова Е.С., Рычагова Т.С., Цыганов В.Е., Жернаков А.И., Кузнецова Е.В., Гришина О.А., Сулима А.С., Федорина Я.В., Чеботарь В.К., Бисселинг Т., Лемансо Ф., Джаниназзи-Пирсон В., Ратэ П., Санхуан Х., Стоугаард Й., Берг Г., Макфи К., Эллис Н., Тихонович И.А. Взаимодействие бобовых с полезными почвенными микроорганизмами: от генов растений к сортам. С.-х. биология. 2011;3:41-47.

Омельянюк Л.В., Сидорова К.К., Шумный В.К. Изучение симбиотических признаков – нодуляции и азотфиксации – у районированных сортов и перспективных линий гороха (*Pisum sativum* L.) при выращивании растений на двух фонах питания азотом. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013;17(3): 202-207.

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;1:105-109.

Сидорова К.К., Назарюк В.М., Шумный В.К., Кленова М.И. Новая модель для определения эффективности бобово-ризобиального симбиоза. Докл. АН. 2001;380(2):283-285.

Сидорова К.К., Столярова С.Н., Катышева В.Б. Азотфиксирующая активность у мутантов гороха. Генетика. 1987;23(7): 1218-1221.

Сидорова К.К., Ужинцева Л.П. Локализация мутантного гена nod4, контролирующего супернодуляцию у гороха. Докл. АН. 1994;336(6):847-849.

Сидорова К.К., Шумный В.К. Новый ген гороха (*Pisum sativum* L.) Nod5-nod5, контролирующий нодуляцию. Докл. АН. 1997; 353(5):703-704.

Сидорова К.К., Шумный В.К. Генетика симбиотической азотфиксации и основы селекции для самоопыляющихся бобовых культур (на примере *Pisum sativum* L.). Генетика. 1999;35(11):1550-1557.

Сидорова К.К., Шумный В.К., Мищенко Т.М. Хромосомная локализация гена Nod5, контролирующего нодуляцию у гороха. Докл. АН. 1999;367(6):851-852.

Сидорова К.К., Шумный В.К. Создание и генетическое изучение коллекции симбиотических мутантов гороха (*Pisum sativum* L.). Генетика. 2003;39(4):501-509.

Сидорова К.К., Шумный В.К. Симбиотические мутанты гороха (*Pisum sativum* L.) – важный генетический источник для селекции на повышение азотфиксации. Докл. АН. 2014;454(5): 612-614.

Сидорова К.К., Шумный В.К., Власова Е.Ю., Гляненко М.Н, Мищенко Т.М., Майстренко Г.Г. Симбиогенетика и селекция макросимбионта на повышение азотфиксации на примере гороха (*Pisum sativum* L.). Информационный вестник ВОГиС. 2010б;14(2):357-374.

Сидорова К.К., Шумный В.К., Гляненко М.Н., Власова Е.Ю., Мищенко Т.М. Генетический потенциал местных эндемичных форм гороха *Pisum sativum* L. по признакам азотфиксации и продуктивности. Генетика. 2014;50(1):35-43.

Сидорова К.К., Шумный В.К., Гончарова А.В., Гончаров П.Л. Использование симбиотических мутантов гороха для повышения нодуляции и азотфиксации. Докл. АН. 2010а;434(3): 427-429.

Тихонович И.А., Алисова С.М., Четкова С.А., Берестецкий О.А. Повышение эффективности азотфиксации путем отбора линий гороха по активности нитрогеназы. С.-х. биология. 1987;2:29-34.

Тихонович И.А., Проворов Н.А. Сельскохозяйственная микробиология как основа экологически устойчивого агропроизводства: фундаментальные и прикладные аспекты. С.-х. биология. 2011;3:3-9.

Холодарь А.В., Сидорова К.К., Шумный В.К. Уровень индолил-3-уксусной кислоты и гиббереллинов в корнях симбиотических мутантов гороха (*Pisum sativum* L.). Генетика. 2001;37(11):1517-1521.

Штарк О.Ю., Данилова Т.Н., Наумкина Т.С., Васильчиков А.Г., Чеботарь В.К., Казаков А.Е., Жернаков А.И., Неманкин Т.А., Прилепская Н.А., Борисов А.Ю., Тихонович И.А. Анализ ис-

ходного материала гороха посевного (*Pisum sativum* L.) для селекции сортов с высоким симбиотическим потенциалом и выбор параметров его оценки. Экол. генетика. 2006;4(2):22-28.

Duc G., Messager A. Mutagenesis of pea (*Pisum sativum* L.) and the isolation of mutants for nodulation and nitrogen fixation. Plant Sci. 1989;60:207-213.

Gresshoff P.M. Molecular genetic analyses of nodulation genes in soybean. Plant Breed. Rev. 1993;11:275-318.

Jacobsen E., Nijdam H.A. A mutant showing efficient nodulation in the presence of nitrate. Pisum Newslett. 1983;15:31-32.

Kneen B.E., LaRue T.A. Induced symbiosis mutants of pea (*Pisum sativum*) and sweet clover (*Melilotus alba annual*). Plant Sci. 1988;58:177–182.

Sidorova K.K. Use of supernodulating mutants in pea breeding. Pisum Genetics. 2011;43:17-19.

Sidorova K.K., Shumny V.K., Mischenko T.M., Vlasova E.Yu. A new gene for supernodulation in pea: nod6. Pisum Genet. 2003;35: 28-29.

Наследование желтой окраски у сафлора красильного, *Carthamus tinctorius* L.

Т.В. Леус

Институт масличных культур Национальной академии аграрных наук Украины, Запорожская область, пос. Солнечный, Украина

Сафлор красильный – *Carthamus tinctorius* L. – малораспространенная культура, генетика которой слабо изучена. Исследователи выделяют 4 типа окраски цветков: красную, оранжевую, желтую и белую. Данные о наследовании окраски неполные и противоречивые. Цель работы – изучение наследования желтой окраски цветков у сафлора. Исследования проводились в 2009–2013 гг. Были использованы 11 образцов с красной, оранжевой, желтой и белой окраской венчика. Образцы были получены в результате самоопыления в течение нескольких лет. Для генетического анализа были использованы результаты искусственного и свободного опыления. Во время искусственного опыления для кастрации материнских цветков были использованы две методики: методика массовой кастрации цветков с помощью целлофанового изолятора, применяемая в Индии, и разработанная нами методика смыва пыльцы. Статистическая обработка проводилась с использованием метода χ^2. Показано, что существует несколько типов наследования признака желтой окраски. При скрещивании растения с желтыми цветками с растением с другой окраской цветков гибриды первого поколения имели желтую окраску. В поколении F_2 в расщеплении наблюдались все 4 типа окраски, а растения с желтой окраской цветков представляли самый большой класс. Реже наблюдалась ситуация, когда во втором поколении выщеплялось меньшее количество растений с желтой окраской цветка при преобладании растений с окраской венчика другого типа. При этом желтая окраска не наблюдалась у участвовавших в скрещивании родительских растений. Доминантный ген, обуславливающий развитие желтой окраски, предложено обозначать буквой *C* (от англ. *Chrome)*. Рецессивный аллель этого гена дает возможность проявления других типов окраски.

Ключевые слова: сафлор, скрещивание, наследование, окраска цветков, *Carthamus tinctorius* L., *Asteraceae*.

Inheritance of yellow colour in safflower (*Carthamus tinctorius* L.)

T.V. Leus

Institute of Oilseed Crops of the National Academy of Agricultural Sciences of Ukraine, Zaporozhskaya oblast, setllement Solnechny, Ukraine

Safflower is a minor crop, and its genetics is poorly known. Four types of safflower corolla color are recognized: red, orange, yellow, and white. As the information on color inheritance is incomplete and contradictory, we aimed to study the inheritance of yellow color in safflower. The research conducted in 2009–2013 involved 11 accessions with red, orange, yellow, and white corollae. Samples were obtained by self-pollination for several years. Their progenies by open and controlled pollination were genetically analyzed. Two emasculation techniques were used in artificial pollination: the Indian mass-emasculation technique with polythene bags and the washout pollen technique we've elaborated. The results were evaluated by the Chi-square test. They revealed several types of yellow color inheritance. Crosses of a yellow-corolla plant to a plant with another corolla color yielded yellow-corolla F_1 progenies. Segregation of F_2 produced all the four colors, the yellow color being the most abundant. However, when the parental plants had corolla colors other than yellow in some cases F_2 contained fewer yellow-corolla plants, while other corolla colors were predominant. The dominant gene determining the yellow color is proposed to be designated as C for Chrome. The recessive allele of this gene permits the development of other corolla colors.

Key words: safflower, breeding, inheritance, flower color, *Carthamus tinctorius*, *Asteraceae*.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Леус Т.В. Наследование желтой окраски у сафлора красильного, *Carthamus tinctorius* L. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):58-62.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Leus T.V. Inheritance of yellow colour in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):58-62.

УДК 633.854.797:631.524.7
Поступила в редакцию 09.10.2014 г.
Принята к публикации 26.12.2014 г.
© АВТОР, 2015

e-mail: tatiana_leus@list.ru

Центр происхождения сафлора – Средиземноморье, родина – Эфиопия и Афганистан. Растение было известно в Древнем Египте, до нашей эры его выращивали в Индии, Китае. В Европу сафлор завезен арабами (Бартенев, 1956). Этот представитель семейства Сложноцветные (Asteraceae) относится к числу древнейших сельскохозяйственных культур, возделываемых человеком. Это неприхотливое растение, хорошо выдерживающее резкие колебания температуры и нетребовательное к почвам.

Сафлор красильный (*Carthamus tinctorius* L.) входит в число так называемых редко используемых культур, несмотря на то что упоминания о нем встречаются еще до нашей эры. Его посевные площади ограничены, и выращивают его в немногих странах (Dajue, Mündel, 1996). На сегодняшний день около половины урожая сафлора приходится на Индию. Сафлор используют как кормовое растение, в технических и декоративных целях, в медицине, однако в основном сейчас он популярен как масличное растение (Мамот, 1952; Bradley et al., 1999; Ji et al., 2009) для пищевых и технических целей. Масло сафлора сходно с подсолнечным (Минкевич, Боровский, 1952).

Исторически сафлор начал возделываться как источник ценного красящего вещества – красного картамина (Бартенев, 1956). Это гликозид, трудно растворимый в воде, но хорошо растворяющийся в щелочах и спирте. Он хорошо окрашивает ткани в красный и розовый цвет. Помимо красного картамина цветки сафлора содержат менее ценный пигмент – сафлор гельб желтого цвета, который, напротив, водорастворим.

В классификаторе ВИР (Классификатор …, 1985) выделены типы окраски для бутона, распустившегося и увядающего цветка. Согласно этим данным, окраска бутона делится на белую, желтую и пурпурно-красную. Для распустившегося цветка выделены белая, желтая и оранжево-красная окраска венчика, а для увядающего – белая, желтая, оранжевая и красная. В ВОС-тесте (UPOV TG/134/3, 1990) выделены три типа окраски для распустившегося цветка: белая, желтая и оранжевая. Дополнительно ВОС-тестом выделен признак смены окраски венчика.

Сафлор считается самоопылителем, однако факторы окружающей среды могут увеличивать процент перекрестного опыления до 50. Плоидность $2n = 24$ (Dajue, Mündel, 1996).

Наследование окраски цветков у сафлора изучалось ранее, однако данные эти неполные и противоречивые. B.N. Narkhede и A.B. Deokar указывают на существование пяти генов, ответственных за окраску цветков (Narkhede, Deokar, 1986; Narkhede et al., 1989). Гены *R*, *O*, *C* и *Y* упоминаются и другими исследователями (Golkar et al., 2010). Их комбинации формируют красную, оранжевую, желтую и серовато-белую окраску венчика. Пятый ген, *P*, отвечающий за формирование пурпурной окраски, в других источниках не встречается. Нет образцов с пурпурной окраской и в нашей коллекции.

Целью нашей работы было выяснение характера наследования желтой окраски у цветков сафлора красильного.

Материалы и методы

Изучение наследования окраски цветков сафлора проводилось в питомнике Института масличных культур НААН с 2009 по 2013 гг. В исследовании мы применяли гибридологический метод (Тихомирова, 1990; Проценко, 1991). Закладка опытов производилась, согласно методикам (Доспехов, 1965), селекционному опытному делу. Опыты закладывались вручную в питомнике на 4–6 рядовых делянках двухметровой длины, ширина междурядий – 0,35 см (площадь 2,8–4,2 м^2), ширина между делянками – 0,7 см. Посев производился в первой половине апреля.

Для определения характера наследования были использованы результаты свободного опыления и скрещиваний. В эксперименте принимали участие 11 образцов сафлора. Образцы 157/1 UE0900046, Медовый UE0900039 (149/3.3), Салют UE0900051 (91/1) имеют желтую окраску (рисунок, *а*). Курчавый UE0900044, Огонек UE0900040 (47/1), Искорка UE0900043 (171) – оранжевую (рисунок, *б*). БПК2 UE0900049, Рассвет UE0900042, 129/к UE0900045, Розочка UE0900038 (63) – красную (рисунок, *в*) и Белоцветковый неколючий UE0900035 (152) – белую (рисунок, *г*). Образцы получены путем самоопыления в течение нескольких лет.

Для кастрации материнских растений были использованы две методики. Методика, используемая для массовой кастрации цветков, применяется в Индии (Dajue, Mündel, 1996). При этом на растении выбираются 5–10 хорошо развитых головок на 4–5 ветках и изолируются полиэтиленовыми изоляторами. Остальные ветви обрезаются. Повышенная температура и влага внутри изолятора предотвращают самоопыление. Когда зацветает половина цветков, производят опыление, для более успешного результата процедуру проводят три дня подряд. Чтобы избежать загнивания и возникновения заболеваний, в конце цветения полиэтиленовые изоляторы заменяют бумажными или тканевыми. Данная методика была использована нами в измененном виде: оставшиеся свободными ветви не обрезали, а использовали как отцовские растения. Вторая использованная методика смыва пыльцы разработана нами. Созревший бутон вскрывается за 1–2 дня до цветения, после чего верхняя часть цветка вместе с пыльниками разрывается тонкой иглой. Когда все цветки таким образом вскрыты, корзинку прополаскивают в стакане с водой. После этого цветки накрывают изоляторами и 1–2 дня ждут вытягивания пестиков. Опыление производят несколько дней подряд до полного отцветания

Окраска венчика сафлора: желтая (*а*); оранжевая (*б*); красная (*в*); белая (*г*).

корзинки (Леус, Ведмедева, 2013). Перенос пыльцы с отцовского растения на материнское осуществлялся мягкой кисточкой. Таким образом были получены гибриды F_1 от скрещивания.

Отбор гибридов F_1 от свободного опыления проходил следующим образом. От нескольких растений материнской линии, не накрытых изоляторами, были взяты и высеяны семена. Полученные из них растения проверялись на сходство с материнской линией по таким морфологическим признакам, как окраска цветков и наличие колючек. Растения, отличавшиеся от материнской линии, были признаны гибридными.

Гибриды F_2 были получены путем самоопыления гибридов F_1.

Статистическая обработка проводилась с использованием метода χ^2 (Лакин, 1990).

Результаты

Четыре гибрида F_1 от скрещивания дали поколение F_2. Также поколение F_2 получено от 7 гибридов F_1 от свободного опыления. Еще от 13 скрещиваний имеются только гибриды первого поколения. По совокупности этих данных был проведен генетический анализ.

При скрещивании растения с желтыми цветами с растением с другой окраской цветков гибриды первого поколения имели желтую окраску (табл. 1). При этом в поколении F_2 в расщеплении наблюдались все 4 типа окраски (желтая, оранжевая, красная и белая), а растения с желтой окраской цветков представляли самый большой класс. В результатах, полученных от свободного опыления, аналогичная ситуация наблюдалась в 6 случаях из 7.

Реже наблюдалась ситуация, когда во втором поколении выщеплялось меньшее количество растений с желтой окраской цветка при преобладании растений с окраской венчика другого типа. При этом желтая окраска не наблюдалась у участвовавших в скрещивании родительских растений (табл. 2).

Мы предположили существование доминантного гена, контролирующего развитие желтой окраски. Чтобы это проверить, мы объединили растения с оранжевыми

Таблица 1. Наследование желтой окраски по доминантному типу

Номер/ год скрещивания	Комбинация скрещивания	F_1	Окраска потомков F_2			Модель	Теоретические частоты	χ^2
			желтая	оранжевая и красная	белая			
85/2011	♀152 × ♂*N*	ж	19	4	6	9 : 3 : 4	16,3:5,4:7,2	1,04
92/2011	♀63 × ♂*N*	ж	14	4	–	3 : 1	13,5:4,5	0,07
86/2012	♀БПК2 × ♂*N*	ж	114	35	–	3 : 1	111,8:37,3	0,18
101/2012	♀152 × ♂*N*	ж	14	6	6	9 : 3 : 4	14,6:4,9:6,5	0,32
110/2012	♀152 × ♂*N*	ж	66	17	22	9 : 3 : 4	59,1:19,7:26,3	1,87
123/2012	♀47/1 × ♂*N*	ж	169	54	–	3 : 1	167,3:55,3	0,07
128-130/2012	♀129/к × ♂91/1	ж	46	19	–	3 : 1	48,8:16,3	0,62
115-116/2013	♀152 × ♂149/3.3	ж	175	59	87	9 : 3 : 4	180,6:60,2:80,3	0,76

N – неизвестная отцовская форма при свободном опылении; ж – желтая окраска венчика.

Таблица 2. Появление желтой окраски во втором поколении

Номер/ год скрещивания	Комбинация скрещивания	F_1	Окраска потомков F_2			
			желтая	оранжевая	красная	белая
98-100/2012	♀152/2 × ♂N	ор	13	54	25	28
112/2013	♀152 × ♂171	ор	36	117	47	66
113/2013	♀152 × ♂171	ор	20	61	21	47

N – неизвестная отцовская форма при свободном опылении, ор – оранжевая окраска венчика.

и красными цветками в один класс. Данные представлены в табл. 1.

В скрещиваниях участвовали растения со всеми 4 типами окраски венчика . В первом поколении наблюдалось единообразие – все растения имели желтую окраску цветков. Во втором поколении наблюдалось расщепление на 2 класса по схеме 3 : 1 или на 3 класса по схеме 9 : 3 : 4, если при создании потомков F_1 участвовали растения с белыми цветками. При этом в потомстве F_2 преобладала доля растений с желтой окраской цветков. Подсчет χ^2 показал отклонение эмпирических частот от теоретических в рамках допустимых значений.

Таким образом, при расщеплении 3 : 1 желтые цветки образовывались при наличии гетерозиготного или доминантного состояния растений по гену, контролирующему желтую окраску. В случае рецессивной гомозиготы проявлялась красная или оранжевая окраска венчика цветка сафлора. При расщеплении 9 : 3 : 4 белая окраска проявлялась при наличии рецессивной гомозиготы по гену-ингибитору окраски *y*. Доминантный аллель гена *Y* дает возможность проявления других типов окраски. Этот аллель гена *Y* в комбинации с доминантным аллелем гена, отвечающего за желтую окраску, в фенотипе дает желтую окраску венчика. При наличии доминантного аллеля гена *Y* и рецесивной гомозиготы по гену, отвечающему за развитие желтой окраски, проявляется красная или оранжевая окраска венчика.

Обсуждение

Изучая окраску цветков сафлора, B.N. Narkhede и A.B. Deokar (1986) первыми дали названия генам, ответственным за ее формирование. Согласно им, доминантный ген *C* (от слова *Cyan*) обуславливает развитие белой окраски, *Y* – желтой, *R* – красной и *O* – оранжевой. Однако дальнейшие исследования показали, что белая окраска у сафлора не обуславливается доминантным геном, а наследуется по типу рецессивного эпистаза (Golkar et al., 2010; Леус, Ведмедева, 2012). Рассчитанные генотипы растений представлены в табл. 3.

По этим данным, рецессивный аллель гена *Y* в гомозиготном состоянии обуславливает белую окраску венчика. При наличии доминантного аллеля гена *Y* проявляются другие типы окраски. За проявление желтой окраски отвечает доминантный аллель гена *C*. Чтобы убрать возникающее противоречие, мы предлагаем его обозначать как *C* (от англ. слова *Chrome* – желтый цвет). Тогда растение с генотипом *Y-C-* будет иметь желтую окраску венчика, с *yyC-* и *yycc* – белую, а при генотипе *Y-cc* будет проявляться красная или оранжевая окраска.

В наших скрещиваниях гибриды первого поколения, имеющие желтую окраску цветков, имеют генотипы *YYCc* и *YyCc*. В скрещиваниях 85/2011, 101/2012, 110/2012 и 115-116/2013 гибриды второго поколения желтого цвета имеют генотипы *YYCC*, *YYCc*, *YyCC* и *YyCc*. Растения с белой окраской венчика имеют ге-

Таблица 3. Генотипы растений, согласно данным зарубежных исследователей

Генотипы	По: Narkhede и Deokar (1986)	По: Golkar et al. (2010)
rrooyycc		белый
rrooyyC-	белый	белый
R-ooyyC-	белый	
rrO-yyC-	белый	
R-O-yyC-	белый	
rrooY-C-	красный	желтый
rrO-Y-C-	желтый	
R-O-Y-C-	желтый	
rrooY-cc		оранжевый

нотипы *yycc*, *yyCc*, *yyCC* и растения с красными и оранжевыми цветками – генотипы *Yycc* и *YYcc*. В скрещиваниях 92/2011, 86/2012, 123/2012, 128-130/2012 гибриды второго поколения с желтой окраской венчика цветка имеют генотипы *YYCC* и *YYCc*, красной и оранжевой – *YYcc*.

У номеров 128-130/2012 и 115-116/2013 мы имеем возможность определить генотипы родителей. Генотип образца 129/к будет *YYcc*, 91/1 и 149/3.3 – *YYCC* и 152 – *yycc*.

В скрещиваниях 98-100/2012, 112/2013, 113/2013 (табл. 2) в F_2 наблюдалось появление меньшей доли растений с желтой окраской цветка при преобладании доли растений с оранжевой. Можно предположить, что в этом случае за проявление желтой окраски отвечают другие гены. Вероятно, что разные их комбинации обеспечивают формирование желтых, красных и оранжевых цветков, однако для генетического анализа этих признаков недостаточно данных.

Таким образом, установлено, что в образцах Медовый (UE0900039) и Салют (UE0900051) желтая окраска цветков обусловлена одним доминантным аллелем гена, обозначенного *C*. Рецессивный аллель этого гена дает возможность проявляться действию других генов, обуславливающих оранжевую и красную окраски.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Бартенев Д.И. Сафлор и его применение. Ученые записки. 1956;3:(8):173-183.

Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М.: Колос, 1965.

Классификатор вида *Carthamus tinctorius* L. (сафлор красильный) (Под ред. В.А. Корнейчук). Л.: ВИР, 1985.

Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1990.

Леус Т.В., Ведмедева Е.В. Наследование признака белой окраски цветков у некоторых образцов сафлора красильного. Вісник харківського національного аграрного університету. Серія біологія. 2012;16:25:92-95.

Леус Т.В., Ведмедева К.В. Спосіб схрещування сафлора красильного. Патент № 84640 від 25.10.2013. Промислова власність. Офіційний бюлетень, 2013;20.

Мамот Я.Г. О колючках у сафлора. Изд. Акад. наук Узбекской ССР. 1952; № 2.

Минкевич И.А., Боровский В.Е. Масличные культуры, изд. 2. М.: Сельхозгиз, 1952.

Проценко Н.В. Генетический словарь. Киев, 1991.

Тихомирова М.М. Генетический анализ Л.: ЛГУ, 1990.

Bradley V.L., Guenthner R.L., Johnson R.C., Hannan R.M. Evaluation of Safflower Germplasm for Ornamental Use. Perspectives on new crops and new uses. Alexandria: ASHS Press, 1999: 433-435.

Golkar P., Arzani A., Rezaei A. M. Inheritance of flower colour and spinelessness in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). J. Genet. 2010;89(2):259-262.

Dajue L., Mündel H.-H. Safflower. Carthamus tinctorius L. Promoting the conversation and use of underutilized and neglected crops. Rome: IPGRI, 1996.

Ji D.B., Zhang L.Y., Li C.L., Ye J., Zhu H.B. Effect of Hydroxysafflor yellow A on human umbilical vein endothelial cells under hypoxia. Vascular Pharmacology. 2009;50(3/4):137-145.

Narkhede B.N., Deokar A.B. Inheritance of corolla colour in safflower. J. of Maharashtra Agricultural Univ. 1986;11:278-281.

Narkhede B.N., Deokar A.B., Patil A.M. Genetics of corolla colour in Safflower: Abstr. Second Intern. Safflower: Abstracts Second International Safflower Conference, Hyderabad, India January 9–13. Agricultural Res. Station. 1989.

UPOV TG/134/3 Guidelines for the conduct of tests for distinctness, homogenity and stability. International union for the protection of new varieties of plants, 1990.

Генетика клейстогамии при внутривидовой гибридизации вида *Gossypium barbadense* L.

Т.И. Мухиддинов, А.А. Абдуллаев, Э. Кучкаров, А.Х. Чориев, С.К. Жумаев

Институт генетики и экспериментальной биологии растений Академии наук Республики Узбекистан, Ташкентская область, Кибрайский район, п/о Юкори-Юз, Республика Узбекистан

Изучение генетической закономерности наследственности и изменчивости признаков хазмо- и клейстогамного типов цветка хлопчатника на основе внутривидовой гибридизации вида *Gossypium barbadense* L. – весьма важная задача генетики, с которой неразрывно связаны практические цели селекции и семеноводства. В настоящем исследовании закономерности наследования альтернативного признака хазмо- и клейстогамного типов цветка у внутривидовых гибридов *G. barbadense* L. Это имеет большое теоретическое и практическое значение при создании изогенных форм, линий и сортов с герметично закрытым клейстогамным типов цветка, обладающих важными хозяйственно ценными признаками. Впервые разработана методика определения генетического контроля хазмо- и клейстогамного типа цветка при внутривидовой гибридизации вида *G. barbadense* L., являющаяся продолжением наших исследований по межвидовым гибридам хлопчатника. Для генетического анализа гибридных растений использованы две схемы: (1) парные реципрокные гибриды F_1, F_2 и (2) беккросс-гибриды F_b. На этой основе установлены генетические закономерности наследования признаков типа цветка у реципрокных гибридов F_1, которые имеют генотип $c_1cg_1Cg_2cg_2$, фенотип – хазмогамный, причем реципрокные различия не отмечены. Выявлено, что в F_2 происходят генотипическое расщепление классов по схеме 1 $cg_1cg_1Cg_2Cg_2$: 2 $cg_1cg_1Cg_2cg_2$: 1 $cg_1cg_1cg_2cg_2$, где клейстогамия в двойном рецессиве (этот признак наследуется по типу полного доминирования), а также расщепление на два фенотипических класса в соотношении 3 хазмогамных и 1 клейстогамный тип цветка. Показано, что в F_b по генотипу происходит следующее расщепление: хазмогамный – 1 $cg_1cg_1Cg_2Cg_2$; клейстогамный – 1 $cg_1cg_1cg_2cg_2$. Таким образом, следует отметить, что в потомстве гибридов F_1, контрастных по форме цветка, у хлопчатника доминирует хазмогамный тип цветка и расщепление в гибридных популяциях F_2 происходит по закону Г. Менделя с соотношением 3 : 1, характерным для полного доминирования монофакториальных аллельных скрещиваний с подтверждением соотношения в F_b 1 : 1.

Ключевые слова: *Gossypium barbadense*, клейстогамия, генетика, генетический анализ, внутривидовая гибридизация.

Inheritance of cleistogamy in interspecific hybridization of *Gossypium barbadense* L.

T.I. Mukhiddinov, A.A. Abdullayev, E. Kuchkarov, A.H. Choriev, S.K. Jumaev

Institute of Genetics and Plant Experimental Biology, AS of the Republic of Uzbekistan, Tashkent region, Kibrai district, Yukory-Yuz, Republic of Uzbekistan

Studies of the inheritance and and variability of chasmo- and cleistogamous types of cotton flower on the base of intraspecies hybridization of *Gossypium barbadense* L. are an urgent genetical task, whose applications involve plant breeding and seed industry. The purpose of our study was to determine the genetic control of this trait on the base of the regularity of alternative chasmo- and cleistogamous types of flowers in intraspecific hybrids of *G. barbadense* species. It is of theoretical and practical significance in the development of isogenic forms, lines, and varieties with the fully closed cleistogamous type of flowers, possessing important commercial traits. A pioneering method was elaborated for determining the genetic control of chasmo- and cleistogamous types of flowers in inrtaspecific hybridization of *Gossypium barbadense* L., which was a continuation of our studies on interspecific cotton hybridization. Two strategies were applied to the genetic analysis of hybrids: (1) paired reciprocal hybrids F_1, F_2 and (2) backcrossed hybrids F_b. On the grounds of these strategies, we determined the inheritance mode of flower types in reciprocal hybrids F_1, which possessed the $c_1cg_1Cg_2cg_2$ genotype with chasmogamous flowers without reciprocal difference. The classes segregated in F_2 as follows: 1 ($cg_1cg_1Cg_2Cg_2$) : 2 ($cg_1cg_1Cg_2cg_2$) : 1 ($cg_1cg_1cg_2cg_2$), where cleistogamy was double recessive (This trait shows the complete dominance inheritance pattern.) Segregation into two phenotypic classes occurs in the 3:1 ratio, i.e., three plants with chasmogamous flowers per one cleistogamous. The segregation F_b is 1:1; i.e., 1 chasmogamous : 1 cleistogamous. Thus, cotton chasmogamy is inherited in F_2 according to the Mendelian law in a completely dominant manner: 3:1, which is proven by the F_b cross.

Key words: *Gossypium barbadense*, cleistogamy, intraspecific hybridization, genetic analysis.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Мухиддинов Т.И., Абдуллаев А.А., Кучкаров Э., Чориев А.Х., Жумаев С.К. Генетика клейстогамии при внутривидовой гибридизации вида *Gossypium barbadense* L. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):63-68.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Mukhiddinov T.I., Abdullayev A.A., Kuchkarov E., Choriev A.H., Jumaev S.K. Inheritance of cleistogamy in interspecific hybridization of *Gossypium barbadense* L. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):63-68.

УДК 633.511:631.527.5
Поступила в редакцию 15.12.2014 г.
Принята к публикации 28.1.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: igebr-anruz@mail.ru

Изучение генетической закономерности наследственности и изменчивости признаков хазмо- (открытого) и клейстогамного (закрытого) типов цветка хлопчатника на основе внутривидовой гибридизации вида *Gossypium barbadense* L. – важная задача генетики, с которой неразрывно связаны практические цели селекции и семеноводства (Hou et al., 1980; Мухиддинов, 1997, 2010) при создании изогенных форм, линий и сортов с клейстогамным типом цветка, обладающих важными хозяйственно ценными признаками. Нам известно о единственной небольшой работе (Hou et al., 1980) по межвидовой гибридизации вида *G. hirsutum* × *G. Barbadense*, в которой клейстогамный признак наследовался по рецессивному типу. Учитывая, что хлопчатник с хазмогамным цветком является факультативным самоопылителем, а следовательно, способствует перекрестному опылению, мы определили величину перекрестного опыления – она составила от 0,5 до 15,4 % (Мухиддинов, 1997). Между тем перекрестное опыление приводит к биологическому засорению, вследствие чего в панмиктических популяциях нарушается генетическая однородность генотипа с проявлением фенотипа особи и они становятся гетерозиготными и гетерогенными.

Клейстогамия является биологически чистым и экологически безопасным герметично закрытым типом цветка. Образующийся при ней влагоемкий резервуар способствует рациональному опылению и оплодотворению, обеспечивая жизнеспособность и долговечность генотипа в структуре элементов цветка.

Цель работы – установить закономерности наследования альтернативного признака хазмо- и клейстогамного типов цветка у внутривидовых гибридов хлопчатника вида *G. barbadense* L. Это имеет большое теоретическое и практическое значение при создании изогенных форм, линий и сортов с герметично закрытым клейстогамным типом цветка, обладающих такими важными хозяйственно ценными признаками, как ультраскороспелость, высокая урожайность, устойчивость к различным заболеваниям, засолению и водному дефициту, листопадность, самочеканность, с высоким выходом, длиной и технологическим качеством волокна I–III промышленных типов, отвечающих требованиям международного стандарта.

Материалы и методы

Исходным материалом для исследований при внутривидовой гибридизации вида G. barbadense L. служили следующие сорта хлопчатника родительских форм: 8763-И, С-6037, 9871-И, Ижод и Наво. Последние два сорта, Ижод и Наво, получены нами на основе новой методики, базирующейся на знаниях о генетическом контроле признака хазмогамного и клейстогамного типов цветка и на межвидовой гибридизации, с участием образцов, характеризующихся закрытым типом цветка (процедура, не имеющая аналогов в мировом хлопководстве).

В целях изучения генетических закономерностей наследования типа цветка нами проанализированы родительские формы и их реципрокные гибриды F_1, F_2 и F_b на самоопыленном материале, полученном от внутривидового скрещивания вида *G. barbadense*: сорта с хазмогамным типом цветка 8763-И, С-6037 и 9871-И; и сорта с клейстогамным типом цветка Ижод и Наво. Опыт был заложен с соблюдением принципа рандомизации по блочному повторению. Для генетического анализа гибридных растений были использованы следующие две схемы:

1. Парные реципрокные гибриды F_1 и F_2:
   F_1, F_2 а) $P_1 \times P_2$, б) $P_2 \times P_1$.
2. Беккросс-гибриды F_b:
   F_b а) $(P_1 \times P_2) \times P_1$, б) $(P_1 \times P_2) \times P_2$.

По данной методике нами ранее также были изучены и установлены генетические закономерности признаков хазмо- и клейстогамного типов цветка при межвидовой гибридизации вида *G. hirsutum* × *G. barbadense.* Генетический анализ гибридных растений показал, что тип расщепления классов зависит от генотипа родительских сортов по генам типов цветка в потомстве их гибридов (F_2) и может быть неоднозначным: 3 : 1 и 15 : 1.

Моногенное расщепление 3 : 1 имело место в F_2, когда родительские формы различались по аллельному состоянию одного гена как альтернативного признака (♂ $Cg_1Cg_1cg_2cg_2$ × ♀ $cg_1cg_1cg_2cg_2$) – один из родителей был хазмогамный, другой – клейстогамный. Дигенное расщепление 15 : 1 наблюдалось, когда различие родительских форм было по обоим генам (♂ $Cg_1Cg_1cg_2cg_2$ × ♀ $cg_1cg_1Cg_2Cg_2$) и оба родителя имели хазмогамный тип. Подобное расщепление наблюдалось обычно при дигенной некумулятивной полимерии (Мухиддинов, 1997).

В целях определения генетического контроля хазмо- и клейстогамного типов цветка мы проводили ежедневные учеты и наблюдения. При этом выявлялось соотношение классов альтернативного признака в пределах одной и той же особи по общепринятой методике кастрации и скрещивания. Схема размещения растений: 90 × 25 × 1.

Результаты

Наши исследования были построены на выделении генотипов с проявлением в фенотипе особи, характеризующейся важнейшими морфобиологическими и хозяйственно ценными признаками, служащими основой при формировании форм, семей, линий и создании сортов с хазмогамным, но менее отзывчивым к перекрестному опылению, и клейстогамным с герметично закрытым, облигатно клейстогамным типом цветка, обеспечивающим генетическую однородность генотипа (95–98 %) с гомозиготным потомством.

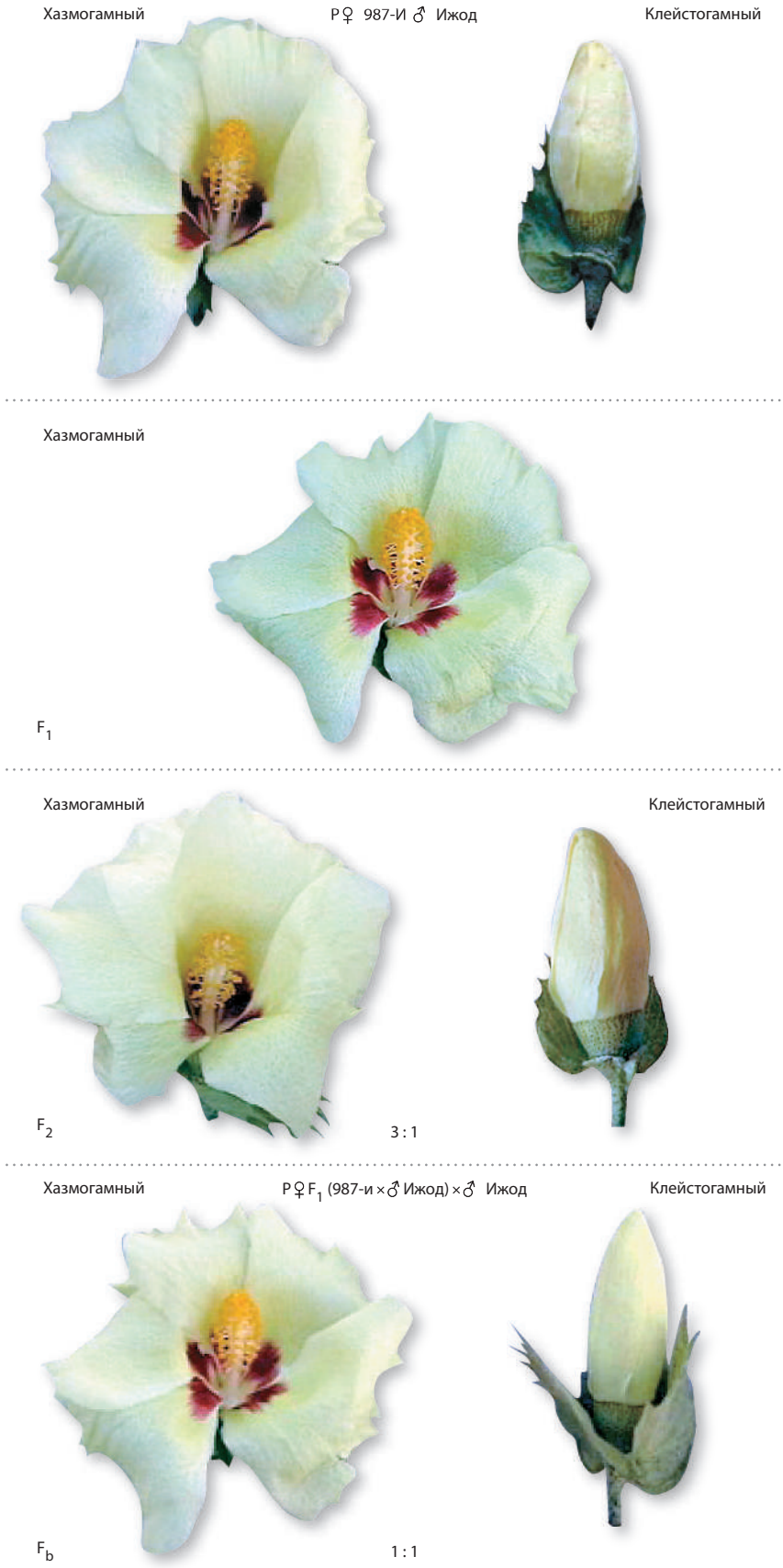
Для этой цели на протяжении вегетационного периода в онтогенезе растений (F_1, F_2 и F_b) и у соответствующих

исходных родительских форм проводились ежедневные учеты и наблюдения, характеризующие частоту встречаемости хазмо- и клейстогамного типов цветка в пределах одной и той же особи и определяющие их процентное и количественное соотношение.

У открытого, хазмогамного, типа в день цветения к 10–11 часам утра цветок полностью формируется, лепестки венчика в апикальной части развертываются и цветок остается открытым в течение дня. К концу дня лепестки венчика начинают терять тургор, меняют окраску, происходит плазмолиз, и лепестки скручиваются по спирали в правую или левую сторону. Через 2–3 дня венчик высыхает и опадает. У высохшего венчика лепестки цветка в апикальной части становятся скомканными, похожими на бумагу. Это свойственно только хазмогамным отцветающим цветкам и является генетическим маркерным признаком.

У вида *G. barbadense* встречаются 2 формы цветка: хазмогамные (открытые) и клейстогамные (закрытоцветущие, редко возникающие в отдельных сортах, например, у 9696-И), которые никогда не раскрываются. У клейстогамного цветка хлопчатника жизнеспособность сохраняется дольше, чем у хазмогамного, за счет образования закрытого влагоемкого резервуара внутри цветка. К этому приспособлены внутренние субэлементы органов цветка автогамного типа. Такие наследственно приспособительные эмбриогенетические элементы цветка при опылении и оплодотворении служат важнейшими эволюционными признаками и факторами адаптированности для сохранения структуры вида *G. barbadense*. Это послужило основой созданных нами форм, линий и сортов (Ижод, Наво и Клейстогам-1) интенсивного типа с закрытым типом цветка (Мухиддинов, 1992а, б; Мухиддинов, Мусаев, 1998; Мухиддинов и др., 2000).

Гибридные растения F_1 в прямых (9871-И × Ижод; 8763-И × Ижод,



Расщепление хазмо- и клейстогамного цветка у гибридов F_1, F_2 и F_b.

Наследование клейстогамного типа цветка при внутривидовой гибридизации вида *G. barbadense* L.

Родительские формы и их гибриды	Всего растений, шт.	Фенотипические классы		Соотношение	χ^2	*P*
		хазмогамный, шт.	клейстогамный, шт.			
9871-И	50	50	–	1 : 0	0,0	0,0
Ижод	40	–	40	0 : 1	0,0	0,0
F_1 9871-И × Ижод	50	50	–	1 : 0	0,0	0,0
F_1 Ижод × 9871-И	50	50	–	1 : 0	0,0	0,0
F_b 9871-И × Ижод × 9871-И	101	101	–	1 : 0	0,0	0,0
F_b 9871-И × Ижод × Ижод	154	82	72	1 : 1	0,6493	0,50–0,30
F_2 9871-И × Ижод Семья-2640	221	163	58	3 : 1	0,1824	0,70–0,50
Семья-2651	148	112	36	3 : 1	0,0360	0,90–0,80
Сумма	369	275	94	3 : 1	0,0442	0,90–0,80
F_2 Ижод × 9871-И Семья-2663	24	17	7	3 : 1	0,2221	0,70–0,50
Семья-2665	137	102	35	3 : 1	0,0290	0,90–0,80
Семья-2673	78	54	24	3 : 1	1,3845	0,30–0,20
Сумма	239	173	66	3 : 1	0,8716	0,50–0,30
8763-И	40	40	–	1 : 0	0,0	0,0
F_1 8763-И × Ижод	30	30	–	1 : 0	0,0	0,0
F_1 Ижод × 8763-И	30	30	–	1 : 0	0,0	0,0
F_b Ижод × 8763-И × 8763-И	64	64	–	1 : 0	0,0	0,0
F_b Ижод × 8763-И × Ижод	50	26	24	1 : 1	0,1600	0,70–0,50
F_2 8763-И × Ижод Семья-938	144	104	40	3 : 1	0,5926	0,50–0,30
Семья-939	101	79	22	3 : 1	0,5577	0,50–0,30
Семья-941	214	159	55	3 : 1	0,0560	0,90–0,80
Сумма	459	342	117	3 : 1	0,0567	0,90–0,80
F_2 Ижод × 8763-И Семья-968	177	134	43	3 : 1	0,0470	0,90–0,80
Семья-978	199	152	47	3 : 1	0,2026	0,70–0,50
Семья-982	154	110	44	3 : 1	1,0459	0,50–0,30
Сумма	530	396	134	3 : 1	0,0226	0,90–0,80
С-6037	40	40	–	1 : 0	0,0	0,0
F_1 Ижод × С-6037	40	40	–	1 : 0	0,0	0,0
F_1 С-6037 × Ижод	40	40	–	1 : 0	0,0	0,0
F_b Ижод × С-6037 × С-6037	40	40	–	1 : 0	0,0	0,0
F_b Ижод × С-6037 × Ижод	43	20	23	1 : 1	0,2092	0,70–0,50
F_2 Ижод × С-6037 Семья-992	72	49	23	3 : 1	1,8517	0,20–0,10
Семья-993	78	61	17	3 : 1	0,4273	0,70–0,50
Семья-1004	43	30	13	3 : 1	0,6274	0,50–0,30
Сумма	193	140	53	3 : 1	0,1312	0,80–0,70
F_2 С-6037 × Ижод Семья-1009	55	43	12	3 : 1	0,1696	0,70–0,50
Семья-1010	68	48	20	3 : 1	0,7058	0,50–0,30
Семья-1011	60	45	15	3 : 1	0,0	0,0–0,0
Семья-1016	54	42	12	3 : 1	0,2134	0,70–0,50
Семья-1020	58	45	13	3 : 1	0,2068	0,70–0,50
Сумма	295	223	72	3 : 1	0,0553	0,0–0,80

Окончание таблицы

Родительские формы и их гибриды	Всего растений, шт.	Фенотипические классы		Соотношение	χ^2	*P*
		хазмогамный, шт.	клейстогамный, шт.			
Наво	40	–	40	0 : 1	0,0	0,0
F_1 Наво × 9871-И	24	24	–	1 : 0	0,0	0,0
F_1 9871-И × Наво	23	23	–	1 : 0	0,0	0,0
F_b Наво × 9871-И × 9871	29	29	–	1 : 0	0,0	0,0
F_b Наво × 9871-И × Наво	40	21	19	1 : 1	0,1000	0,80–0,70
F_2 9871-И × Наво Семья 212	47	36	11	3 : 1	0,0634	0,90–0,80
Семья 220	71	53	18	3 : 1	0,0046	0,95–0,90
Семья 220а	62	46	16	3 : 1	0,0215	0,90–0,80
Семья 221	67	51	16	3 : 1	0,0447	0,90–0,80
Сумма	247	186	61	3 : 1	0,0121	0,95–0,90
F_2 Наво × 9871-И Семья 239	54	39	15	3 : 1	0,2222	0,70–0,50
Семья 244	73	57	16	3 : 1	0,3698	0,70–0,50
Семья 247	55	43	12	3 : 1	0,2969	0,70–0,50
Сумма	182	139	43	3 : 1	0,1831	0,70–0,50

Ижод × С-6037 и 9871-И × Наво) и обратных комбинациях скрещивания характеризовались хазмогамным типом цветка. В исследуемых комбинациях скрещивания хазмогамный тип цветка оказался доминантным, а клейстогамный – рецессивным признаком. При этом в F_1 реципрокных различий не наблюдалось. Это дает возможность полагать, что клейстогамный признак контролируется определенными ядерными генами. При анализе гибридных растений F_2 9871-И × Ижод; F_2 8763-И × Ижод; F_2 Ижод × С-6037; F_2 9871-И × Наво по анализируемому признаку и в обратных комбинациях происходит расщепление и образуются два фенотипических класса: как хазмогамные цветки, так и клейстогамные в соотношении 3 : 1 (рисунок, таблица).

Соотношение фенотипических классов из 369 растений F_2 9871-И × Ижод составило: 275 – хазмогамные, 94 – клейстогамные (χ^2 = 0,0442 и *p* = 0,90–0,80).

В F_2 Ижод × 9871-И из 239 растений 173 были хазмогамные и 66 – клейстогамные (χ^2 = 0,8716; *p* = 0,50–0,30). Генетическая закономерность с высоким достоверным различием сохраняется и у других реципрокных комбинаций (8763-И × Ижод, Ижод × С-6037, 9871-И × Наво) скрещивания.

На основе изучаемых признаков (см. рисунок и таблицу) видно, что такая зависимость детерминации этих признаков с достоверностью сохраняется и при семейном анализе указанных комбинаций скрещивания. Полученные результаты дают основание полагать, что хазмо- и клейстогамные цветки в указанных комбинациях скрещивания как маркерный признак контролируются аллельным состоянием одного основного гена. Данный признак наследуется по типу полного доминирования. Гибридные растения F_1 подвергались беккроссу как с доминантным, так и с рецессивным родителем.

У анализированных растений F_b 9871-И × Ижод × 9871-И, F_b Ижод × 8763-И × 8763-И, F_b Ижод × С-6037 × С-6037, F_b Наво × 9871-И × 9871 наблюдается полное проявление хазмогамного цветка (1 : 0). При скрещивании с реципрокным родителем Ижод, Наво (F_b 9871-И × Ижод × Ижод, F_b Ижод × 8763-И × Ижод, F_b Ижод × С-6037 × Ижод, F_b Наво × 9871-И × Наво) происходит теоретически ожидаемое расщепление на два фенокласса растений с хазмо- и клейстогамными цветками, соотношение, близкое к 1 : 1 у комбинации F_b 9871-И × Ижод × Ижод в абсолютных цифрах 82 : 72, достоверность χ^2 = 0,6493; *p* = 0,50–0,30. Соответственно, F_b Ижод × 8763-И × Ижод 26 : 24 с достоверным различием χ^2 = 0,1600; p = 0,70–0,50, а у комбинации F_b Ижод × С-6037 × Ижод соотношение растений – 20 : 23 с достоверным различием χ^2 = 0,2092; *p* = 0,70–0,50; у комбинации F_b Наво × 9871-И × Наво соотношение растений – 21 : 19 с достоверностью χ^2 = 0,1000; *p* = 0,80–0,70. При этом у всех комбинаций F_1, скрещенных с хазмогамными родителями, наблюдается полное проявление хазмогамного типа цветка (1 : 0), а когда растения F_1 скрещиваются с клейстогамным родителем, наблюдается расщепление классов по типу цветка в соотношении 1 : 1, что подтверждает достоверность различия полученных данных по моногенному характеру наследования с расщеплением классов хазмо- и клейстогамного типов цветка.

При генетическом анализе установлено, что у гибридных растений (F_1, F_2 и F_b) наследование хазмо- и клейстогамного цветка генотипических классов составляет 1 : 2 : 1 с проявлением фенотипических классов 3 : 1. Отметим,

что у хлопчатника тип цветка контролируется аллельным состоянием только одного основного гена Cg_1cg_1; Cg_2cg_2. Клейстогамный тип цветка контролируется гомозиготным состоянием этих двух генов, которыми обладает двойной рецессив генотипа $cg_1cg_1cg_2cg_2$. Хазмогамный тип цветка контролируется доминантными аллелями этих генов. В зависимости от родительских форм в их гибридных поколениях F_2 и F_b наблюдается альтернативное расщепление фенотипических классов в соотношении 3 : 1 или 1 : 1, что с достоверным различием подтверждает моногенный характер наследования данного признака.

При моногенной детерминации исходные родительские формы скрещивания гибридов характеризуются по изучаемому признаку следующими генотипами вида *G. barbadense*: 1) сорта 9871-И, 8763-И и С-6037 с генотипом $cg_1cg_1Cg_2Cg_2$, фенотип – хазмогамный; 2) сорта Ижод и Наво с генотипом $cg_1cg_1cg_2cg_2$, фенотип – клейстогамный. Они различаются между собой аллельными состояниями только одного основного гена. F_1 обладает моногетерозиготным генотипом, $cg_1cg_1Cg_2cg_2$, с хазмогамным типом цветка. В F_2 происходит генотипическое расщепление по следующей схеме: 1 $cg_1cg_1Cg_2Cg_2$: 2 $cg_1cg_1Cg_2cg_2$: 1 $cg_1cg_1cg_2cg_2$.

Поскольку наследование этого признака происходит по типу полного доминирования, то F_2 расщепляется на два фенотипических класса в соотношении 3 хазмо- : 1 клейстогамный тип цветка.

В F_b по генотипу происходит расщепление 1 $cg_1cg_1Cg_2Cg_2$ хазмогамный тип : 1 $cg_1cg_1cg_2cg_2$ клейстогамный тип, что подтверждает достоверность полученных данных в результате генетического анализа гибридных растений F_1, F_2 и F_b.

Таким образом, следует отметить, что в потомстве гибридов F_1, контрастных по форме цветка, у хлопчатника доминирует хазмогамный тип цветка и расщепление в гибридных популяциях F_2 происходит по закону Г. Менделя с соотношением 3 : 1, являющимся характерным для полного доминирования монофакториальных аллельных скрещиваний с подтверждением соотношения в F_b 1 : 1.

Обсуждение

Гибридные растения F_1 9871-И × Ижод; 8763-И × Ижод, Ижод × С-6037 и 9871-И × Наво характеризовались хазмогамным типом цветка. Следовательно, в этих комбинациях скрещиваний клейстогамный тип цветка был рецессивным, а хазмогамный – доминантным признаком. Реципрокных различий у гибридов F_1 не наблюдалось. Это дает основание полагать, что данный признак контролируется структурными ядерными генами.

При анализе растений гибридов F_2, полученных от указанных 4 реципрокных комбинаций скрещивания, имело место расщепление по анализируемому признаку с образованием двух фенотипических классов: а) растения с хазмогамным типом цветка; б) растения с клейстогамным типом цветка. Их соотношение соответствовало ожидаемому 3 : 1 (таблица). На основе этих данных мы полагаем, что хазмо- клейстогамные типы цветка в указанных комбинациях скрещивания контролируются аллельным состоянием одного гена и наследуются по типу полного доминирования. Гибридные растения F_1 подвергались беккроссу как с доминантным, так и с рецессивным родителем, обладавшим хазмо- и клейстогамным типами цветка. Как видно из табличных данных, в F_b от рецессивных родителей наблюдалось теоретически ожидаемое расщепление на два фенотипических класса растений с клейсто- и хазмогамным типами цветка в соотношении, близком 1 : 1. Эти данные подтверждают, что хазмо- и клейстогамный типы цветка имеют моногенную детерминацию как альтернативный признак.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Мухиддинов Т.И. Особенности нового сорта Ижод, полученного методом межвидовой гибридизации. VI съезд Узбек. Респ. общества генетиков и селекционеров. Тез. докл. Ташкент, 1992а.

Мухиддинов Т.И. Интеграция хозяйственно ценных признаков на базе клейстогамии при межвидовой гибридизации хлопчатника. Матер. VI съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. Минск, 1992б;2:105.

Мухиддинов Т.И. Изменчивость, наследование и взаимосвязь клейстогамного цветка с хозяйственными признаками у хлопчатника: Автореф. дис. … канд. биол. наук. Ташкент, 1997.

Мухиддинов Т.И. Исследование генетических особенностей селекции сортов хлопчатника с клейстогамным типом цветка. Генетика. 2010;46(6):689-698.

Мухиддинов Т.И., Абдуллаев А.А., Кучкаров Э. Создание изогенных линий на основе генетики клейстогамии. Сельское хозяйство Узбекистана. Ташкент, 2000;1:49-52.

Мухиддинов Т.И., Мусаев Д.А. Наследование признака клейстогамии цветка при межвидовой гибридизации G. hirsutum L. и G. barbadense L. Тез. докл. Междунар. конф., посвящ. 100-летию акад. Н.В. Цицина. М., 1998:394-396.

Hou B., Koto E., Schwendiman J. Determinisme genetigue de douemutants du cotonnier capsule pileuse et fleur cleistogame. Coton et Fibres trop. 1980;35(3):355-357.

Генетический контроль ремонтантности в популяциях *Fragaria vesca* L. (Rosaceae) в Западной Сибири

С.О. Батурин

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

В Западной Сибири активное цветение *Fragaria vesca* приходится на первую декаду июня, а плодоношение – на конец июня – начало июля. Во время экспедиционных обследований 2002–2013 гг. дикорастущих популяций *Fragaria vesca* L. в Западной Сибири нами выявлены случаи вторичного цветения растений в августе – октябре. Цель настоящей работы – изучить генетический контроль проявления ремонтантности в дикорастущих популяциях *Fragaria vesca*. Материалом для исследования служили образцы *F. vesca* из экспедиционных сборов, а также сеянцы, выращенные из семян, собранных в августе – октябре в естественных местах произрастания лесной земляники. Кроме того, проводился генетический анализ сеянцев, полученных из семян от самоопыления образцов экспедиционных сборов. Повторное цветение и плодоношение было изучено у 1 486 сеянцев, полученных от растений с однократным типом плодоношения. В анализе участвовали представители 32 популяций из Западной Сибири и 856 сеянцев из 10 популяций. Генетический анализ повторно цветущих растений *Fragaria vesca*, произрастающих в природных условиях, показал, что они, как правило, являются гомозиготными по доминантному аллелю – однократное плодоношение. Проявление повторного цветения *F. vesca* в Западной Сибири рассматривается как временная реакция генотипа растения на конкретные для сезона вегетации условия произрастания. Лишь в одной популяции лесной земляники, расположенной в предгорье Кузнецкого Алатау, выявлены гетерозиготные растения по типу плодоношения. Характер сегрегации в потомстве от самоопыления растений этой популяции свидетельствует о том, что ремонтантность контролируется монофакториально с рецессивным типом наследования и имеет такую же природу происхождения, как и в альпийских популяциях *F. vesca*.

Ключевые слова: лесная земляника, *Fragaria vesca*, генетический анализ, генетика репродуктивных признаков, однократное плодоношение, ремонтантность, тип плодоношения, популяция.

The genetic control of the day-neutral habit in populations of *Fragaria vesca* (Rosaceae) in Western Siberia

S.O. Baturin

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

In Western Siberia, intense flowering of *Fragaria vesca* occurs in the first ten days of June and fruiting takes place from the end of June till early July. During our expeditions investigating natural *Fragaria vesca* L. populations of Western Siberia in 2002–2013, we registered cases of reflowering, or repeated flowering in August-October. The paper concerns the genetic control of re-flowering in natural populations of *Fragaria vesca*. The study was conducted with accessions collected in the expeditions and seedlings grown from seeds taken in August-October from natural populations of woodland strawberry reflowering. Genetic analysis of seedlings obtained by self-pollination of collected accessions was also made. It involved 1486 seedlings from plants with seasonal fruiting (representing 32 Western Siberian populations) and 856 seedlings from 10 populations showing reflowering and refruiting. Genetic analysis of reflowering *Fragaria vesca* plants growing in natural conditions showed that they were usually homozygous for the dominant allele of seasonal fruiting. Reflowering in *Fragaria vesca* in Western Siberia is considered to be a provisional response of the genotype to certain growth conditions specific for a particular vegetation season. The only woodland strawberry population in the foothills of Kuznetsk Alatau displayed plants heterozygous for fruiting habit. Segregation in the progeny of self-fertilized plants from this population evidences monogenic control of day neutrality with a recessive type of inheritance. Its nature is similar to that in Alpine *Fragaria vesca* populations.

Key words: woodland strawberry, *Fragaria vesca*, genetic analysis, genetics of reproductive traits, seasonal flowering, day neutrality, flowering duration, population.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Батурин С.О. Генетический контроль ремонтантности в популяциях *Fragaria vesca* L. (Rosaceae) в Западной Сибири. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):69-73.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Baturin S.O. The genetic control of the day-neutral habit in populations of *Fragaria vesca* (Rosaceae) in Western Siberia. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):69-73.

УДК 575.165+581.151
Поступила в редакцию 19.11.2014 г.
Принята к публикации 28.01.2015 г.
© АВТОР, 2015

e-mail: SO_baturin@mail.ru

Земляника лесная, *Fragaria vesca* L. ($2n = 2x = 14$), наиболее широко распространенный вид земляники Северного полушария, включает многочисленные разновидности и экотипы. Их возникновение обусловлено обширным ареалом вида (евразийско-американский гипарктическо-бореальный ареал) и разнообразием почвенно-климатических условий в местах произрастания растений лесной земляники (Лозина-Лозинская, 1926; Юзепчук, 1941; Сухарева, 1976; Staudt, 1989). Для вида характерен однократный тип плодоношения в течение одного вегетативного периода (Ведерникова, Дубровная, 1997). Тем не менее в дикорастущих популяциях лесной земляники альпийского горного массива, помимо однократного характера плодоношения, выявлено повторное плодоношение – ремонтантность (Richardson, 1914). В Западной Европе это свойство легло в основу селекции мелкоплодных ремонтантных сортов земляники (Darrow, 1966).

Ремонтантное плодоношение у земляник является следствием преобразования ростовой и генеративной функций, обусловливающих усиление энергии ветвления и интенсивности репродуктивного процесса. Это преобразование является результатом изменения фотосинтетической активности и повышения эффективности работы листового аппарата, которые вызваны переключением растения на фотопериодическую нейтральность (независимость от длины дня) и отсутствием реакции на низкие температуры во время периода покоя (Sønsteby, Heide, 2008). С физиологичной точки зрения, признак «однократность – многократность плодоношения» напоминает «триггерное» приспособление, переключающее развитие растения с режима чувствительности к фотопериоду и низким температурам в состоянии покоя на альтернативный – фотопериодическую нейтральность и отсутствие реакции на низкие температуры. Ремонтантность представляет собой одно из двух альтернативных состояний признака «тип плодоношения». Характер наследования признака «тип плодоношения» показан как монофакториальный, при котором однократное цветение и плодоношение в течение одного вегетационного периода контролируются доминантным аллелем (*S*), а моногократное плодоношение (ремонтантность) контролируется рецессивным аллелем (*s*) (Richardson, 1914; Brown, Wareing, 1965; Фадеева, 1975).

В Западной Сибири активное цветение *F. vesca* приходится на первую декаду июня, а плодоношение – на конец июня – начало июля. Во время экспедиционных обследований в 2002–2013 гг. дикорастущих популяций *Fragaria vesca* L. в Западной Сибири нами выявлены случаи вторичного цветения растений в августе – октябре (Жмылев и др., 2009). Такие растения чаще выявлялись в горных лесных массивах Горной Шории, предгорьях Кузнецкого Алатау и Салаира, хребтов Саяно-Алтайского нагорья и Алтая. Цель настоящей работы – изучить генетический контроль проявления ремонтантности в дикорастущих популяциях *Fragaria vesca*, а также обсудить возможные причины возникновения вторичного цветения в популяциях, приуроченных к горным массивам Западной Сибири.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили образцы *F. vesca* из экспедиционных сборов (табл. 1), а также сеянцы, выращенные из семян, собранных в августе – октябре в естественных местах произрастания лесной земляники. Кроме того, проводился генетический анализ сеянцев, полученных из семян от самоопыления образцов экспедиционных сборов. Всего было изучено 1 486 сеянцев, полученных от растений с однократным типом плодоношения – представителей 32 популяций из Западной Сибири и 856 сеянцев из 10 популяций, проявляющих повторное цветение и плодоношение. За эталон ремонтантности взяли коммерческие сорта *F. vesca* альпийского происхождения Alexandria, Baron Solemacher и Yellow miracle.

В опытах по самоопылению растений соцветия изолировали прозрачным упаковочным целлофаном. В случае использования направленных скрещиваний цветки кастрировали пинцетом и изолировали также прозрачным упаковочным целлофаном[1], при этом соцветия помещали в изолятор, вокруг основания цветоноса прокладывалась вата для предотвращения попадания насекомых (возможных переносчиков пыльцы), сверху изолятор завязывали тонким шпагатом с этикеткой. Семена проращивались при комнатной температуре в чашках Петри после двухмесячной стратификации при температуре 3–5 °C. В августе сеянцы в возрасте 5–6 мес. переносились в открытый грунт. Сеянцы выращивались на стандартном агрофоне без полива и дополнительного внесения удобрений. Для математической обработки результатов использовали стандартные статистические методы (Зайцев, 1973).

Результаты и обсуждение

Изучение 1 486 сеянцев, полученных от самоопыления растений с однократным типом плодоношения различных популяций, не выявило среди них ремонтантных фенотипов. Результаты генетического анализа сеянцев по признаку «тип плодоношения», полученных от повторно плодоносящих растений в естественных условиях произрастания, представлены в табл. 2. Большинство анализируемых образцов в семенном потомстве не проявляют ремонтантный характер плодоношения, следовательно, не имеют аллеля *s*, отвечающего за проявление ремонтантности. Лишь у образцов № 99-1, 04-27 и 05-12 из Кемеровской области в семенном потомстве отмечены

[1] Многолетний опыт применения прозрачного упаковочного целлофана для изготовления изоляторов показал его эффективность благодаря наличию газообмена через материал – внутренние стенки изоляторов не отпотевают и температурный режим внутри изолятора существенно не меняется, а также благодаря прозрачности стенок, что позволяет наблюдать развитие плодов.

Таблица 1. Исходный материал *Fragaria vesca* L.

Регистрационный номер	Происхождение образца
97-1	Алтайский край, окрестности пос. Усть-Уба, горный склон в долине р. Катунь
99-1	Кемеровская область, Кемеровский р-н, окрестности с. Барановка, юго-западный склон горы, на скальных обнажениях, предгорье Кузнецкого Алатау
02-19	Новосибирская область, Маслянинский р-н, окрестности с. Дубровка, Присалаирье, юго-восточный склон прибрежной скалы в долине р. Бердь, разнотравье с редкими березами и осинами
02-26	Кемеровская область, г. Таштагол, северная окраина города, вершина заросшей луговой растительностью горы, юго-западный склон, луговое пастбищное разнотравье, Горная Шория
02-43	Кемеровская область, окрестности г. Таштагол, дно рудного карьера, каменистая россыпь, Горная Шория
03-13	Новосибирская область, Искитимский р-н, окрестности с. Бурмистрово, сосновый бор
03-15	Окрестности г. Горно-Алтайска. Распадок между отрогами, Алтай
04-26	Республика Хакасия, окрестности г. Абаза, Саяно-Алтайское нагорье, левый берег р. Абакан, сосновый бор
04-27	Кемеровская область, Кемеровский р-н, окрестности с. Барановка, юго-западный склон каменистого холма, полог пихтового леса, на скальных обнажениях, предгорье Кузнецкого Алатау
05-12	
06-14	Республика Хакасия, окрестности г. Абаза, Саяно-Алтайское нагорье, правый берег р. Абакан, смешанный лес
08-5	Новосибирская область, Болотнинский р-н, ленточный сосновый бор на берегу р. Обь, 11 км на северо-восток от с. Новобибеево
13-04	Кемеровская область, г. Кемерово, окрестности п.г.т. Кедровка, юго-восточный склон вскрышных пород угольного отвала

Образцы № 99-1, 04-27 и 05-12 представляют собой отдельные растения из одной популяции, произрастающей в окрестностях с. Барановка Кемеровского района, Кемеровской области.

единичные сеянцы, повторно зацветающие и плодоносящие, т. е. в потомстве от самоопыления этих образцов наблюдается рецессивный фенотип – ремонтантное плодоношение. Наличие в потомстве этих образцов сегрегации по изучаемому признаку дает нам основание для проведения генетического анализа генотипической структуры исходных образцов. В связи с тем, что для применения критерия χ^2 соответствия эмпирических частот теоретическим необходимо наличие не менее пяти частот в каждом классе, мы не можем применить этот критерий для данных по образцам № 99-1 и 05-12. Однако для № 04-27 было проведено сравнение на соответствие модели моногенного наследования изучаемого признака. Нулевая гипотеза предполагает соответствие фактических данных теоретическому распределению 3 : 1 (3 сеянца с неремонтантным типом плодоношения и 1 сеянец с ремонтантным типом плодоношения) (Richardson, 1914; Brown, Wareing, 1965). Соотношение фенотипов в потомстве F_1, полученное при самоопылении образца № 04-27, составило 6,7 : 1. Рассчитанное значение критерия соответствия нулевой гипотезе (критерий *G*) равно 3,51. Табличное значение критерия (при уровне значимости 0,05 и одной степени свободы) составляет 3,84. Поскольку полученное значение $3{,}51 < 3{,}84$, то нулевая гипотеза принимается и данные соответствуют моногенному наследованию признака. Образец № 04-27 является гетерозиготным по признаку «тип плодоношения», а в популяции присутствует аллель *s*, отвечающий за ремонтантное плодоношение. Исходя из модели моногенного наследования изучаемого признака, следует отметить, что при самоопылении образцов № 99-1, № 04-27 и № 05-12, представляющих одну популяцию, в потомстве от самоопыления имеется явный недостаток потомков с рецессивным ремонтантным фенотипом, особенно у образцов № 99-1 и № 05-12. Возможно, на ювенильном этапе развития сеянцев происходит избирательная гибель растений с ремонтантным фенотипом, причину которой предстоит выяснить в дополнительных экспериментах.

Генетически детерминированное ремонтантное плодоношение обнаружено лишь в популяции, расположенной в окрестностях с. Барановка Кемеровской области. В ней выявлены растения (образцы № 99-1, 04-27 и 05-12), которые при выращивании на экспериментальном участке не проявляют ремонтантность, но при самоопылении в семенном потомстве образуют ремонтантные сеянцы, т. е. являются гетерозиготными по типу цветения и плодоношения. Поскольку, согласно опубликованным данным, ремонтантное цветение и плодоношение у *F. vesca* осуществляются рецессивными гомозиготами (Richardson, 1914; Brown, Wareing, 1965), мы проанализировали один из таких ремонтантных сеянцев, № 01/7-9-4, полученный от образца № 99-1, на гомозиготность по рецессивному фенотипу путем его самоопыления. Полученное от него потомство I_2 (223 растения) имело ремонтантный фенотип, т. е. все сеянцы повторно цвели и плодоносили. Таким образом, ремонтантный сеянец № 01/7-9-4 является гомозиготным по рецессивному при-

Таблица 2. Распределение сеянцев по признаку «тип плодоношения» у дикорастущих повторно цветущих образцов *Fragaria vesca* при их самоопылении (2003–2013 гг.)

Номер образца	Тип плодоношения		Всего сеянцев, шт.
	однократный	ремонтантный	
97-1	34	0	34
99-1	14	1	15
02-26	136	0	136
02-43	78	0	78
03-15	44	0	44
04-26	29	0	29
04-27	40	6	46
02-19	144	0	144
05-12	38	2	40
06-14	11	0	11
08-5	139	0	139
13-04	140	0	140

Таблица 3. Сегрегация по признаку «тип плодоношения» в потомствах *Fragaria vesca* с участием ремонтантного образца № 01/7-9-4 (2010 г.)

Комбинация опыления	Тип плодоношения	
	однократный	ремонтантный
Самоопыление		
Alexandria	0	61
Baron Solemacher	0	48
Yellow miracle	0	26
01/7-9-4	0	223
Гибридизация		
Yellow miracle × Alexandria	0	31
Alexandria × Baron Solemacher	0	10
Baron Solemacher × 01/7-9-4	0	205
Yellow miracle × 01/7-9-4	0	115
01/7-9-4 × Alexandria	0	124

знаку «ремонтантное плодоношение». В связи с тем что проявление ремонтантности следует считать мутацией гена, контролирующего характер плодоношения (Brown, Wareing, 1965), возникла необходимость проверки соответствия этой мутации, выявленной в сибирской популяции *F. vesca*, мутации, присутствующей в альпийских популяциях лесной земляники. Для этого использовали коммерческие ремонтантные сорта, созданные в Западной Европе на базе генофонда альпийских популяций лесной земляники. Результаты скрещиваний образца № 01/7-9-4 с сортами Alexandria, Baron Solemacher и Yellow miracle представлены в табл. 3.

Сорта альпийского происхождения, как и ожидалось, гомозиготны по типу плодоношения, что подтверждается их самоопылением, а также скрещиванием их между собой. В потомстве отсутствует полиморфизм по анализируемому признаку, все растения ремонтантные. Ремонтантным было и потомство у анализируемого образца № 01/7-9-4. При использовании образца 01/7-9-4 в качестве как отцовского родителя, так и материнского получены потомства, в которых все сеянцы проявляли ремонтантность. Таким образом, мы можем утверждать, что мутация, вызывающая ремонтантность в популяции *F. vesca*, произрастающей в окрестностях с. Барановка Кемеровской области, предгорьях Кузнецкого Алатау, произошла в том же локусе, что и подобная мутация в альпийских популяциях лесной земляники, и наследуется согласно менделевским законам.

Таким образом, эксперимент с самоопылением растений *F. vesca*, имевших повторное цветение и плодоно-

шение в местах естественного произрастания, показал, что в семенных потомствах практически отсутствуют растения с ремонтантным типом плодоношения. Лишь в одной популяции из окрестностей с. Барановка Кемеровской области, имевшей отдельные вторично цветущие растения, в семенных потомствах были обнаружены сеянцы с ремонтантным типом плодоношения. Генетический анализ по гену, контролирующему однократное плодоношение, показал, что у большинства обследованных популяций *F. vesca* повторно цветущие и плодоносящие растения являются гомозиготами по этому доминантному аллелю (*S*). Исключение составляет популяция из окрестностей с. Барановка, где повторно цветущими растениями могут быть как гомозиготы, так и гетерозиготы. По-видимому, повторное цветение и плодоношение отдельных растений в популяции следует рассматривать как реакцию особей на различные нарушения механизма контроля их сезонного развития (Жмылев и др., 2009), в том числе вызванные особыми микроклиматическими условиями конкретного сезона вегетации в местах естественного произрастания. Например, для *F. vesca* показано влияние спектрального состава света, длины дня и температуры воздуха на инициацию вторичного цветения и экспрессию ремонтантности (Sønsteby, Heide, 2008; Hytönen, 2009; Rantanen et al., 2014). По-видимому, неслучайно повторно цветущие и плодоносящие отдельные растения популяции были обнаружены в горных таежных массивах, где температурный и световой режимы, а также влажность воздуха имеют свои отличительные особенности относительно равнинной местности (Смагин и др., 1980). Таким образом, реализация повторного цветения в естественно произрастающих популяциях во многом может зависеть от действия климатических факторов среды, т. е. вторичное цветение может иметь эпигенетический контроль (Ausín et al., 2005; Dennis, Peacock, 2007). Этим можно объяснить то, что вторично цветущие растения, изъятые из естественной среды произрастания и помещенные в условия опытного участка, прекращали повторно цвести, поскольку изменились условия произрастания. Несмотря на низкую завязываемость семянок у повторно плодоносящих растений (20–25 %), повторное плодоношение представляет собой дополнительный ресурс семенной репродукции в популяциях, тем самым внося вклад в конкуренцию за новые места обитания.

В дикорастущих популяциях *F. vesca* Западной Сибири у некоторых растений наблюдаются повторное цветение и плодоношение. Такие случаи плодоношения мы относим к реакции генотипа растения на конкретные для сезона вегетации условия произрастания. Сибирские популяции *F. vesca* крайне редко имеют гетерозиготные растения по типу плодоношения. Растения преимущественно гомозиготны по доминантному аллелю *S* – однократный тип плодоношения. Нами обнаружена лишь одна популяция *F. vesca* в предгорье Кузнецкого Алатау, имеющая гетерозиготные растения по типу плодоношения. Характер сегрегации в потомстве от самоопыления растений этой популяции свидетельствует о том, что ремонтантность контролируется монофакториально с рецессивным типом наследования и имеет природу происхождения, аналогичную таковой в альпийских популяциях *F. vesca*.

Благодарности

Работа выполнена по бюджетному проекту VI.53.1.1. при финансовой поддержке экспедиционных грантов СО РАН 2008–2013 гг.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Ведерникова О.П., Дубровная С.А. Онтогенез земляники лесной. Онтогенетический атлас лекарственных растений (Под ред. Л.А. Жуковой). Йошкар-Ола, 1997;196-202.

Зайцев Г.Н. Методика биометрических расчетов. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. М.: Наука, 1973.

Жмылев П.Ю., Карпухина Е.А., Жмылева А.П. Вторичное цветение: индукция и нарушения развития. Журн. общ. биологии. 2009;70(3):262-272.

Лозина-Лозинская А.С. Обзор видов рода Fragaria. Изв. ГБС СССР. 1926;25:1:47-86.

Смагин В.Н., Ильинская С.А., Назимова Д.И., Новосельцева И.Ф., Чередникова Ю.С. Типы лесов Южной Сибири. Новосибирск: Наука, 1980.

Сухарева Н.Б. Сибирские и дальневосточные земляники. Апомиксис и его значение для эволюции и селекции. Новосибирск: Наука, 1976;165-175.

Фадеева Т.С. Генетика земляники. Л., 1975.

Юзепчук С.В. Подсемейство Rosoidaceae. Флора СССР. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1941;58-69.

Ausín I., Alonso-Blanco C., Martinez-Zapater M. Environmental regulation of flowering. Int. J. Dev. Biol. 2005;49:689-705. DOI: 10.1387/ijdb.052022ia

Brown T., Wareing P.E. The genetical control of the everbearing habit and three other characters in varieties of *Fragaria vesca*. Euphytica. 1965;14:97-112.

Darrow G.M. The Strawberry History, Breeding and Physiology. N.Y.: Hort. Rinehart and Winston, 1966.

Dennis E.S., Peacock W.J. Epigenetic regulation of flowering. Curr. Opin. Plant Biol. 2007;10:520-527. DOI:10.1016/j.pbi.2007.06.009

Hytönen T. Regulation of Strawberry Growth and Development. Acad. Dissertation. Helsinki: Helsinki Univ. Print, 2009.

Rantanen M., Kurokura T., Mouhu K., Pinho P., Tetri E., Halonen L., Palonen P., Elomaa P., Hytönen T. Light quality regulates flowering in FvFT1/FvTFL1 dependent manner in the woodland strawberry *Fragaria vesca*. Frontiers in Plant Sci. 2014;5:271. Available at: http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fpls.2014.00271/pdf. DOI: 10.3389/fpls.2014.00271

Richardson C.W. A preliminary note on the genetics of *Fragaria.* J. Genet. 1914;3:171-177.

Sønsteby A., Heide O.M. Long-day rather than autonomous control of flowering in the diploid everbearing strawberry *Fragaria vesca* ssp. semperflorens. J. Hort. Sci. Biotech. 2008;83:360-366.

Staudt G. The species of Fragaria, their taxonomy and geographical distribution. Inter. Strawberry Symp. Acta Hort. 1989;1(265): 23-33.

Идентификация генотипов яровой мягкой пшеницы Казахстанско-Сибирской сети питомников по составу субъединиц глютенина и глиадина

А.И. Абугалиева[1], А.И. Моргунов[2], Х. Пенья[2], Н.Б. Волковинская[1], Т.В. Савин[3]

[1] Товарищество с ограниченной ответственностью «Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства» Акционерного общества «КазАгроинновация», Алмалыбак, Казахстан;
[2] СИММИТ, Турция; [3] Казахский национальный аграрный университет, Алматы, Казахстан

Казахстанско-Сибирский питомник (КАСИБ) улучшения яровой мягкой пшеницы под эгидой СИММИТ за десятилетний период идентифицирован по пяти изученным блокам на состав глиадина (1B/1R транслокация), состав высокомолекулярных субъединиц (ВМС) и низкомолекулярных субъединиц (НМС) глютенина и класс твердозерности. Состав ВМС глютенина приведен в соответствии с регламентом UPOV (Union for the Protection of New Varieties of Plants – Союз охраны селекционных достижений) по 27, 28 и 29 признакам системы тестирования на однородность, отличимость и стабильность для 188 однородных сортообразцов. Основная часть сортов яровой мягкой пшеницы характеризуется формулами по составу глютенина «2* 7+9 5+10» (до 40 % из всех однородных сортов), «2* 7+9 2+12» (до 30 %) и «1 7+9 5+10» (до 8 % сортообразцов). В сортовом генофонде Казахстана обнаружены генотипы с новой субъединицей 4+10 в хромосоме 1D в образцах Эритроспермум 55/94-01-20, Фитон 41. Сорт Иридост отмечен как носитель относительно редкого аллеля 5,5+10 в хромосоме 1D, ранее выявленного у сортов Целиноградка, Целинная 24, Акмола 3. Для генотипов Э-607 и Э-757 характерна редкая субъединица 7*+8. Уровень однородности сортообразцов наиболее высок в 3 блоках КАСИБ (8–9; 10–11; 12–13) и составляет 74–84 %. Пшенично-ржаная транслокация 1BL.1RS идентифицирована преимущественно у образцов селекции Сибирского научно-исследовательского института сельского хозяйства (СибНИИСХоз) и Восточно-Казахстанского научно-исследовательского института сельского хозяйства (ВКНИИСХ) в каждом КАСИБ, для всех образцов, представленных ЗАО «Кургансемена», ТОС «Агросемконсалт», и образцов селекции ТОО «Фитон». Сорта Алтайская 105, Курганская 5, Лютесценс 1300, Фитон 42, Лютесценс 53/95-98-1, Лютесценс 53/88-94-12, Лютесценс 54, Лютесценс 30-94, Эритроспермум 607 и Актобе 1574 в различных условиях выращивания характеризовались широким спектром изменчивости по твердозерности – от полумягкозерных до твердозерных.

Ключевые слова: яровая пшеница, ВМС и НМС, глютенин, глиадин, пшенично-ржаная транслокация, твердозерность, идентификация сортов, UPOV.

Kazakhstan-Siberian spring common wheat identification according to glutenin and gliadin composition

A.I. Abugalieva[1], A.I. Morgunov[2], J.R. Pena[2], N.B. Volkovinskaya[1], T.V. Savin[3]

[1] Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant Industry, Almalybak, Kazakhstan; [2] CIMMYT, Turkey; [3] Kazakh National Agrarian University, Almaty, Kazakhstan

Within ten years, the Kazakhstan-Siberian nursery net for spring common wheat improvement (KASIB) working under the auspices of CIMMYT (Intenational Maize and Wheat Improvement Center) characterized accessions of five cultivar blocks with regard to the compositions of gliadin (1B/1R translocation), glutenin HMW and LMW subunits, and grain hardness. HMW glutenin compositions for 188 homogeneous variety samples are given in accordance with UPOV (Union for the Protection of New Varieties of Plants) regulations and 27, 28 and 29 features in tests for uniformity, distinctness, and stability. Most spring wheat cultivars possess the glutenin spectra 2* 7+9 5+10" (40 %), "2* 7+9 2+12" (up to 30 %), and "17+95+10" (8 %). The Kazakhstan varietal gene pool includes genotypes with a new subunit 4 + 10 on 1D in samples of Erythrospermum 55/94-01-20 and Phyton 41. Cultivar Iridost is noted as carrying the relatively rare allele 5,5 + 10 on chromosome 1D. This allele was previously identified in Tselinogradka, Tselinnaya 24, and Akmola 3 cultivars. The rare subunit 7*+ 8 is typically present in E-607 and E-757. The last three KASIB blocks (8-9; 10-11; 12-13) show higher levels of uniformity: up to 74–84 %. The 1BL.1RS wheat-rye translocation is more frequently identified in accessions by Siberian Scientific Research Institute of Agriculture and Eastern Kazakhstan Research Institute of Agriculture breeding in each KASIB block and also in all the accessions presented by the companies Kurgansemena and Agrosemkonsal and selected by the Fiton company. Varieties Altaiskaya 105, Kurganskaya 5, Lutescens 1300, Phyton 42, Lutescens 53/95-98-1, Lutescens 53/88-94-12, Lutescens 54; Lutescens 30-94, Erythrospermum 607, and Aktobe 1574 showed the whole range of variability in grain

УДК 633.111.1«321»:631.526.32
Поступила в редакцию 15.12.14 г.
Принята к публикации 09.02.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: kiz_abugalieva@mail.ru

hardness (from middle soft to hard) under different growth conditions.

Key words: spring wheat, HMW and LMW glutenin subunits, gliadin, wheat-rye translocation, hardness, variety identification, UPOV.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Абугалиева А.И., Моргунов А.И., Пенья Х., Волковинская Н.Б., Савин Т.В. Идентификация генотипов яровой мягкой пшеницы Казахстанско-Сибирской сети питомников по составу субъединиц глютенина и глиадина. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):74-82.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Abugalieva A.I., Morgunov A.I., Pena J.R., Volkovinskaya N.B., Savin T.V. Kazakhstan-Siberian spring common wheat identification according to glutenin and gliadin composition. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):74-82.

Охрана селекционных достижений (сортов растений) осуществляется через движение семенного материала. Унификация, выравненность и чистота семян гарантируют сохранение однородности, стабильности сортов. Поэтому Союз охраны селекционных достижений – Union Protection of Varieties (UPOV) совместно с Международной ассоциацией по тестированию семян – International Seed Testing Association (ISTA) заинтересованы в наличии четких критериев при DUS-тестировании (DUS-тест – test for distinctness, uniformity and stability – тест на отличимость, однородность и стабильность). С этой целью был проведен ряд специальных исследований по пригодности и целесообразности использования результатов электрофоретического изучения белковых маркеров, прежде всего проламинов зерна (Cooke, 1995). В последние годы в методике UPOV для идентификации сортов используется электрофоретический анализ запасных белков.

Информация по составу высокомолекулярных субъединиц (ВМС) глютенина в сочетании с данными по компонентному составу глиадина позволяет ответить на вопросы технических критериев UPOV: отличимость, однородность и стабильность (Jones *et al*., 2003). По рекомендации UPOV, результаты по составу ВМС глютенина представляют согласно присутствию конкретных субъединиц, соответствующих хромосомам 1A, 1B и 1D, как это было осуществлено для сортового генофонда Казахстана (Abugalieva, Morgounov, 2004; Abugalieva, Pena, 2010).

Материалы и методы

Изучены сорта и образцы Казахстанско-Сибирской сети улучшения яровой мягкой пшеницы (КАСИБ 4-13) – 216 генотипов от 17 оригинаторов, выращенные в двух репродукциях в 3–8-й зонах возделывания в Казахстане и Сибири. Состав высокомолекулярных и никзомолекулярных субъединиц глютенина определяли по методу, принятому в СИММИТ (Abugalieva, Pena, 2010), компонентный состав глиадина определяли по Перуанскому с соавт. (1996).

Результаты

По результатам анализа 216 генотипов яровой мягкой пшеницы, включая стандарты, обнаружена их принадлежность к 25 типам электрофоретических спектров ВМС глютенина, из которых 18 характерны для однородных 188 сортов (табл. 1). Остальные сорта представляют собой смеси по 1–3 аллелям локусов в хромосомах 1A, 1B и 1D, присутствующим в одном спектре и в одном сорте (табл. 2).

Основная часть яровой мягкой пшеницы характеризуется формулой «2* 7+9 5+10» – до 40 % из всех однородных сортообразцов; формулой «2* 7+9 2+12» – до 30 % и формулой «1 7+9 5+10» – до 8 % сортообразцов.

Разнообразие блоков определяется варьированием по 1A- и 1B-хромосоме на уровне 5 субъединиц и по 1D – 4 субъединиц высокомолекулярного глютенина (ВМГ) (рис. 1). Судя по распределению генотипов, питомники КАСИБ представлены в основном ВМС глютенина, детерминирующими высокое хлебопекарное качество: по 1A – 2* (77–79 %) и 1 (14–15 %); по 1B – 7+9 (81–82 %) и 7+8 (13–15 %); по 1D – 5+10 до 60 % (рис. 1).

В данном наборе среди образцов сортового генофонда Казахстана обнаружены генотипы с новой субъединицей 4+10 по 1D-хромосоме в образцах Эритроспермум 55/94-01-20 (Павлодарский НИИСХ, КАСИБ 8-9), Фитон 41 (КАСИБ 8-9); стандарт раннеспелый (КАСИБ 8-9). Сорт Иридост отмечен как носитель относительно редкого аллеля 5,5+10 по 1D-хромосоме, ранее выявленной для сортов Целиноградка, Целинная 24, Акмола 3 (Abugalieva, Morgounov, 2004). По 1B-хромосоме сорт Челяба для всего набора был оригинален по наличию в составе ВМГ субъединицы 6+8 и в смеси для сорта Лютесценс 29-94. Для генотипов Э-607 и Э-757 характерна редкая субъединица 7*+8.

Блоки КАСИБ состоят из сортосмеси от 16 % (КАСИБ 12-13) до 60 % (КАСИБ 6-7). Последнее, возможно, связано с тем, что анализ ВМС глютенина проведен для образцов из каждого региона отдельно, тогда как в других блоках – только в одной местности. В табл. 3 представлена информация по сортосмесям в разрезе оригинаторов и блоков КАСИБ с учетом в том числе и слабых загрязнений. Уровень однородности повышается для последних 3 блоков КАСИБ 8-9; 10-11; 2-13 до 74–84 %. В разрезе оригинаторов процент полиморфных по ВМС глютенинам сортов колеблется от 14 % (ВКНИИСХ) до 50–60 % (Курганский НИИСХ, Павлодарский НИИСХ и Челябинский НИИСХ). Низкая доля смешанных генотипов отмечена для сортообразцов селекции ВКНИИСХ, также для Актюбинской СХОС (20 %), КазНИИЗиР (21 %), Алтайского НИИЗиС (25 %). Таким образом, по ВМС глютенина могут быть идентифицированы 40–84 % генотипов в зависимости

Таблица 1. Характеристика сортов яровой мягкой пшеницы КАСИБ 4-13 по составу ВМС глютенина (однородные)

Формула (QS*) / суммарный QS	Кол-во сортообразцов	Зона КАСИБ	Сортообразец
2* 7+9 5+10 (3) (2) (4) /9	74	4-5	Омская 35, Чернява 13, Новосибирская 29, Алтайская 50, Фора, Лютесценс 54, Лютесценс 5395, Степная 1, Актобе 32, Е-756
		6-7	53-94-98-2, Алтайская 100, Челяба 2, Фитон 156, Фитон 42, ГВК 1916-9, Лютесценс 1085, Лютесценс 196/94-6, Лютесценс 94, Омская 36, Омская 37, Памяти Рюба, Шагала, Степная 16, Степная 2, Женис
		8-9	Степная 17, ГВК 1914/15, Кайыр, Лютесценс 1503, Лютесценс 53/95-98-1, 53-88-94-12, Фитон 27, Линия 776, Лютесценс 706, Лютесценс 716, Сибаковская Юбилейная, Омская 38, Лютесценс 529/00-10С
		10-11	Заульбинка, Велютинум 15, Эритроспермум 65, Лютесценс 94, Лютесценс 1599 (Сары-Арка), Павлодарская 10, Павлодарская 11, Фитон 9, Фитон С 41ЧС, Астана 2, ВК-1, Лютесценс 363/96-4, Лютесценс 16-04, Лютесценс 120-03, Челяба 75
		12-13	Асар, Степная 1583-08, Лютесценс 823, Эритроспермум 35-12-13, Лютесценс 1558, Лютесценс 1569, Фитон 43, Владимир, Астана 2, Омская 35, Степная волна, Лютесценс 697, Р-40, Линия 96-99-14, Линия 241-00-4, Новосибирская 31, Лютесценс 172-01, Омская 41
2* 7+9 2+12 (3) (2) (2) /7	55	4-5	Омская 34, Нива 2, Голубковская, Новосибирская 15, Лютесценс 509, Лютесценс 574, Лютесценс 424, Астана, Байтерек, Шортандинская 95 улучшенная, ГВК 1860-80, ГВК 1369-2, ГВК 1857-9
		6-7	Алтайская 530, Эритроспермум 760, ГВК 1526, ГВК 1860-12, Лютесценс 1300, Лютесценс 1350, Лютесценс 20, ОК-1, Степная 16
		8-9	Степная 62, Предгорная, Лютесценс 29, Эритроспермум 14, Лютесценс 1502, Фитон 214, Северянка, Лютесценс 801
		10-11	Актобе 1574, Актобе 1580, Актобе 1582, Павлодарская 9, Северянка 2, Экада 85, Фитон С 36 ЧС, Памяти Азиева, Саратовская 29, Сибирский Альянс, Лютесценс 259
		12-13	Степная 75, ГВК 2033-7, ГВК 2036-15, ГВК 2055-1, Лютесценс 342, Лютесценс 2, Лютесценс 4, Лютесценс 9-33, Линия 18001, Памяти Азиева, Саратовская 29, Лютесценс 311/00-2(2)-6
0 7+9 5+10 (1) (2) (4) /7	5	4-5	Чебаркульская
		6-7	Мальцевская 110
		10-11	Альфа 79, Фитон 109
		12-13	Лютесценс С 197С
2* 7+8 5+10 (3) (3) (4) /10	9	4-5	Сибирская 12, Удача
		6-7	Алтайская 105, Лютесценс 210/99-10
		8-9	Лютесценс 686
		10-11	Омская 39
		12-13	Лютесценс 23490
2* 7+8 2+12 (3) (3) (2) /8	7	4-5	Ирень, Иргина, Красноуфимская, Терция, Эритроспермум 607
		8-9	САД-114
		10-11	Терция
		12-13	Лютесценс 844
1 7+9 5+10 (3) (2) (4) /9	15	4-5	Соната, Сибирская 123, Эритроспермум 727, Е-746
		6-7	27-90-98-3
		8-9	Челяба Юбилейная, САД 101, Лютесценс 158-01
		10-11	Ырым, Лютесценс 360/96-6, ОМГАУ 90, Эритроспермум 78
		12-13	Линия 165, Лютесценс С 24, Лютесценс 151/03-85
1 17+18 2+12 (3) (3) (2) /8	2	8-9	Линия 752
		12-13	Фитон С 50ЧС

Окончание табл. 1

Формула (QS*) / суммарный QS	Кол-во сортообразцов	Зона КАСИБ	Сортообразец
1 7+8 2+12 (3) (3) (2) /8	5	4–5	Ария
		6–7	Степная 15
		8–9	А-125
		12–13	Пиротрикс 3586, Р-23-14
0 7+9 2+12 (1) (2) (2) /5	3	4–5	Актюбинка
		8–9	Степная 1509/06
		12–13	Новосибирская 18
1 7+8 5+10 (3) (3) (4) /10	3	4–5	Надежда, № 18
		6–7	Лютесценс 166 СП 94
		8–9	Лютесценс 157
1 6+8 2+12 (3) (1) (2) /6	1	4–5	Челяба
2* 17+18 2+12 (3) (3) (2) /8	1	6–7	Фитон 25
2* 17+18 5+10 (3) (3) (4) /10	1	6–7	Курганская 5, Лютесценс 30-94
2* 7*+8 2+12 (3) (3) (2) /		4–5	Э-607
1 17+18 5+10 (3) (3) (4) /10	2	8–9	Линия 790
1 7+9 2+12 (3) (2) (2) /7	2	6–7	53-88-94-12
		10–11	Апасовка

* QS – quality score, по Payne и UPOV.

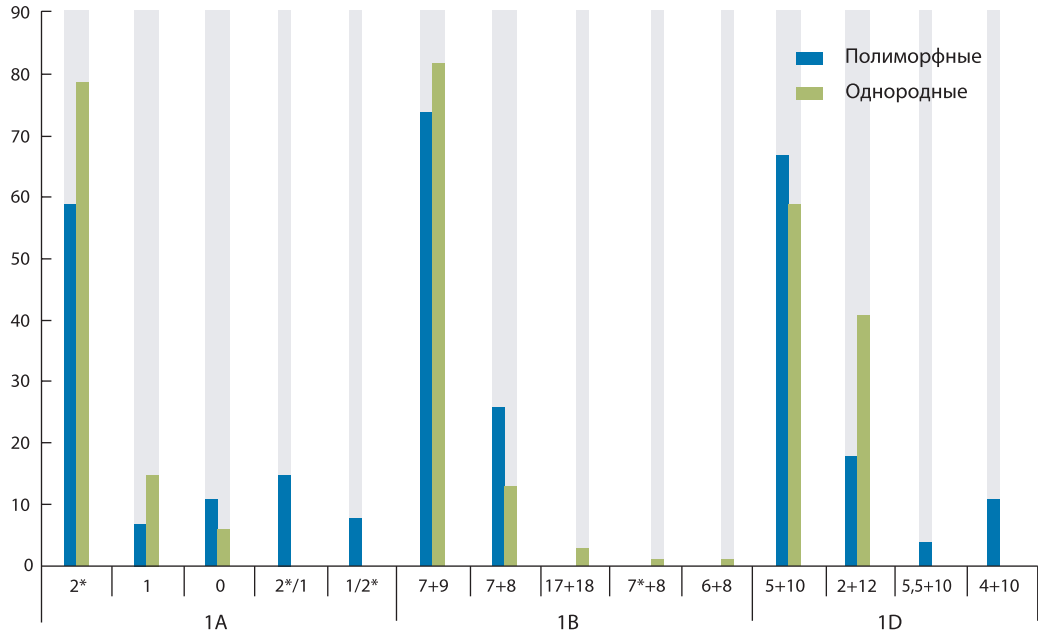


Рис. 1. Распределение генотипов яровой мягкой пшеницы сети КАСИБ 4-13 по частоте ВМС глютенина.

Таблица 2. Характеристика сортов яровой мягкой пшеницы КАСИБ 4-13 по составу ВМС глютенина (смешанные/полиморфные)

Хромосома		Зона КАСИБ	Сортообразец
1B	1D		
7+9	5,5+10 (2+12)	8-9	Иридост
7+9	4+10 (5+10)	8-9	Эритроспермум 55/94-01-20
7+9	4+10 (2+12)	8-9	Фитон 41
7+8	4+10	8-9	Стандарт раннеспелый
7+9	5+10	8-9	Лютесценс 601, Эритроспермум 78
7+9	5+10	10-11	Лютесценс 415/00
7+9	2+12 (5+10)	10-11	Алтайская 110
7+8	2+12	4-5	Ария
7+8 (7+9)	2+12 (5+10)	10-11	Фитон 9
7+9 (7+8)	5+10 (2+12)	10-11	Лютесценс 1545
7+8	5+10	10-11	Челяба степная
7+8	5+10	10-11	Лютесценс 120-03
(7+9)		12-13	Эритроспермум 23390
7+9	5+10	4-5	Лютесценс 13
	(2+12)	8-9	Лютесценс 1501, Лютесценс 517, Лютесценс 307/97-23
		10-11	Жазира, Лютесценс 1541, Лютесценс 901, Омская 35, Лютесценс 290/99-7
		12-13	Р-89А, Лютесценс 1614
7+8 (7+9)	2+12	12-13	Экада 113
7+9	2+12	4-5	Лютесценс 148-97-16
	(5+10)	12-13	Солтустик
7+8 (7+9)	2+12	12-13	Лютесценс 89-06
7+9	5+10	12-13	Эритроспермум 95-07
7+8 (7+9)	5+10 (2+12)	10-11	Самгау
7+9	2+12	4-5	Байтерек
	(5+10)	8-9	Лютесценс 1502
7+9 (17+18)	5+10	8-9	Лютесценс 53/88-94-12
7+9 (6+8)	2+12	4-5	Лютесценс 29-94
7+9 (17+18)	5+10 (2+12)	4-5	Э-756
17+18 (7+8)	2+12 (5+10)	4-5	Э-758
7*+8	5+10 (2+12)	4-5	Э-757

от блока КАСИБ, 14 % генотипов – как носители пшенично-ржаной транслокации 1BL.1RS.

Разнообразие по хромосомам 1A, 1B и 1D представлено по блокам КАСИБ (рис. 2) и по оригинаторам (табл. 4). На сорта, представленные как смеси, необходимо обратить внимание с точки зрения доведения их до однородности по составу субъединиц ВМС глютенина в процессе первичного семеноводства на основе способа отбора по данным электрофореза запасных белков (Кожемякин и др., 1995).

В целом необходим контроль популяций каждого конкретного сорта в разных зонах. Так, в блоке КАСИБ 6-7 только часть сортов имела одну и ту же формулу во всех условиях выращивания: Алтайская 100, Алтайская 530, Фитон 25, ГВК 1860-12, ГВК 1916-9, Лютесценс 1085, Лютесценс 1350, Лютесценс 210/99-10, Лютесценс 94, Лютесценс 20, ОК-1 и Женис. К ним могут быть добавлены сорта Степная 15, Шагала, 27-90-98-3, 59-94-98-2, ГВК 1526-2, которые представлены как смеси по 1D-хромосоме (5+10 и 2+12) и Лютесценс 196/94-6 по 1A-хромосоме (1 и 2*). Информация по электрофоретическим спектрам запасных белков важна еще и потому, что несет и технологическую нагрузку как основа клейковинного комплекса.

В основном по 4 зонам КАСИБ 6-7 сорта (Фитон, Карабалык, Актюбинск и Павлодар) однородны по элект-

Таблица 3. Сорта со смешанной формулой ВМС глютенина в разрезе оригинаторов и блоков КАСИБ 4-13

Оригинатор	Всего сортов	Смеси	КАСИБ 4-5	КАСИБ 6-7	КАСИБ 8-9	КАСИБ 10-11	КАСИБ 12-13	% смеси
Актюбинская СХОС	15	3	–	Степная 2 Степная 15 Степная 16	–	–	–	20
ВКНИИСХ	14	2	–	ГВК 1526-2	Иридост	–	–	14
КазНИИЗиР	14	3	–	Шагала, Лютесценс 166 СП 94	–	Самгау	–	21
Карабалыкская СХОС	13	4	Лютесценс 13, Эритроспер-мум 78	Эритроспер-мум 760	–	Жазира	–	31
Карагандинский НИИСХР	14	6	–	Лютесценс 1300	Лютесценс 1501 Лютесценс 1502	Лютесценс 1541 Лютесценс 1545	Лютесценс 1614	43
Павлодарский НИИСХ	10	6	Лютесценс 29-94	27-90-98-3 53-88-94-12 53-94-98-2	53-88-94-12 Эр.55/94-01-20	–	–	60
КазНИИЗХ	7	2	Байтерек	–	–	–	Солтустик	29
Отар	7	3	Э-756; Э-757; Э-758	–	–	–	–	42
Фитон	15	5	–	Фитон 156, Фитон 42	Фитон 41	Фитон 9	Экада 113	33
Агросем-консалтинг	5	1	–	–	Лютесценс 601	–	–	20
ИББР	2	–	–	–	–	–	–	-
Алтайский НИИЗ	16	4	Лютесценс 509 Лютесценс 424	–	Лютесценс 517	Алтайская 110	–	25
Курганский НИИСХ	14	6	Фора	Курганская 5 Мальцевская 110	–	Лютесценс 290/99-7	Р89-А Терция	43
Кур/семена	6	–	–	–	–	–	–	–
Красноуфимская	3	–	0	–	–	–	–	–
ОМГАУ	15	5	Нива 2	–	Эритроспер-мум 78	Лютесценс 120-03	Эритроспер-мум 9507 Лютесценс 89-06	33
СибНИИСХ	16	7	Омская 34, Лютесценс 148-97-16	Лютесценс 196/94-6 Омская 36, Омская 37	Лютесценс 307/97-23	Омская 35	–	44
СибНИИРС	7	1	Удача	–	–	–	–	14
ЧелябНИИСХ	9	6	Челяба	Челяба 2 Памяти Рюба	–	Челяба степная	Эритроспер-мум 23390	67

Таблица 4. Генетический потенциал качества яровой мягкой пшеницы блока КАСИБ 4-13 в разрезе оригинаторов по ВМС глютенина, транслокации 1BL.1RS и твердозерности (доля сортообразцов, %)

Оригинатор	По ВМС глютенина (QS*)						С транслокацией 1B/1R	Мягкозерные
	10	9	8	7	6	5		
Актюбинская СХОС	4	42	4	36	–	14	7	7
ВКНИИСХ	–	32	–	62	–	6	43	–
КазНИИЗР	47	33	7	13	–	–	–	–
Карабалыкская СХОС	–	47	–	43	–	–	–	7
Карагандинский НИИРС	6	55	6	33	–	–	–	7
Павлодарский НИИСХ	5	42	10	38	–	5	–	36
НИИ по безопасности, Отар	10	30	50	–	20	–	–	–
ТОО «Агросемконсалт»	–	37	–	63	–	–	50	–
ТОО «Фитон»	–	36	18	41	–	5	21	7
КазНИИЗХ, Шортанды	–	50	–	50	–	–	–	–
Алтайский НИИЗ	5	50	5	40	–	–	–	6
Курганский НИИСХ	9	30	39	22	–	–	25	7
СибНИИРС (Новосибирск)	29	43	14	14	–	–	–	–
Челябинский НИИСХ	29	53	6	6	6	–	22	–
ОМГАУ	5	63	11	21	–	–	6	–
СибНИИСХ, Кургансемена (Омск)	14	48	–	38	–	–	33	–

* QS – quality score, по Payne и UPOV

Таблица 5. Сорта яровой мягкой пшеницы сети КАСИБ с 1B/1R-транслокацией

Зона КАСИБ	Сортообразец	Оригинатор
4-5	Чернява 13	ОМГАУ
	Чебаркульская	Челябинский НИИСХ
	Э-746	НИИПББ (Отар)
6-7	ГВК 1916-9	ВКНИИСХ
	Лютесценс 210/99-10, Омская 37	СибНИИСХоз
	ОК-1	Курганский НИИСХ
	Степная 15 – смесь	Актюбинская СХОС
8-9	Предгорная 70 – смесь, ГВК 1914-15	ВКНИИСХ
	Фитон 41	НПФ «Фитон»
	Северянка, Лютесценс 801	Агросемконсалт
	Лютесценс 529/00-10 С, Лютесценс 307/97-23	СибНИИСХ
10-11	Заульбинка, Велютинум 15	ВКНИИСХ
	Северянка 2	Агросемконсалт
	Лютесценс 363/96-4, Лютесценс 360/96-6, Лютесценс 290/99-7	Кургансемена
	Омская 39	СибНИИСХоз
12-13	ГВК 2033-7	ВКНИИСХ
	Фитон 43, Лютесценс С 19 ЧВ	НПФ «Фитон»
	Линия 96-99-14, Линия 241-00-4	Кургансемена
	Омская 41, Лютесценс 311/00-2(2)-6	СибНИИСХоз
	Эритроспермум 23390	Челябинский НИИСХ

рофоретического спектру глиадина. Сорта Лютесценс 94, Лютесценс 1300 и Алтайская 10 имеют отличный спектр глиадина по Павлодару.

Многие сорта имеют одинаковую формулу по спектру глиадина: 1) ГВК 1526-2, ГВК 1860-12, Лютесценс 1350, 53-90-98-2, Курганская 5 и Мальцевская 110; 2) Степная 2, Степная 15, 53-88-94-12, Алтайская 105, Алтайская 530 и Челяба 2; 3) Женис, Лютесценс 166-СП-94, Лютесценс 20 и Лютесценс 94; 4) Фитон 42, Фитон 156, Степная 16 и Лютесценс 196/94-6; 5) Памяти Рюба, Омская 36, 27-90-98-2 (рис. 3).

Методом электрофореза глиадина в ПААГ проанализировано 52 сорта пшеницы по 6 точкам произрастания: 1 – Акмола; 2 – Павлодар; 3 – Костанай; 4 – Караганда; 5 – ВКО; 6 – КИЗ для блока КАСИБ 4-5 (297 образцов).

Однородными по спектру глиадина являются три сорта: Соната, Лютесценс 574 и Лютесценс 424. Достаточно однородны (имеют по одному биотипу) сорта Ирень, Челяба и № 18. По 3 типа спектров имеют сорта: Красноуфимская 90, Сибирская 12, Сибирская 123, Омская 34, Новосибирская 15, Лютесценс 53-95, Алтайская 50, Фора, Лютесценс 219-94 и ГВК 1860-80. По 4 типа спектра выявлено у 17 образцов: Лютесценс 148-97-16, Чернява, Голубковская, Удача, Ария, Терция, Чебаркульская, Астана, Байтерек, Надежда, Эритроспермум 78, Эритроспермум 727, Эритроспермум 746, Акмола 2, Лютесценс 1310, Нива 2 и Новосибирская 29. По 5 типов спектра обнаружено у 12 сортов: Омская 35, Иргина, Лютесценс 509, Шортандинская 95 улучшенная, Лютесценс 13, Актюбинка, ГВК 1369-2, ГВК 1857-9, Эритроспермум 757, Эритроспермум 758, Карагандинская 25 и Лютесценс 1411. Разные типы глиадиновых спектров по всем 6 точкам произрастания выявлены у 4 сортов: Степная 1, Актюбе 32, Эритроспермум 756 и Лютесценс 1410. Кроме того, сорта Лютесценс 54, Лютесценс 30-94 и Эритроспермум 607 были проанализированы только по трем точкам (Караганда, ВКО и КИЗ) и имели по ним разные типы спектра.

Наиболее удалены от всех кластеров генотипы ОК-1, Фитон 25 и ГВК 1916-9, два из которых имеют пшенично-ржаную 1B/1R-транслокацию. В этом наборе (КАСИБ 6-7) по этому признаку схожи образцы омской селекции: Омская 37 и Л 210/90-10.

Пшенично-ржаная транслокация идентифицирована в большей степени для образцов селекции СибНИИСХОЗ и ВКНИИСХ в каждом КАСИБ (кроме КАСИБ 4-5) для всех образцов, представленных «Кургансемена» (кроме Лютесценс 415/00), в КАСИБ 10-11 и КАСИБ 12-13, представленных «Агросемконсалт» (КАСИБ 8-9 и КАСИБ 10-11), а также для образцов селекции ТОО «Фитон» (Фитон 41 и Фитон 43), в том числе на основе материала челночной селекции. Всего обнаружено таких генотипов 30 из 216 (табл. 5).

Для сорта Омская 37 оригинаторами показана еще и пшенично-пырейная транслокация, что характеризует

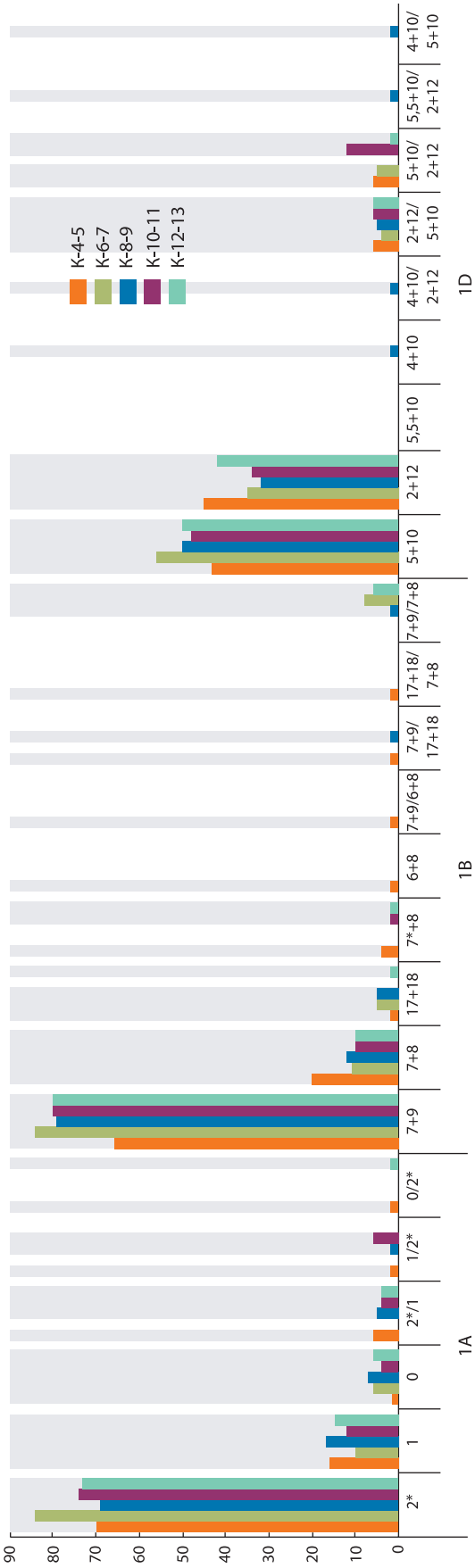


Рис. 2. Распределение генотипов яровой мягкой пшеницы пяти блоков КАСИБ (4-5; 6-7; 8-9; 10-11; 12-13) по частоте ВМС глютенина.

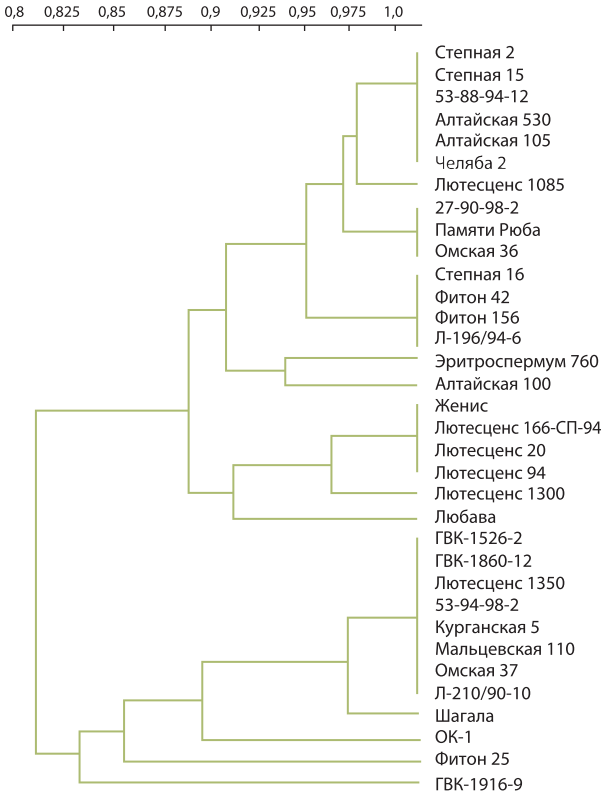


Рис. 3. Дендрограмма сходства–различий (Мера Хемминга) сортообразцов яровой мягкой пшеницы КАСИБ-6 по электрофоретическому спектру компонентов глиадина.

происхождение сортов омской селекции (Зыкин и др., 2003; Белан и др., 2012).

Определение класса твердозерности в процессе испытания и регистрации сорта является ключевым в системе зернового маркетинга от сорта к товарному производству, так как обусловливает принадлежность сорта конкретному технологическому классу и требования к его качеству. Строго к хлебопекарным пшеницам по классу «твердозерная» и «среднетвердозерная», в том числе согласно стандартам ведущих стран-экспортеров, относятся 203 из 212 сортов. Остальные не всегда обеспечивают высокий выход крупинчатой муки.

Блок КАСИБ 6-7 отличался наиболее высокой долей сортов и линий с нестабильным индексом твердозерности (до 15,2 %), что сопровождалось переходом в класс «смесь» и «полумягкозерная» в различных условиях выращивания для сортов Алтайская 105, Курганская 5, Лютесценс 1300, Фитон 42, Лютесценс 53/95-98-1 и Лютесценс 53/88-94-12. В блоке КАСИБ 4-5 сорта Лютесценс 54, Лютесценс 30-94 и Эритроспермум 607 характеризовались полным спектром изменчивости по твердозерности – от полумягкозерных до твердозерных, в зависимости от условий выращивания (ввиду исходной неоднородности по соотношению мягких/твердых зерен), в блоке КАСИБ 8-9 до 5 % (Лютесценс 53/95-98-1 и Лютесценс 53/88-94-12) мягкозерных генотипов и в блоке КАСИБ 10-11 – генотип Актюбе 1574.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Белан И.А., Россеева Л.П., Бадаева Е.Д., Зеленский Ю.И., Блохина Н.П., Шепелев С.С., Першина Л.А. Изучение хозяйственно ценных и адаптивных признаков у линий сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37, несущих транслокации 1RS.1BL и 7DL-7Ai. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012;16(1):178-186.

Зыкин В.А., Белан И.А., Колмаков Ю.В. Эволюция качества зерна яровой мягкой пшеницы в процессе селекции в условиях Западной Сибири. Докл. РАСХН. 2003;5:3-5.

Перуанский Ю.В., Абугалиева А.И., Савин В.Н. Методы биохимической оценки коллекционного и селекционного материала. Алма-Ата, 1996.

Abugalieva A., Pena R.J. Grain quality spring and winter wheat in Kazakhstan. J. Asian Austral. Plant Sci. Biotechnol. 2010;4(1): 87-90.

Abugalieva A.I., Morgounov A.I. Grain quality of spring wheat in Kazakhstan and Central Asia. Proc. Inter. Wheat Quality Conf. «From Molecular Improvement to Consumer Needs», May 29–31, Beijing, China. 2004;8-9.

Cooke R.J. Gel electrophoresis for the identification of plant varieties. J. Chrom A. 1995;698:281-299.

Jones H., Jarman R.G., Austin L., Whaite G., Cooke R.G. The management of variety reference collections in distinctness, uniformity and stability testing of wheat. Euphytica. 2003;132:175-184.

Интрогрессивные линии мягкой пшеницы с генетическим материалом *Agropyron glaucum*

Р.О. Давоян, И.В. Бебякина, Э.Р. Давоян, А.С. Зинченко, Ю.С. Зубанова, Д.С. Миков

Государственное научное учреждение Краснодарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия

Пырей сизый *Agropyron glaucum* (Desf. ex DC) Roem. & Schult является ценным источником генов устойчивости к болезням, морозостойкости, выносливости к засолению. Для передачи генетического материала от этого вида мягкой пшенице был использован 76-хромосомный нестабильный амфидиплоид, объединяющий в себе геномы A и B мягкой пшеницы сорта Аврора, часть (6) хромосом генома D этого сорта и полный набор хромосом *Ag. glaucum* (2*n* = 42). Получен большой набор интрогрессивных линий мягкой пшеницы сорта Аврора, различающихся по комплексу морфо-биологических признаков. Для эффективного использования полученных линий в селекции проводятся цитологический и молекулярно-генетический анализы, оценка по устойчивости к болезням и качеству зерна. В данной статье рассмотрены результаты исследования 25 ранее не изученных интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Ag. glaucum*. Определено, что за исключением линии Д43 все остальные в MI мейоза формируют 21 бивалент. В линиях Д3, Д21 и Д23 генетический материал *Ag. glaucum* представлен в виде транслокационного сегмента, а в линии Д7, Д43 и Д49 – в виде замещенных хромосом и предположительно транслокаций. У 18 линий замещена одна пара хромосом пшеницы. Для идентификации транслокаций и замещенных хромосом был проведен микросателлитный анализ с использованием специфичных к хромосомам D-генома маркеров. Интрогрессии затронули все хромосомы генома D, за исключением 3D и 4D. Исследуемые линии различаются по содержанию белка и клейковины, качеству клейковины и общей хлебопекарной оценке. Изучение спектров глиадина выявило изменение формулы глиадина у 7 из 12 линий по сравнению с сортом-реципиентом Аврора. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о генетическом разнообразии и ценности исследуемых интрогрессивных линий для селекции мягкой пшеницы.

Ключевые слова: интрогрессивные линии мягкой пшеницы, *Agropyron glaucum*, цитологический анализ, микросателлитный анализ, устойчивость к болезням, технологические качества зерна.

Introgression of common wheat lines with genetic material of *Agropyron glaucum*

R.O. Davoyan, I.V. Bebyakina, E.R. Davoyan, A.N. Zinchenco, Y.S. Zubanova, D.S. Mikov

SSI Krasnodar Research Institute of Agriculture, Krasnodar, Russia

Grey wheatgrass *Agropyron glaucum* (Desf. ex DC) Roem. & Schult is a valuable source of genes for resistance to diseases, frost resistance, and salt tolerance. An unstable 76-chromosomal amphidiploid combining genomes A and B of common wheat variety Avrora, six chromosomes of genome D of the same variety, and a full set of *Ag. glaucum* (2*n* = 42) chromosomes was used as an intermediate to transfer the genetic material from the wild donor to the said wheat variety. A large set of wheat introgression lines differing in a variety of morphobiological characters was developed. For effective employment of the developed lines in breeding, cytological and molecular-genetical analyses of the lines were conducted, and their pest resistance and grain technological properties were evaluated. We report the investigation of 25 common wheat introgression lines with genetic material from *Ag. glaucum*, not studied hitherto. All lines but D43 formed 21 bivalents in MI meiosis. In lines D3, D21, and D23, the genetic material of *Ag. glaucum* was present as a translocation segment. Lines D7, D43, and D49 carried substituted chromosomes and, presumably, translocations. One pair of wheat chromosomes was substituted in 18 lines. For the identification of translocations and substituted chromosomes, microsatellite analysis was done with markers specific to D genome chromosomes. The introgression touched all D genome chromosomes except 3D and 4D. The lines under the study differed in protein and gluten contents, gluten quality, and bread-making quality. Study of gliadin spectra revealed changes in the gliadin formula in 7 of 12 lines with reference to the recipient Avrora variety. Thus, the results obtained point to genetic diversity of investigated introgression lines and their value for common wheat breeding.

Key words: introgression lines of common wheat, *Agropyron glaucum*, cytological analysis, microsatellite analysis, resistance to diseases, the technological quality of grain.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян Э.Р., Зинченко А.С., Зубанова Ю.С., Миков Д.С. Интрогрессивные линии мягкой пшеницы с генетическим материалом *Agropyron glaucum*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):83-90.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan E.R., Zinchenco A.N., Zubanova Y.S., Mikov D.S. Introgression of common wheat lines with genetic material of *Agropyron glaucum*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):83-90.

УДК 633.111.1:633.2:611.527
Поступила в редакцию 27.01.2015 г.
Принята к публикации 27.02.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: davoyanro@mail.ru

Несмотря на большие успехи в селекции мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), большое значение имеет создание сортов, которые наряду с высокой потенциальной урожайностью будут иметь эффективные гены устойчивости к различным видам биотических и абиотических стрессов. Актуальным остается повышение качества зерна. Многие из этих проблем можно решить путем переноса в геном пшеницы генетического материала от ее диких и культурных сородичей.

Генофонд дикорастущих сородичей в основном используется для передачи генов устойчивости к болезням. Значительная часть эффективных генов происходит из этого генофонда (McIntosh et al., 2005), но при этом не все из них нашли должное применение в селекционной практике (Friebe et al., 1996).

При межвидовых и особенно межродовых скрещиваниях зачастую наблюдается связь переданного положительного признака с отрицательными, такими как удлинение вегетационного периода, ухудшение хлебопекарных качеств, склонность к полеганию, понижение урожайности и др. (Worland et al., 1988; Knott, 1989; Brevis et al., 2008). Количество нежелательных признаков зависит от формы передачи и характера их проявления. Кроме того, возможно, в некоторых линиях генетический материал дикого вида в недостаточной степени компенсирует отсутствующие пшеничные хромосомы (Zeven, Waninge, 1986). В то же время передаваемый генетический материал от природных сородичей может либо не иметь негативного эффекта, либо быть сцепленным с другими положительными признаками (Zeller, Fuchs, 1983; Тимонова и др., 2012).

Пырей сизый *Agropyron glaucum* (Desf. ex DC) Roem. and Schult. (syn. *Thinopyrum intrmedium* (Host) Barkworth and D.R. Dewey) ($2n = 6x = 42$) является ценным источником генов устойчивости к болезням, морозостойкости, выносливости к засолению (Цицин, 1937; McGuire, Dvorak, 1981; Jauhar, Peterson, 1996). От этого вида в различные хромосомы мягкой пшенице переданы гены устойчивости: *Lr 38*, *Sr 44*, *Pm40*, *Pm 43*, *Wsm 1*, *Bdv 2*, *Bdv 3* (Li, Wang, 2009; McIntosh et al., 2009).

Одним из эффективных способов передачи полезных генов от дикорастущего вида мягкой пшенице являются создание и использование синтетического амфидиплоида, в котором один из геномов мягкой пшеницы замещен на геном дикого сородича (Давоян и др., 2012).

Для передачи ценных признаков от *Ag. glaucum*, и в первую очередь устойчивости к болезням, использовался 76-хромосомный нестабильный амфидиплоид (Аврокум), объединяющий в себе геномы A и B мягкой пшеницы сорта Аврора, часть (6) хромосом генома D этого сорта и полный набор хромосом *Ag. glaucum* (Жиров, Терновская, 1984). В результате проведенной работы был получен большой набор интрогрессивных линий мягкой пшеницы, различающихся по комплексу морфо-биологических и хозяйственно ценных признаков (Давоян и др., 2004).

Целью данной работы было всестороннее изучение (цитологический и молекулярно-генетический анализы, оценка по устойчивости к болезням и технологическим показателям зерна) 25 ранее не изученных интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Ag. glaucum.*

Материалы и методы

Исходным материалом служили 25 линий мягкой пшеницы (BC_2F_{16}–BC_2F_{22}) с генетическим материалом *Ag. glaucum*, полученные от скрещивания синтетической формы Аврокум с восприимчивым к листовой ржавчине сортом Аврора.

Подсчет хромосом в метафазе I митоза проводился на давленых препаратах кончиков корешков проростков, окрашенных реактивом Шиффа. Изучение конъюгации хромосом в метафазе I мейоза проводилось на давленых препаратах, окрашенных уксуснокислым гематоксилином. В мейозе подсчитывали число бивалентов, унивалентов и мультивалентов. Цитологические исследования выполняли на микроскопе «Laboval 4» Karl Zeiss при увеличении 10 × 10; 40 × 10; 100 × 10.

Заражение и оценку по устойчивости к листовой ржавчине, желтой ржавчине и мучнистой росе проводили во взрослой стадии в полевых условиях по общепринятым методикам (Методы селекции ..., 1988). Устойчивость к листовой ржавчине определяли по шкале Майнса и Джексона (Mains, Jakson, 1926), желтой ржавчине – Гасснера и Штрайба (Gasner, Straib, 1934). К устойчивым относили растения с типом реакции к ржавчинам 0–2. Растения с промежуточным типом реакции от 0 до 1 обозначали баллом 01. Оценку по устойчивости к мучнистой росе проводили по шкале Гешеле (Пересыпкин, 1979). Растения со степенью поражения мучнистой росой 0–20 % считались устойчивыми.

Микросателлитный анализ проводили с использованием специфичных к хромосомам D-генома маркеров *Xgdm* (Pestsova et al., 2000): 1DL – *Xgdm* 111; 1DS – *Xgdm* 60; 2DL – *Xgdm* 6; 2DS – *Xgdm* 35; 3DL – *Xgdm* 38; 3DS – *Xgdm* 62; 4DL – *Xgdm* 125; 4DS – *Xgdm* 129; 5DL – *Xgdm* 3; 6DL – *Xgdm* 98; 6DS – *Xgdm* 108; 7DL – *Xgdm* 150; 7DS – *Xgdm* 130.

Амплификация праймеров проходила при следующих условиях: 94 °C – 3 мин 30 циклов (95 °C – 15 с; 55–60 °C – 30 с; 72 °C – 2 мин) – 72 °C – 3 мин. Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле с 0,5 × буфером TBE. Концентрация геля варьировала от 1,8 до 2,3 % в зависимости от размера амплифицированного фрагмента. Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете с помощью фотобокса «INFINITI 1000». В качестве маркера молекулярной массы использовали ДНК-маркер M 24 100 bp «СибЭнзим».

Таблица 1. Характеристика линий Арокум/Аврора по устойчивости к болезням. 2008–2013 гг.

№	Линия	Ржавчина, тип реакции		Мучнистая роса, %
		листовая	желтая	
1	Д1	2	1	5
2	Д3	4	3	30
3	Д5	3	3	20
4	Д7	3	2	20
5	Д9	1/3	2	30
6	Д12	1	01	10
7	Д15	2	1	10
8	Д17	01	01	20
9	Д21	4	3	30
10	Д23	4	3	30
11	Д25	1/3	2	10
12	Д27	3	01	10
13	Д29	2	2	20
14	Д31	01	2	30
15	Д33	1	2	25
16	Д37	01	1	10
17	Д39	01	1	40
18	Д41	01	2	20
19	Д43	2(3)	3	15
20	Д49	2(3)	2	40
21	Д51	1	2	30
22	Д53	2	2	40
23	Р97	01	01	20
24	Р115	2	1	10
25	Р271	1	2	10
Аврора		4	1	40

Технологические качества зерна изучали в отделе технологии и биохимии зерна ГНУ КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко по методикам Государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур (1988). Электрофорез глиадина проводили в крахмальном геле по методике Созинова и Поперели (1978).

Результаты

Устойчивость интрогрессивных линий к болезням

Поскольку главной задачей являлась передача от *Ag. glaucum* мягкой пшенице устойчивости к болезням, линии оценивались по устойчивости к одним из наиболее распространенных и вредоносных болезней – листовой ржавчине (*Puccini. triticina* Eriks.), желтой ржавчине (*Puccinia striiformis* f. sp. tritici) и мучнистой росе (*Blumeria graminis* f. sp. tritici).

В табл. 1 приведена характеристика линий Аврокум/Аврора по устойчивости к перечисленным болезням за 2008–2013 гг.

Из 25 проанализированных линий 16 были устойчивы к листовой ржавчине. Высокую устойчивость с типом реакции 01 проявили 7 линий: Д17, Д31, Д33, Д37, Д39, Д41 и Д43. Также были выявлены две линии, Д9 и Д25, с гетерогенным типом реакции, у которых на фоне высокой устойчивости (тип реакции 1) проявляются единичные пустулы с типом реакции 3.

Резистентность к желтой ржавчине несут 20 (80 %) линий, три из которых (Д12, Д17 и Д27) имеют тип реакции на заражение 01. Устойчивость к мучнистой росе проявили 14 линий.

Особую ценность для селекции представляют линии, устойчивые к комплексу болезней. Устойчивость одновременно к двум болезням проявили 9 линий и к трем – 10 линий (Д1, Д12, Д15, Д17, Д29, Д37, Д41, Р97, Р115 и Р271). Следует отметить линии Д12 и Д37, обладающие высокой устойчивостью ко всем трем болезням.

Большое разнообразие линий по устойчивости к болезням может свидетельствовать о множественных интрогрессиях генетического материала *Ag. glaucum* в геном мягкой пшеницы сорта Аврора.

Таблица 2. Анализ мейоза в MI МКП у гибридов F_1, полученных от скрещивания стабильных линий Аврокум/Аврора с сортом Краснодарская 99

Линия	Просмотрено клеток	21^{II}, %	$20^{II}+2^{I}$, %	Клетки с	
				унивалентами, отличными от 2^{I}, %	мультивалентами, %
Д1	73	24,7	69,9	2,7	2,7
Д3	80	78,7	17,5	-	3,8
Д5	84	15,4	77,4	3,6	3,6
Д7	67	31,3	59,7	3	6
Д9	82	24,4	69,5	2,4	3,7
Д12	74	13,5	79,8	4	2,7
Д15	79	38	55,7	1,3	5
Д17	94	21,3	72,3	2,1	4,2
Д21	86	66,3	25,6	2,3	5,8
Д23	75	57,4	36	1,3	5,3
Д25	70	35,7	58,6	2,8	2,9
Д27	85	34,1	62,4	-	3,5
Д29	98	87,8	7,2	2	3
Д31	84	22,6	72,6	2,4	2,4
Д33	73	34,2	60,3	1,4	4,1
Д37	82	26,8	66	2,4	4,8
д39	90	30	64,5	2,2	3,3
Д41	87	37,9	57,5	2,3	2,3
Д43	68	32,4	60,3	1,5	5,8
Д49	85	29,4	62,3	2,4	5,9
Д51	80	26,2	66,3	2,5	5
Д53	76	38,2	57,9	1,3	2,6
Р97	74	28,4	64,9	2,7	4
Р115	82	23,3	69,5	3,6	3,6
Р271	84	29,8	63	2,4	4,8
Аврора	92	75	19,6	1,1	4,3

Цитологическая и молекулярно-генетическая характеристика интрогрессивных линий

Наряду с полезными признаками, полученными от дикорастущего сородича, одним из основных условий применения интрогрессивных линий в качестве доноров является их цитологическая стабильность, поскольку она тесно связана с нормальным онтогенезом растений. Очень важно также, в каком виде генетический материал с необходимыми признаками от дикого вида привнесен в геном мягкой пшеницы (дополненные хромосомы, замещенные хромосомы, транслокации или рекомбинации).

Анализ растений изучаемых линий по числу хромосом в метафазе I митоза выявил, что все они являются 42-хромосомными. С учетом беккроссов и большого числа самоопыляющихся поколений это вполне объяснимо. По этой же причине ожидалась высокая доля цитологически стабильных линий.

Для установления цитологической стабильности изучали конъюгацию хромосом в метафазе I мейоза в материнских клетках пыльцы (МКП) у 3–4 растений от каждой линии. Число просмотренных клеток на одну линию варьировало от 104 до 132 (см. Доп. материалы 1[1]).

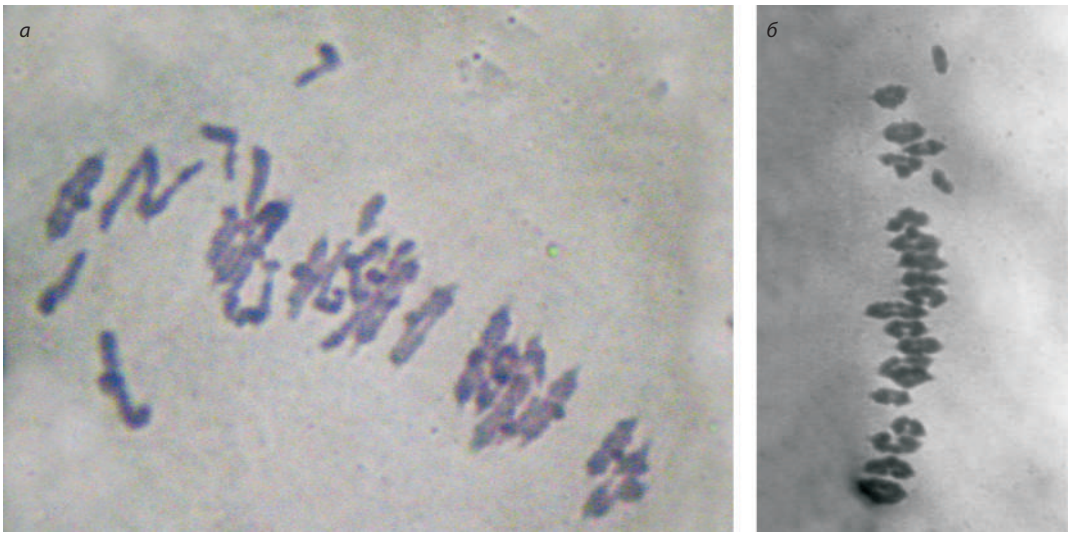
К цитологически стабильным относили линии, у которых количество изученных клеток с бивалентной конфигурацией хромосом (21^{II}) превышало 90 %.

В результате анализа было выявлено, что, за исключением одной линии (Д43), все остальные в MI мейоза формируют 21 бивалент и, таким образом, являются цитологически стабильными.

Наличие мультивалентов у линий Д12 и Д31 свидетельствует о возможном присутствии у них транслокаций.

Для того чтобы выяснить, в какой именно форме был передан генетический материал *Ag. glaucum* от синтетической формы, предварительно отобранные цитологически стабильные линии (21^{II}) были скрещены

[1] Дополнительные материалы см. в Приложении 1 по адресу: http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2015-04/appx1.pdf



Ассоциация хромосом в метафазе I мейоза у гибридов F_1.
а – Краснодарская 99 × Д21, $18^{II} + 1^{IV}$; *б* – Краснодарская 99 × Д12, $20^{II} + 2^{I}$.

с одним из наиболее мейотически стабильных сортов мягкой пшеницы селекции КНИИСХ – Краснодарская 99. Предполагалось, что если у исследуемых линий материал синтетиков представлен как транслокационный сегмент, то у гибридов F_1 в MI мейоза у более чем 50 % клеток будут формироваться биваленты и мультиваленты.

Если же генетический материал синтетиков в линиях представлен в виде целой хромосомы, то, как правило, ассоциация хромосом будет $20^{II}+2^{I}$.

Процент клеток с мультивалентной ассоциацией хромосом колебался от 2,6 до 6 при 4,3 % у сорта Аврора, несущего транслокацию 1RS.1BL (табл. 2). Мультиваленты у изучаемых растений были представлены тривалентами, квадривалентами как закрытого, так и открытого типа (рисунок, *а*). Число мультивалентов, приходящихся на одну клетку, не превышало двух.

У гибридов F_1 с линиями Д3, Д21 и Д23 в MI мейоза у более 50 % клеток ассоциация хромосом представлена бивалентами и мультивалентами. Следовательно, генетический материал *Ag. glaucum* в этих линиях имеет форму транслокационного сегмента.

Линии Д7, Д43 и Д49 наряду с замещенными хромосомами предположительно несут транслокации, так как у гибридов с ними в метафазе I мейоза формируется относительно большое количество клеток с мультивалентной ассоциацией хромосом – 6; 5,8 и 5,9 % соответственно.

Ассоциация хромосом в MI мейоза у гибридных растений F_1, полученных с участием линии Д29, схожа с таковой у сорта Аврора. В то же время эта линия отличается от сорта Аврора устойчивостью к листовой ржавчине и мучнистой росе. Вероятно, интрогрессия генетического материала *Ag. glaucum* в эту линию произошла за счет рекомбинации или небольшой транслокации.

У остальных 18 линий замещена одна пара хромосом пшеницы, так как в MI мейоза ассоциация хромосом представлена как $20^{II} +2^{I}$ (рисунок, *б*).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что хромосомы *Ag. glaucum* могут в достаточной степени компенсировать отсутствие хромосом пшеницы, а также успешно конъюгировать с ними.

Относительно большое количество замещенных линий, полученных от скрещивания геномно-замещенной формы Аврокум с Авророй, а также их разнообразие по фенотипическим признакам позволяли надеяться на то, что произошло замещение разных хромосом D-генома пшеницы на хромосомы *Ag. glaucum*.

Для идентификации у исследуемых линий замещенных хромосом и транслокаций по геному D был проведен микросателлитный анализ с использованием специфичных к хромосомам D-генома маркеров *Xgdm* (Pestsova et al., 2000). По наличию амплификации судили о присутствии в геноме соответствующей хромосомы. Так, у линии Д51 отсутствовала амплификация праймеров по короткому и длинному плечам 7D хромосомы, что может предполагать ее замещение на соответствующую от *Ag. glaucum* (см. Доп. материалы 2). Кроме того, эта линия также имеет хромосомную перестройку (транслокацию) в коротком плече хромосомы 6DL.

У линий Д17, Д37, Д39, Д41 отсутствовала амплификация по короткому плечу хромосомы 2D и по длинному плечу 5D хромосомы. Эти линии предположительно имеют транслокацию 2DL.2Ag S и замещение хромосомы 5D мягкой пшеницы на 5Ag *Ag. glaucum*. Следует отметить, что все 4 линии проявляют одинаковый, высокий тип реакции устойчивости (01) к листовой ржавчине, что косвенно может также свидетельствовать об идентичности представленного в них генетического

материала *Ag. glaucum.* Транслокации по длинному плечу хромосомы 1D могут иметь линии Д43 и Д49.

В целом из 22 проанализированных линий у 7 из них – Д17, Д37, Д39, Д41, Д43, Д49, Д51 – выявлены хромосомные перестройки в геноме D мягкой пшеницы.

За исключением 3D и 4D, эти изменения произошли по всем хромосомам генома D. В остальных линиях интрогрессии, очевидно, затронули хромосомы других геномов, A или B.

Технологические качества зерна полученных линий

Помимо передачи мягкой пшенице устойчивости к различным биотическим и абиотическим факторам, повышения отдельных элементов продуктивности, чужеродные интрогрессии существенно влияют на технологические качества зерна и муки (Bochev, 1983; Аксельруд, Рыбалка, 2002; Лайкова и др., 2013).

Для выяснения технологических характеристик зерна была проведена оценка 12 линий урожая 2010 г. по содержанию белка и клейковины, качества клейковины, хлебопекарным качествам. В рамках этой работы также была проведена идентификация формулы глиадина у данных линий. Выявлено значительное разнообразие линий по изученным признакам (см. Доп. материалы 3).

Содержание белка у линий в сильной степени зависит от условий вегетационного периода и может накапливаться у отдельных из них до 20 %. Все исследуемые линии, за исключением Д23 и Д53, превышали сорт-реципиент Аврора по содержанию белка. Наивысшие показатели имели линии Д1 и Д31 – 18,1 и 17,2 % соответственно.

Генетические системы, детерминирующие количество клейковины так же, как и содержание белка, в значительной степени подвержены влиянию внешних условий. В целом, как и ожидалось, большинство линий превышает по этому показателю сорт-реципиент.

Из 12 проанализированных линий 9 имели содержание клейковины более 30 %. Минимальное значение по этому признаку составило 24,4 % (Д53), а максимальное – 38,4 % (Д1). Содержание клейковины у сорта Аврора составило 28,2 %.

Технологические качества зерна определяются не только высоким содержанием белка и клейковины. Важное значение имеет также и качество клейковины. Особенно это актуально для интрогрессивных линий пшеницы с генетическим материалом дикорастущих сородичей. В основном высокое содержание белка и клейковины связано с ухудшением качества клейковины.

В нашем анализе также лучшие по содержанию белка линии Д1, Д15 и Д31 имеют наиболее высокие показатели ИДК клейковины, соответствующие по ГОСТ второй группе. Выделено 6 линий с первой группой клейковины, при этом 4 из них – Д25, Д29, Д37 и Д49 – имеют высокие показатели по содержанию белка и клейковины.

По объемному выходу хлеба варьирование составляло от 645 мл (Д43) до 880 мл (Д7), при этом 11 линий превышают родительский сорт Аврора (640 мл).

В итоге исследуемые линии различались между собой по общей хлебопекарной оценке. Три линии, Д1, Д31, Д43, имели более низкую хлебопекарную оценку по сравнению с сортом Аврора (4,4 балла).

Семь линий, Д7, Д21, Д23, Д25, Д29, Д37 и Д49, имели более высокую, чем у сорта Аврора, оценку, при этом две из них, Д29 и Д49, высокую – 4,8 балла.

Хлебопекарные качества муки определяются специфическими реологическими свойствами клейковинного комплекса, состоящего в основе своей из глиадинов и глютенинов. Локусы, кодирующие субъединицы глютенина и компоненты глиадина, расположены в хромосомах первой и шестой гомеологических групп (Payne et al., 1982). В то же время в ряде работ установлено, что в контроле технологических и хлебопекарных качеств зерна мягкой пшеницы могут участвовать генетические факторы, расположенные в других хромосомах (Mansur et al., 1990; Пшеничникова и др., 2006). Это существенно расширяет возможности интрогрессивной селекции в улучшении технологических и хлебопекарных качеств мягкой пшеницы.

Глиадины представляют собой полиморфную белковую систему, что позволяет использовать аллельные варианты глиадинкодирующих локусов в качестве эффективных маркеров генотипа. Для записи спектров глиадина у изучаемых нами линий в нашей работе была использована форма, предложенная А.А. Созиновым (1978). Первая цифра обозначает номер хромосомы, буква – геном и последняя цифра – номер аллеля.

В результате проведенной работы у 7 из 12 линий были выявлены изменения формулы глиадина по сравнению с сортом Аврора (см. Доп. материалы 3). При этом многие линии сочетали высокое содержание белка и клейковины при хороших показателях ее качества. Изменения затронули хромосомы как 1-й гомеологичной группы пшеницы Gld1D1 (линии Д23, Д25, Д53), Gld1D2 (линия Д29), так и 6-й: Gld6A3 (Д29), Gld6B2 (Д31, Д51), Gld6D2 (Д25). Линии Д37 и Д49 при одинаковой формуле глиадина с сортами-реципиентами имели значительные отличия от них по содержанию белка, клейковины и качеству клейковины. Очевидно, что не только хромосомы 1-й и 6-й гомеологичных групп влияют на формирование белкового комплекса.

Обсуждение

Первые сведения о получении гибридов *Ag. glaucum* с пшеницей и их изучение относятся к 1930-м гг. (Вакар, 1935; Цицин, 1937; Хижняк, 1938). Несмотря на это можно сказать об относительно слабом использовании *Ag. glaucum* в селекции мягкой пшеницы. Основное внимание уделяется интрогрессии устойчивости к болезням и вредителям.

Главной задачей при получении нами интрогрессивных линий также являлась передача от *Ag. glaucum* мягкой пшенице устойчивости к болезням, и в частности к одной из наиболее распространенных и вредоносных – листовой ржавчине. В настоящее время известно о передаче от пырея сизого мягкой пшенице только одного гена устойчивости к листовой ржавчине – *Lr38*. Данный ген был передан посредством транслокации от длинного плеча хромосомы 7 группы *Ag. glaucum* в негомеологичные хромосомы пшеницы 2A, 5A, 1D, 3D и 6D (Friebe et al., 1992). Полученные линии снижали урожайность зерна (Dyck, Friebe, 1993) и не нашли широкого применения в селекции. В то же время не исключено, что у *Ag. glaucum* могут присутствовать другие гены устойчивости как к листовой ржавчине, так и к другим болезням, о чем также свидетельствуют полученные нами результаты. Оценка исследуемых линий выявила большое разнообразие по их устойчивости как к листовой, так и к желтой ржавчине и мучнистой росе. Это может быть связано с различием интрогрессивного генетического материала *Ag. glaucum* в геноме мягкой пшеницы сорта Аврора, и возможной передачей нового гена(ов) устойчивости. На основе гибридологического анализа (Давоян, 2012) ранее было выявлено различие по генам устойчивости к листовой ржавчине у линий Д17 и Д31. Таким образом, как минимум одна из них должна отличаться по гену устойчивости от *Lr 38*. Для более точного ответа на этот вопрос начаты работы по идентификации гена *Lr 38* в устойчивых к листовой ржавчине линиях.

Использование 76-хромосомного нестабильного амфидиплоида (Аврокум) позволило нам получить большой набор цитологически стабильных интрогрессивных линий мягкой пшеницы, различающихся по комплексу морфо-биологических и хозяйственно ценных признаков (Давоян и др., 2004).

Поскольку Аврокум объединял в себе геномы A и B мягкой пшеницы сорта Аврора, часть (6) хромосом генома D и полный набор хромосом *Ag. glaucum*, ожидалось, что интрогрессии в основном затронут геном D.

Ранее проведенная нами работа по идентификации замещенных хромосом на основании изучения мейоза MI у гибридов, полученных от скрещивания линий с тестерными чужеродно-замещенными линиями, выявила замещения по всем хромосомам генома D, за исключением хромосомы 1D (Давоян и др., 2005).

Микросателлитный анализ исследуемых в данной работе 22 линий выявил хромосомные перестройки по геному D у 7 линий, при этом изменения коснулись всех остальных хромосом генома D за исключением 3D и 4D. Обобщая полученные результаты, можно сделать вывод о том, что изменения затронули практически все хромосомы генома D. В то же время у ряда устойчивых линий (Д1, Д12, Д15, Д29, Д31 и др.) не было выявлено хромосомных перестроек по геному D. Очевидно, интрогрессии затронули хромосомы геномов A или B.

Исследуемые линии имеют значительный полиморфизм по содержанию белка и клейковины, качеству клейковины и общей хлебопекарной оценке. Большинство из них обладают более высокими показателями белка и клейковины по сравнению с сортом Аврора, при этом клейковина у линий Д25, Д29, Д37 и Д49 отнесена к первой группе. Хлебопекарная оценка 7 линий была выше, чем у сорта Аврора, у двух из них, Д29 и Д49, она была высокая и составила 4,8 балла.

Изучение спектров глиадина у изучаемых 12 линий выявило изменение формулы глиадина по сравнению с сортом-реципиентом Аврора. Изменения затронули хромосомы как 1-й гомеологичной группы пшеницы, так и 6-й.

Широкий спектр изменений глиадинкодирующих аллелей, содержания белка и клейковины полученных линий подтверждает возможность существенного изменения белкового комплекса мягкой пшеницы за счет интрогрессии в нее генетического материала диких сородичей.

Линии Д15, Д29 и Д37 сочетают хорошую хлебопекарную оценку с устойчивостью к комплексу болезней.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о генетическом разнообразии и ценности исследуемых интрогрессивных линий для селекции мягкой пшеницы.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта № 13-04-96-545 р-юг-а РФФИ и администрации Краснодарского края.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Аксельруд Д.В., Рыбалка А.И. Оригинальные агротехнологические свойства линий озимой мягкой пшеницы на основе чужеродных интрогрессий от диких и культурных сородичей. Пути повышения и стабилизации производства высококачественного зерна: Сб. докл. Междунар. науч.-практ. конф. Краснодар, 2002:34-37.

Вакар Б.А. Цитология пшенично-пырейных гибридов. Омск: Омское областное изд-во, 1935.

Давоян Р.О., Бебякина И.В., Бессараб К.С. Получение и характеристика чужеродно-замещенных линий озимой мягкой пшеницы Аврора с хромосомами *Agropyron glaucum*. Эволюция научных технологий в растениеводстве: Сб. науч. тр., посвящ. 90-летию КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко. Краснодар, 2004; 3:3-9.

Давоян Р.О., Бебякина И.В., Кекало Н.Ю. Идентификация хромосом пырея сизого (*Agropiron glaucum*) у замещенных линий сорта мягкой пшеницы Аврора. Наука Кубани. 2005;4: 104-107.

Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян О.Р., Зинченко А.Н., Давоян Э.Р., Кравченко А.М., Зубанова Ю.С. Синтетические формы как основа для сохранения и использования генофонда диких сородичей мягкой пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012;16(1):44-51.

Давоян О.Р. Изучение интрогрессивных линий *Triticum aestivum* L. для использования в селекции мягкой пшеницы: Автореф. дис. … канд. биол. наук. Краснодар, 2012.

Жиров Е.Г., Терновская Т.К. Геномная инженерия у пшеницы. Вестн. с.-х. науки. 1984;10:58-66.

Лайкова Л.И., Белан И.А., Бадаева Е.Д., Россеева Л.П., Шепелев С.С. Создание и изучение сорта яровой мягкой пшеницы «Памяти Майстренко» с интрогрессией генетического материала от синтетического гексаплоида *Triticum timopheevii* Zhuk. × *Aegilops tauchii* Coss. Генетика. 2013;49(1):103-112.

Методы селекции и оценки устойчивости пшеницы и ячменя к болезням в странах-членах СЭВ. Прага, 1988.

Методика Государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. М., 1988.

Пересыпкин В.Ф. Болезни зерновых культур. М.: Колос, 1979: 122-124.

Пшеничникова Т.М., Ермакова М.Ф., Попова Р.К. Технологические качества зерна и муки мягкой пшеницы в линиях с межсортовым замещением хромосом 1 и 6 гомеологичных групп. С.-х. биология. 2006;1:57-62.

Тимонова Е.М., Леонова И.Н., Белан И.А., Россеева Л.П., Салина Е.А. Влияние отдельных участков хромосом *Triticum timopheevii* на формирование устойчивости к болезням и количественные признаки мягкой пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012;16(1):142-159.

Созинов А.А., Попереля Ф.А. Методика вертикального дискового электрофореза в крахмальном геле и генетический принцип классификации глиадинов. Одесса, 1978.

Хижняк В.А. Формообразование у пшенично-пырейных гибридов. Изд. АН СССР. 1938:597-626.

Цицин Н.В. Что дает скрещивание пшеницы с пыреем. М.: Сельхозиздат, 1937.

Bochev B. The genus *Aegilops* – possibilities and perspectives of utilization the breeding of high quality wheat cultivar. Proc. of 7th World Cereal Genet. and Breed. Congr. Prague, 1983:237-242.

Brevis J.C., Chicaiza O., Khan I.A., Jackson L., Morris C.F., Dubcovsky J. Agronomic and quality evaluation of common wheat near-isogenic lines carrying the leaf rust resistance gene LR 47. Crop Sci. 2008;48:1441-1451.

Dyck P.L., Fiebe B. Evaluation of leaf rust resistance from wheat chromosomal translocation lines. Crop Sci. 1993;33:687-690.

Gasner G., Straib U.W. Weitere Untersuchungen uber die Spezialisierung sverhaltnissedes Gelbrostes *Puccinia glumarum* (Schm.) Erikss. u. Henn. Arb. Boil. Reichsanstalt. 1934;21:121-145.

Friebe B., Zeller F.J., Mukai Y., Forster B.R., Bartos P., McIntosh R.N. Characterization of rust-resistant wheat- Agropyron intermedium derivatives by C-banding, *in situ* hybridization and isozyme analysis. Theor. Appl. Genet. 1992;83:775-782.

Friebe B., Jiang J., Raupp W.J., McIntosh R.A., Gill B.S. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. Euphytica. 1996;91:59-87.

Jauhar P.P., Peterson T.S. *Thinopyrum* and *Lophopyrum* as a sources of genes for wheat improvement. Cereal Res. Commun. 1996;24: 15-21.

Knott D.R. The effect of transfers of alien genes for leaf rust resistance on the agronomic and quality characteristics of wheat. Euphytica. 1989;44:65-72.

Li H., Wang X. *Thinopyrum ponticum* and *Th. intermedium*: the promising source of resistance to fungal and viral diseases of wheat. J. Genet. Genom. 2009;36:557-565.

Mains E.B., Jakson H.S. Physiologic specialization in leaf rust of wheat, Puccinia triticina Erikss. Phytopatology. 1926;16:89-120.

Mansur L.M., Qualset C.O., Kasarda D.D. Effects of «Cheyenne» chromosomes on milling and baking quality in «Chinese Spring» wheat in relation to glutenin and gliadin storage proteins. Crop Sci. 1990;30:593-602.

McGuire P.E., Dvorak J. High salt-tolerance potential in wheat grasses. Crop Sci. 1981;21(5):497-500.

McIntosh R.A., Devos K.M., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C.F., Appels R., Anderson O.D. Catalogue of gene symbols for wheat: 2005 supplement. Ann. Wheat Newslet. 2005;51:272-285.

McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X. Catalogue of gene symbols for wheat: 2009 supplement. Ann. Wheat Newslet. 2009;55:256-278.

Payne P.I., Holt L.M., Lawrence G.J. The genetics of gliadinis and glutenins, the major storage proteins of the wheat endosperm. Plant Foods Human Nutr. 1982;31:229-241.

Pestsova E., Ganal M.W., Roder M.S. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. Genome. 2000;43:689-697.

Worland A.J., Law C.N., Hollins T.W., Kabner R.M.D., Guira A. Location of a gene for resistance to eyesot (*Pseudocercosporella herpotrichoides*) on chromosome 7D of bread wheat. Plant Breeding. 1988;101(1):43-51.

Zeller F.J., Fuchs E. Cytologie und Krankheitsresistenz einer 1A/1R-und mehrerer 1B/1R-Weizen-Roggen-Translokatiossorten. Z. Pflanzenzucht. 1983;90(4):285-296.

Zeven A.C., Waninge J. The degree of similarly or backross lines of *Triticum aestivum* cultivars Manitou and Neepawa with *Aegilops speltoides* accessions as donor. Euphytica. 1986;35:677-685.

Создание короткостебельных линий с вавилоидным типом колоса и их цитогенетическая характеристика

А.Дж. Алиева[1], С.П. Мехтиева[1], Р.К. Керимова[2]

[1] Институт генетических ресурсов Национальной академии наук Азербайджана, Баку, Азербайджан; [2] Бакинский государственный медицинский университет, Баку, Азербайджан

Гибридизация между гексаплоидными видами пшеницы (*Triticum* L.) и тритикале (× *Triticosecale* Wittm.) широко используется в фундаментальных исследованиях по генетике и селекции для изучения взаимной интрогрессии генетической информации в исходные виды. Исходя из того, что гексаплоидное тритикале, полученное в Институте генетических ресурсов (ИГР НАН Азербаджана), обладает широким формообразовательным потенциалом, мы задались целью использовать его в скрещиваниях с мягкой пшеницей. В процессе формообразования в гибридных популяциях второго и третьего поколений, полученных от скрещивания гексаплоидного тритикале с различными сортами (Опал и Чайниз Спринг) и разновидностью мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* var. *velutinum*), выщеплялись растения с пшеничным, ржаным, промежуточным и тритикальным типом колоса. Начиная с третьего поколения среди гибридных растений были выделены константные формы короткостебельных растений с ветвистыми колосьями вавилоидного типа. Несмотря на нестабильность и наличие множества нарушений мейоза у растений первого поколения, в последующих поколениях у гибридных растений, в том числе и у ветвистых морфотипов, наблюдалась как мейотическая, так и морфологическая стабильность. Молекулярно-цитогенетическими методами FISH (fluorescence *in situ* hybridization) и GISH (genome *in situ* hybridization) охарактеризован хромосомный состав одной из этих линий (378/3SD), и она идентифицирована как замещенная линия. Хромосомная паспортизация таких линий позволит использовать их в качестве моделей для генетических исследований, в том числе для изучения признака вавилоидности колоса, а также обеспечит им дальнейшее применение в генетических исследованиях по заданным свойствам.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., гексаплоидное тритикале, формообразование, вавилоидный тип колоса, мейоз, FISH, GISH, замещенная линия.

Raise of short-stemmed vaviloid branched spike lines and their cytogenetics

A.J. Aliyeva[1], S.P. Mehdiyeva[1], R.K. Kerimova[2]

[1] Genetic Resources Institute of ANAS, Baku, Azerbaijan; [2] Baku State Medical University, Baku, Azerbaijan

Hybridization between hexaploid species of wheat (*Triticum* L.) and triticale (Ч *Triticosecale* Wittm.) is used widely in genetic research and breeding when studying mutual introgressions of genetic material to original species. As far as the hexaploid triticale obtained in our Institute possessed a strong potential of morphogenesis, we decided to use it in crosses with bread wheat. During the process of morphogenesis in hybrid population of the second and third generations derived from the crosses between hexaploid triticale with different bread wheat cultivars (Opal and Chinese Spring) and variety (*Triticum aestivum* var. *velutinum*), plants with wheat, rye, intermediate, and triticale-like spike types were noted. Starting from the third generation, constant short-stemmed vaviloid branched spike plants were isolated among populations under study. Despite instability and numerous meiotic aberrations observed in the first generation of plants, including branched-spike ones, the subsequent progeny demonstrated meiotic and morphological stability. The chromosome composition of one of the lines (378/3SD) was characterized by fluorescence in situ hybridization (FISH) and genome *in situ* hybridization (GISH), and it was identified as a substitution line. Chromosomal identification of such lines will allow their use in genetic studies concerning specified traits, in particular, the vaviloid branched spike.

Key words: *Triticum aestivum* L., hexaploid triticale, morphogenesis, vaviloid type of spike, meiosis, FISH, GISH, substitution line.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Алиева А.Дж., Мехтиева С.П., Керимова Р.К. Создание короткостебельных линий с вавилоидным типом колоса и их цитогенетическая характеристика. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015; 19(1):91-96.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Aliyeva A.J., Mehdiyeva S.P., Kerimova R.K. Raise of short-stemmed vaviloid branched spike lines and their cytogenetics. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):91-96.

УДК 633.11:631.527
Поступила в редакцию 24.10.2014 г.
Принята к публикации 29.01.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: arzu2007@mail.ru

Многими исследователями при отдаленной гибридизации отмечены случаи появления ветвистоколосых растений пшеницы (Mac Key, 1966; Филатенко, 1968; Цицин, 1981; Алиева, 2009; Алиева, Аминов, 2013). Появление таких «вавилоидов» наблюдалось также при воздействии мутагенами на мягкую (*T. aestivum* L.) и твердую пшеницы (*T. durum* Desf.) и на *T. persicum* Vav. ex Zhuk.

Некоторые исследователи (Фляксбергер, 1935; Туманян, 1935) высказывали мнение о происхождении *T. vavilovii* Jakubz. в результате естественной мутации от спельтоидной формы мягкой пшеницы или мутации, произошедшей после спонтанной гибридизации тетраплоидной пшеницы (предположительно, *T. dicoccum* Schuebl.) с мягкой пшеницей (Дорофеев, 1968). Таким образом, было неслучайным появление среди гибридных комбинаций *T. durum* × *T. aestivum* легко обмолачиваемых константных «вавилоидов», описанных как *T. durum* subsp. *unicum* (Лукьяненко, Костин, 1979). Позднее формы, полученные от спонтанной гибридизации твердой пшеницы с мягкой и подвергшиеся мутациям, были отнесены к разновидностям *T. vavilovii* Jakubz.

В нашем эксперименте короткостебельные (карликовые) растения с вавилоидным типом колосьев выщеплялись почти во всех гибридных популяциях, полученных при гибридизации гексаплоидного тритикале (× *Triticosecale* Wittm., AABBRR) с мягкой пшеницей (*Triticum aestivum* L., AABBDD), и на их основе выделены линии VAV-1, VAV-2 и 378/3SD.

Поскольку в литературе нет данных о молекулярно-цитогенетических особенностях таких вавилоидных форм, было интересно изучить их именно с этой точки зрения. Поэтому данная работа посвящена созданию константных короткостебельных вавилоидных растений и молекулярно-цитогенетическому анализу линии 378/3SD с указанной морфологией колоса.

Материалы и методы

Работа выполнена на экспериментально-опытном участке Института генетических ресурсов НАН Азербайджана. Материалом для исследования послужили гибридные популяции, полученные от скрещивания гексаплоидного тритикале – *Triticale* (6*x*) с сортами мягкой пшеницы Opal (Германия) и Chinese Spring (Китай), а также разновидностью мягкой пшеницы – *Triticum aestivum* L. var. *velutinum*.

В проведении исследования наряду с гибридологическим методом (Горин и др., 1968) были использованы классический мейотический анализ и современные молекулярно-цитогенетические – FISH (fluorescence *in situ* hybridization) и GISH (genomic *in situ* hybridization) анализы. Конъюгацию хромосом в мейозе у короткостебельных вавилоидных линий изучали по общепринятой методике (Паушева, 1988) с некоторыми модификациями. Анализ мейоза проводили на временных ацетокарминовых давленых препаратах, цитогенетические наблюдения проводили с помощью микроскопа «Leitz Orthoplan» (Германия).

Молекулярно-цитогенетический анализ проводили на давленых препаратах клеток апикальной меристемы кончика корешков, приготовленных в соответствии с методикой (Jiang et al., 1994). FISH-анализ проводился согласно методике (Linc et al., 1999) с использованием зондов pSc119.2 (Bedbrook et al., 1980), Afa-семейства (Nagaki et al., 1995) и pTa71 (Gerlach, Bedbrook, 1979). pSc119.2, Afa-семейства и pTa71 метили биотином – 16-dUTP, дигоксигенином – 11-dUTP и смесью (1 : 1) этих двух антител соответственно. Для детекции проб pSc119.2 и Afa-семейства использовали флюорохромы стрептовидин-FITC и родамин соответственно. GISH проводили согласно методике (Reader et al., 1994) с незначительными модификациями по Molnár-Láng с соавт. (2000). Геномную ДНК *S. cereale* L. метили с помощью метода ник-трансляции. Препараты анализировали с использованием фильтров № 10 для FITC, № 15 для родамина, № 01 для DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindol) и с помощью программного обеспечения ImagePro Plus 4.0 Software (Media Cybernetics Silver Spring, MA, USA) на эпифлюоресцентном микроскопе «Zeiss Axioskop-2». Изображения регистрировались Spot CCD-камерой (Diagnostic Instruments, Sterling Heights).

Результаты и обсуждение

Использованное в работе *Triticale* (6*x*) было получено путем скрещивания амфидиплоида *T. durum* Desf. × *Ae. tauschii* Coss (AABBDD, $2n = 6x = 42$) с рожью *S. cereale* subsp. *segetale* Zhuk. (RR, $2n = 2x = 14$). В F_1 были получены амфигаплоидные гибриды с геномной формулой ABDR ($n = 4x = 28$). В F_2 исследование мейоза показало, что одно из растений является амфидиплоидом ($2n = 8x = 56$) и имеет геномную структуру AABBDDRR. Из этого амфидиплоида было получено только 3 растения. Два из них погибли, а третье имело 42 хромосомы, поэтому гибрид был назван неполным амфидиплоидом (НАД). В дальнейшем геномный состав НАД претерпел изменения. Проведенные анализы с использованием GISH показали, что хромосомы генома D полностью элиминировали, и этот образец в настоящее время является гексаплоидным тритикале с геномной формулой AABBRR (рис. 1).

Для передачи ржаного хроматина мягкой пшенице была проведена гибридизация между *Triticale* (6*x*) и сортами мягкой пшеницы Opal и Chinese Spring, а также разновидностью мягкой пшеницы var. *velutinum*, результаты скрещивания которых показаны в табл. 1.

Степень завязываемости семян в гибридных комбинациях между *Triticale* (6*x*) и тремя образцами мягкой пшеницы была низкой и варьировала между 20 и 29 %. Большинство гибридных зерен были морщинистыми и щуплыми. Гибридные растения F_1 морфологически

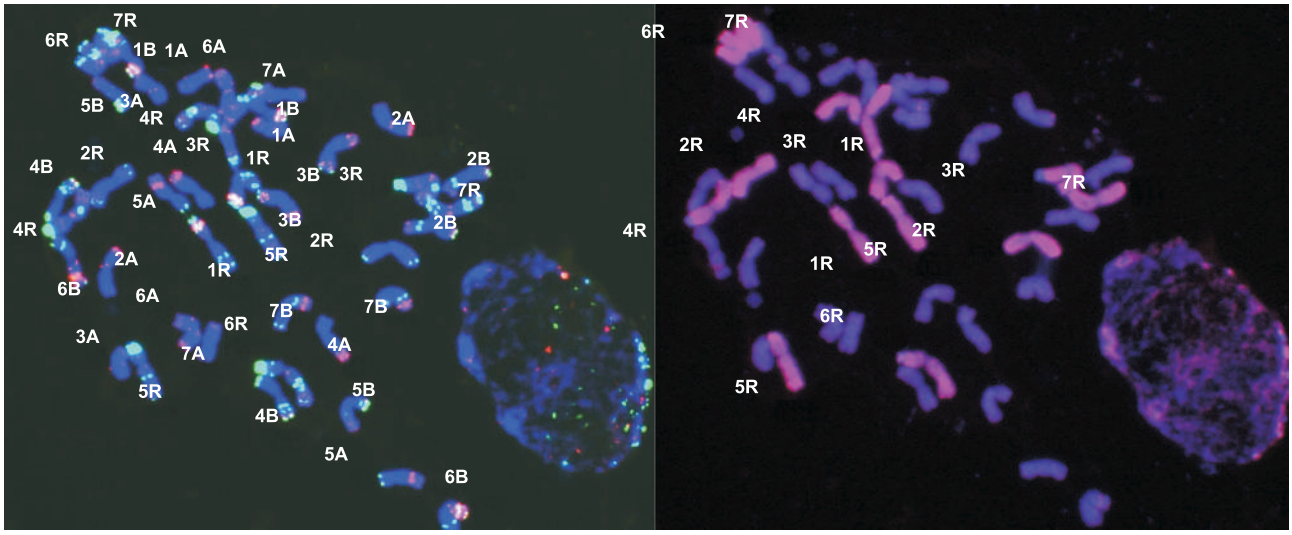


Рис. 1. Молекулярно-цитогенетические анализы генома НАД методами FISH (слева) и GISH (справа): элиминирование хромосом генома D и присутствие полного набора хромосом A, B и R геномов.

Таблица 1. Значения завязываемости и фертильности растений F_1 в трех гибридных комбинациях *Triticale* (6*x*) × *T. aestivum* L.

Комбинации	Число кастрированных цветков	Число гибридных зёрен	Завязываемость, %	Фертильность F_1, %
Triticale (6*x*) × cv. Opal	76	18	23,68	8,71
Triticale (6*x*) × var. *velutinum*	200	40	20,00	26,67
Triticale (6*x*) × cv. Chinese Spring	90	26	28,89	15,72

Таблица 2. Сравнительная характеристика поведения хромосом в мейозе гибридов F_1 *Triticale* (6x) × *T. aestivum* L. и стабильных линий (L) с колосом вавилоидного типа

Комбинации		МКП	Бивалентыы		Унивалентыы	Триваленты	Квадривалентыы	Число хиазм	2*n*
			закрытые	открытые					
Triticale (6*x*) × cv. Opal	F_1	175	10,82 ± 0,60	1,94 ± 0,46	15,86 ± 1,02	0,21 ± 0,14		24,27 ± 0,86	42
VAV-1	L	169	19,15 ± 0,42	1,26 ± 0,45	1,18 ± 0,32			39,56 ± 0,45	42
Triticale (6*x*) × var. *velutinum*	F_1	178	9,60 ± 0,27	2,90 ± 0,23	16,51 ± 0,34	0,04 ± 0,10	0,09 ± 0,12	22,46 ± 0,30	42
VAV-2	L	145	18,62 ± 0,29	1,92 ± 0,29	0,92 ± 0,34			39,21 ± 0,35	42
Triticale (6*x*) × cv. Ch. Spring	F_1	148	10,55 ± 0,63	2,02 ± 0,55	16,78 ± 1,21		0,02 ± 0,08	23,37 ± 1,05	42
378/3SD	L	103	17,19 ± 0,39	1,79 ± 0,22	2,74 ± 0,20	0,18 ± 0,14	0,19 ± 0,17	37,12 ± 0,41	42

были промежуточными между родительскими формами, и их фертильность варьировала между 8,7 и 26,7 %. Также у гибридов F_1 был изучен процесс мейоза, данные которого приведены в табл. 2. Степень конъюгации хромосом у гибридов F_1 была низкой. Так, количество закрытых бивалентов на одну материнскую клетку пыльцы (МКП) составило в среднем 10–11, открытых бивалентов – 2, а унивалентов – 16–17 (рис. 2). В то же время у всех гибридов F_1 трех комбинаций в малом количестве наблюдались мультивалентные ассоциации в виде три- и квадривалентов. Частота образования хиазм варьировала от 22 до 24. Также с большой частотой наблюдались такие мейотические нарушения, как асинхронное деление, неравномерное распределение хромосом между полюсами, формирование диад и тетрад с микроядрами.

У гибридных комбинаций в F_2 и F_3 наблюдался широкий формообразовательный процесс с выщеплением более 100 морфотипов. По морфологии колоса

Рис. 2. Метафаза I в мейозе у гибрида F_1 *Triticale* (6*x*) × cv. Chinese Spring.

Рис. 3. Фракции с вавилоидным типом колосьев, наблюдающиеся при формообразовании в F_3 у гибридной комбинации *Triticale* (6*x*) × *T. aestivum* var. *velutinum*.

Рис. 4. Короткостебельная линия VAV-1 с вавилоидным типом колоса.

эти морфотипы были подразделены на 4 группы: пшеничный, ржаной, тритикальный и промежуточный. У группы с тритикальным морфотипом были обнаружены растения с вавилоидным типом колоса (рис. 3), которые в поздних поколениях были выделены в константные короткостебельные линии (VAV-1 (рис. 4), VAV-2 и 378/3SD). Исследование мейотического процесса у этих вавилоидных линий выявило значительное увеличение степени хромосомной конъюгации (табл. 2).

Для установления хромосомного состава геномов линия 378/3SD была исследована молекулярно-цитогенетическими методами (FISH и GISH). Результаты показали, что она является замещенной. Например, геномный состав линии 378/3SD включает 14 хромосом A (1A–7A), 12 хромосом B (2B–7B), 8 хромосом D (1D–3D, 6D) и 8 хромосом ржаного (1R, 4R, 5R, 7R) геномов (рис. 5). В этой линии между хромосомами пшеничного и ржаного геномов произошли следующие 4 межгеномных замещения: 1R(1B), 2D(2R), 3D(3R) и 6D(6R). Как видно из геномной конституции этих линий, только одно замещение наблюдалось между ржаным геномом и B геномом пшеницы, остальные были R/D замещениями.

Впервые спонтанное гомеологическое замещение пшеничной хромосомы 1B ржаной хромосомой 1R получено в 1930 г. в Германии в результате гибридизации сорта мягкой пшеницы с сортом ржи Petkus, но оно было обнаружено только в начале 1970-х гг. с открытием C-окрашивания хромосом. Позднее было выявлено свойство ржаной хромосомы 1R компенсировать гомеологичные ей хромосомы пшеницы 1A, 1B и 1D; были созданы линии с замещениями 1A/1R, 1B/1R и 1D/1R, несущие ряд полезных признаков (Ji et al., 2008; Carvalho et al., 2009; Molnár-Láng et al., 2010; Zhou et al., 2012). Было обнаружено, что 2R(2D)-замещение приводит к изменениям ряда признаков у тритикале – к уменьшению высоты растения, длины колоса и вегетационного цикла растений, толерантности к высоким концентрациям NaCl, улучшению продуктивных качеств (Куркиев, 2008; Силкова и др., 2008; Lei et al., 2011).

Некоторыми исследователями, проводящими идентификацию и характеристику линий с 1R(1B)-замещениями, было отмечено маркирование данного замещения оригинальными аллелями секалинкодируюших локусов *Sec1* и *Sec2* (Моцный и др., 2009).

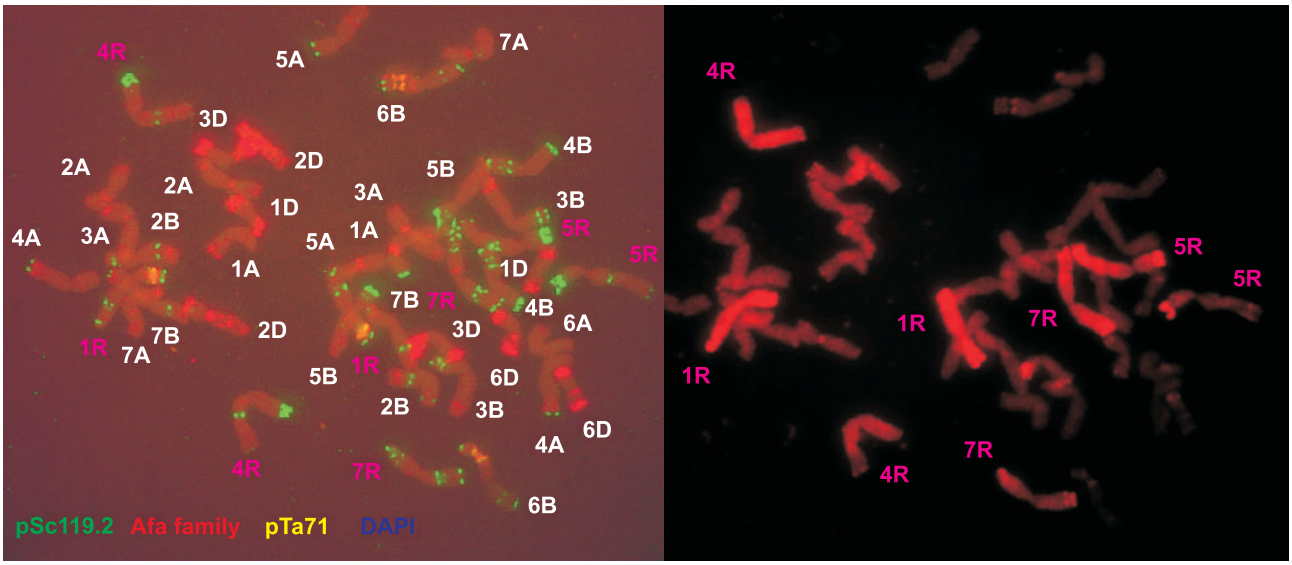


Рис. 5. Молекулярно-цитогенетические анализы генома линии 378/3SD методами FISH (слева) и GISH (справа): межгеномные замещения 1R(1B), 2D(2R), 3D(3R) и 6D(6R).

Отмечены теломерно-субтеломерные и геномные перестройки в пшенично-ржаных замещенных и дисомно дополненных линиях (Alkhimova et al., 1999; Bento et al., 2010; Szakács, Molnár-Láng, 2010). При исследовании замещенных линий по хромосомам 2H, 3H, замещенной линии по телоцентрической хромосоме 6HS установлены большая генетическая стабильность дисомно дополненных линий по хромосомам 2H и 3H, но меньшая стабильность дисомно дополненных линий по хромосоме 1HS, полученных из гибридов при гибридизации местной озимой пшеницы Martonvásári 9kr1 с сортом двухрядного озимого ячменя сорта Igri (Szakács, Molnár-Láng, 2007, 2010).

Таким образом, хромосомная паспортизация таких линий позволит использовать их в качестве моделей для генетических исследований, в том числе для изучения признака вавилоидности колоса, а также обеспечит им дальнейшее применение в генетических исследованиях по заданным свойствам.

Благодарности

Данная работа выполнена при финансовой подержке Фонда развития науки при Президенте Азербайджанской Республики – грант № EIF-2011-11(3)-82/52/3. Авторы выражают свою искреннюю признательность главному директору Центра сельскохозяйственных исследований при АН Венгрии доктору З. Бедо и всему рабочему персоналу лаборатории молекулярной цитогенетики в лице заведующей доктора М. Молнар-Ланг.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Алиева А.Дж. Источник нового типа ветвистоколосости у твердых пшениц. Докл. РАСХН. 2009;3:10-11.

Алиева А.Дж., Аминов Н.Х. Влияние генома D пшеницы на проявление признака нового типа ветвистоколосости в гибридных популяциях линии 171ACS. Генетика. 2013;49(11):1284-1291.

Горин А.П., Дунин М.С., Коновалов Ю.Б. Практикум по селекции и семеноводству полевых культур. М.: Колос, 1968.

Дорофеев В.Ф. Спонтанные мутации как фактор формообразования пшеницы. Вестник с.-х. науки. 1968;7:16-26.

Куркиев К.У. Наследование высоты растения у гексаплоидных форм тритикале с R/D замещением. Генетика. 2008;44(9): 1238-1245.

Лукьяненко П.П., Костин В.В. Новые формы твердой пшеницы. Докл. ВАСХНИЛ. 1970;6:2-3.

Моцный И.И., Файт В.И., Благодарова Е.М. Идентификация и характеристика 1R(1B) замещенных линий мягкой пшеницы. Цитология и генетика. 2009;43(3):26-35.

Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат, 1988.

Силкова О.Г., Щапова А.И., Шумный В.К. Передача генетического материала ржи в геном мягкой пшеницы методом межгеномного замещения хромосом. Информационный вестник ВОГиС. 2008;12(4):654-661.

Туманян М.Г. Генофонд пшениц Армении. Тр. Арм. СХИ. 1935;1.

Филатенко А.А. Межвидовая гибридизация в роде *Triticum* L.: Автореф. дис. … канд. биол. наук. Л.: ВИР, 1968.

Флаксбергер К.А. Пшеница. Культурная флора СССР. М.; Л.: Госиздат колх. и совх. лит-ры, 1935.

Цицин Н.В. Теория и практика отдаленной гибридизации. АН СССР. Гл. бот. сад. М.: Наука, 1981.

Alkhimova A.G., Heslop-Harrison J.S., Shchapova A.I., Vershinin A.V. Rye chromosome variability in wheat-rye addition and substitution lines. Chromosome Res. 1999;7:205-212. DOI: 10.1023/a:1009299300018

Bedbrook J.R., Jones J., O'Dell M., Thompson R.J., Flavell R.B. A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. Cell. 1980;19:545-560.

Bento M., Gustafson P., Viegas W., Silva M. Genome merger: from sequence rearrangements in triticale to their elimination in wheat-rye addition lines. Theor. Appl. Genet. 2010;121:489-497. DOI: 10.1007/s00122-010-1325-6

Carvalho A., Martín A., Heslop-Harrison J.S., Guedes-Pinto H., Lima-Brito J. Identification of the spontaneous 7BS/7RL intergenomic translocation in one F_1 multigeneric hybrid from the Triticeae tribe. Plant Breeding. 2009;128:105-108. DOI:10.1111/j.1439-0523.2008.01519.x

Gerlach W.L., Bedbrook J.L. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. Nucl. Acids Res. 1979;7:1869-1885.

Ji J., Wang Zh., Sun J., Li J., Zhang X., Wang D., Zhang A. Identification of new T1BL.1RS translocation lines derived from wheat (*Triticum aestivum* L. cultivar «Xiaoyan No. 6») and rye hybridization. Acta Physiol. Plant. 2008;30:689-695. DOI: 10.1007/s11738-008-0167-1

Jiang J., Friebe B., Gill B.S. Chromosome painting of «Amigo» wheat. Theor. Appl. Genet. 1994;8:811-813.

Lei M.P., Li G.R., Zhang S., Liu C., Yang Z. Molecular cytogenetic characterization of a new wheat *Secale africanum* 2Ra(2D) substitution line for resistance to stripe rust. J. Genet. 2011;90(2): 283-287.

Linc G., Friebe B.R., Kynast R.G., Molnár-Láng M., Köszegi B., Sutka J., Gill B.S. Molecular cytogenetic analysis of *Aegilops cylindrica* Host. Genome. 1999;42:497-503.

Mac Key J. Species relationship in *Triticum.* Proc. 2nd Intern. Wheat Genet. Symp.,1963. Hereditas Suppl., 1966;2:237-275.

Molnár-Láng M., Cseh A., Szakács E., Molnár I. Development of a wheat genotype combining the recessive crossability alleles *kr1kr1kr2kr2* and the 1BL.1RS translocation, for the rapid enrichment of 1RS with new allelic variation. Theor. Appl. Genet. 2010;120(8):1535-1545. DOI: 10.1007/s00122-010-1274-0

Molnár-Láng M., Linc G., Friebe B.R., Sutka J. Detection of wheat–barley translocations by genomic *in situ* hybridization in derivatives of hybrids multiplied *in vitro.* Euphytica. 2000;112: 117-123.

Nagaki K., Tsujimoto H., Isono K., Sasakuma T. Molecular characterization of a tandem repeat, Afa family, and its distribution among *Triticeae.* Genome. 1995;38:479-486.

Reader S.M., Abbo S., Purdie K.A., King I.P., Miller T.E. Direct labelling of plant chromosomes by rapid *in situ* hybridization. Trends Genet. 1994;10:265-266.

Szakács E., Molnár-Láng M. Development and molecular cytogenetic identification of new winter wheat – winter barley («Martonvásári 9 kr1» – «Igri») disomic addition lines. Genome. 2007;50(1): 43-50. DOI: 10.1139/g06-134.

Szakács É., Molnár-Láng M. Molecular cytogenetic evaluation of chromosome instability in *Triticum aestivum–Secale cereale* disomic addition lines. J. Appl. Genet. 2010;51:149-152. DOI: 10.1007/bf03195723

Zhou J., Zhang H., Yang Z., Li G., Hu L., Lei M., Liu C., Zhang J., Ren Z. Characterization of a new T2DS.2DL-?R translocation triticale ZH-1 with multiple resistances to diseases. Genet. Resour. Crop Ev. 2012;59:1161-1168. DOI: 10.1007/s10722-011-9751-0

Отсутствие генетической интрогрессии между *Elymus ciliaris* и *E. pendulinus* (Triticeae: Poaceae) по результатам SDS-электрофореза белков эндосперма в связи с гипотезами происхождения *E. amurensis*

А.В. Агафонов[1], Е.В. Кобозева[1], С.И. Татьков[2]

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия; [2] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

StY-геномная группа видов рода *Elymus* представляет особый интерес, поскольку большинство видов заходит на территорию России с южных приграничных территорий, преимущественно из Китая. Перекрывание ареалов *Elymus pendulinus*, *E. ciliaris* и *E. amurensis* в пределах России наблюдается только в южной части Дальнего Востока. В отечественной систематике считается, что *E. ciliaris* филогенетически близок к *E. pendulinus* и, вероятно, от гибридизации этих видов произошел самостоятельный вид *E. amurensis*. В Китае *E. amurensis* признается одной из разновидностей *E. ciliaris*. С целью выявления видовой специфичности проведено изучение полиморфизма белков эндосперма методом SDS-электрофореза у *E. pendulinus*, *E. ciliaris* и *E. amurensis* из ряда районов Приморского края. Образцы видов из мест общего произрастания анализировались с целью обнаружения общих полипептидных компонентов, которые могли бы появиться в результате генетической интрогрессии. Визуальный анализ электрофоретических спектров, а также построение дендрограмм с использованием различных мер сходства показали высокую степень видовой специфичности *E. ciliaris* и *E. pendulinus* и не выявили признаков интрогрессии, несмотря на то что два вида часто произрастают в общих экотопах и даже образуют стерильные гибриды. Не обнаружены также признаки происхождения *E. amurensis* от высокообособленных видов *E. ciliaris* и *E. pendulinus*. Показана необходимость привлечения методов биосистематики и экспериментальной генетики для подтверждения происхождения и таксономического ранга новых и ряда общепризнанных видов рода *Elymus*.

Ключевые слова: *Elymus pendulinus*, *Elymus ciliaris*, StY-геномные виды, белки эндосперма, SDS-электрофорез, интрогрессия.

Absence of genetic introgression between *Elymus ciliaris* and *E. pendulinus* (Triticeae: Poaceae) as shown by endosperm protein SDS-electrophoresis in connection with hypotheses of *E. amurensis* origin

A.V. Agafonov[1], E.V. Kobozeva[1], S.I. Tatkov[2]

[1] Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk, Russia; [2] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

The StY-genome group of *Elymus* species is of special interest, most of its species ranges extending to Russia from southern frontier territories, mainly from China. The ranges of *Elymus pendulinus*, *E. ciliaris* and *E. amurensis* within Russia overlap in the southern part of the Russian Far East only. *Elymus ciliaris* is considered by Russian taxonomists to be phylogenetically close to *E. pendulinus*, while hybridization of these species gave rise to the independent species *E. amurensis*. Moreover, in China, *E. amurensis* is recognized as a variety of *E. ciliaris*. Endosperm protein polymorphism was studied by SDS-electrophoresis for the purpose to reveal species specificity in *E. pendulinus*, *E. ciliaris*, and *E. amurensis* from a number of localities in the Primorskii Krai. Accessions of species from places of their joint occurrence were analyzed to detect identical polypeptide components which could have appeared due to genetic introgression. Nevertheless, both electrophoretic images visual analyses and construction the dendrograms of populations with various similarity coefficients revealed a high species specificity of *E. ciliaris* и *E. pendulinus* but no signs of introgression in spite of the fact that the two species often grow in common ecotopes and even form sterile hybrids. No indications of the origin of *E. amurensis* from the highly distinct species *E. ciliaris* and *E. pendulinus* were found either. The necessity of biosystematic and experimental methods for confirmation of the origin and

УДК 633.289:633.11:634.8:581.483
Поступила в редакцию 05.11.2014 г.
Принята к публикации 26.02.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: agalex@mail.ru; ekobozeva87@mail.ru

taxonomic rank of new and many recognized species in the genus *Elymus* is shown.

Key words: *Elymus pendulinus*, *Elymus ciliaris*, StY genome species, introgression, endosperm protein, SDS-electrophoresis.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Агафонов А.В., Кобозева Е.В., Татьков С.И. Отсутствие генетической интрогрессии между *Elymus ciliaris* и *E. pendulinus* (Triticeae: Poaceae) по результатам SDS-электрофореза белков эндосперма в связи с гипотезами происхождения *E. amurensis*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):97-103.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Agafonov A.V., Kobozeva E.V., Tatkov S.I. Absence of genetic introgression between *Elymus ciliaris* and *E. pendulinus* (Triticeae: Poaceae) as shown by endosperm protein SDS-electrophoresis in connection with hypotheses of *E. amurensis* origin. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):97-103.

Многочисленные виды рода пырейник (*Elymus* L.) характеризуются многолетним циклом развития и аллоплоидной геномной конституцией (Dewey, 1984; Love, 1984). Основной формой размножения является гамоспермия с преимущественным самоопылением (автогамия), явления агамоспермии отмечены только у некоторых гексаплоидных австралийских видов (Torabinejad, Mueller, 1993). Данный род широко распространен на всех материках, но центром происхождения считается Центральная Азия, где встречается не менее половины всех известных его видов (Lu, 1994; Salomon et al., 1997; Barkworth et al., 2007). StY-геномная группа видов представляет особый интерес, поскольку большинство их заходит в Россию с приграничных территорий Китая, где система классификации таксонов рода во многом не совпадает с российской (Chen, Zhu, 2006; Цвелев, 2008).

Ареал пырейника реснитчатого (*Elymus ciliaris* (Trin.) Tzvel.) охватывает территории Монголии, Японии, Китая, а также России, где этот вид распространен только на юге Дальнего Востока (Цвелев, 1976; Bothmer et al., 2005). Пырейник амурский (*E. amurensis* (Drob.) Czer.) также распространен на Дальнем Востоке, но как самостоятельный вид признается только российскими систематиками. Основная часть ареала пырейника повислого (*E. pendulinus* (Nevski) Tzvel.) находится в Китае (Bothmer et al., 2005). На территорию России этот вид заходит только северными фрагментами ареала: в Горный Алтай, Бурятию, Забайкалье и на Дальний Восток. Пырейник Гмелина (*E. gmelinii* (Ledeb.) Tzvel.) – самый широко распространенный вид StY-геномной группы, основной ареал которого расположен в южной части Сибири, а на Дальнем Востоке граница ареала достигает центральной части п-ва Камчатка (Пробатова, 1985; Bothmer et al., 2005). В пределах территории России перекрывание ареалов названных видов наблюдается только на Дальнем Востоке.

Н.Н. Цвелев и Н.С. Пробатова (Цвелев, Пробатова, 2010. С. 32) дали комментарий к описанию *E. amurensis*: «Возможно, происходит от гибридизации *Elymus ciliaris* × *E. pendulinus*». Однако ранее Н.С. Пробатовой в примечании к описанию вида *E. ciliaris* было указано: «Мы относим к этому виду также немногочисленные (возможно, гибридные) экземпляры с волосистыми сверху пласт. л. (обычно у *E. ciliaris* пласт. л. голые), уклоняющиеся в этом отношении к *E. amurensis*. *E. amurensis* нередко присоединялся в качестве подвида к *E. ciliaris*, но мы считаем, что последний вид близок к *E. pendulinus*, в то время как *E. amurensis*, вероятно, более близок к *E. gmelinii*» (Пробатова, 1985. С. 117). Таким образом, из данных предположений следует, что *E. ciliaris* близок к *E. pendulinus* и, вероятно, от гибридизации этих видов произошел *E. amurensis*, который, тем не менее, более близок к *E. gmelinii*, чем к *E. ciliaris*.

Приведенная противоречивая точка зрения на взаимоотношения названных видов рассматривается нами достаточно критически, поскольку не подтверждена какими-либо экспериментальными данными. В настоящее время точные сведения о взаимоотношениях между видами *E. ciliaris* – *E. pendulinus* и *E. amurensis* – *E. gmelinii* практически отсутствуют. Имеются лишь отдельные публикации о гибридизации выборочных локальных биотипов *E. ciliaris* и *E. pendulinus* с целью установления общей геномной конституции видов (Lu et al., 1990; Zhou et al., 1999). В последние годы большое количество работ по филогении рода было выполнено с применением методов молекулярной генетики, но полной ясности в вопрос взаимоотношений конкретных видов внутри StY-геномной группы они не внесли (Sun, Salomon, 2009; Mason-Gamer et al., 2010; Sun, Komatsuda, 2010).

Ранее нами были проведены комплексные исследования филогенетических и, как следствие, таксономических взаимоотношений между *E. ciliaris* и *E. amurensis* (Кобозева и др., 2011). На основании полученных результатов было предложено объединить эти два вида в качестве полиморфного *E. ciliaris* s. l., так как широкая изменчивость морфологических и биохимических признаков, включая диагностические, не дает возможности разграничивать данные виды на практике. Кроме того, изучалась возможность молекулярного ISSR (inter-simple sequence repeats) маркирования для выяснения взаимоотношений четырех вышеназванных видов (Агафонов и др., 2010). Было продемонстрировано, что *E. pendulinus*, *E. ciliaris* и *E. gmelinii* образовывали отдельные отчетливые кластеры на дендрограмме, построенной на основе 156 полученных ISSR-фрагментов. При этом образцы *E. amurensis* были расположены в общем кластере с *E. ciliaris*, что также подтверждает наше предположение о том, что *E. amurensis* является одним

из морфотипов *E. ciliaris*. Дальневосточные выборки *E. pendulinus* оказались незначительно, но, тем не менее, ближе к сибирским выборкам *E. gmelinii*, чем к дальневосточным биотипам *E. ciliaris*.

Таким образом, видовая самостоятельность *E. pendulinus*, *E. ciliaris* и *E. gmelinii* не вызывает сомнений даже с учетом внутривидового полиморфизма каждого из трех видов. Тем не менее из результатов нельзя заключить, что современная межвидовая интрогрессия и дальнейшее формообразование невозможны в смешанных популяциях с совместным произрастанием разных StY-геномных видов рода *Elymus*.

Детальный морфологический анализ дальневосточных образцов *E. ciliaris* и *E. pendulinus* показал наличие стабильных признаков, по которым возможно различить эти виды (Кобозева, Агафонов, 2011). Вместе с тем в местах общего произрастания нами неоднократно были найдены межвидовые гибриды с промежуточными признаками. Все такие растения были абсолютно стерильными. Три искусственных гибрида, полученных в лабораторных условиях, характеризовались промежуточными состояниями признаков и также обладали полной пыльцевой и семенной стерильностью. Однако морфологический анализ растений *E. ciliaris* и *E. pendulinus* не позволяет однозначно ответить на вопрос о возможности протекания интрогрессивных процессов, так как для обоих видов характерна изменчивость по гомологичным рядам признаков – степень опушения листовых пластинок, наличие трихом и ресничек на нижних и верхних цветковых чешуях.

Поскольку результаты выборочной гибридизации не могут быть однозначным доказательством отсутствия интрогрессии, необходимы дополнительные сведения об уровнях видовой обособленности.

Запасные белки эндосперма представляют собой полиморфную систему генетических маркеров, несущих информацию о видовой специфичности, гетерогенности популяций, преимущественных формах размножения и о явлениях межвидовой интрогрессии. Основную массу белков эндосперма у злаков трибы Triticeae составляют проламины (спирторастворимые белки) и глютелины (белки, извлекаемые слабыми растворами щелочей). Функционально активные белки (ферменты, ингибиторы и т. д.) относятся, как правило, к легкорастворимым фракциям водорастворимых альбуминов и солерастворимых глобулинов и представлены в зерновках в относительно меньших количествах (Конарев, 1983; Созинов, 1985). Электрофоретический анализ полипептидных спектров белков проламин-глютелинового комплекса много лет используется нами для изучения природных и экспериментальных популяций видов рода *Elymus* (Агафонов, Агафонова, 1992; Agafonov, Baum, 1998; Агафонов, Баум, 2000; Gerus, Agafonov, 2005 ; Агафонов, Герус, 2008; Герус, Агафонов, 2011). В основе метода лежит получение изолированного эндосперма из индивидуальных зерновок без примесей оболочки и зародыша (Агафонов, Агафонова, 1989). Эффективность этого метода обеспечивается не только высокой разрешающей способностью, но и доступностью анализируемого материала, так как белки зерновки сохраняют электрофоретические свойства длительный срок после потери всхожести семян.

Цель данной работы – провести анализ полиморфизма и специфичности электрофоретических спектров запасных белков эндосперма у *E. ciliaris* и *E. pendulinus* и на основе полученных данных оценить вероятность протекания межвидовой интрогрессии данных видов в связи с гипотезами происхождения *E. amurensis*.

Материалы и методы

Анализировались природные образцы видов из коллекции, собранной сотрудниками ЦСБС СО РАН. Данные о происхождении образцов *E. ciliaris* и *E. pendulinus* приведены в Дополнительных материалах 1 и 2[1]. Всего было исследовано 42 образца *E. ciliaris* и 39 образцов *E. pendulinus* из разных популяций Приморского края. Используемая номенклатура образцов была предложена нами и образована 3 латинскими буквами и 4 цифрами, две первые из которых обозначают год сбора, а две другие – порядковый номер образца локальной коллекции. В связи с существенным числом образцов из смешанных популяций для них приведены только первые две цифры кода (Доп. материалы 2).

Выделение запасных белков эндосперма и электрофорез в SDS-системе проводили по методу Laemmli (1970) с модификациями (Агафонов, Агафонова, 1992). В качестве стандарта использовали зерновки образца *E. sibiricus* L. ALT-8401, у которого полипептидные компоненты электрофоретического спектра ранее были откалиброваны по стандартным маркерам молекулярных масс. Для более точной идентификации каждого компонента строились шкалы относительной электрофоретической подвижности (ОЭП). Изучение полипептидного состава спектров проводили в двух электрофоретических вариантах, –Me и +Me, как предложено ранее (Kostina et al., 1998). В варианте –Me выявляются мономерные белки, преимущественно проламины. Вариант +Me обеспечивает разделение смеси проламинов и субъединиц глютелина, диссоциированных после обработки экстрактов 2-меркаптоэтанолом. Поскольку у самоопыляющихся видов рода *Elymus* зерновки с одной особи с большой вероятностью идентичны по спектрам запасных белков, то для общей характеристики конкретного растения достаточно одной зерновки (Герус, Агафонов, 2006; Агафонов и др., 2008). Поэтому в данной работе в сравнительные опыты было взято по одной зерновке с растения. Выделение индивидуальных белковых спектров (профилей) образцов

[1] Дополнительные материалы см. в Приложении 2 по адресу: http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2015-04/appx2.pdf

из электрофореграммы, построение матрицы сходства и кластеризация индивидуальных образцов двух видов из мест общего произрастания были выполнены с использованием программы BioNumerics (Applied Maths, Бельгия). Матрицу рассчитывали с использованием различных мер сходства: коэффициентов Жаккара (Jaccard), Дайса (Dice), Охаи (Ochiai) и «different bands» (The BioNumerics manual, 2004).

По всем рассчитанным матрицам были построены дендрограммы методом невзвешенного парно-группового кластерного анализа с арифметическим усреднением UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Поскольку они несколько различались, по ним было построено консенсусное дерево, на котором совпадающие кластеры выделены жирными линиями, а несовпадающие обозначены пунктиром. Достоверность структуры ветвления определялась бутстрепом.

Результаты и обсуждение

Было проведено изучение электрофоретических свойств белков эндосперма *E. ciliaris* (варианты –Me и +Me) (Доп. материалы 3). Результаты подтвердили ранее полученные данные о том, что у видов рода *Elymus* вариант +Me является более информативным, так как помимо мономерных белков на спектрах присутствовали компоненты, соответствующие субъединицам полимерных белков – глютелинов и агрегированных проламинов. Опыт показал сходство всех образцов вида, включая северокорейский, в общем распределении полипептидов по ОЭП. В варианте –Me проявились 4 отчетливо выраженные зоны. Самые мелкие, но ярко выраженные (интенсивные) полипептиды 28–37 кДа (55–80 ед. ОЭП) по электрофоретическим свойствам близки к таковым у других видов рода *Elymus* (Агафонов, Агафонова, 1992; Герус, Агафонов, 2006), но в зоне около 40 кДа (50–55 ед. ОЭП) присутствовала специфическая группа компонентов. Наиболее полиморфная группа полипептидов была расположена в зоне 40–50 кДа (37–47 ед. ОЭП), а наименее вариабельная группа из 2–3 полипептидов – в зоне около 55 кДа (25–30 ед. ОЭП).

При переходе к варианту +Me у изучаемых образцов так же, как и у изученных ранее представителей *Elymus*, происходили изменение величин ОЭП большинства компонентов и появление новых субъединиц глютелина (Agafonov, Baum, 1998; Kostina et al., 1998). Белковые группы 50–55 ед. и 37–47 ед. ОЭП сливались в одну группу с высокой степенью изменчивости. Пара наибольших по массе глютелиновых субъединиц (22–23 ед. ОЭП) присутствовала у всех приморских образцов (у MES-8745 и VOK-8631 – с небольшими отклонениями по ОЭП), но отсутствовала у северокорейского COR-8992 с замещением парой 24–25 ед. Наиболее консервативный полипептид около 29 ед. ОЭП был также отнесен нами к субъединицам глютелина или агрегированного проламина. Результаты изучения других образцов *E. ciliaris* показали наличие внутривидового сходства в общем группировании компонентов по зонам ОЭП, но отсутствие постоянных видоспецифичных полипептидов.

Сравнительный анализ запасных белков семян *E. ciliaris* s.l. и *E. pendulinus* в варианте –Me показал следующие закономерности (Доп. материалы 4). Во-первых, визуально белковые профили двух видов заметно отличаются в распределении компонентов по зонам ОЭП, в частности характерная для *E. ciliaris* группа компонентов 50–55 ед. ОЭП у *E. pendulinus* отсутствует. Анализ образцов MES-8613 и MES-8640 (дорожки 17 и 18, блок B), соответствующих виду *E. amurensis*, показал совпадение по компонентам спектра с другими образцами *E. ciliaris* в зонах ОЭП 22–24 ед., 52–55 ед. и 73–86 ед. ОЭП. Этот факт полностью согласуется с выводом об их видовом единстве (Кобозева и др., 2011).

Во-вторых, выявлено, что *E. pendulinus* более изменчив, чем *E. ciliaris* s. l., по участкам спектров 20–35 и 60–85 ед. ОЭП, даже при исключении из анализа географически отдаленных образцов GAL-8942 и HAB-8902 (A-1 и A-2). Так, у *E. ciliaris* обнаружено только 4 высокомолекулярных компонента 20–35 ед. ОЭП, а у *E. pendulinus* их не менее 10.

Анализировались выборки семян разных образцов двух видов из мест общего произрастания (Доп. материалы 5). Визуально на спектрах не выявлено отчетливых общих полипептидов, указывающих на наличие интрогрессивных процессов. Напротив, проявилась видовая специфичность компонентного состава белковых профилей, демонстрирующая обособленность *E. ciliaris* и *E. pendulinus* при использовании данного критерия.

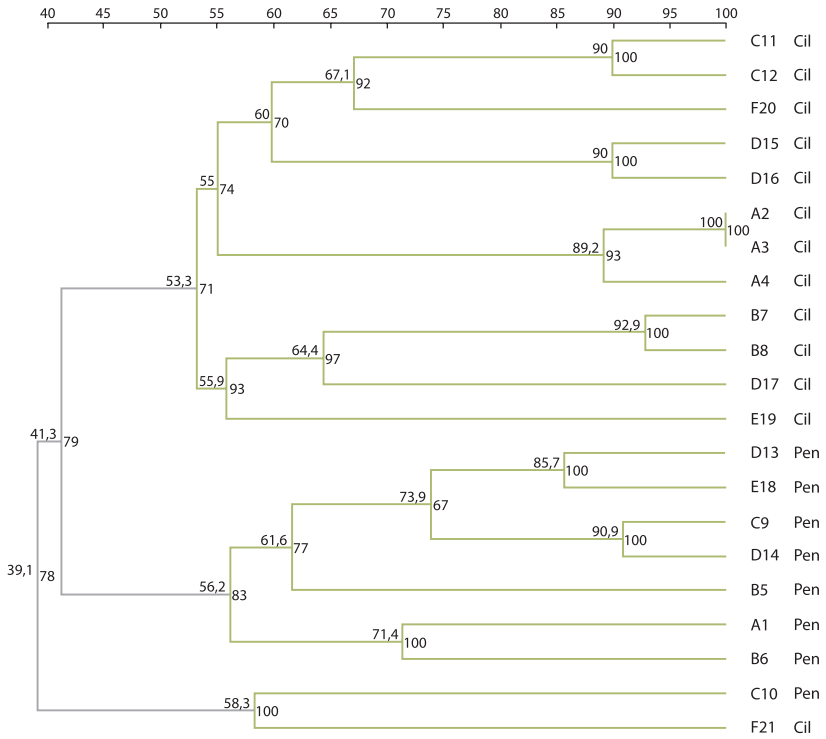
Электрофореграмма (Доп. материалы 5) была дополнительно проанализирована с помощью программы BioNumerics. С использованием различных мер сходства построена консенсусная дендрограмма (Доп. материалы 6) и проведен бутстреп-анализ достоверности кластеров (рисунок). При сравнении двух дендрограмм очевидно, что кластеры [(D13*, E18*) (C9*, D14*)], (A1*, B6*), [(C11, C12) F20], [(A2, A3), A4], (D15, D16), (B7, B8) выявляются лишь при использовании различных мер сходства и имеют значения бутстрепа около 100 %, что указывает на их высокую достоверность. Кластеры [(D13*, E18*) (C9*, D14*)] (A1*, B6*) представляют образцы *E. pendulinus*, остальные – *E. ciliaris*. Отдаленность образца *E. pendulinus* C10 (RUS-0733) от остальных образцов вида, вероятнее всего, связана с искривлением данного электрофоретического трека и ошибкой программы считывания.

Проведенный дополнительный опыт показал сходство RUS-0732 с другими образцами из популяции RUS-07. Отдаленность F21 (SLA-0709) от других образцов *E. ciliaris* подтверждается существенным отличием в белковых профилях (Доп. материалы 6). На дендрограмме (рисунок) образцы C10* и F21 объединены в один кластер с высоким значением бутстрепа (100 %),

однако сходство их между собой очень низкое (58,3 %), что указывает на формальный характер объединения. Данное предположение подтверждается и консенсусной дендрограммой (Доп. материалы 6), на которой они не составляют кластер. Местоположение критических образцов *E. pendulinus* RUS-0732 и *E. ciliaris* SLA-0709 установлено также недостаточно достоверно.

Таким образом, образцы двух видов разделились по разным кладам, что в целом подтверждает наше исходное предположение о наличии видовой специфичности белковых спектров семян *E. pendulinus* и *E. ciliaris*. Обнаружение двух образцов, C10* (*E. pendulinus*) и F21 (*E. ciliaris*), отличающихся по белковым профилям от других представителей видов, возможно, указывает на более широкую изменчивость белковых спектров для представителей обоих видов и нуждается в дополнительном исследовании.

Согласно полученным комплексным данным, последствия межвидовой интрогрессии между *E. ciliaris* и *E. pendulinus* в природных популяциях нами не обнаружены, несмотря на то что два вида часто произрастают в общих экотопах в непосредственной близости друг от друга. Тем не менее это не означает, что процессы интрогрессии не могут протекать в других точках ареала. Но результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что вероятность такого явления достаточно мала. Возможно, такого рода процессы могут протекать с исключительно низкой частотой или совершенно «запрещены» в природных условиях по причине эволюционно дивергировавших геномов данных видов. Что касается происхождения *E. amurensis*, то этот таксон, вероятнее всего, представляет собой совокупность морфотипов *E. ciliaris* s. l. (Кобозева и др., 2011), которая не обладает качествами самостоятельного вида. В настоящее время нет никаких оснований предполагать происхождение *E. amurensis* от



Дендрограмма популяций *E. ciliaris* (Cil) и *E. pendulinus* (Pen), рассчитанная с бутстреп-анализом достоверности кластеров.

Цифрами слева от узлов обозначена мера сходства образцов (%), справа – значения бутстрепа (%). Нумерация образцов проведена в соответствии с Доп. материалами 5.

гибридизации обособленных видов *E. ciliaris* и *E. pendulinus*. Вместе с тем в экспедиционный сезон 2012 г. в Приморском крае нами обнаружена обширная популяция особей, не соответствующих характеристикам *E. ciliaris* или *E. amurensis*. Означает ли это, что обнаружен новый вид рода *Elymus* или одна из морфологически отклоняющихся форм базового вида *E. ciliaris* – должно показать дополнительное подробное изучение живого материала.

Проблема межвидовой интрогрессии тесно связана с периодическими публикациями о нахождении «новых для науки видов» рода *Elymus* (Котухов, 1992; Цвелев, 2008). Однако в большинстве случаев такие «новые виды» представляют собой единичные стерильные межвидовые гибриды (в случаях филогенетически отдаленных видов), интрогрессивные или рекомбинантные формы (при относительной филогенетической близости родительских видов или биотипов) либо выборочные морфологически отклоняющиеся формы исходного вида (Герус, Агафонов, 2006; Агафонов, 2011; Кобозева и др., 2011, 2012). Можно утверждать, что среди видов рода *Elymus*, описанных за последние 20 лет с территории России, нет ни одного, видовая самостоятельность которого была доказана авторами новых видов биосистематическими или генетическими методами с учетом особенностей репродукции. Этот тезис касается не только видов с территории России, но также с прилегающих территорий Казахстана и Китая. Именно поэтому мы считаем совершенно необходимым привлечение методов биосистематики и экспериментальной генетики для подтверждения происхождения и таксономической обособленности новых и ряда общепризнанных видов рода.

Благодарности

Авторы выражают благодарность д.б.н. О.В. Дорогиной и к.б.н. Д.Е. Никоновой за помощь в проведении исследований. Работа выполнена при

финансовой поддержке РФФИ, проекты № 08-04-00747, № 11-04-00861.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Агафонов А.В. Общая структура рекомбинационного генпула *Elymus caninus* (Triticeae: Poaceae) по данным скрещиваемости и оценки наследования некоторых морфологических признаков, используемых в таксономии. Растительный мир Азиатской России (Вестник Центрального сибирского ботанического сада СО РАН). 2011;2(8):61-70.

Агафонов А.В., Агафонова О.В. SDS-электрофорез белков эндосперма у представителей рода пырейник (*Elymus* L.) с различной геномной структурой. Сиб. биол. журнал. 1992;3: 7-12.

Агафонов А.В., Агафонова О.В. Способ идентификации генотипов многолетних злаков трибы Пшеницевые (Triticeae): А.с. СССР № 1546022. 1989.

Агафонов А.В., Баум Б.Р. Индивидуальная изменчивость и репродуктивные свойства половых гибридов внутри комплекса *Elymus trachycaulus* (Poaceae: Triticeae) и близких таксонов. 1. Полиморфизм запасных белков эндосперма у биотипов Северной Америки и Евразии. Turczaninowia. 2000;3(1):63-75.

Агафонов А.В., Герус Д.Е. Исследование полиморфного комплекса *Elymus charkeviczii* Probat. s.l. (Triticeae: Poaceae) полуострова Камчатка с позиций биосистематики и таксономической генетики. Растительный мир Азиатской России (Вестник Центрального сибирского ботанического сада СО РАН). 2008;1:58-70.

Агафонов А.В., Герус Д.Е., Дорогина О.В. Самоопыление видов рода *Elymus* (Triticeae: Poaceae) и его отражение на полипептидных спектрах белков эндосперма. Сиб. ботан. вестник: электронный журнал. 2008;3(1/2):21-26. http://journal.csbg.ru.

Агафонов А.В., Герус Д.Е., Кобозева Е.В. Дифференциация StY-геномных видов рода *Elymus* (Poaceae) в Азиатской России по данным морфологии, изменчивости запасных белков эндосперма, гистона H1 и ДНК маркеров. Матер. IV Междунар. конф. «Проблемы изучения растительного покрова Сибири» (1–3 ноября 2010 г., Томск). Томск: Изд-во Томск. ун-та, 2010.

Герус Д.Е., Агафонов А.В. Генетическое разнообразие в природных популяциях *Elymus fibrosus* (Triticeae: Poaceae) по запасным белкам эндосперма. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011;15(3):531-539.

Герус Д.Е., Агафонов А.В. Моделирование интрогрессивных процессов между *Elymus fibrosus* и *E. caninus* (Poaceae) и их регистрация с помощью одномерного SDS-электрофореза. Генетика. 2006;42(12):1405-1413.

Кобозева Е.В., Агафонов А.В. Существует ли вероятность интрогрессивных процессов между StY геномными видами *Elymus ciliaris* и *E. pendulinus* (Poaceae) в природных популяциях? Матер. Всерос. конф. «Проблемы сохранения растительного мира Северной Азии и его генофонда». Новосибирск: Изд-во «Сибтехнорезерв», 2011:88-91.

Кобозева Е.В., Герус Д.Е., Овчинникова С.В., Агафонов А.В. Таксономические взаимоотношения между StY геномными видами *Elymus ciliaris* и *E. amurensis* (Poaceae). Turczaninowia. 2011;14(3):35-44.

Кобозева Е.В., Овчинникова С.В., Агафонов А.В. Изменчивость и таксономические взаимоотношения между StY-геномными видами *Elymus pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* (Triticeae: Poaceae). Растительный мир Азиатской России (Вестник Центрального сибирского ботанического сада СО РАН). 2012;2(10):87-93.

Конарев В.Г. Белки растений как генетические маркеры. М.: Колос, 1983.

Котухов Ю.А. Новые виды рода *Elymus* (Poaceae) из Восточного Казахстана. Ботан. журнал. 1992;77(6):89-93.

Пробатова Н.С. Мятликовые, или Злаки – Poaceae Barnh. (Gramineae Juss.). Сосудистые растения Советского Дальнего Востока. Л.: Наука, 1985;1:89-382.

Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М.: Наука, 1985.

Цвелев Н.Н. Злаки СССР. Л.: Наука, 1976.

Цвелев Н.Н. О роде *Elymus* L. (Poaceae) в России. Ботан. журнал. 2008;93(10):1587-1596.

Цвелев Н.Н., Пробатова Н.С. Роды *Elymus* L., *Elytrigia* Desv., *Agropyron* Gaertn., *Psathyrostachys* Nevski и *Leymus* Hochst. (Poaceae: Triticeae) во флоре России. Комаровские чтения. Владивосток: Дальнаука, 2010;57:5-102.

Agafonov A.V., Baum B. Variation of endosperm proteins in the complex of Elymus trachycaulus (Link) Gould ex Shinners / Triticeae III (Ed. Jaradat A.A.), Enfield, New Hampshire, Science Publ., 1998:273-282.

Barkworth M.E., Campbell J.J.N., Salomon B. Elymus L. Flora of North America (Eds K.E. Barkworth, K.M. Capels, S. Long, L.K. Anderton, M.B. Piep). V. 24. N.Y.: Oxford: Oxford Univ. Press, 2007:288-343.

Bothmer R. von, Salomon B., Enomoto T., Watanabe O. Distribution, habitat and status for perrennial Triticeae species in Japan. Bot. Jahrb. Syst. 2005;126:317-346. DOI: 10.1127/0006-8152/2005/0126-0317

Chen S.L., Zhu G.H. Elymus L. Flora of China (Poaceae), 2006. Beijing, St. Louis. 22:400-429. DOI: 10.1093/aob/mcm014

Dewey D.R. The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae. Gene manipulation in plant improvement (Ed. J.P. Gustafson). N.Y.: Plenum Publ. Corp., 1984:209-279.

Gerus D.E., Agafonov A.V. Introgression between Elymus caninus and E. fibrosus as revealed by morphology and one-dimensional SDS-electrophoresis. Czech J. Genet. Plant Breed. 2005;41:74-78.

Kostina E.V., Agafonov A.V., Salomon B. Electrophoretic properties and variability of endosperm proteins of Elymus caninus (L.) L. Triticeae III (Ed. A.A. Jaradat). Enfield, New Hampshire: Sci. Publ., 1998:265-272.

Love A. Conspectus of the Triticeae. Feddes Repert.1984; 5:425-521.

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680-685. DOI: 10.1038/227680a0

Lu B.-R. The genus Elymus in Asia. Taxonomy and biosystematics with special reference to genomic relationships. Proc. 2nd Int. Triticeae Symp. (Eds R.R.-C. Wang, K.B. Jensen, C. Jaussi). Logan, Utah, 1994:219-233.

Lu B.-R., Yan J., Yang J., Flink J. Biosystematic studies among Roegneria pendulina Roegneria ciliaris and Roegneria kamoji of the tribe Triticeae Gramineae. Acta Botanica Yunnanica. 1990;12(2):161-171.

Mason-Gamer R.J., Burns M. M., Naum M. Phylogenetic relationships and reticulation among Asian Elymus (Poaceae) allotetraploids: analyses of three nuclear gene trees. Mol. Phylogen. Evol. 2010;54:10-22. DOI: 10.1016/j.ympev.2009.10.002

Salomon B., Bothmer R. von, Seberg O. A proposal for an Elymus core collection. Plant Genet. Res. Newsletter. 1997;111:77-81.

Sun G., Komatsuda T. Origin of the Y genome in Elymus and its relationship to other genomes in Triticeae based on evidence from

elongation factor G (EF-G) gene sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 2010;56:727-733. DOI:10.1016/j.ympev.2010.03.037

Sun G., Salomon B. Molecular evolution and origin of tetraploid Elymus species. Breeding Sci. 2009;59:487-491. DOI: 10.1270/jsbbs.59.487

The BioNumerics manual (2004) Applied Maths BVBA. www.appliedmaths.com.

Torabinejad J., Mueller R.J. Genome constitution of the Australian hexaploid grass, Elymus scabrus (Poaceae: Triticeae). Genome. 1993;36:147-151.

Zhou Y.-H., Yen C., Yang J.-L., Zheng Y.-L. Biosystematic study of Roegneria tenuispica, R. ciliaris and R. pendulina (Poaceae: Triticeae). Plant Syst. Evol. 1999;217:215-220.

Использование генофонда яблони: источники и доноры хозяйственно полезных признаков

Е.Н. Седов

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур Россельхозакадемии, Орловская область, д. Жилина, Россия

В статье рассмотрены значение и степень использования генетических коллекций в деле создания новых адаптивных, отвечающих современным требованиям, сортов яблони. Показано, что в селекционных учреждениях, в том числе и во ВНИИСПК, еще в недостаточной степени используется генетическое разнообразие имеющихся коллекций. Установлено, что ценными исходными формами в селекции яблони в России и мире являются сорта Мекинтош, Джонатан, Уэлси, Голден Делишес, Мелба, Антоновка обыкновенная, Ранетка пурпуровая, Папировка. Опыт селекции яблони во ВНИИСПК показал, что, несмотря на наличие большой генетической коллекции, при выведении около 50 сортов было задействовано в качестве исходных родительских форм только 48 сортов, что составляет менее 7 % от имеющегося в учреждении генофонда в более чем 700 сортов. Наиболее ценными исходными сортами оказались Мекинтош (с его помощью получено 12 новых сортов), иммунный к парше Сеянец 814 (9 сортов), Антоновка обыкновенная (7 сортов), Папировка тетраплоидная (11 сортов), Сеянец SR 0523 (7 сортов), Антоновка краснобочка (8 сортов), Редфри (9 сортов), Уэлси (8 сортов), Бессемянка мичуринская (4 сорта) и Пепин шафранный (4 сорта). В работе приводятся источники и доноры для селекции яблони на колонновидность, зимостойкость, скороплодность и высокую продуктивность, длительную лежкость плодов, высокую устойчивость и иммунитет к парше, а также доноры диплоидных гамет для селекции триплоидных сортов, источники и доноры высокого содержания в плодах сахаров, титруемых кислот, биологически активных веществ (аскорбиновой кислоты и Р-активных веществ).

Ключевые слова: яблоня, сорта, селекция, источники, доноры, колонновидность, иммунитет к парше, полиплоидия, биохимический состав плодов.

Apple gene pool use, sources and donors of economically valuable traits

E.N. Sedov

SSI All Russia Research Institute of Fruit Crop Breeding of RAAS, Orel district, vil. Zhilina, Russia

The significance of an apple genetic collection and its use in the development of new adaptive apple cultivars meeting up-to-date requirements are investigated. Nevertheless, the genetic diversity of existing collections is shown to be still insufficiently used in breeding institutions. McIntosh, Jonathan, Wealthy, Golden Delicious, Melba, Antonovka Obyknovennaya, Ranetka Purpurovaya, and Papirovka are valuable parental varieties in apple breeding, used in Russia and worldwide. In spite of the availability of a large genetic collection, only 48 cultivars were used as initial parental forms when developing about 50 apple varieties (according to the All-Russia Research Institute of Fruit Crop Breeding). That makes up less than 7% of the gene pool of over 700 cultivars kept at the Institute. Among 10 most valuable sources of new varieties are McIntosh (12), scab immune Seyanetz 814 (9), Antonovka Obyknovennaya (7), Papirovka Tetraploid (11), etc. We recommend sources and donors for apple breeding for commercially valuable traits (winter hardiness, columnar tree type, precocity and high productivity, long fruit storability, high resistance and immunity to scab), as well as donors of diploid gametes for triploid cultivar breeding, sources and donors of high contents of sugars, titrated acids and biologically active substances (ascorbic acid and P-active substances) in fruits. The necessity of selection and breeding of complex sources and donors possessing two and more valuable traits (immunity to scab and tetraploidy, immunity to scab and the columnar tree type, etc.) is discussed.

Key words: apple, cultivars, breeding, sources, donors, columnar tree type, scab immunity, polyploidy, biochemical composition of fruits.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Седов Е.Н. Использование генофонда яблони: источники и доноры хозяйственно полезных признаков. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):104-110.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Sedov E.N. Apple gene pool use, sources and donors of economically valuable traits. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):104-110.

УДК 634.11:631.52
Поступила в редакцию 12.12.2014 г.
Принята к публикации 28.01.2015 г.
© АВТОР, 2015

Всероссийский НИИ селекции плодовых культур является старейшим помологическим учреждением России и в апреле 2015 г. отметит свое 170-летие. На протяжении всего периода деятельности учреждения пополнение и поддержание генофонда плодовых растений и его изучение являлись первостепенной задачей (Генофонд ..., 2012, 2013). В настоящее время ВНИИСПК располагает более 700 сортообразцов яблони. Изучение генофонда позволило выделить сорта и формы с максимальным проявлением ряда хозяйственно ценных признаков, а также дать селекционную оценку сортообразцов при использовании их в качестве исходных форм (Генофонд …, 2013). Установлено, что только 140 сортообразцов из генофонда яблони ВНИИСПК использовались в селекции в качестве исходных форм как в России, так и за рубежом, и являются родоначальниками новых сортов (Седов, 2009). Ценными исходными формами (по выходу от них новых сортов) оказались: Мекинтош, Джонатан, Уэлси, Голден Делишес, Антоновка обыкновенная, Мелба, Ранетка пурпуровая, Папировка (Седов, 2009). Более 70 новых сортов в России и за рубежом получено с участием в качестве родительской формы сорта Мекинтош и Антоновки обыкновенной, более 60 – с участием сорта Джонатан и более чем по 30 – с участием сортов Боровинка, Папировка, Голден Делишес.

Представляет интерес анализ степени использования генетической коллекции во ВНИИСПК в течение 60 лет. При создании во ВНИИСПК 77 новых сортов использовали 48 исходных форм. Наиболее ценными по выходу новых сортов оказались следующие исходные родительские формы. С участием в качестве исходной формы сорта Мекинтош создано 12 новых сортов, в том числе районированные сорта Желанное (Мекинтош – свободное опыление), Орловское полосатое и Орлик (Мекинтош × Бессемянка мичуринская). 11 новых сортов получено с участием Папировки тетраплоидной. Это сорта Августа (Орлик × Папировка тетраплоидная), Масловское, Спасское и Яблочный Спас (Редфри × Папировка тетраплоидная), Осиповское (Мантет × Папировка тетраплоидная) и др. С участием иммунного к парше (ген V_f) Сеянца 814 (F_2 *M. floribunda* 821 × Голден Делишес) получено 9 новых сортов, в том числе Солнышко, Веньяминовское, Строевское, Юбилей Москвы, Юбиляр – все одного происхождения (Сеянец 814 – свободное опыление). С участием в качестве родительской формы Редфри получено также 9 новых сортов, в том числе Жилинское и Спасское (Редфри × Папировка тетраплоидная). С участием Антоновки краснобочки получено 8 сортов, в том числе Свежесть (Антоновка краснобочка × PR12T67), Орловский пионер и Память Исаева (Антоновка краснобочка × SR 0523); 8 – с участием Уэлси тетраплоидного, в том числе Министр Киселев (Чистотел × Уэлси тетраплоидный), Александр Бойко (Прима × Уэлси тетраплоидный). С участием в качестве исходной формы Антоновки обыкновенной получено 7 сортов, в том числе Имрус (Антоновка обыкновенная × OR18T13), Здоровье (Антоновка обыкновенная × OR48T47) и Память воину (Уэлси × Антоновка обыкновенная); 7 сортов получено с участием Сеянца SR 0523 (донор гена V_m), в том числе Орловим (Антоновка обыкновенная × SR 0523), а также Орловский пионер, Память Исаева, Славянин – все они одного происхождения (Антоновка краснобочка × SR 0523). При использовании в качестве исходных форм таких сортов, как Бессемянка мичуринская, Голден Делишес и Пепин шафранный по получено 4 сорта. Остальные из 48 исходных форм дали от 1 до 3 новых сортов.

Большой и разнообразный генофонд, созданный и изученный во ВНИИСПК, позволил вести селекцию яблони по ряду направлений: на полевую и олигогенную устойчивость (иммунитет) к парше; на полиплоидном уровне; на улучшение биохимического состава плодов; на получение колонновидных сортов. В то же время следует отметить недостаточное использование генофонда яблони. Из более 700 сортообразцов яблони коллекции ВНИИСПК в создании новых сортов в России и в мире принимали участие 140 сортов (≈ 20 %), а в ВНИИСПК в селекционный процесс вовлечено только 48 сортов (менее 7 %). Расширение генетической коллекции и более интенсивное ее использование могут повысить эффективность селекции сортов, отвечающих требованиям производства.

Для эффективной целенаправленной селекции яблони большое значение имеет правильный подбор исходных родительских пар. В зависимости от задач и целей селекционеру необходимо подобрать источники и доноры тех признаков, которые он намерен видеть у создаваемого сорта. Ниже приводятся источники и доноры по основным хозяйственным признакам на основе опыта селекции яблони во ВНИИСПК. В табл. 1 указаны источники таких хозяйственно ценных признаков, как колонновидность, зимостойкость, скороплодность, продуктивность и лежкость плодов.

В результате многолетней целенаправленной работы (1977–2014 гг.) междисциплинарным коллективом ВНИИСПК создан, изучен и включен в Госреестр селекционных достижений, допущенных к использованию, 21 иммунный сорт при использовании доноров иммунитета (с геном V_f) (табл. 2). На первых этапах работы в качестве доноров привлекали зарубежные источники иммунитета из коллекции института: Сеянец 814 (F_2 *M. floribunda* 821 × Голден Делишес), Сеянец PR12T67 (Уэлси × F_2 *M. floribunda* 821), Сеянец 1924 [F_2 *M. floribunda* 821 × Уэлси) × (F_2 *M. floribunda* 821 × Джонатан)], Сеянец OR18T13 [Вольф Ривер × (Вольф Ривер × *M. atrosanguinea* 804/240-57)] и сорта Прима, Прайм, Макфри и другие, обладающие геном V_f. По мере создания более зимостойких форм, полученных от этих сеянцев и сортов, в качестве исходных форм стали использовать последние.

Таблица 1. Доноры и источники при селекции на колонновидность, зимостойкость, скороплодность, продуктивность и лежкость плодов

Признак	Доноры и источники	Литературный источник
Колонновидность (с геном *Co*)	Мекинтош – Важак, Восторг, Васюган, Валюта, Гирлянда, Диалог, Есения, Зеленый шум, Золотой початок, Лукомор, Малюха, Московское ожерелье, Останкино, Поэзия, Президент, Приокское, Сенатор, Созвездие, Триумф, Червонец, Янтарное ожерелье	Кичина, 2002; Седов, Серова, 2009; Савельев, Савельева, 2012; Качалкин, 2013; Седов и др., 2013
Зимостойкость	Анис алый, Анис полосатый, Антоновка краснобочка, Антоновка обыкновенная, Багрянка новая, Грушовка московская, Заря (Свердловск), Китайка сенинская, Коричное ананасное, Коричное полосатое, Коробовка, Красное летнее, Медок, Поповка, Скрыжапель, Солнцедар, Уральское масляное, Шаропай	Каталог …, 1981; Седов, 2011
Скороплодность	Анис алый, Анис полосатый, Апорт, Бельфлер-китайка, Бессемянка мичуринская, Богатырь, Болотовское, Боровинка, Вагнер, Ветеран, Голден Грайма, Голден Делишес, Гринсливз, Грушовка московская, Жигулевское, Июльское Черненко, Кандиль орловский, Куликовское, Мантет, Меканис, Мекинтош, Мелба, Олимпийское, Орлик, Орловская гирлянда, Папировка, Пепин шафранный, Прима, Салгирское, Скрыжапель, Уэлси	Седов, 2011
Высокая продуктивность	Анис алый, Анис серый, Антоновка краснобочка, Антоновка обыкновенная, Афродита, Бельфлер-китайка, Бессемянка мичуринская, Богатырь, Болотовское, Голден Делишес, Грушовка московская, Делишес, Жигулевское, Золотая осень, Коричная китайка, Куликовское, Мелба, Мечта, Минское, Орловское полосатое, Папировка, Пепин шафранный, Пепинка литовская, Свежесть, Северный синап, Синап орловский, Слава переможцам, Спартан, Уэлси, Шафран саратовский Колонновидные сорта: Валюта, Диалог, Останкино, Таскан, Телеймон	Шидаков, 1991; Седов, 2011, 2014
Длительная лежкость плодов	Абхазское железное яблоко, Аврора, Айдаред, Бабушкино, Бен Девис, Белорусский синап, Блек Стейман, Борсдорф-китайка, Вайне, Васильковское, Волжское зимнее, Голден Делишес, Зеленка зимняя, Зимнее нарядное, Золотое Грайма, Кинг Девид, Корей, Корнет, Кортланд, Краснокутское, Крендал, Кретешти, Кутузовец, Майское, Мекинтош, Несравненное, Новогоднее красное, Обильное, Онтарио, Опалесцент, Память Мичурина, Пепин Рибстона, Пепин шафранный, Подарок Москве, Подарок юбилею, Помгриз, Помон-китайка, Ренет бергамотный, Ренет днепровский, Ренет курский золотой, Ренет Черненко, Рояль Ред Делишес, Свежесть, Северный синап, Синап орловский, Скарлет Стейман Ред, Спартан, Старк, Старкримсон, Трудовое, Уинстон, Уэлси, Фарсайд, Феймез	Седов, 1973, 2011; Седов и др., 1981; Малыченко, Баландина, 1986

За период 1977–2014 гг. по данному разделу селекции ВНИИСПК проведена гибридизация в объеме 2,36 млн цветков, выращено 465 тыс. однолетних сеянцев, перенесено в селекционный сад (после многократных браковок) 59,8 тыс. сеянцев.

Донорами диплоидных гамет являлись: Альфа-68 (4*x*), Антоновка плоская (2-4-4-4*x*), Джаент Спай (2-4-4-4*x*), Мекинтош тетраплоидный (4*x*), Мелба тетраплоидная (4*x*), Папировка тетраплоидная (2-4-4-4*x*), Спартан тетраплоидный (4*x*), Уэлси тетраплоидный (2-4-4-4*x*), 13-6-106 (Суворовец – свободное опыление) (4*x*), 30-47-88 [Либерти × 13-6-106 (Сеянец Суворовца) (4*x*)].

Нами установлена высокая эффективность использования доноров диплоидных гамет. С их участием получено 17 триплоидных адаптивных продуктивных сортов, из которых 9 включено в Госреестр (районировано). Особенно ценным донором диплоидных гамет при создании сортов с летним созреванием плодов оказалась Папировка тетраплоидная. С ее участием создано 7 сортов, из которых 5 включено в Госреестр (районировано): Августа (Орлик × Папировка тетраплоидная), Дарена (Мелба × Папировка тетраплоидная), Масловское (Редфри × Папировка тетраплоидная), Осиповское (Мантет × Папировка тетраплоидная), Яблочный Спас (Редфри × Папировка тетрраплоидная) и два сорта – Жилинское и Спасское оба от скрещивания Редфри с Папировкой тетраплоидной проходят государственное испытание (Седов и др., 2012).

Вкусовые качества плодов яблони во многом определяются отношением сахара к кислоте. По содержанию кислоты сорта могут различаться в 10 и более раз. В связи с этим именно содержание кислоты в плодах яблони в большой степени определяет сахарокислотный показатель и вкус плодов. Источники, используемые при селекции на качество плодов, перечислены в табл. 3.

Как правило, хорошим вкусом характеризуются сорта с сахарокислотным индексом от 15 до 25–28 (Седов и др., 2007). Анализ данных по сахарокислотному индексу плодов для районированных и перспективных в России сортов яблони зависит от зоны выращивания,

Таблица 2. Доноры и источники устойчивости к парше

Устойчивость к парше	Доноры и источники	Литературный источник
Относительная (полигенная)	Алтайский голубок, Антоновка новая, Антоновка обыкновенная, Антоновка сладкая, Антор, Апрельское, Банановое, Батская красавица, Белорусское малиновое, Белорусский синап, Богатырь, Борсдорфское луковичное, Вагнер, Вайнсеп, Выдубецкая плакучая, Голден Грайма, Горноалтайское, Десертное Исаева, Джонатан, Диана, Долго, Зарянка, Кальвиль снежный, Кокс Оранж, Комлевское, Коричное новое, Коробовка, Малиновое оберлянское, Миасское, Нежное забайкальское, Орион, Осенняя радость, Палитра, Память Жаворонкова, Память Мичурина, Пармен зимний золотой, Пепин орловский, Пепин Рибстона, Пепинка алтайская, Победа Черненко, Ренет курский золотой, Ренет Ландсбергский, Ренет Черненко, Ренет шампанский, Ром Бьюти, Сигне Тилиш, Синап орловский, Слава переможцам, Спартан, Старкримсон, Суворовец, Таганой, Тамбовское, Уральское наливное, Уэлси, Шафранное, Шунтукское, Эни Элизабет	Барсукова, Кочетков, 1978; Седов и др., 1981, 1989; Савельев и др., 1982; Ульяновская, 2009; Калинина и др., 2010; Седов, 2011
Олигогенная с генами		
V_f	Александр Бойко, Амулет, Афродита, Благовест, Болотовское, Былина, Веньяминовское, Джолена, Джонафри, Здоровье, Имант, Имрус, Кандиль орловский, Курнаковское, Масловское, Надзейны, Орловское полесье, Памяти Хитрово, Перлина Киева, Поспех, Прайм, Прайз, Прима, Примула, Присцилла, Редфри, Рождественское, Свежесть, Селена, Серафима, Солнышко, Спасское, Старт, Строевское, Себрина, Успенское, Флорина, Цыганочка, Чародейка, Черноморское Инденко, Юбилей Москвы, Юбиляр, Яблочный Спас, сеянцы 814, 1924, BM 41497, PR12T67	Crosby et al., 1992; Седов, 2011
V_r	Реалка, Река, Релета, Ремура	
V_m	Реалка, Река, Релета, Ремура Сеянец SR 0523 [Ред Мелба × (Вольф Ривер × *M. atrosanguinea* 804)], Брянское, Зарянка, Марат Бусурин, Муррей, Орловим, Орловский пионер, Память Исаева, Раувила, Скифское золото, Славянин, Соковинка, Червонец, Чистотел	Седов и др., 1989; Жданов, Седов, 1991

что наглядно показано в табл. 4. Как видно из таблицы, сахарокислотный индекс (СКИ) у плодов яблони снижается с юга на север и с запада на восток.

Особый интерес представляют комплексные доноры, которые в своем генотипе несут два или несколько ярко выраженных селектируемых признаков. К таким относится полученный нами сеянец 30-47-88, являющийся тетраплоидом (донором диплоидных гамет) и обладающий иммунитетом к парше (ген V_f). Получен от скрещивания иммунного сорта Либерти (ген V_f) с тетраплоидным сеянцем 13-6-106 (Суворовец – свободное опыление – 4*x*). Плоды имеют массу 180 г. Мякоть плодов зеленоватая, плотная, сочная, кисло-сладкого вкуса. Внешний вид и вкус плодов оцениваются на 4,3 балла. Он рекомендуется для широкого использования в селекции (Седышева, Седов, 1994; Седов и др., 2008; Седышева и др., 2013).

Ряд сортов яблони нашей селекции также служат комплексными донорами. Сорта Гирлянда, Созвездие, Есения и другие обладают колонновидностью (ген *Co*) и иммунитетом к парше (ген V_f), с успехом используются в селекционной работе как доноры двух признаков.

Известно, что триплоидные сорта яблони, как правило, характеризуются меньшей периодичностью плодоношения по годам, лучшей товарностью плодов и повышенной самоплодностью. Они могут быть получены с использованием мутагенеза, но более простой продуктивный способ их получения – скрещивания типа диплоид × тетраплоид (донор диплоидных гамет) или тетраплоид × диплоид. Нами впервые в России этим путем (разнохромосомные скрещивания) получено 9 сортов яблони, которые уже включены в Госреестр селекционных достижений, допущенных к использованию (районированы).

Предварительная селекция (пребридинг) предусматривает более полное использование генофондов яблони, имеющихся в селекционных учреждениях, и опыта предыдущих поколений селекционеров при оценке исходных форм. В ряде случаев для конструирования новых сортов в существующих генофондах отсутствуют необходимые готовые для использования формы и селекционеру приходится их создавать. В природе не существовало сорта или крупноплодной формы яблони, которые бы обладали иммунитетом к парше и образовывали диплоидные гаметы. Форма яблони 30-47-88, полученная от ступенчатых скрещиваний, является одновременно донором диплоидных гамет и обладает иммунитетом к парше (ген V_f). Целенаправленный подбор и создание доноров ценных признаков способны интенсифицировать и ускорить селекционный процесс.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Таблица 3. Доноры и источники, используемые при селекции на качество плодов

Характеристика	Доноры и источники	Литературный источник
Высокое содержание сахаров в плодах (выше 10,5 %)	Августа, Антоновка десертная, Бакстер, Вятич, Дарена, Джонатановое, Джойс, Жигулевское, Исилькульское, Камышловское желтое, Конфетное, Красное раннее, Лесной красавец, Мартовское, Медок, Медуница, Минезота, Нежное забайкальское, Низкорослое, Память воину, Пепин Рибстона, Помгриз. Ренет волжский, Старкримсон, Уважаемая, Уральский партизан, Филипповка, Яблочный спас, Янтарь	Каталог …, 1981; Лобанов, Франчук, 1985; Седов, 2011
Содержание титруемых кислот в плодах		
низкое (до 0,6 %)	Антоновка сладкая, Афродита, Бежин луг, Болотовское, Вятич, Звездочка, Зимнее душистое, Конфетное, Медок, Медуница, Мекинтош, Мирончик, Несравненное, Низкорослое, Новогородчина, Октябренок, Орлик, Память воину, Пепин орловский, Помгриз, Пришвинское, Роскошное, Синап орловский, Старт	Седов и др., 2007
высокое (1,01–1,80 %)	Антоновка плоская, Багрянка новая, Бельфлер алтайский, Веселовка, Грушовка ранняя, Добрыня, Долго, Камышловское желтое, Клоз, Комлевское, Комсомолец Бурятии, Красноярское, Томич, Лалетино, Ломоносовское, Малинка, Октябрьское, Пепинка алтайская, Самоцвет, Святой Лаврентий, Солнцедар, Уважаемая, Фонарик, Янтарка алтайская	Седов и др., 2007
Сахарокислотный индекс		
низкий (6,7–8,2)	Багрянка новая, Желтое наливное, Комлевское, Ломоносовское, Октябрьское, Самоцвет, Солнцедар, Уважаемая, Уралочка	Седов и др., 2007
высокий (40-97)	Антоновка сладкая, Зимнее душистое, Конфетное, Медок, Медуница, Мирончик, Несравненное, Новогородчина	Седов и др., 2007
Десертное качество плодов	Апрельское, Бельфлер-китайка, Бессемянка мичуринская, Болотовское, Бордовое, Веньяминовское, Гала, Голден Делишес, Джойс, Джонаголд, Джонаред, Джанатан, Кендал, Коричное полосатое, Кортланд, Линда, Лобо, Мантет, Меканис, Мекаун, Мекинтош, Мелба, Орлик, Прогресс, Ренет Симиренко, Синап орловский, Слава Англии, Слава переможцам, Суйслепское, Элстар	Каталог сортов яблони, 1981; Шидаков, Костык, 1985; Шидаков, 1991
Высокое содержание аскорбиновой кислоты (26,1–42,0 мг/100 г)	Алтайское красное, Веселовка, Вита, Диво, Долго, Желтое ребристое, Зимнее Плесецкого, Камышловское желтое, Кулон-китайка, Кулундийское, Лалетино. Миасское, Налив амурский, Несравненное, Пальметта, Пепин алтайский, Поливитаминное, Ранетка Ермолаева, Ранетка пурпуровая, Ренет Фрома золотой, Россиянка, Румянка свердловская, Сибирский сувенир, Скала, Трудовое, Чара	Седова, 1981; Помология, Т. I, 2005; Седов и др., 2007, 2013; Седов, 2011
Высокое содержание Р-активных веществ (более 350 мг/100 г)	Августа, Бежин луг, Болотовское, Вита, Добрыня, Жебровское, Желанное, Зарянка, Имрус, Кандиль орловский, Комсомолка Бурятии, Курнаковское, Лалетино, Мантет, Орловский пионер, Память Семакину, Пепинка алтайская, Радость Надежды, Ранетка Ермолаева, Свежесть, Сеянец пудовщины, Старт, Строевское, Успенское, Юбилей Москвы, Яблочный Спас	Седова, 1981; Помология, Т. I, 2005; Седов и др., 2007, 2013; Седов, 2011

Таблица 4. Влияние зон выращивания яблок на отношение сахара к кислоте (сахарокислотному индексу)

Зона выращивания	Число изученных сортов	Среднее значение СКИ	Размах варьирования
Южная (Северо-Кавказский и Нижневолжский регионы)	61	21,4	8,2–61,0
Переходная (Центральный, Центрально-Черноземный и Нижневолжский регионы)	92	17,8	9,2–36,9
Северная (Северный, Северо-Западный, Волго-Вятский регионы)	34	15,8	5,4–21,8
Урал, Сибирь, Дальний Восток	103	14,0	4,4–48,8

Яблочный Спас. Триплоидный районированный сорт селекции ВНИИСПК. Получен от скрещивания Редфри × Папировка тетраплоидная (*4x*).

Иммунный к парше донор диплоидных гамет 30-47-88 (Либерти × 13-6-106).

Августа. Триплоидный районированный сорт селекции ВНИИСПК. Получен от скрещивания Орлик (2x) × Папировка тетраплоидная (4x).

Поэзия. Сорт селекции ВНИИСПК – донор колонновидности (ген *Co*). Проходит государственное испытание.

Кандиль. Районированный сорт орловской селекции ВНИИСПК – донор иммунитета к парше.

Приокское. Районированный сорт селекции ВНИИСПК – донор колонновидности (ген *Co*).

Афродита. Районированный сорт селекции ВНИИСПК – донор иммунитета к парше (ген V_f).

Список литературы

Барсукова О.Н., Кочетков В.М. Устойчивость перспективных сортов яблони к болезням. Интенсификация садоводства Адыгеи. Майкоп, 1978:19-26.

Генофонд плодовых, ягодных и декоративных древесно-кустарниковых культур ГНУ ВНИИСПК Российской академии сельскохозяйственных наук (Под ред. Н.Г. Красовой). Орел: ВНИИСПК, 2012.

Генофонд семечковых культур (Под общ. ред. Н.И. Савельева). Мичуринск-наукоград РФ, 2013.

Жданов В.В., Седов Е.Н. Селекция яблони на устойчивость к парше. Тула: Приок. кн. изд-во, 1991.

Калинина И.П., Ящемская З.С., Макаренко С.А. Селекция яблони на юге Западной Сибири. Новосибирск, 2010.

Каталог сортов яблони (Сортовой фонд и его использование) (Под ред. Е.Н. Седова). Орел: Орловск. отд. Приок. кн. изд-ва, 1981.

Качалкин М.В. Яблоня 21 века. Колонны, которые плодоносят. М., 2013.

Кичина В.В. Колонновидные яблони. Все о яблонях колонновидного типа. М., 2002.

Лобанов Г.А., Франчук Е.П. Подбор родительских форм при селекции яблони на улучшение химического состава плодов. Селекция яблони на улучшение качества плодов: Сб. ст. Орел, 1985: 33-40.

Малыченко В.В., Баландина Л.Н. Исходный материал для селекции сортов интенсивного типа. Науч.-тех. бюл. ВИР. Л., 1986;166:3-6.

Помология. В 5 т. Т. I. Яблоня (Под общ. ред. Е.Н. Седова). Орел: ВНИИСПК, 2005.

Савельев Н.И., Яковлев С.П., Ищенко Л.А. Комбинационная способность некоторых исходных форм яблони по устойчивости к парше. Бюл. науч. информ. ЦГЛ. 1982;38:7-9.

Савельева Н.Н., Савельева И.Н. Яблоня колонновидная. Биология, генетика, селекция. Мичуринск-наукоград РФ. 2012.

Седов Е.Н. Генофонд яблони и его использование в селекции. Плодоводство и ягодоводство России. 2009;XXI:246-257.

Седов Е.Н. Селекция и новые сорта яблони. Орел: ВНИИСПК, 2011.

Седов Е.Н. Селекция яблони в средней полосе РСФСР. Орел: Орловск. отд-ние Приок. кн. изд-ва, 1973.

Седов Е.Н. Скороплодность и продуктивность гибридного потомства яблони. Вестн. Саратовского ГАУ. 2014;2:33-36.

Седов Е.Н., Жданов В.В., Седова З.А. и др. Селекция яблони. М.: Агропромиздат, 1989.

Седов Е.Н., Корнеева С.А., Серова З.М. Колонновидная яблоня в интенсивном саду. Орел: ВНИИСПК, 2013.

Седов Е.Н., Корнеева С.А., Серова З.М. Создание интенсивных садов яблони путем выращивания колонновидных сортов в кроне зимостойкого полукарликового подвоя 3-4-98 (рекомендации). Орел: ВНИИСПК, 2014.

Седов Е.Н., Красова Н.Г., Седова З.А. Товарные и потребительские качества плодов. Каталог сортов яблони (сортовой фонд яблони) и его использование. Орел: Орловск. отд-ние Приок. кн. изд-ва, 1981:91-103.

Седов Е.Н., Макаркина М.А., Левгерова Н.С. Биохимическая и технологическая характеристика плодов генофонда яблони. Орел: ВНИИСПК, 2007.

Седов Е.Н., Седышева Г.А., Макаркина М.А., Серова З.М., Корнеева С.А. Ценные доноры и источники для селекции яблони. Вестн. Саратовского ГАУ. 2013;10:30-33.

Седов Е.Н., Седышева Г.А., Серова З.М. Селекция яблони на полиплоидном уровне. Орел: ВНИИСПК, 2008.

Седов Е.Н., Седышева Г.А., Серова З.М., Ульяновская Е.В. Папировка тетраплоидная – ценная исходная форма в создании триплоидных сортов летнего созревания. Плодоводство и ягодоводство России. М., 2012;XXXII(2):15-20.

Седов Е.Н., Серова З.М. Суперинтенсивный сад (Сад колонновидных сортов). Интенсивный яблоневый сад на слаборослых вставочных подвоях. Орел: ВНИИСПК, 2009:155-158.

Седова З.А. Итоги и перспективы селекции яблони на повышенное содержание аскорбиновой кислоты в плодах. Селекция яблони в СССР: Сб. ст. Орел, 1981:149-155.

Седышева Г.А., Седов Е.Н. Полиплоидия в селекции яблони. Орел: ВНИИСПК, 1994.

Седышева Г.А., Седов Е.Н., Горбачева Н.Г. и др. Новый донор селекционно значимых признаков для создания триплоидных, адаптивных, высококачественных сортов яблони. Садоводство и виноградарство. 2013;1:13-18.

Ульяновская Е.В. Формирование адаптивного сортимента яблони на основе устойчивости и иммунных к парше сортов: Автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. [Северо-Кавказ. зональн. НИИ сад-ва и виноградарства]. Краснодар, 2009.

Шидаков Р.С. Сортимент яблони и совершенствование его путем селекции в предгорьях Северного Кавказа. Нальчик, 1991.

Шидаков Р.С., Костык П.П. Совершенствование сортимента яблони по вкусовым качествам плодов. Садоводство, виноградарство и виноделие Молдавии. 1985;4:20-22.

Crosby J.A., Janick I.J. Pecknold P.C. Breeding apples for scab Resistance: 1945–1990. Fruit Varieties J. 1992:145-166.

Получение удвоенных гаплоидов у видов рода *Brassica* L.

Н.А. Шмыкова, Д.В. Шумилина, Т.П. Супрунова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Всероссийский научно-исследовательский институт селекции и семеноводства овощных культур», Московская область, Одинцовский район, пос. ВНИИССОК, Россия

Технология получения удвоенных гаплоидов (DH (double haploid)-технологии) через культуру пыльников или микроспор *in vitro* – один из способов генетического улучшения сельскохозяйственных растений. С помощью DH-технологии полностью гомозиготные растения можно получить в течение одного года, в отличие от классических методов селекции, при использовании которых процесс инбридинга занимает 6–12 лет. Преимущество этого биотехнологического подхода также состоит в расширении формообразовательного процесса за счет гаметоклональной изменчивости. Наибольший успех в получении DH-растений через культуру микроспор достигнут у некоторых сортов рапса (*Brassica napus* L.). Эффективность DH-технологии у других представителей рода *Brassica* остается по-прежнему низкой. На индукцию эмбриогенеза микроспор влияют многочисленные факторы: условия выращивания донорных растений, их генотип, стадия развития микроспор, состав питательной среды, условия культивирования. Перепрограммирование микроспор с гаметофитного пути развития на спорофитный происходит под действием различных стрессовых воздействий. К факторам, способным повысить эффективность эмбриогенеза у представителей рода *Brassica,* относятся предобработка пыльников и микроспор повышенной температурой или колхицином. Улучшение процесса регенерации растений из эмбриоидов может быть достигнуто за счет использования регуляторов роста (этилен, абсцизовая кислота, индолилуксусная кислота). Оптимальное значение и комбинация этих факторов являются необходимым условием для успешного эмбриогенеза. В данной обзорной статье обобщен опыт зарубежных и российских ученых в области разработки технологии получения удвоенных гаплоидов капустных культур, показаны различные факторы, влияющие на процессы получения DH-растений, а также подходы, позволяющие повысить индукцию эмбриогенеза из микроспор у растений рода *Brassica*.

Ключевые слова: *Brassica*, DH-технологии, культура микроспор, эмбриогенез, удвоенные гаплоиды.

Doubled haploid production in *Brassica* L.

N.A. Shmykova, D.V. Shumilina, T.P. Suprunova

All-Russia Research Institute of Vegetable Breeding and Seed Production, VNIISSOK village, Odintsovo district, Moscow region, Russia

Doubled haploids (DHs) production through androgenesis is a biotechnological method for genetic improvement of crops. Biotechnological DH line production offers advantages to plant breeders, including the possibility to obtain homozygous lines within a year in contrast to common inbreeding methods, which may take 6–12 years. The greatest success in androgenesis has been achieved in some varieties of rapeseed (*Brassica napus* L.). However, the efficiency of androgenesis in other *Brassica* species is still poor. Induction of microspore embryogenesis is usually induced by many factors such as conditions of donor plant growth, genotype, microspore developmental stage, culture medium composition, and culture conditions. The reprogramming of microspores from the gametophytic to the sporophytic habit of development depends on various stress factors. Certain pretreatments of microspores, such as high temperature and colchicine, can favor androgenesis in *Brassica* species. Plant regeneration from microspores can be improved by proper application of different growth regulators (ethylene, abscisic acid, and indole acetic acid). Optimal combinations of these factors are mandatory for efficient androgenesis. In this review, we summarize the experience of our colleagues in DH-technology in the *Brassica* genus. Attention is focused on some factors influencing the development of doubled haploid plants and their impact on enhancing the efficiency of androgenesis in *Brassica* species.

Key words: *Brassica*, DH technology, microspore culture, embryogenesis, doubled haploids.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Супрунова Т.П. Получение удвоенных гаплоидов у видов рода *Brassica* L. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):111-120.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Shmykova N.A., Shumilina D.V., Suprunova T.P. Doubled haploid production in *Brassica* L. seeds. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):111-120.

УДК 573.6:635.33:581.3
Поступила в редакцию 18.11.2014 г.
Принята к публикации 27.01.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: shmykovanat@mail.ru

Хозяйственное значение растений рода *Brassica* L. трудно переоценить. Среди них наиболее широкую известность имеют масличные, овощные, кормовые и медоносные культуры. В современной селекции сельскохозяйственных культур приоритетным является создание гибридов F_1, отличающихся от сортов высокой урожайностью, выравненностью растений по срокам созревания и качеству продуктивных органов. Наиболее сложным, трудоемким и продолжительным звеном в этом процессе является выведение константных родительских линий, на создание которых уходит от 6 до 12 лет при использовании традиционных методов селекции.

В большинстве развитых стран в настоящее время для ускорения селекции широко используются технологии получения удвоенных гаплоидов (DH-технологии) (Dunwell, 2010). Среди таких технологий ведущее место занимает культура микроспор *in vitro*, которая не только обеспечивает гомозиготность получаемых удвоенных гаплоидов (DH-линии), но и способствует расширению спектра формообразования генетических рекомбинантных форм, в том числе с рецессивными признаками. В основе технологии лежит способность микроспор переходить с гаметофитного пути развития на спорофитный под действием стрессовых факторов (повышенная температура высокое осмотическое давление и т. д.). При соответствующих условиях такие микроспоры начинают делиться по спорофитному типу, образуя эмбриоиды.

Первые успешные исследования по культуре микроспор капустных культур проведены в начале 1980-х годов (Lichter, 1982). Позднее был разработан базовый протокол культуры микроспор рапса, который служит основой DH-технологии для растений рода *Brassica* L. (Pechan, Keller, 1988). Затем культуру микроспор стали применять для различных разновидностей капусты: капусты цветной (*B. oleracea* var. *botrytis*), брокколи (*B. oleracea* var. *italica*), капусты полу- и рыхлокочанной (*B. oleracea* var. *costata*), кольраби (*B. oleracea* var. *gongylodes*), капусты декоративной (*B. oleracea* var. *acephala*) и капусты белокочанной (*B. oleracea* var. *capitata*), а также капусты китайской (*B. rapa* ssp. *chinensis*) (Lichter, 1989; Takahata, Keller, 1991; Duijs et al., 1992; Cao et al., 1994; Zhang et al., 2008; Winarto, Teixeira da Silva, 2011; Yuan et al., 2012).

Несмотря на успехи биотехнологии в этой области, универсальной технологии получения удвоенных гаплоидов у различных растений рода *Brassica* не существует, так как на процессы получения DH-растений влияют многочисленные факторы: условия выращивания донорных растений, их генотип, стадия развития микроспор, тип предобработки бутонов и микроспор, состав питательных сред, условия культивирования. При этом оптимальное значение перечисленных факторов является необходимым условием для эмбриогенеза.

Если в развитых зарубежных странах DH-технологии успешно развиваются в течение последних 25 лет, то в России они находятся на начальном этапе. Однако задача, стоящая перед селекционерами в нашей стране, требует устойчивого наращивания конкурентоспособной продукции при условии сокращения затрат. Решение ее возможно за счет привлечения современных биотехнологических подходов.

Цель данной работы – обобщить опыт зарубежных коллег в области разработки технологии получения удвоенных гаплоидов капустных культур, показать различные подходы, позволяющие повысить индукцию эмбриогенеза из микроспор у растений рода *Brassica*.

Факторы, влияющие на образование эмбриоидов

Универсальных протоколов культуры изолированных пыльников/микроспор для всех видов не существует в силу межвидовых и внутривидовых (генотип-зависимых) различий в отзывчивости к андрогенезу. При проведении первоначального скрининга видов на отзывчивость к андрогенезу в основном используются базовые протоколы, разработанные для растений рода *Brassica* (рапс сорта Топаз). Основные шаги таких протоколов остаются неизменными. Они включают выращивание растений-доноров, отбор бутонов, выделение микроспор, культивирование микроспор и индуцирование эмбриогенеза, регенерацию растений, удвоение хромосом. Тем не менее в каждом конкретном случае необходима разработка индивидуальных протоколов культуры изолированных пыльников/микроспор для каждого конкретного вида, сорта, генотипа, растения.

Основной протокол и шаги, описанные ранее, постоянно оптимизируются учеными. В этом контексте такие параметры, как стадия развития донорного растения и бутонов (Pechan, Keller, 1988; Baillie et al., 1992), плотность культуры микроспор (Huang et al., 1990; Ferrie et al., 1999), сахароза или полиэтиленгликоль (ПЭГ), регуляторы осмотического давления (Baillie et al., 1992; Ilic-Grubor et al., 1998; Lionneton et al., 2001) являются объектами различных исследований.

Стадия развития микроспор

У растений рода *Brassica* к эмбриогенезу способны микроспоры на поздней стадии развития и ранние двухклеточные пыльцевые зерна (Pechan, Keller, 1988; Huang et al., 1990). В процессе культивирования наблюдаются различные цитологические изменения, происходящие в них, например появление большого числа крахмальных зерен (Kott et al., 1988; Zaki, Dikinson, 1990; Lo, Pauls, 1992). Характерным признаком перехода микроспор с гаметофитного пути развития на спорофитный является первый симметричный митоз клеток взамен асимметричному.

Исследование изменений структуры цитоскелета в процессе инициации эмбриогенеза показало, что в поздних микроспорах, характеризующихся присутствием крупной вакуоли и латерально расположенного ядра, к симметричному делению клеток ведут два пути (Zaki, Dikinson, 1990). В первом случае в течение первых 12 ч культивирования при 32 °С микроспор, находящихся на поздней стадии развития, ядро клетки сохраняет свое маргинальное положение, но при этом меняется плоскость деления, что приводит к симметричному делению клеток и, соответственно, эмбриогенному развитию. Во втором случае митоз инициируется тогда, когда ядро смещается от оболочки к центру микроспоры (Zaki, Dikinson, 1990; Hause et al., 1993). По мнению исследователей, центральная вакуоль и микротрубочки удерживают ядро в ацентричном положении вблизи клеточной мембраны. Исчезновение центральной вакуоли и нарушение образования микротрубочек, инициируемое высокой температурой, являются причиной миграции ядра к центру микроспоры. Таким образом, вследствие митоза образуются две равноценные клетки, что также приводит к эмбриогенному развитию.

Возможен также и третий тип развития эмбриоидов, который инициируется в раннем двухклеточном пыльцевом зерне (Hause et al., 1993). В этом случае после 24 ч культивирования происходит деление вегетативной клетки, что не наблюдается в случае гаметофитного пути развития. При этом генеративная клетка оказывается блокированной возле интины и, как правило, не вступает в митоз (Binarova et al., 1993).

Таким образом, успех индукции эмбриогенеза зависит от правильной оценки состояния развития мужского гаметофита донорного растения. Развитие цветка управляется взаимодействием гомеозисных генов. Так, например, тычиночные примордии развиваются после того, как появились примордии чашелистиков и лепестков, но до инициации плодолистиков (Goldberg et al., 1993). Эта взаимосвязь в развитии частей цветка сохраняется на протяжении всего периода его жизни, поэтому по морфологическим признакам одних частей цветка можно судить о степени развития других. Например, коэффициент корреляции между длиной бутона и стадией развития мужского гаметофита у капусты брокколи составляет 0,85–0,94 (Шмыкова, 2006). Можно предположить, что у более длинного бутона будут более длинные тычинки, лепестки и пестик, а в пыльниках более крупных бутонов микроспоры или пыльца будут находиться на более поздних стадиях развития. По данным Pechan и Keller (1988), норма удлинения бутона рапса в сутки составляет 0,75 ± 0,02 мм, а время, в течение которого микроспора у рапса является способной к прохождению эмбриогенеза, приблизительно равно 8 ч. Это период между стадиями G2 перед митозом и G1 после митоза (Telmer et al., 1992). Однако определить оптимальную стадию развития бутона для культивирования микроспор, ориентируясь только на его размер, проблематично. Для этого необходимо учитывать различные факторы, такие как условия выращивания донорного растения, его фенотипические особенности. Например, Baillie с соавт. (1992) оценивали бутоны *B. campestris* длиной 2,2–2,9 мм и 3,0–3,9 мм, и ими было отмечено, что эмбриоиды развивались лишь из микроспор, выделенных из бутонов 2,2–2,9 мм. Оптимальный размер бутонов у *B. napus* сильно отличается от *B. campestris* и составляет 4,02–4,2 мм (Pechan, Keller, 1988). По данным других исследователей, этот показатель значительно зависит от сортообразца. Так, у гибрида Топаз он составил 3,5–3,9 мм, а у сортообразцов DH1 2075 – 2,0–2,4 мм и Westor – 2,5–2,9 мм (Bhowmik et al., 2011). Различие между сортообразцами также прослеживается у *B. juncea*, оптимальными для эмбриогенеза у сорта Varuna считаются бутоны длиной 3,1–3,5 мм, а для сортов Pusa Bold и B10-902 – 2,5–3,0 мм (Prem et al., 2005, 2008). При исследовании различных видов капустных культур было показано, что микроспоры, находящиеся на поздней стадии развития, подходящей для эмбриогенеза, тоже различаются по величине: самые маленькие у *B. nigra*, средние у *B. napus* и самые крупные у *B. oleracea* (Lichter, 1989). Отсюда следует, что определение оптимальных размеров бутонов, содержащих отзывчивые микроспоры для индукции эмбриогенеза, является необходимым условием для успешного культивирования.

Индукция эмбриогенеза

К числу наиболее важных факторов, способных вызывать индукцию эмбриогенеза у представителей рода *Brassica*, относится тепловая предобработка пыльников (Keller, Armstrong, 1979; Telmer et al., 1992; Simmonds, Keller, 1999). Чаще всего для этой цели используют тепловые режимы от 32 °С до 40 °С с различной временной экспозицией. Эффективность индукции эмбриогенеза зависит от генотипа, температуры и времени воздействия. Обычно температурный стресс эффективно применяется на стадии, предшествующей первому гаплоидному митозу или во время него. Pechan с соавт. (1991) показали, что стрессовая предобработка культуры микроспор высокой температурой необходима для инициации процесса переключения микроспор с гаметофитного пути развития на спорофитный. Во время высокотемпературного стресса первые 8 ч культивирования являются критическими. Активация процессов, регулирующих индукцию и поддерживающих эмбриогенез микроспор, происходит в эти временные рамки. Simmond и Keller (1999) наблюдали, что первое деление в микроспорах, стрессированных высокой температурой, является симметричным, в отличие от нормального асимметричного деления, предшествующего образованию пыльцевого зерна. Другой наблюдаемый феномен в этот период – образование в микроспорах белков теплового шока (БТШ), вызванное высокотемпературным воздействием на них (Pechan et al., 1988;

Cordewener et al., 1995; Pechan, Smykal, 2001). Наличие этих белков в пыльцевых зернах после теплового воздействия, по мнению авторов, указывает на их связь с процессом эмбриогенной индукции.

В большинстве случаев было показано, что воздействие высокой температурой должно быть кратковременным. Например, микроспоры *B. napus* становились эмбриогенными, если культивирование при 32,5 °C продолжалось 18–24 ч, а затем температурный режим сменялся на 25 °C (Simmonds, Keller, 1999). У *B. campestris* также отмечено положительное действие температурных предобработок на эмбриогенез в культуре пыльников (Keller, Armstrong, 1979). У *B. napus* в культуре микроспор на поздней стадии их развития переход на эмбриогенный путь развития был индуцирован повышенной температурой (32,5 °C) в течение 4 суток (Telmer et al., 1992; Custers et al., 1994; Cordewener et al., 1995). Другие исследователи наблюдали самый большой выход эмбриоидов при воздействии температуры 32 °C в течение 48 ч, при этом проявлялась генотипическая зависимость (Baillie et al., 1992). Индивидуальная восприимчивость разных сортообразцов *B. napus* к температурному воздействию отмечена в работе Зубаревой с соавт. (2013). Так, эмбриоиды были получены при температурном воздействии 32 °C на культуру микроспор в течение 72 ч у сортообразцов Ханна, Jp-8, Jp-4 и № 444; в варианте воздействия с температурой 33 °C – у сортообразцов № 1, № 417, Луговской и Гриффин, а для сортообразцов Кобра, SR, Центр 1 и Центр 2.1 потребовалась предобработка температурой 35 °C продолжительностью 24 ч. Положительное влияние температурной предобработки (32 °C) на эмбриогенез из микроспор выявлено у редиса (*Raphanus sativus*) (Takahata et al., 1996; Chun et al., 2011). В культуре микроспор *B. juncea* эмбриогенез индуцируется при более длительном температурном воздействии. По данным Chanana (2005), продолжительность его составляет 72 ч, а другие исследователи (Prem et al., 2005, 2008) проводят предобработку такой же температурой (32,5 °C) в течение 10–11 сут. Для растений вида *B. oleracea*, к которому относятся слабо отзывчивые генотипы, температурная обработка также является необходимой для индукции эмбриогенеза. Keller и Armstrong (1981) наблюдали максимальный выход эмбриоидов у капусты декоративной (*B. oleracea* var. *acephala*) при предобработке температурой 35 °C в течение 1 сут. У брюссельской капусты (*B. oleracea* var. *gemmifera*) лучшие результаты были получены в культуре пыльников, когда для индукции применяли температуру 35 °C в течение 16 ч (Ockendon, 1984). Исследователями было показано, что оптимальность временной и температурной экспозиции предобработки зависит от сортообразца. Так, Keller и Armstrong (1983) отметили, что оптимальный режим предобработки для брокколи (*B. oleracea* var. *italica*) составляет 35 °C в течение 2 сут. Другие авторы (Duijs et al., 1992) показали, что для трех сортов этой разновидности капусты лучшей является предобработка температурой 30 °C в течение 48 ч, а Takahata и Keller (1991), Halkjaer и Ringgaard (1997) наблюдали положительное воздействие на культуру микроспор температурой 32,5 °C и 35 °C в течение суток. В более поздней работе Dias (2001) было показано, что для культуры микроспор 9 сортообразцов брокколи из 10, оптимальной была индукция эмбриогенеза при температурном воздействии 32,5 °C в течение суток и для одного сортообразца – 30 °C в течение 2 сут.

Накопившиеся факты позволили предположить участие цитоскелета в регулировании положения ядра перед первым гаплоидным митозом и его причастность к эмбриогенезу (Hause et al., 1993). Было показано влияние колхицина на образование эмбриоидов у *B. napus* в культуре микроспор, а также трифлюралина, обладающего антимикротубулярным действием на цитоскелет микроспоры (Mollers et al., 1994; Zaki, Dickenson, 1995; Zhou et al., 2002). В этих исследованиях эффективность индукции эмбриогенеза сочеталась с удвоением хромосом, что способствовало сокращению времени получения DH-растений.

Холодовая предобработка микроспор для индукции эмбриогенеза у растений рода *Brassica* применяется редко и кажется противоречащей ранее проведенным исследованиям. Тем не менее была показана эффективность холодовой предобработки бутонов или соцветий, предназначенных для получения культуры микроспор *B. napus* (Lichter, 1982), *B. oleracea* (Osolnik et al., 1993), *B. rapa* (Sato et al., 2002), и предобработки непосредственно изолированных микроспор у *B. napus* (Charne, Beversdorf, 1988). Интересные результаты были получены Gu с соавт. (2004) в эксперименте, сочетающем низкотемпературный шок с осмотическим. Они использовали холодовую предобработку стерильных бутонов *B. napus*, помещенных в питательную среду NLN с 13 %-й сахарозой. У яровых сортообразцов, таких как Топаз, Ханна, № 7039, № 7041, № 7042, эта предобработка способствовала увеличению выхода эмбриоидов в 2–8 раз в зависимости от образца. Менее значительное увеличение прослеживалось у озимых сортообразцов *B. napus*. Однако в литературе встречаются данные и об отрицательных эффектах низкотемпературных обработок у *B. napus* (Dunwell et al., 1985) и *B. rapa* (Sopory, Munshi, 1996). Вышеизложенные факты подчеркивают, что для каждого сортообразца нужен индивидуальный подбор индуцирующего фактора, который, по-видимому, зависит от устойчивости растения к нему.

Плотность культуры микроспор

Другим фактором, влияющим на выход микроспор, является плотность культуры клеток. Показано, что для *B. napus* плотность 30 000–40 000 кл/мл в первые 2–4 суток с последующим разведением до 10 000 кл/мл является критической для эмбриогенеза. Плотность

культуры выше 100 000 кл/мл ингибирует эмбриогенез (Huang et al., 1990). Для *B. oleracea* более высокую частоту эмбриогенеза дает плотность, не превышающая 50 000 кл/мл, по сравнению с 100 000 кл/мл (Ferrie et al., 1999). Однако, по данным этих исследователей, два генотипа (Bo-1 и Bo-4) составили исключение: у них высокая частота эмбриогенеза проявлялась при более высокой плотности. Это говорит о том, что утверждение об оптимальной плотности не может быть применено для всех капустных культур, тем не менее плотность 10–40 тыс. клеток в 1 мл более предпочтительна для многих видов и сортообразцов.

Осмотическое давление

Сахароза используется в культуре растительных клеток *in vitro* как источник углеводов и регулятор осмотического давления. Осмотическое давление в среде является критическим фактором для развития зиготического эмбриоида *in vitro*. Обычно высокое осмотическое давление требуется для эмбриоида на ранних стадиях развития, но на поздних стадиях оно должно быть более низким. В культуре микроспор различных видов рода *Brassica* в питательных средах используют, как правило, сахарозу в концентрации 10 или 13 % (Palmer et al., 1996). Однако в ряде работ использование более высокой концентрации сахарозы на начальных этапах обеспечивало высокий выход эмбриоидов. Так, Baillie с соавт. (1992), работавшие с *B. campestris*, Ferrie с соавт. (1999), изучавшие *B. oleracea*, и Lionneton с коллегами (2001) на *B. juncea* показали, что культивирование микроспор на среде с 17 %-й сахарозой в течение 48 ч с последующей заменой ее на 10 %-ю увеличивает частоту эмбриогенеза. Сахароза в высоких концентрациях может действовать как осмотический стресс, с другой стороны, она необходима для формирования эмбриоидов. Доказательство двойного эффекта сахарозы на формирование эмбриоидов показано в исследованиях Ilic-Grubor с соавт. (1998) у *B. napus*. Так, эмбриоиды на сердечковидной, торпедовидной и ранних семядольных стадиях, образовавшиеся на средах с полиэтиленгликолем (ПЭГ), имеют большое сходство с зиготическими аналогами. В противоположность этому внешняя морфология эмбриоидов, индуцируемых на средах с высокой сахарозой, отличается от образованных на средах с ПЭГ и зиготических эмбриоидов. Это подтверждает влияние высокой концентрации сахарозы на морфологию эмбриоидов. В работах Ferrie с соавт. (1999) на *B. oleracea* также показано, что сахароза является наиболее важным компонентом среды, влияющим на эмбриогенез.

Активированный уголь

Активированный уголь (АУ) часто вводят в питательные среды, что способствует повышению эффективности эмбриогенеза из микроспор у ряда растений, таких как *B. rapa* ssp. *oleifera* (Guo, Pulli, 1996), *B. oleracea* (Dias, 1999) и *B. juncea* (Prem et al., 2008). Gland с соавт. (1988) показали, что АУ не повышает эмбриогенез, но улучшает регенерацию растений из эмбриоидов у рапса. Margale и Chevre (1991) обнаружили, что АУ в концентрации 1 % способствует продукции эмбриоидов, тогда как в его отсутствие развитие эмбриоидов заканчивается на уровне 4–8 клеток. В работе Dias (2001) было показано, что при культивировании микроспор капусты брокколи и капусты цветной эффект от добавления АУ в питательные среды был различным, в зависимости от сортообразцов. Положительное влияние АУ на увеличение числа эмбриоидов происходило у капусты цветной сорта Bola de Neva и капусты брокколи гибридов Marathon и Mariner. В работе другого исследователя (Mathias, 1988) было показано, что использование двухслойной питательной среды, в которой нижний слой содержал АУ, позволяло увеличить частоту образования эмбриоидов у *B. napus*.

В химии АУ используется как сильный адсорбент для газообразных и растворенных твердых веществ. Gland с соавт. (1988) предположили, что АУ адсорбирует токсичные вещества, выделяемые неактивными микроспорами, тем самым, способствует эмбриогенному развитию микроспор. Одним из таких веществ является этилен и другие газообразные вещества, выделяемые клетками в культуре *in vitro* (Johansson, 1983). Косвенным подтверждением этого являются данные по увеличению числа эмбриоидов при культивировании микроспор капусты цветной и капусты брокколи на средах с добавлением нитрата серебра, который является антагонистом этилена (Dias, Martins, 1999).

Другое предположение заключается в том, что АУ может также адсорбировать фенольные соединения, которые выделяются поврежденными тканями в процессе культивирования (Fridborg et al., 1978). Так, в культуре пыльников дурмана и анемоны адсорбция фенольных соединений АУ способствовала стимуляции эмбриогенеза (Johansson, 1983). Однако в культуре микроспор *Brassica* ожидается низкий уровень фенольных соединений, так как суспензия микроспор лишена соматических тканей, хотя высвобождение некоторого количества фенольных соединений в питательную среду возможно.

Lichter (1989), культивируя различные виды семейства Капустные, предположил, что АУ, добавленный в питательные среды для культивирования изолированных микроспор, может адсорбировать не только вредные вещества, но также и некоторые компоненты, необходимые для развития растений. Weatherhead с коллегами (1979) показал, что добавление 0,3 % АУ в питательную среду в культуре пыльников табака привело к полной адсорбции тиамин хлорида и никотиновой кислоты. По мнению авторов, также была снижена концентрация биотина, фолиевой кислоты и пиридоксина, однако это не касалось мезоинозита.

По мнению других исследователей, благодаря способности АУ адсорбировать катионы, он может влиять

на показатель pH питательной среды в сторону его увеличения (Langowska, 1980; Smith, Krikorian, 1990). В одних исследованиях применение АУ повышало эмбриогенез микроспор *B. rapa* (Guo, Pulli, 1996), *B. oleracea* (Dias, 1999), *B. nigra* (Margale, Chevre, 1991) и *B. juncea* (Prem et al., 2008), другими авторами показано, что АУ дает негативный эффект на эмбриогенез в культуре микроспор *B. juncea* (Prem et al., 2005) и *B. rapa* (Takahashi et al., 2012). Возможно, что эти разногласия в эффективности применения АУ заключаются в различии способов его применения. В экспериментах Guo и Pulli (1996), в которых проявлялся положительный эффект на эмбриогенез, АУ был добавлен с агарозой. В других экспериментах, показавших отрицательное действие, АУ добавлялся без агарозы, при этом авторы предположили, что происходит прилипание частиц угля к микроспорам и образующимся эмбриоидам, что препятствует их росту и развитию (Prem et al., 2005).

Эффективность влияния АУ зависит от концентрации макросолей в питательной среде (Takahashi et al., 2012). По мнению Wang с соавт. (2009), индукция эмбриогенеза лучше происходит на среде, содержащей половинную концентрацию макросолей NLN (без АУ), чем на полной среде. Поскольку АУ не является избирательным адсорбентом, он может одновременно поглощать не только вещества-ингибиторы, выделяемые микроспорами, но и часть макросолей, находящихся в питательной среде. При использовании полной NLN концентрация солей может быть снижена до оптимальной величины, и в этом случае добавление АУ будет играть положительную роль. При применении сред с пониженной концентрацией солей эффект от добавления угля может быть отрицательным.

Другие факторы, влияющие на эмбриогенез в культуре микроспор

В первоначальном протоколе культивирования микроспор капустных культур экзогенные регуляторы роста не применялись. Однако в ряде случаев использование низких концентраций N^6-бензиламинопурина (БАП) и α-нафтилуксусной кислоты (НУК) повышало результативность технологии получения эмбриоидов в культуре микроспор. Например, добавление БАП способствовало развитию нормальных эмбриоидов у *B. napus* (Charne, Beversdorf, 1988; Ferrie, 2003), *B. rapa* (Takahashi et al., 2012), *B. campestris* ssp. *pekinensis* (Lee, Kim, 2000) и *B. oleracea* var. *italica* (Na et al., 2011). В работе Е.А. Калашниковой с соавт. (2011) было показано положительное действие кинетина и НУК (1 мг/л) на процесс прямого эмбриогенеза в культуре микроспор рапса.

Одним из факторов, отрицательно влияющих на индукцию эмбриогенеза, является этилен, образующийся при разрушении клеток стенок пыльников в процессе получения суспензии микроспор. За последнее десятилетие проведен целый ряд исследований, направленных на снижение концентрации этилена в культуре микроспор растений рода *Brassica*. С этой целью были использованы ингибиторы синтеза этилена, такие как нитрат серебра, тиосульфат серебра, хлорид кобальта, аминоэтоксивинилглицин, которые добавлялись в питательные среды, что способствовало повышению эмбриогенеза (Prem et al., 2005, 2008; Na et al., 2011). В некоторых работах показан положительный эффект предобработки микроспор растений рода *Brassica* антиауксином PCIB (3-хлорфеноксиизомасляная кислота), который уменьшает ауксин-индуцированное образование этилена (Agarwal et al., 2006; Ahmadi et al., 2012). Понижение концентрации этилена также возможно при добавлении в питательные среды полимера Pluronic F-68, что позволяет индуцировать эмбриогенез у неотзывчивых генотипов *B. napus* (Barbulescu et al., 2011).

Положительное влияние на образование и развитие эмбриоидов в культуре микроспор растений рода *Brassica* могут оказывать брассиностероиды (Ferrie et al., 2005; Belmonte et al., 2010). Не менее важную физиологическую роль играет pH питательной среды. В исследованиях Yuan с соавт. (2012) было показано, что относительно высокое значение pH питательной среды (6,2–6,4) более эффективно для индукции эмбриогенеза из микроспор у большинства генотипов капусты белокочанной по сравнению с pH 5,8. Наилучший результат в этом исследовании был получен при использовании питательной среды NLN 13 (pH 6,4), дополненной 10 мг арабиногалактонового белка и 3 μM 2-(N-морфолино) этансульфоновой кислоты (MES) в качестве буфера. Эффективность эмбриогенеза при этом возросла с 4,5 до 22,9 эмбриоидов/бутон. Требование к более высоким значениям pH среды, по-видимому, объясняется физиологическими особенностями пыльцы капустных культур, которая способна прорастать на искусственных питательных средах при значениях pH 8–9 в зависимости от сортообразца (Бунин и др., 2003).

Условия выращивания донорных растений также влияют на эмбриогенез. Так, выход эмбриоидов, полученных в культуре микроспор от растений рапса, растущих при 12–15 °C вместо 18–23 °C при световом периоде 16/8 ч, был выше (Lo, Pauls, 1992).

Зависимость эмбриогенеза от генотипа показана для капусты брюссельской (Ockendon, 1985), капусты цветной (Ockendon, 1988) и брокколи (Orton, Browers, 1985; Wang et al., 1999).

Факторы, влияющие на регенерацию растений

Вторая составляющая часть протокола DH-технологии – регенерация растений из эмбриоидов – также требует усовершенствования, так как частота получения полноценных растений бывает низкой и непостоянной. Большинство эмбриоидов подвержено аномальному развитию, такому как нарушение пролиферации клеток гипокотиля и семядолей и образование вторичных

эмбриоидов. По литературным данным, ряд предобработок эмбриоидов пониженными температурами, гибберелловой кислотой (ГК), абсцизовой кислотой (АБК) и подсушиванием (обезвоживанием) повышают регенерацию растений (Kott, Beversdorf, 1990; Huang et al., 1991; Cegielska-Taras et al., 2002; Zhang et al., 2006). Культивирование эмбриоидов на подкладке из фильтровальной бумаги поверх агаризованной среды или среды, содержащей высокие концентрации желирующих веществ, также повышало регенерацию (Takahata, Keller, 1991; Takahashi et al., 2012).

Регуляторы роста, такие как этилен, АБК, β-индолилуксусная кислота (ИУК), могут также играть ключевую роль в улучшении качества апикальной меристемы стебля. Во многих соматических эмбриогенных системах дефицит этилена способствует каллусообразованию и росту. И наоборот, стимулирование биосинтеза этилена оказывает положительное влияние на формирование соматических эмбриоидов (Chen, Chang, 2003).

В зиготических эмбриоидах рапса латеральное разрастание семядолей находится под влиянием локальной аккумуляции этилена в 20-дневных культурах. Позже второй пик концентрации этилена наблюдается во время стадии обезвоживания зародышей семени. У эмбриоидов такого же возраста, полученных из микроспор, второй пик концентрации этилена значительно ниже. У них отсутствуют обезвоживание и стадия покоя, типичные для зиготических эмбриоидов. Различие в количестве этилена, наблюдаемое между зиготическим эмбриоидом и эмбриоидом из микроспор у рапса, по всей видимости, может быть причиной разрастания семядолей у последнего (Hays et al., 2001).

Многие другие примеры иллюстрируют решающую роль правильной гормональной регуляции во время развития. Ауксины ответственны за симметричный переход от глобулярного до сердечковидного эмбриоида. Отсутствие необходимого уровня ауксинов препятствует удлинению гипокотиля во время перехода от торпеды к семядольной стадии (Yeung, Ramesar-Fortner, 2006). У эмбриоидов рапса из микроспор уровень ИУК ниже, чем у зиготических эмбриоидов. Зиготические эмбриоиды рассматриваются как источник этого ауксина в ответ на регуляторные сигналы, идущие от других тканей семени, из которых ИУК экспортируется по всему растению. Таким образом, анормальный уровень, на-блюдаемый у андрогенных эмбриоидов, может происходить из-за отсутствия материнских окружающих тканей (Hays et al., 2000).

Другой гормон со значительной морфогенной ролью, АБК – синтезируется в вегетативных частях растений, транспортируется в семена, где накапливается в эндосперме и кожуре. Было показано, что поддержание правильного, регулируемого эндогенного уровня АБК, а также ИУК связано с соматическим эмбриогенным ответом у разных видов растений (Feher et al., 2003). Во время зиготического эмбриогенеза АБК, в частности, вовлечена в поддержание морфологической целостности ранних эмбриоидов, а также последних стадий созревания, обезвоживания и сохранения питательных элементов. Абсолютный уровень АБК в эмбриоидах из микроспор ниже по сравнению с зиготическими у тех же самых видов (Hays et al., 2001). В ряде работ дефицит АБК в эмбриоидах, полученных из микроспор, был компенсирован добавлением экзогенного гормона, что способствовало увеличению числа нормально развивающихся эмбриоидов *B. napus* и *B. oleraceae* (Rudolf et al., 1999; Yeung, Ramesar-Fortner, 2006; Yadollani et al., 2011).

Несмотря на ограниченные и фрагментарные данные, связанные с эмбриогенным развитием микроспор, сегодня получение DH-линий растений семейства *Brassicaceae* с помощью биотехнологических методов, таких как культура микроспор, широко востребовано селекционными компаниями развитых стран. Главным преимуществом DH-технологий по сравнению с традиционной селекцией является снижение временных затрат на получение гомозиготного материала и сокращение площадей, занятых под селекционными посевами, что обеспечивает значительное понижение стоимости вновь создаваемых сортов и гибридов.

Внедрение DH-технологий в селекционный процесс требует надежных и недорогих протоколов культуры клеток. Несмотря на то что в получении гаплоидов у растений рода *Brassica* достигнуты большие успехи, тем не менее существует множество факторов, которые могут способствовать улучшению и оптимизации DH-технологий. Необходимо более глубокое фундаментальное понимание процессов индукции эмбриогенеза микроспор и развития гаплоидных растений, которое будет обеспечивать высокую эффективность получения DH-линий у высокоотзывчивых генотипов и сокращать число неотзывчивых сортообразцов. Чем больше микроспор будет вовлечено в эмбриогенез, тем большее разнообразие новых генотипов будет доступно селекционеру.

Таким образом, необходимо, чтобы значительные инвестиции, направленные в сельскохозяйственные исследования, были сфокусированы на поддержку научных проектов, направленных на повышение эффективности DH-технологий сельскохозяйственных растений.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Бунин М.С., Шмыкова Н.А., Степанов В.А. Методы репродуктивной биологии в селекции овощных культур рода *Brassica* L. М.: ВО Минсельхоза России, 2003:3-21.

Зубарева И.А., Головешкина Е.Н., Виноградова С.В., Грибова Т.Н., Монахос С.Г., Игнатов А.Н. Создание дигаплоидных линий *Brassica napus* L. – доноров устойчивости к вирусу мозаики турнепса. С.-х. биология. 2013;5:122-124.

Калашникова Е.А., Чунг М.Д., Соловьев А.А., Шевелуха В.С. Технология получения дигаплоидных растений рода *Brassica in vitro*. Докл. РАСХН. 2011;1:5-8.

Шмыкова Н.А. Разработка системы биотехнологических методов, направленных на ускорение селекционного процесса овощных культур: Автореф. дис. … д-ра с.-х. наук. М., 2006.

Agarwal P.K., Agarwal P., Custers J.B.M., Liu C., Bhojwan S.S. PCIB an antiauxin enhances microspore embryogenesis in microspore culture of *Brassica juncea.* Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2006;86:201-210. DOI 10.1007/s11240-006-9108-0.

Ahmadi B., Alizadeh K., da Silva J.A.T. Enhanced regeneration of haploid plantlets from microspores of *Brassica napus* L. using bleomycin, PCIB, and phytohormones. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2012;109:525-533. DOI 10.1007/s11240-012-0119-8.

Baillie A.M.R., Epp D.J., Hutcheson D., Keller W.A. *In vitro* culture of isolated microspores and regeneration of plants in *Brassica campestris.* Plant Cell Rep. 1992;11:234-237.

Barbulescu D.M., Burton W.A., Salisbury P.A. Pluronic F-68: an answer for shoot regeneration recalcitrance in microspore-derived *Brassica napus* embryos. *In Vitro* Cell Dev. Biol. Plant. 2011;47:282-288. DOI 10.1007/s11627-011-9353-8

Belmonte M., Elhiti M., Waldner B., Stasolla C. Depletion of cellular brassinolide decreases embryo production and disrupts the architecture of the apical meristems in *Brassica napus* microspore-derived embryos. J. Exp. Bot. 2010;61:2779-2794. DOI: 10.1093/jxb/erq110

Bhowmik P., Dirpaul J., Polowick P., Ferrie A.M.R. A high throughput *Brassica napus* microspore culture system: influence of percoll gradient separation and bud selection on embryogenesis. Plant Cell Tissue Org. Cult. 2011;106:359-362. DOI: 10.1007/s11240-010-9913-3

Binarova P., Straatman K., Hause B., Hause G., van Lammeren A.A.M. Nuclear DNA synthesis during the induction of embryogenesis in cultured microspores and pollen of *Brassica napus* L. Theor. Appl. Genet. 1993;87:9-16.

Cao M.Q., Li Y., Liu F., Dore C. Embryogenesis and plant regeneration of pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) via *in vitro* isolated microspore culture. Plant Cell Rep. 1994;13:447-450.

Cegielska-Taras T., Tykarska T., Szala T., Kuras M., Krzymanski J. Direct plant development from microspore-derived embryos of winter oilseed rape *Brassica napus* L. ssp. *oleifera* (DC.) Metzger. Euphytica. 2002;124:341-347.

Chanana N.P., DhawanV.V., Bhojwani S.S. Morphogenesis in isolated microspore cultures of *Brassica juncea.* Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2005;83:169-177. DOI: 10.1007/s11240-005-4855-x

Charne D.G., Beversdorf W.D. Improving microspore culture as a rapeseed breeding tool: the use of auxins and cytokinins in an induction medium. Can. J. Bot. 1988;66:1671-1675.

Chen J.T., Chang W.C. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid enhanced direct somatic embryogenesis from *Oncidium* leaf cultures. Biol. Plant. 2003;46:455-458.

Chun C., Park H., Na H. Microspore-derived embryo formation in radish (*Raphanus sativus* L.) according to national and environ mental conditions. Hort. Environ. Biotechnol. 2011;52:530-535. DOI:10.1007/s13580-011-0080-1

Cordewener J.H.G., Hause G., Gorgen E., Busink R., Hause B., Hans J.M., Dons H.J.M., van Lammeren A.A.M., van Lookeren Campagne M.M., Pechan P. Changes in synthesis and localization of members of the 70-kDa class of heat-shock proteins accompany the induction of embryogenesis in *Brassica napus* L. microspores. Planta. 1995;196:747-755.

Custers J.B.M., Cordewener J.H.G, Nollen Y., Dons H.J.M., van Lookeren Campagne M.M. Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus.* Plant Cell Rep. 1994;13:267-271.

Dias J.C.S. Effect of activated charcoal on *Brassica oleracea* microspore culture embryogenesis. Euphytica. 1999;108:65-69.

Dias J.C.S. Effect of incubation temperature regimes and culture medium on broccoli microspore culture embryogenesis. Euphytica. 2001;119:389-394.

Dias J.C.S., Martins M.G. Effect of silver nitrate on anther culture embryo production of different *Brassica oleracea* morphotypes. Sci. Hort. 1999;82:299-307.

Duijs J.C., Voorrips R.E., Visser D.L., Custers J.B.M. Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* L. Euphytica. 1992;60:45-55.

Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. Plant Biotechnol. J. 2010;8:377-424. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x

Dunwell J.M., Cornish M., De Courcel A.G.L. Influence of genotype, plant growth temperature and anther incubation temperature on microspore embryo production in *Brassica napus* ssp. *oleifera.* J. Exp. Bot. 1985;36:679-689.

Feher A., Pasternak T.P., Dudits D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2003;74:201-228.

Ferrie A.M.R. Microspore culture of *Brassica* species. Doubled haploid production in crop plants (Ed. M. Maluszynski et al.). Kluwer, Dordrecht. 2003:205-215.

Ferrie A.M.R., Dirpaul J., Krishna P., Krochko J., Keller W.A. Effects of brassinosteroids on microspore embryogenesis in *Brassica* species. *In Vitro* Cell Dev. Biol. Plant. 2005;41:742-745. DOI: 10.1079/IVP2005690

Ferrie A.M.R., Taylor D.C., MacKenzie S.L., Keller W.A. Microspore embryogenesis of high sn-2 erucic acid *Brassica oleracea* germplasm. Plant Cell Tissue Organ Cult. 1999;57:79-84.

Fridborg G., Pedersen M., Landstrom A., Eriksson T. The effect of charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. Physiol Plant. 1978;43:104-106.

Gland F., Lichter R., Schweiger H.G. Genetic and exogenous factors affecting embryogenesis in microspore cultures of *Brassica napus* L. J. Plant Physiol. 1988;132:613-617.

Goldberg R.B., Beals T.P., Sanders P.M. Anther development: basic principles and practical applications. Plant Cell. 1993;5:1217-1229.

Gu H.H., Hagberg P., Zhou W.J. Cold pretreatment enhances microspore embryogenesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.). Plant Growth Regul. 2004;42:137-143.

Guo Y.D., Pulli S. High-frequency embryogenesis in *Brassica campestris* microspore culture. Plant Cell Tiss Org Cult. 1996;46:219-225.

Halkjaer M., Ringgaard S. Microspore culture in *B. oleracea* L. COST-824: Gametic Embryogenesis Workshop, Book of Abstracts. Sjusjoen, Norway, 1997.

Hause G., Hause P., Pehan P., van Lammeren A.A.M. Cytoskeleton changes and induction of embryogenesis in microspore and pollen cultures of *Brassica napus* L. Cell Biol. Int. 1993;17:153-166.

Hays D.B. Mandel R.M., Pharis R.P. Hormones in zygotic and microspore embryos of *Brassica napus.* Plant Growth Regul. 2001;35:47-58.

Hays D.B., Reid D.M., Yeung E.C., Pharis R.P. Role of ethylene in cotyledon development of microspore-derived embryos of *Brassica napus*. J. Exp. Bot. 2000;51:1851-1859. DOI:10.1093/jexbot/51.352.1851

Huang B., Bird S., Kemble R., Miki B., Keller W. Plant regeneration from microspore-derived embryos of *Brassica napus*: effect

of embryo age, culture temperature, osmotic pressure, and abscisic acid. *In Vitro* Cell Dev. Biol. 1991;27:28-31.

Huang B., Bird S., Kemble R., Simmonds D., Keller W., Miki B. Effects of culture density, conditioned medium feeder cultures on microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. Plant Cell Rep. 1990;8:594-597.

Ilic-Grubor K., Attree S.M., Fowke L.C. Comparative morphological study of zygotic and microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. as revealed by scanning electron microscopy. Ann. Bot. 1998;82:157-165.

Johansson L. Effects of activated charcoal in anther cultures. Physiol. Plant. 1983;59:397-403.

Keller W.A., Armstrong K.C. Stimulation of embryogenesis and haploid production in *Brassica campestris* anther cultures by elevated temperature treatments. Theor. Appl. Genet. 1979;55:65-67.

Keller W.A., Armstrong K.C. Production of anther-derived dihaploid plants in autotetraploid marrowstem kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*). Can. J. Genet. Cytol. 1981;23:259-265.

Keller W.A., Armstrong K.C. Production of haploids via anther culture in *Brassica oleracea* var. *italica* of Broccoli. Plant Breed. 1983;32:151-159.

Kott L., Beversdorf W.D. Enhanced plant regeneration from microspore-derived embryos of *Brassica napus* by chilling, partial desiccation and age selection. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 1990;23:187-192.

Kott L.S., Polsoni L., Beversdorf W.D. Cytological aspects of isolated microspore culture in *Brassica napus*. Can. J. Bot. 1988;66: 1658-1664.

Langowska T. Effect of activated carbon and brown coal suspensions for growth and development of *Scenedes musobliquus* (Sc.449). Pol. Arch. Hydrobiol. 1980;27:125-136.

Lee S.S., Kim A.J. Effect of cultural vessel, plant growth regulator, illuminating and shaking on embryo induction and growth in microspore culture of heading Chinese cabbage. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 2000;41:16-20.

Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Z. Pflanzenphysiol. 1982;105:427-434.

Lichter R. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different *Brassicacea* species. Plant Breeding. 1989;103:119-123.

Lionneton E., Beuret W., Delaitre C., Rancillac M. Improved microspore culture and doubled-haploid plant regeneration in the brown condiment mustard (*Brassica juncea*). Plant Cell Rep. 2001;20:126-130.

Lo K.H., Pauls K.P. Plant growth environment effects on rapeseed microscope development and culture. Plant Physiol. 1992;99: 468-472.

Margale E., Chevre A.M. Factors effecting embryo production from microspore culture of *Brassica nigra* (Koch). Cruciferae Newslett. 1991;14(15):100-101.

Mathias R. An improved *in vitro* procedure from embryoids derived from isolated microspores of rape (*Brassica napus* L.). Plant Breeding. 1988;100:320-322.

Mollers C., Iqbal M.C.M., Robbelen G. Efficient production of doubled haploid *Brassica napus* plants by colchicines treatment of microspores. Euphytica. 1994;75:95-104.

Na H., Kwak J.H., Chun C. The effect of plant growth regulators, activated charcoal and $AgNO_3$ on microspore derived embryo formation in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). Hort. Environ. Biotechnol. 2011;52(5):524-529. DOI: 10.1007/s13580-011-0034-7

Ockendon D.J. Anther culture in Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*). I. Embryo yields and plant regeneration. Ann. Appl. Biol. 1984;105:285-291.

Ockendon D.J. Anther culture in Brussels sprouts *(Brassica oleracea* var. *gemmifera*). II. Effect of genotype on embryo yields. Ann. Appl. Biol. 1985;107:101-104.

Ockendon D.J. The ploidy of plants obtained from anther culture of cauliflowers (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). Ann. Appl. Biol. 1988;113:319-325.

Orton T.J., Browers M.A. Segregation of genetic markers among plants regenerated from cultured anthers of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). Theor. Appl. Genet. 1985;69:637-643.

Osolnik B., Bohanes B., Jelaska S. Stimulation of androgenesis in white cabbage (*Brassica oleracea var. capitata*) anthers by low temperature and anther dissection. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 1993;32:241-246.

Palmer C.E., Keller W.A., Arnison P.G. Experimental haploidy in *Brassica* species. *In vitro* haploid production in higher plants (Ed. S.M. Jain et al.). V. 3: Important selected plants. Kluwer. Dordrecht. 1996:143-171.

Pechan P.M., Bartels D., Brown D.C.W., Schell J. Messenger-RNA and protein changes associated with induction of *Brassica* microspore embryogenesis. Planta. 1991;184:161-165.

Pechan P.M., Keller W.A. Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus.* Physiol. Plant. 1988;74:377-384.

Pechan P.M., Smykal P. Androgenesis: affecting the fate of the male gametophyte. Physiol. Plant. 2001;111:1-8. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110101.x

Prem D., Gupta K., Agnihotri A. Effect of various exogenous and endogenous factors on microspore embryogenesis in Indian mustard (*Brassica juncea* [L.] Czern & Coss). *In vitro* Cell Dev. Biol. Plant. 2005;41:266-273. DOI: 10.1079/IVP2005636

Prem D., Gupta K., Sarkar G., Agnihotri A. Activated charcoal induced high frequency microspore embryogenesis and efficient doubled haploid production in *Brassica juncea*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2008;93:269-282. DOI: 10.1007/s11240-008-9373-1

Rudolf K., Bohanec B., Hansen M. Microspore culture of white cabbage, *Brassica oleracea* var. *capitata* L.: genetic improvement of non-responsive cultivars and effect of genome doubling agents. Plant Breeding. 1999;118:237-241.

Sato S., Katoh N., Iwai S., Hagimori M. Effect of low temperature pretreatment of buds or inflorescence on isolated microspore culture in *Brassica rapa* (syn. *B. campestris*). Breed. Sci. 2002;52: 23-26. http://dx.doi.org/10.1270/jsbbs.52.23

Simmonds D.H., Keller W.A. Significance of pre-prophase bands of microtubules in the induction of microspore embryogenesis of *Brassica napus.* Planta. 1999;208:383-391.

Smith D.L., Krikorian A.D. Somatic pro-embryo production from excised wounded zygotic carrot embryos on hormone free medium; evaluation of the effects of pH, ethylene and activated charcoal. Plant Cell Rep. 1990;9:34-37.

Sopory S., Munshi M. Anther culture. *In vitro* haploid production in higher plants (Ed. J.M. Mohan et al.). Dordrecht: Kluwer, 1996;1:145-176.

Takahata Y., Keller W.A. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore cultures of *Brassica oleracea* L. Plant Sci. 1991;74:235-242.

Takahata Y., Komatsu H., Kaizuma N. Microspore culture of radish (*Raphanus sativus* L.): influence of genotype and culture conditions on embryogenesis. Plant Cell Rep. 1996;16:163-166.

Takahashi Y., Yokoi S., Takahata Y. Improvement of microspore culture method for multiple samples in *Brassica.* Breed. Sci. 2012;61:96-98. http://dx.doi.org/10.1270/jsbbs.61.96.

Telmer C.A., Simmonds D., Newcomb W. Determination of developmental stage to obtain high frequencies of embryogenic microspores in *Brassica napus.* Physiol. Plantarum. 1992;84:417-424.

Wang M., Farnham M.W., Nannes J.S.P. Ploidy of broccoli regenerated from microspore culture versus anther culture. Plant Breed. 1999;118:249-252.

Wang T., Li H., Zhang J., Ouyang B., Lu Y.G., Ye Z.B. Initiation and development of microspore embryogenesis in recalcitrant purple flowering stalk (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *purpurea Hort*.) genotypes. Sci. Hortic. 2009;121:419-424. DOI:10.1016/j.scienta.2009.03.012

Weatherhead M.A., Burdon J., Henshaw G.G. Effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. Z. Pflanzenphysiol. 1979;94:399-406.

Winarto B., Teixeira da Silva J.A. Microspore culture protocol for Indonesian *Brassica oleracea.* Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2011;107:305-315. DOI:10.1007/s11240-011-9981-z

Yadollani A., Abdollani M.R., Moieni A. Effects of carbon source, polyethylene glycol and abscisic acid on secondary embryo induction and maturation in rapeseed (*Brassica napus* L.) microspore-derived embryos. Acta Physiol. Plant. 2011;33:1905-1912. DOI:10.1007/s11738-011-0738-4

Yeung E.C., Ramesar-Fortner N.S. Physiological influences in development and function of shoot apical meristem of microspore-derived embryos of *Brassica napus* «Topas». Can. J. Bot. 2006;84:371-384.

Yuan S.X., Su Y.B., Liu Y.M., Fang Z.Y., Yang L.M., Zhuang M., Zhang Y.Y., Sun P.T. Effects of pH, MES, arabinogalactan-proteins on microspore cultures in white cabbage. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2012;110:69-76. DOI:10.1007/s11240-012-0131-z

Zaki M., Dickinson H. Modification of cell development *in vitro* – the effects of colchicines on anther and isolated microspore culture in *Brassica napus.* Plant Cell Tiss. Org. Cult. 1995;40:255-270.

Zaki M., Dickinson H.G. Structural changes during the first division of embryos resulting from anther and microspore culture in *Brassica napus.* Protoplasma. 1990;156:149-162.

Zhang G., Zhang D., Tang G., He Y., Zhou W. Plant development from microspore-derived embryos in oilseed rape as affected by chilling, desiccation and cotyledon excision. Biol. Plant. 2006;50:180-186.

Zhang W., Qiang F., Xigang D., Manzhu B. The culture of isolated microspores of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and the importance of genotype to embryo regeneration. Sci. Hortic. 2008;117:69-72. DOI:10.1016/j.scienta.2008.03.023

Zhou W.J., Hagberg P., Tang G.X. Increasing embryogenesis and doubling efficiency by immediate colchicine treatment of isolated microspores in spring *Brassica napus.* Euphytica. 2002;128:27-34.

Метаболомный подход к оценке сортовой специфичности семян *Brassica napus* L.

Г.Н. Смоликова[1], А.Л. Шаварда[1, 2], И.В. Алексейчук[1], В.В. Чанцева[1], С.С. Медведев[1]

[1] Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; [2] Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Современные молекулярно-биологические исследования характеризуются применением совокупности методологических платформ, позволяющих изучать организмы как на геномном и протеомном уровнях, так и на уровне метаболомов. Однако для обоснования возможности применения метаболомного анализа в селекции необходимо проведение исследований на широком спектре видов и сортов растений. В данной работе с использованием метода газовой хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией, проведена оценка содержания низкомолекулярных метаболитов в семенах разных сортов рапса, которые относились к одной репродукции. В каждом метаболическом профиле было аннотировано по 168 соединений, из которых 52 идентифицировано. Идентифицированные соединения включали аминокислоты, органические и жирные кислоты, токоферолы, фитостеролы. Обработка полученных данных осуществлялась методами мультивариантной статистики: методом главных компонент (МГК), методом дискриминантного анализа проекций на латентные структуры (ПЛС-ДА) и методом множественного регрессионного анализа проекций на латентные структуры. Созданные МГК и ПЛС-ДА модели демонстрировали достоверные различия между метаболомами исследованных сортов рапса. Наиболее значимый вклад в формирование моделей вносили аминокислоты и органические кислоты. Суммарный процент объясненной информации для МГК и ПЛС-ДА моделей составил в среднем 65 %. Достоверность ПЛС-ДА модели, согласно перекрестной проверке по методу «венецианские жалюзи», составила 91,67 %. Таким образом, показано, что метаболомный подход может служить эффективным инструментом для идентификации сортовой принадлежности семян. Необходимым условием при этом является создание постоянно обновляемой базы метаболомных профилей, характерных для конкретных сортов. Применение дискриминантного анализа проекций на латентные структуры позволит сравнивать метаболомы неизвестных образцов семян с имеющимися в базе данных метаболомными профилями и на этой основе классифицировать новые образцы семян.

Ключевые слова: *Brassica napus* L., семена, газовая хроматография, масс-спектрометрия, метаболомика, метод главных компонент, дискриминантный анализ проекций на латентные структуры.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Смоликова Г.Н., Шаварда А.Л., Алексейчук И.В., Чанцева В.В., Медведев С.С. Метаболомный подход к оценке сортовой специфичности семян *Brassica napus* L. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):121-127.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Smolikova G.N., Shavarda A.L., Alekseichuk I.V., Chantseva V.V., Medvedev S.S. The metabolomic approach to the assessment of cultivar specificity of *Brassica napus* L. seeds. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii*–Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):121-127.

The metabolomic approach to the assessment of cultivar specificity of *Brassica napus* L. seeds

G.N. Smolikova[1], A.L. Shavarda[1, 2], I.V. Alekseichuk[1], V.V. Chantseva[1], S.S. Medvedev[1]

[1] Saint-Petersburg State University, St.-Petersburg, Russia; [2] V.L. Komarov Botanical Institute of the RAS, St.-Petersburg, Russia

Recent biomolecular studies tend to involve combinations of different methods and approaches that allow analyzing organisms on the genomic and proteomic levels, as well as on the level of metabolomics. However, in order to justify the use of the metabolomics techniques in plant breeding, it is important to perform comprehensive analysis of a broad range of species and varieties. In this study, we evaluated the contents of low-molecular-weight substances in seeds of different rapeseed cultivars by the gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) technique. For every metabolomic profile, we estimated 168 target substances, and 52 of them were unambiguously identified. These compounds included amino acids, organic and fatty acids, tocopherols, and phytosterols. In order to keep the data assay within the context of multivariate statistics, we used principal component analysis (PCA), partial least square discriminant analysis (PLS-DA), and partial least square regression (PLS-R). Subsequent analysis revealed a significant difference between the metabolomic profiles of the investigated rapeseed cultivars, with the primary role of the amino acids and organic acids. Noticeably, the PLS-DA model showed 65% of the explained variance and, according to the Venetian blinds cross-validation test, 91.67 % of the accuracy. Thus, we demonstrate the effectiveness of the metabolomics approach to the varietal identification of seeds. This strategy can be further improved with a continuously updated database of the metabolomic profiles of different species and cultivars. Application of the PLS-DA method will allow comparison of the metabolites of unknown samples with the existing profiles and, subsequently, identification of new seed samples.

Key words: *Brassica napus* L., seeds, gas chromatography, mass spectrometry, metabolomics, principal component analysis, projection to latent structures – discriminant analysis.

УДК 577.121:631.527.11:631.53.011.2
Поступила в редакцию 01.12.2014 г.
Принята к публикации 27.02.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: galina.smolikova@gmail.com

Термин «метаболомика» впервые был предложен Оливером в 1998 г. как метод функциональной геномики, позволяющий проследить поток информации от гена к функции (Oliver et al., 1998). Метаболом представляет собой совокупность низкомолекулярных метаболитов, содержание которых, с одной стороны, обусловлено генетически, а с другой стороны, зависит от адаптации организма к внешним факторам. Таким образом, метаболом можно рассматривать как биохимическую реализацию генотипа. Современные молекулярно-биологические исследования характеризуются применением различных методологий, позволяющих изучать растительные организмы не только на геномном и протеомном уровнях, но также и на уровне метаболома (Hollywood et al., 2006; Shulaev, 2006; Harrigan et al., 2007). Только совместное применение этих подходов позволяет комплексно подойти к изучению процессов, протекающих в живых системах, и является основой системной биологии (Афонников, Миронова, 2014).

В последние годы метаболомный подход начинает активно использоваться при создании новых и оценке уже существующих сортов сельскохозяйственно важных растений. При этом используются такие методы разделения веществ, как газовая хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография и капиллярный электрофорез. Для идентификации метаболитов используются масс-спектрометрия и ядерный магнитный резонанс. Сравнительный анализ метаболомных профилей был проведен для семян разных сортов кукурузы (Röhlig et al., 2009), клещевины (Pigott et al., 2011), нигеллы (Farag et al., 2014). Однако для обоснования возможности применения метаболомного анализа в селекции необходимо проведение подобных исследований на гораздо более широком спектре видов и сортов. При этом требуется также отработка методологии их сравнительной оценки с использованием мультивариантной статистики.

В данной работе проведен метаболомный анализ семян разных сортов рапса, основанный на газовой хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией. Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с использованием метода главных компонент, дискриминантного анализа проекций на латентные структуры и множественного регрессионного анализа проекций на латентные структуры.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись семена рапса (*Brassica napus* L.) разных сортов из коллекции Всероссийского института растениеводства им. Н.И. Вавилова: Юбилейный (к-5285), Sielecki (к-4371), Русская Кудья (к-336) и Оредеж-4 (к-5273). Семена всех сортов относились к одной репродукции – Тамбовская область, урожай 2012 г.

Оценка всхожести семян и развития проростков

Семена проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге в термостате при 2 °C в течение 7 сут. (по 50 семян в 4 повторностях). Всхожесть учитывали согласно ГОСТ 12038-84. На 7-е сутки прорастания подсчитывали количество нормально развитых проростков, ненормально развитых проростков и непроросших семян.

Проведение метаболомного анализа

Экстракцию метаболитов проводили в течение 7 дней в метаноле в герметически закрытых микропробирках типа эппендорф объемом 1,5 мл (SSI, США). Перед экстракцией семена взвешивали в количестве 10 семян на пробу, помещали в эппендорфы, растирали с добавлением небольшого количества метанола и далее доводили объем метанола до 1 мл. После экстракции эппендорфы центрифугировали при 3 000 g и переносили супернатант в виалы объемом 2 мл. Супернатант в виалах выпаривали до состояния тонкой пленки в вакуумном ротационном испарителе Eppendorf Concentrator Plus («Eppendorf», Германия).

Дериватизацию проводили методом исчерпывающего силилирования. Для этого выпаренные под вакуумом сухие метаболиты растворяли в пиридине, содержащем трикозан (nC_{23}) в качестве внутреннего стандарта. Силилирование проводили при помощи бис-триметилсилилтрифторацетамида, содержащего 1 % триметилхлоросилана (BSTFA+ TMCS, «Supelco», США) в сухом термоблоке при 100 °C в течение 15 мин.

Газовая хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией (ГХ-МС)

Определение концентраций метаболитов проводили методом ГХ-МС на газовом хроматографе Agilent 6850 GC, оснащенном квадрупольным масс-селективным детектором Agilent 5975B VL MSD («Agilent Technologies», США). Использовали неполярную капиллярную колонку DB-5HT (5 % фенилметилсилоксан, длина 30 м, внутренний диаметр 250 мкм, толщина пленки 0,1 мкм, J&W Scientific, США). Пробу вводили с помощью программируемого автоматического пробоотборника Agilent G4513A в режиме инжекции с делением потока 20 : 1 (Split); температура испарителя – 330 °C, давление − 60,3 кПа, скорость потока газа-носителя через испаритель − 23,9 мл/мин. Ионизацию веществ в камере масс-спектрометра осуществляли посредством электронного удара (70 эВ) при температуре ионизационной камеры 230 °C и температуре квадруполя 150 °C.

Идентификация метаболитов

Индексы удерживания веществ рассчитывали с помощью программы AMDIS (G. Mallard, «NIH») на основании данных по времени выхода нормальных углеводородов

Посевные качества семян и развитие семидневных проростков разных сортов рапса

Названия сортов	Масса 1000 семян, г	Всхожесть семян, %	% от всхожести	
			нормально развитые проростки	ненормально развитые проростки
Юбилейный	2,74 ± 0,04	98 ± 2	90 ± 3	8 ± 4
Sielecki	2,59 ± 0,17	96 ± 2	92 ± 2	4 ± 2
Русская Кудья	2,65 ± 0,06	94 ± 3	82 ± 2	12 ± 3
Оредеж-4	2,66 ± 0,12	92 ± 2	73 ± 5	19 ± 6

C10–C35. Вещества идентифицировали с использованием баз данных NIST/EPA/NIH 11 Mass Spectral Library (http://www.nist.gov/srd) и пользовательской библиотеки AMDIS, созданной на кафедре физиологии и биохимии растений СПбГУ. Разметку пиков хроматограмм выполняли в программе UniChrom 5.09.1034 (www.unichrom.com). Всего было размечено 168 пиков, из них идентифицировано 52. Неидентифицированные метаболиты размечали по индексу удерживания. Все 168 метаболитов были использованы для создания метаболомного профиля, представленного в виде матрицы содержания веществ (в мкг/г сырой массы).

Расчет содержания метаболитов проводили с использованием внутреннего стандарта (nC_{23}) без учета коэффициентов чувствительности.

Статистическая обработка данных и программное обеспечение

Все измерения проводили в 3 биологических повторностях. Статистическую обработку показателей всхожести семян проводили в MS Microsoft Excel 2007 с использованием стандартного пакета анализа данных. На графиках и в таблицах представлены средние арифметические значения величин и ошибка среднего арифметического.

Матрица данных для анализа основывалась на концентрациях метаболитов, которые предварительно были приведены к единичной дисперсии с помощью шкалирования по стандартным отклонениям.

Метаболомный профиль оценивался с использованием метода главных компонент (МГК), дискриминантного анализа проекций на латентные структуры (ПЛС-ДА, Projection to Latent Structures−Discriminant Analysis) и множественного регрессионного анализа проекций на латентные структуры (ПЛС-R).

Обработка данных метаболомного профиля осуществлялась в среде MS Microsoft Excel 2007 с использованием макроса Multibase (http://numericaldynamics.com) и в среде Matlab 8.14 (MathWorks) с использованием статистического пакета.

Достоверность модели ПЛС-ДА оценивалась согласно перекрестной проверке (Cross-Validation Test) по методу «венецианские жалюзи» (Ballabio, Consonni, 2013). Данный метод позволяет в автоматическом режиме рассчитать множество моделей ПЛС-ДА по аналогии с исходной, но без использования части данных. Практически это выражалось в том, что в каждой модели не было включено по одной повторности каждого сорта. Неиспользованная повторность являлась контролем, который далее был классифицирован на основании созданной модели. Точность классификаций была усреднена по всем моделям, общее число которых было максимизировано для имеющегося объема данных. Среднее значение точности классификаций характеризует способность ПЛС-ДА модели достоверно идентифицировать неизвестный метаболомный профиль по заданным параметрам.

Результаты

Оценка всхожести семян и развития проростков

Выбор сортов рапса для метаболомного анализа преследовал цель минимизировать вклад качества семян в содержание низкомолекулярных метаболитов с тем, чтобы акцентироваться только на сортовой специфичности. В связи с этим были отобраны сорта рапса одной репродукции, семена которых незначительно различались по всхожести. Как видно из таблицы, масса 1 000 семян у всех исследованных сортов находилась в пределах 2,6–2,7 г, а общее количество проросших семян варьировало от 92 до 98 %.

Однако более подробный анализ позволил установить, что отобранные сорта можно разделить на две группы. В первую группу были включены сорта Юбилейный и Sielecki, всхожесть семян у которых была равна 98 и 96 %, а количество нормально развитых проростков составляло 90 и 92 % соответственно. Во вторую группу были включены сорта Русская Кудья и Оредеж-4, всхожесть семян у которых была равна 94 и 92 %, а количество нормально развитых проростков составляло 82 и 73 % соответственно.

ГХ-МС анализ содержания низкомолекулярных метаболитов

ГХ-МС анализ низкомолекулярных метаболитов был проведен в экстрактах, полученных из целых семян рапса (Дополнительные материалы 1[1]).

В каждой хроматограмме было размечено по 168 компонентов, из которых по 52 компонента было идентифи-

[1] Дополнительные материалы см. в Приложении 3 по адресу: http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2015-04/appx3.pdf

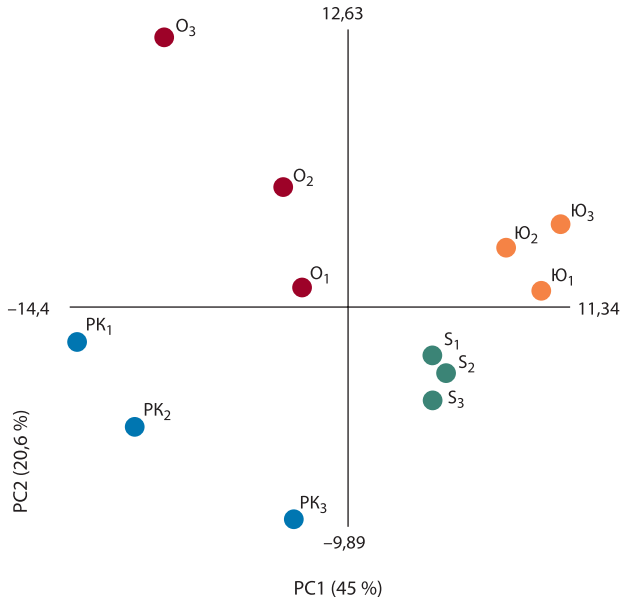


Рис. 1. Распределение семян разных сортов рапса на плоскости в координатах 1-й и 2-й главной компонент ($ГК_1$ и $ГК_2$ соответственно), рассчитанное по методу главных компонент.

$РК_1$–$РК_3$ – сорт Русская Кудья; $О_1$–$О_3$ – сорт Оредеж-4; S_1–S_3 – сорт Sielecki; $Ю_1$–$Ю_3$ – сорт Юбилейный. Модель построена на основе анализа концентраций 168 метаболитов. $ГК_1$ – 45 % объясненной дисперсии; $ГК_2$ – 20,6 % объясненной дисперсии.

цировано. Идентифицированные соединения включали такие метаболиты, как аминокислоты, органические и жирные кислоты, токоферолы и фитостеролы. Неидентифицированные компоненты хроматограмм аннотировали с указанием их индекса удерживания. В эту группу были включены сахара, поскольку применяемая методология не позволяет осуществить их точную идентификацию. Исключение составила сахароза, присутствующая в семенах в больших количествах.

Для метаболомного анализа создавали матрицу, в которой в качестве наблюдений выступали варианты (по 3 повторности каждого сорта семян рапса), а в качестве параметров – названия аннотированных метаболитов. Таким образом, профиль включал 12 наблюдений, 168 параметров и 2 016 концентраций метаболитов. Далее полученный метаболический профиль был проанализирован методом главных компонент и методами дискриминантного и регрессионного анализа проекций на латентные структуры.

Метод главных компонент (МГК) относится к алгоритмам уменьшения размерности данных, которые позволяют отобразить многомерные данные на 2–3-мерной поверхности и тем самым делают их доступными для восприятия (Pearson, 1901). Метод заключается в том, что для каждого наблюдения все параметры располагают в Гильбертовом пространстве таким образом, чтобы параметры стали координатами, а каждое наблюдение было представлено единственной точкой в пространстве. В нашем эксперименте было создано многомерное пространство из 168 координат, на котором представлено 12 точек. При этом расположение каждой точки в системе координат зависело от концентраций всех содержащихся в образцах метаболитов. Далее прокладывалась первая главная компонента ($ГК_1$) с таким условием, чтобы сумма квадратов расстояний от нее до всех точек была минимальна. Вторая главная компонента ($ГК_2$) была отложена перпендикулярно первой с тем же условием минимизации расстояний. Таким образом, все данные нашей матрицы, состоящей из показателей концентраций 2 016 метаболитов, оказались отображены на 2-мерной плоскости (рис. 1).

Алгебраически модель основана на следующем уравнении:

$$X = T \times P^t + E = \sum_{u=1}^{A} t_u \times p_u^t + E,$$

где X – матрица предобработанных (нормированных и центрованных) метаболомных данных размерностью $I \times J$, каждая строка (I) – наблюдение/образец и каждый столбец (J) – параметр/метаболит; T – матрица счетов (координат в новом пространстве) размерностью $I \times A$; P – матрица нагрузок (коэффициентов метаболитов) размерностью $J \times A$; E – матрица остатков/ошибок; A – число рассчитываемых главных компонент; t – главные компоненты, p – параметры главных компонент.

Особенностью МГК является то, что он относится к методам анализа данных «без учителя»: возможные различия по степени важности между отдельными метаболитами не принимаются во внимание и все параметры учитываются в равной степени.

На основании проведенного анализа можно видеть, что точки, являющиеся отражением метаболомов семян, объединились в 4 класса, соответствующие 4 исследуемым сортам. На рис. 1 видно, что точки, соответствующие одному классу, не перекрываются и находятся в разных областях модели относительно 1-й и 2-й главных компонент. Это свидетельствует о достоверных различиях между сортами. Суммарный процент объясненной информации для МГК модели составил 65,6 % (45 % для $ГК_1$ и 20,6 % для $ГК_2$).

Как было сказано выше (см. табл. 1), семена исследуемых сортов по посевным качествам были разделены на две группы: 1) сорт Юбилейный и сорт Sielecki (всхожесть – 98 и 96 % соответственно); 2) сорт Русская Кудья и сорт Оредеж-4 (всхожесть – 94 и 92 % соответственно). Осуществив проекцию точек, соответствующих вышеуказанным сортам, на горизонтальную ось ($ГК_1$), можно видеть, что 1-я группа расположилась в положительной области оси, а 2-я группа – в отрицательной области. При этом проекции точек относительно горизонтальной оси разместились справа налево в следующем порядке: Русская Кудья и Оредеж-4 (94 и 92 %), Sielecki (96 %),

Юбилейный (98 %). Это позволяет нам высказать предположении, что $ГК_1$ является компонентой, отражающей динамику всхожести семян.

В Дополнительных материалах 2 показаны коэффициенты значимости идентифицированных метаболитов в формировании осей $ГК_1$ и $ГК_2$ и расположении точек описанной выше модели. Указанные коэффициенты могут иметь положительное или отрицательное значение в зависимости от их вклада в положительную или отрицательную области модели, при этом их значимость не зависит от знака и определяется только отклонением от нуля. Важно отметить, что положительная и отрицательная области пространства во многом условны и имеют, скорее, математическое, чем биологическое значение.

Так, например, можно видеть, что в расположение точек относительно положительной области $ГК_1$ наиболее значимый вклад внесли аланин, синаповая кислота, линолевая кислота, а также ряд органических кислот (фумаровая, малеиновая, яблочная, лимонная). Их коэффициент значимости составил 0,10. В расположение категорий в отрицательной области оси $ГК_1$ наиболее значимый вклад внесли мио-инозитол с коэффициентом значимости –0,11, а также этаноламин и фенилаланин с коэффициентами значимости –0,09. Как было сказано выше, $ГК_1$ можно характеризовать как компоненту, отражающую динамику всхожести семян. Поэтому можно ожидать, что содержание указанных соединений находится во взаимозависимости от всхожести семян.

Метод дискриминантного анализа проекций на латентные структуры (ПЛС-ДА), как и описанный выше метод главных компонент, является алгоритмом уменьшения размерности многомерных данных. Принципиальное отличие ПЛС-ДА от МГК состоит в том, что компоненты рассчитываются с учетом заранее определенных (дискриминированных) классов (Barker, Rayers, 2003). В связи с этим ПЛС-ДА относится к методам классификации данных «с учителем»: алгоритму заранее сообщается о принадлежности наблюдений к определенному классу; в результате теряется возможность «слепой» классификации данных, но появляется достоверность анализа значимости параметров относительно заданных классов. Модель ПЛС-ДА создается таким образом, чтобы разброс данных внутри каждого класса был минимальным, а разброс между классами – максимальным.

Математически ПЛС-ДА метод ищет оптимальное представление линейных отношений между независимыми переменными (в нашем случае концентрациями метаболитов) и зависимыми переменными (сортами). Модель основана на следующей системе уравнений:

$$\begin{cases} X = T \times P^t + E \\ Y = U \times Q^t + F \end{cases}$$
$$Cov(T,U) \rightarrow \max,$$

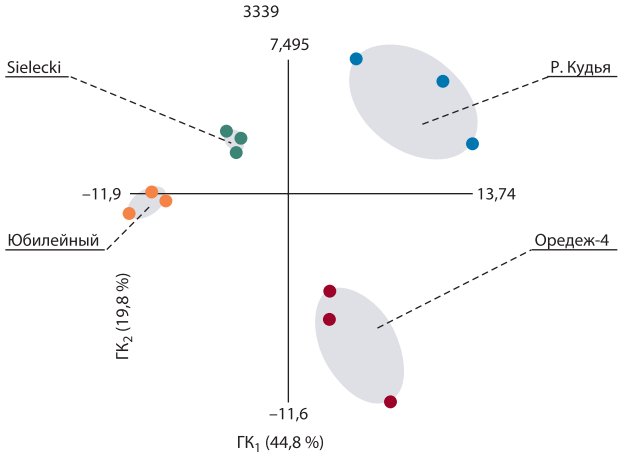


Рис. 2. Распределение семян рапса разных сортов на плоскости в координатах 1-й и 2-й главной компонент ($ГК_1$ и $ГК_2$ соответственно), рассчитанное по методу дискриминантного анализа проекций на латентные структуры.

Модель построена на основе анализа концентраций 168 метаболитов. $ГК_1$ – 44,8 % объясненной дисперсии; $ГК_2$ – 19,8 % объясненной дисперсии.

где X – матрица предобработанных (нормированных и центрованных) метаболомных данных размерностью $I \times J$, каждая строка (I) – наблюдение/образец и каждый столбец (J) – параметр/метаболит; Y – матрица ответов, описывающая принадлежность к классам размерностью $I \times L$; T и U – матрица проекций X и Y соответственно размерностью $I \times A$; P и Q – матрица нагрузок размерностью $J \times A$ и $L \times A$ соответственно; E и F – матрица остатков/ошибок. В ходе декомпозиции X и Y ковариация T и U максимизируется.

Для анализа данных методом ПЛС-ДА мы использовали тот же метаболомный профиль, что и для МГК анализа, но с одним отличием. Наблюдения предварительно были разделены на классы, соответствующие исследуемым сортам (Юбилейный, Sielecki, Русская Кудья, Оредеж-4). Таким образом, анализировались 4 класса, каждый из которых включал по 3 наблюдения (повторности).

Распределение классов на плоскости в координатах $ГК_1$ и $ГК_2$, рассчитанное по методу ПЛС-ДА, представлено на рис. 2. Можно видеть, что так же, как и в МГК модели, классы не перекрывались и расположились в разных областях двухмерной плоскости, что свидетельствует о достоверных различиях между ними. Суммарный процент объясненной информации практически не отличался от МГК модели и составил 64,6 % (44,8 % для $ГК_1$ и 19,8 % для $ГК_2$).

Достоверность ПЛС-ДА модели, оцененная по методу перекрестной проверки, составила 91,67 %.

Осуществив проекцию классов на горизонтальную ось $ГК_1$, можно видеть, что сорта разместились справа налево в следующем порядке: Юбилейный (98 %), Sielecki (96 %), Русская Кудья и Оредеж-4 (94 % и 92 %). То есть

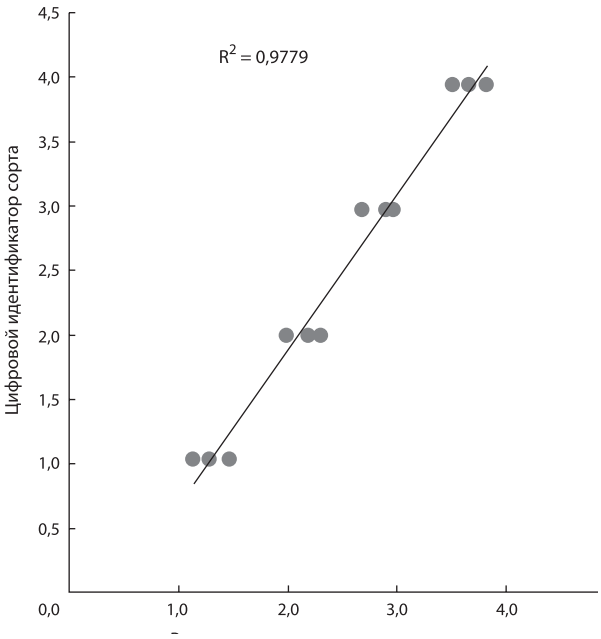


Рис. 3. Множественная регрессионная модель зависимости сортовой принадлежности семян рапса от совокупности концентраций низкомолекулярных метаболитов.

Цифровой идентификатор сорта: 1 – Юбилейный, 2 – Sielecki, 3 – Русская Кудья, 4 – Оредеж-4. Отношения реальных и рассчитанных значений представлены на графике. Модель построена на основе анализа концентраций 168 низкомолекулярных метаболитов, полученных методом ГХ-МС.
R^2 – коэффициент зависимости.

так же, как и в МГК модели, $ГК_1$ проявила себя как компонента, отражающая динамику всхожести семян.

Если МГК метод используется для выявления общих сходств или различий между объектами по всей совокупности их параметров, то ПЛС-ДА метод позволяет более эффективно выявлять соединения, которые связаны с конкретными различиями и тем самым могут являться маркерами дискриминированных классов (Jonsson et al., 2004). В Дополнительных материалах 3) приведены коэффициенты значимости идентифицированных соединений, на основании которых была построена ПЛС-ДА модель. Оказалось, что метаболиты, внесшие наибольший вклад в построение ПЛС-ДА модели, в значительной степени совпадали с результатами МГК модели, но с изменившимся знаком и более высокими коэффициентами значимости. Как уже было отмечено, знак коэффициента значимости метаболита в модели не имеет биологического значения, в то время как возросшее отклонение от нуля однозначно свидетельствует о более высокой чувствительности применяемого метода анализа.

В список наиболее значимых метаболитов можно включить аланин, синаповую, стеариновую, фумаровую кислоты (коэффициент значимости –0,11), малеиновую, лимонную и яблочную кислоты (коэффициент значимости –0,10), мио-инозитол и этаноламин (коэффициенты значимости 0,10 и 0,9).

Множественный регрессионный анализ

С целью обоснования возможности применения метаболомного анализа для оценки сортовой специфичности семян по алгоритму ПЛС дополнительно была рассчитана множественная регрессионная модель (рис. 3). Для этого каждому сорту был присвоен цифровой идентификатор от 1 до 4 и далее рассчитана множественная линейная зависимость между сортовой принадлежностью семян и содержащейся в них совокупностью концентраций низкомолекулярных метаболитов. Коэффициент детерминации реальных и рассчитанных значений сортовой принадлежности семян (R^2) составил 0,9779, что говорит о высокой степени линейной зависимости между анализируемыми факторами.

Таким образом, метаболомный подход может служить эффективным инструментом для идентификации сортовой принадлежности семян. Необходимым условием при этом является создание постоянно обновляемой базы метаболомных профилей, характерных для конкретных сортов семян.

Дальнейшее развитие данного подхода позволит использовать его для предсказания всхожести семян с неизвестной историей и оценки вклада метаболитов в формирование сортовых различий и всхожести.

Применение дискриминантного анализа проекций на латентные структуры позволяет сравнивать метаболомы неизвестных образцов семян с метаболомными профилями, существующими в базе данных, и на этой основе классифицировать новые образцы семян.

Благодарности

Авторы выражают благодарность заведующей лабораторией масличных культур А.В. Гавриловой и куратору коллекции рапса А.Г. Дубовской (Всероссийский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова) за предоставление семян рапса. Работа выполнена с использованием оборудования ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и поддержана грантами СПбГУ № 1.38.233.2014 и РФФИ № 14-04-01-624.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Афонников Д.А., Миронова В.В. Системная биология. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014;18(1):175-192.

Ballabio D., Consonni V. Classification tools in chemistry. Part 1: Linear models. PLS-DA. Analytical Methods. 2013;5:3790-3798. DOI: 10.1039/c3ay40582f

Barker M., Rayers W. Partial Least Squares for Discrimination. J. Chemometrics. 2003;17:166-173. DOI: 10.1002/cem.785

Farag M.A., Gad H.A., Heiss A.G., Wessjohann L.A. Metabolomics

driven analysis of six Nigella species seeds via UPLC-qTOF-MS and GC-MS coupled to chemometrics. Food Chem. 2014;151: 333-342. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.11.032

Harrigan G.G., Martino-Catt S., Glenn K.C. Metabolomics, metabolic diversity and genetic variation in crops. Metabolomics. 2007;3(3):259-272. DOI 10.1007/s11306-007-0076-0

Hollywood K., Brison D.R., Goodacre R. Metabolomics: current technologies and future trends. Proteomics. 2006;6(17):4716-4723. DOI: 10.1002/pmic.200600106

Jonsson P., Gullberg J., Nordstrom A., Kusano M., Kowalczyk M., Sjostrom M., Moritz T. A strategy for identifying differences in large series of metabolomic samples analyzed by GC/MS. Anal. Chem. 2004;76:1738-1745. DOI: 10.1021/ac0352427

Oliver S.G., Winson M.K., Kell D.B., Baganz R. Systematic functional analysis of the yeast genome. Trends Biotechnol. 1998;16: 373-378.

Pearson K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. Philos. Mag. 1901;2:559-572.

Pigott E.J., Roberts W., Ovenden S.P.B., Rochfort S., Bourne D.J. Metabolomic investigations of *Ricinus communis* for cultivar and provenance determination. Metabolomics. 2011. DOI: 10.1007/s11306-011-0355-7

Röhlig R.M., Eder J., Engel K.-H. Metabolite profiling of maize grain: differentiation due to genetics and environment. Metabolomics. 2009;5(4):459-477. DOI: 10.1007/s11306-009-0171-5

Shulaev V. Metabolomics technology and bioinformatics. Briefings in bioinformatics. 2006;7(2):128-139. DOI: 10.1093/bib/bbl012

Некоторые ограничения использования гена *cytb* митохондриальной ДНК как молекулярного маркера для филогенетических и популяционно-генетических исследований на примере рода *Apodemus*

А.Г. Лапинский[1], М.В. Павленко[2], Л.Л. Соловенчук[1], В.В. Горбачев[1]

[1] Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук, Магадан, Россия;
[2] Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

Интерпретация сигнала гена *cytb* мтДНК как молекулярного маркера в филогенетических и популяционно-генетических исследованиях может быть осложнена суммарным влиянием параллельных мутаций (энтропией нуклеотидных последовательностей), которые не позволяют в конечном итоге произвести дифференциацию эффектов гибридизации, естественного полиморфизма и артефактов, вносимых псевдогенами. Мы проанализировали возможные ограничения применения гена *cytb* мтДНК в качестве молекулярного маркера на примере некоторых представителей рода *Apodemus*, для чего были рассчитаны значения энтропии нуклеотидных последовательностей и выполнен поиск вероятных трактов генной конверсии для выборок разных видов из изолированного района Тибета, Кореи, юга Приморского края России и Западной Европы. Обнаружено значительное количество гаплотипов, содержащих мотивы, идентифицируемые как тракты генной конверсии. Выявлен высокий уровень изменчивости нуклеотидных последовательностей у видов с Тибетского нагорья, в наибольшей степени – у *A. draco*. Причинами этого явления могут быть влияние низкой эффективной численности на скорость накопления точечных мутаций, а также роль цитохрома b в процессах адаптации к неблагоприятным условиям среды. Рассмотрены эффекты гипервариабельности нуклеотидной последовательности гена *cytb* в некоторых выборках, ведущие к росту энтропии информационного сигнала этого молекулярного маркера, что может имитировать явления генной конверсии при сопоставлении с другими выборками представителей данного рода. Также приведены примеры вероятного присутствия в опубликованных нуклеотидных последовательностях продуктов секвенирования соответствующих псевдогенов. Высказано предположение, что стратегия использования гена *cytb* в популяционно-генетических и филогенетических исследованиях может различаться в зависимости от степени его вариабельности. Отмечена необходимость тщательного контроля за первичными данными на всех этапах работы с ними.

Ключевые слова: *Apodemus*, мтДНК, *cytb*, генная конверсия, энтропия, псевдоген.

Some limitations in the use of the mitochondrial DNA *cytb* gene as a molecular marker for phylogenetic and population genetic studies by the example of the *Apodemus* genus

A.G. Lapinski[1], M.V. Pavlenko[2], L.L. Solovenchuk[1], V.V. Gorbachev[1]

[1] Institute of the Biological Problems of the North, Far Eastern Branch of the RAS, Magadan, Russia; [2] Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch of the RAS, Vladivostok, Russia

The interpretation of a signal sent by the mtDNA *cytb* gene as a molecular marker in phylogenetic and population genetic research can be complicated by cumulative influence of parallel mutations, i.e., the entropy of nucleotide sequences. Such a phenomenon impedes differentiation among the effects of hybridization, natural polymorphisms, and artifacts imposed by pseudogenes. We analyzed possible limitations in the use of the mtDNA *cytb* gene as a molecular marker by the example of the *Apodemus* genus. For this purpose, the entropy of nucleotide sequences was calculated, and probable tracts of gene conversion were sought in samples of various *Apodemus* species from Tibet, Korea, south of Russian Primorye, and Western Europe. Many haplotypes were identified as containing tracts of gene conversion. The high level of nucleotide sequence variability was found in species from Tibet, particularly, in *A. draco*, presumably due to the influence of low effective sizes of populations on the speed of point mutation accumulation and also cytochrome b role in the adaptation to unfavorable environment. The effects of hypervariability in *cytb* nucleotide sequences of some samplings resulting in entropy growth imitating gene conversion when compared to other species of the genus were analyzed. Examples of possible pseudogene interference among published *cytb* sequences are provided. It is suggested that the strategy in the use of the mtDNA *cytb* gene in population genetics

УДК 575.174:577.212.3
Поступила в редакцию 16.10.2014 г.
Принята к публикации 26.02.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: agl@ibpn.ru

and phylogenetics should be adapted to the degree of the gene variability. Emphasis is placed on the necessity of close control over sequencing data.

Key words: *Apodemus*, mtDNA, *cytb*, gene conversion, entropy, pseudogene.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Лапинский А.Г., Павленко М.В., Соловенчук Л.Л., Горбачев В.В. Некоторые ограничения использования гена *cytb* митохондриальной ДНК как молекулярного маркера для филогенетических и популяционно-генетических исследований на примере рода *Apodemus*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):128-135.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Lapinski A.G., Pavlenko M.V., Solovenchuk L.L., Gorbachev V.V. Some limitations in the use of the mitochondrial DNA *cytb* gene as a molecular marker for phylogenetic and population genetic studies by the example of the *Apodemus* genus. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):128-135.

Филогеография и построение филогений являются актуальными направлениями в биологии (Avise, 2000). Исследования в этой области, помимо изучения биологического разнообразия, включают поиск молекулярных маркеров и разработку методов, адекватных задачам исследований. К числу часто используемых молекулярных маркеров относятся нуклеотидные последовательности митохондриальной ДНК (мтДНК). Среди последних ген цитохрома *b* (*cytb*) является, пожалуй, одним из наиболее изученных митохондриальных генов в отношении структуры и функции его белкового продукта (Esposti et al., 1993). Он содержит быстро и медленно мутирующие позиции кодонов так же, как более и менее вариабельные регионы и целые домены. Поэтому его нуклеотидная последовательность широко используется при изучении разнообразия и в систематике на уровнях от филогенетического (Irwin et al., 1991; Johns, Avise, 1998) до популяционного (см. Rocha-Olivares et al., 1999). В течение длительного времени ген *cytb* рассматривался в качестве едва ли не универсального молекулярного маркера (Avise, Johns, 1999).

Однако за последнее время его применение столкнулось с рядом проблем, таких как неоднозначность нуклеотидного состава, гетерогенность скорости замен у потомков (в различных митолиниях), ведущее к гомоплазии насыщение мутациями в третьей позиции кодонов и ограниченное варьирование замен в первых и вторых позициях, что подчас обусловливает низкую информативность в филогенетических исследованиях высокого ранга и достаточно малое для популяционно-генетических исследований количество информативных сайтов в третьей позиции (Meyer,1994).

Также опубликованы исследования, указывающие на вероятность интерференции соответствующих псевдогенов при секвенировании гена из-за трудности дифференциации сигналов от обеих последовательностей. Так, были приведены примеры построения ложных филогений, основанных на псевдогене *cytb*, в семействе Apodemus (Dubey et al., 2009), как и присутствия псевдогенов митохондриальных генов у некоторых полевок (De Woody et al., 1999) и других грызунов (Smith et al., 1992). Вероятно, число подобных работ будет множиться в связи с тенденцией появления в базах данных вместо участков мтДНК паралогичных последовательностей ядерного происхождения, не идентифицируемых как таковых (Calvignac et al., 2011).

Другое ограничение, менее изученное до настоящего времени, может заключаться в межвидовой гибридизации, ведущей к генной конверсии митохондриального генома из-за сбоя видоспецифичного механизма элиминации отцовской мтДНК после оплодотворения при межвидовом скрещивании (Kaneda et al., 1995), по крайней мере, в первом поколении (Shitara et al., 1998). Так, была показана генная конверсия участков материнских митохондриальных линий рыжих полевок (*Clethrionomys glareolus*) гомологичными участками мтДНК самцов красной полевки (*Cl. rutilis*) в зоне симпатрии этих видов (Малярчук, 2012). На проблему интрогрессии как присутствия гаплотипов чужого вида в зоне симпатрии указывает и Абрамсон (2007). Достаточно подробно перечисленные особенности маркеров на основе мтДНК проанализированы в обзоре В.В. Гречко (2013).

Сложность интерпретации выявляемого нуклеотидного сигнала осложнена суммарным влиянием параллельных мутаций (энтропией нуклеотидных последовательностей), которые не позволяют в конечном итоге произвести дифференциацию эффектов гибридизации, естественного полиморфизма и артефактов, вносимых псевдогенами. В популяционной генетике информация о количестве и длине трактов генной конверсии является ключевой для определения роли конверсии в генерации гаплотипического разнообразия (Ishii, Charlesworth, 1977; Leslie, Watt, 1986). Для определения вероятной конверсии генов наиболее распространенным является алгоритм, предложенный Betrán с соавт. (1997), использующий относительную частоту нуклеотида в сайте для определения, – является ли сайт информативным в плане конверсии между двумя группами нуклеотидных последовательностей. Сегрегирующий нуклеотид считается информативным, если его относительная частота составляет 20 % и менее в группе «конвертированных» последовательностей и в три или более раз выше в группе «конвертирующих» последовательностей. При этом длину тракта конверсии определяют два край-

них информативных сайта. Следует отметить, что тракты длиной в один нуклеотид не учитываются, поскольку они неотличимы от параллельных мутаций, хотя есть исследователи, придерживающиеся противоположной точки зрения (Bosch et al., 2004). Таким образом, с использованием гена *cytb* в качестве маркера связаны как минимум три группы факторов, энтропия нуклеотидных последовательностей, интерференция псевдогенов и генная конверсия, которые могут затруднять трактовку результатов исследования.

Систематика, филогения и филогеография представителей рода *Apodemus* в Евразии изучалась с привлечением самых разнообразных дифференцирующих критериев, таких как морфологические (Зыков, 2011), цитогенетические (Картавцева, 2002), биохимические (Filippucci et al., 2002), молекулярно-генетические, включая маркеры ядерного (Michaux et al., 2002; Докучаев и др., 2008) и митохондриального геномов. Среди последних ген *cytb* мтДНК используется наиболее часто (см. Michaux et al., 2005; Suzuki et al., 2008; Челомина, Атопкин, 2010; Sakka et al., 2010 и многие другие работы). Интерпретация результатов неоднозначна, что некоторыми авторами связывается с выявлением новых, ранее не описанных видов (Suzuki et al., 2008), хотя нельзя исключать, что несоответствие результатов некоторых исследований связано с особенностями молекулярных маркеров, из которых *cytb* мтДНК использовался в большинстве работ последнего времени.

Цель настоящей работы – проанализировать возможные ограничения применения гена *cytb* мтДНК в качестве молекулярного маркера в филогенетических и популяционно-генетических исследованиях на примере некоторых представителей рода *Apodemus*.

Материалы и методы

Материалом для данного исследования послужили представленные в GenBank нуклеотидные последовательности гена *cytb* мтДНК из выборок некоторых представителей рода *Apodemus* (см. Доп. материалы 1[1]): трех довольно изолированных видов китайских эндемиков с юго-восточной оконечности Тибетского нагорья: *A. latronum* (Fan et al., 2011), *A. ilex* (Liu et al., 2012), *A. draco* (Fan et al., 2012). Также были использованы последовательности фрагмента гена *cytb* из выборки *A. agrarius* с юга Приморского края (Переверзева, Павленко, 2014) и двух подвидов *A. agrarius* – корейской полевой мыши *A. agrarius coreae* и островной популяции *A. agrarius chejuensis* (Oh et al., 2013). Чисто европейский вид в настоящей работе представлен выборкой *A. sylvaticus* из Западной Европы (Dubey et al., 2009), в которой приведены последовательности как генов *cytb* мтДНК, так и соответствующих псевдогенов.

[1] Дополнительные материалы см. в Приложении 4 по адресу: http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2015-04/appx4.pdf

Поиск трактов генной конверсии в сравниваемых нуклеотидных последовательностях проводился с использованием программы DnaSP v. 5 (Librado, Rozas, 2009). Для расчета энтропии нуклеотидных последовательностей применялась программа BioEdit v. 7.0.5.3 (Hall, 1999) с алгоритмом расчета информационной энтропии (неопределенности) (H_x) по Шеннону (Shannon, 1948) как мерой вариабельности нуклеотида в каждой из позиций выровненных последовательностей по формуле:

$$H_{(\text{нуклеотид})} = -\sum_i P_i \log_2 P_i,$$

где P_i – частота, с которой i-й нуклеотид встречается в данной позиции (Schneider, Stephens, 1990).

Результаты и обсуждение

При сопоставлении выборок из трех видов, населяющих один и тот же ареал к юго-востоку от Тибета, были получены следующие результаты. Для *A. draco* и *A. ilex* найдено 68 гаплотипов, содержащих тракты, распознающиеся программой DnaSP как результат генной конверсии. Число таких трактов составило 33 между сайтами полной последовательности гена: 1062–1095, 12–1092, 135–699, 231–459, 231–589, 237–699, 243–531, 43–708, 279–813, 285–438, 285–459, 30–1092, 30–327, 369–1092, 396–687, 396–981, 438–708, 522–852, 531–1062, 531–561, 531–636, 531–699, 54–1092, 553–636, 57–396, 588–699, 66–396, 66–522, 699–1008, 699–786, 786–897, 813–981, 831–1033. Их длина варьировала от 30 (между позициями 531 и 561) до 1081 нуклеотида (позиции 12–1092). При этом 5 из 68 гаплотипов принадлежали *A. draco*, а остальные – *A. ilex*.

Количество гаплотипов, содержащих тракты генной конверсии, при сопоставлении выборок *A. latronum* и *A. draco* составило 25 (с длиной трактов от 7 до 40 нуклеотидов, Доп. материалы 2), а между *A. latronum* и *A. ilex* – 11, длина соответствующих трактов составила от 4 до 22 нуклеотидов. Число гаплотипов, которые можно было бы расценивать как конверсию гена *cytb* одного вида другим, примерно одинаково, что не позволяет говорить об ее направленности.

Между выборками *A. agrarius coreae* с юга Корейского полуострова и *A. draco* было обнаружено 12 участков генной конверсии, а для *A. agrarius coreae* и *A. latronum* – всего 3. Такие же результаты были получены при сопоставлении названных выборок с Тибетского нагорья и изолированной выборки *A. agrarius chejuensis* с острова Чеджу, возникшей предположительно вследствие постгляциальной изоляции от *A. agrarius coreae* (Oh et al., 2013).

Между выборками *A. draco* и *A. agrarius* с юга Приморского края было найдено 6 трактов генной конверсии: TTTATTTCTCCATGTAGGACGAGGAATA (279–306) для *A. agrarius* HQ343396 и FJ906768 и CTATTTTTCCCAGACC (730–745) для *A. draco* HM162824, HM162825, HM162826 и HM162827, тогда

как для выборок *A. latronum* и *A. agrarius* участков конверсии не оказалось.

Неожиданным стало сравнение выборок с Тибетского нагорья с выборкой *A. silvaticus* из Западной Европы. Если трактов генной конверсии между последней и *A. latronum* и *A. ilex* не оказалось, то при сравнении с выборкой *A. draco* их было найдено 8.

Мы также определили наличие участков генной конверсии между генами *cytb* и последовательностями соответствующих псевдогенов в выборке *A. sylvaticus* из Западной Европы. Таких трактов обнаружено 3. Нельзя с уверенностью судить, в каком направлении происходит конверсия между последовательностями гена и псевдогена, но очевидно, что этот процесс может оказывать влияние как на филогенетические, так и на популяционно-генетические построения, поскольку предполагается, что мутации в псевдогенах являются селективно нейтральными, в отличие от кодирующих генов мтДНК (Balakirev, Ayala, 2003).

Попарное сопоставление других рассмотренных выборок участков, распознаваемых как тракты, генной конверсии не выявило. Полученные результаты оказались достаточно трудно интерпретируемыми. Если исключительно высокое число эффектов, проявляющихся как генная конверсия, при сопоставлении выборок *A. draco* и *A. ilex* можно было бы трактовать как следствие гибридизации между весьма близкородственными видами из изолированного района симпатрии, то с этой позиции невозможно объяснить наличие одинакового количества гаплотипов, интерпретируемых как результат генной конверсии между выборками *A. draco* и *A. latronum*, с одной стороны, и *A. agrarius coreae* и *A. agrarius chejuensis* – с другой, учитывая островную изоляцию подвида *A. agrarius chejuensis* со времен последнего оледенения. Считать же 8 гаплотипов, обнаруженных при сопоставлении выборок *A. draco* из района, примыкающего с юго-востока к Тибету и *A. sylvaticus* из Западной Европы, как содержащие тракты «генной конверсии», на наш взгляд, абсурдно.

Поэтому мы предположили, что одной из причин найденных различий между изученными выборками представителей рода *Apodemus* были особенности их нуклеотидных последовательностей per se. Для их характеристики была проанализирована информативность сайтов нуклеотидных последовательностей каждой из выборок и построены соответствующие графики энтропии (рисунок, *а–е*). Как видно из графиков, ее значения высоки практически вдоль всей длины последовательности у *A. draco* (рисунок, *а*), менее выражены у *A. ilex* (рисунок, *б*) и *A. latronum* (рисунок, *в*) и организованы в несколько относительно редких доменов в выборках *A. agrarius* из юга Приморья (рисунок, *г*), *A. agrarius coreae* с юга Корейского полуострова (рисунок, *д*) и *A. sylvaticus* из Западной Европы (рисунок, *е*).

Можно предположить, что вариабельность нуклеотидной последовательности гена *cytb* у *A. draco* (и в меньшей степени у *A. ilex* и *A. latronum*) является следствием большого числа мутаций, накопленных видом, длительно существующим в условиях низкой численности и изоляции (Кимура, 1985; Sanford, 2006). О том, что скорость накопления точечных мутаций зависит от эффективной численности популяции, можно судить и по тому, что нуклеотидные последовательности гена у выборки из широкоареального вида *A. sylvaticus* из Западной Европы обладают наименьшей вырожденностью.

Также высокая вариабельность гена *cytb* у видов с Тибетского нагорья может быть связана с его ролью в обеспечении энергетических процессов при адаптации к неблагоприятным условиям. Так, нулевая гипотеза строгой нейтральности отвергалась с $P < 0{,}05$ для *A. draco* при 73 %, для *A. ilex* при 52 %, а для *A. latronum* – при 70 % попарных сравнений (codon based Z-test of selection, выполненный в программе Mega5) (Tamura et al., 2011). В этом отношении может показаться справедливым мнение Bosch с соавт. (2004), согласно которому точечные мутации длиной в один нуклеотид могут считаться генными конверсиями, поскольку формально отличить их от гипервариабельных сайтов не представляется возможным. Подтверждением сказанному может служить расчет параметра ψ (Betrán et al., 1997), измеряющего вероятность события конверсии между сравниваемыми выборками на сайт (т. е. вероятность того, что сайт окажется информативным). Значимость этого параметра при сравнении всех выборок с Тибетского нагорья оказалась довольно низкой: $P > 0{,}05$. Вероятность «ложноположительных» результатов определения трактов конверсии может проистекать и из-за реализованного в программе DnaSP условия, при котором вариант нуклеотида в конкретном сайте окажется информативным (Betrán et al., 1997). По этому условию, вероятность возникновения двух независимых параллельных мутаций на одной хромосоме принята $P \leq 0{,}2^2 = 0{,}04$. Понятно, что при названных предпосылках программа не сможет дифференцировать тракты генной конверсии от тех, которые возникли в результате параллельных мутаций в высоковариабельном регионе.

Дополнительным свидетельством в пользу того, что причина наблюдаемого эффекта кроется в чрезвычайной изменчивости нуклеотидных последовательностей гена *cytb* в образцах *A. draco*, является ее сравнение с двумя выборками *A. agrarius* – *A. agrarius coreae* и *A. agrarius chejuensis*, давшее одинаковые результаты, несмотря на то что две последние четко различаются популяционно-генетически (Oh et al., 2013). Очевидно, что «генная конверсия» между идентичными трактами у *A. draco* и обоих подвидов *A. agrarius* указывает на то, что она является следствием насыщения мутациями нуклеотидных последовательностей гена *cytb* у *A. draco*. Поэтому не имеет значения, используется ли эта выборка (как

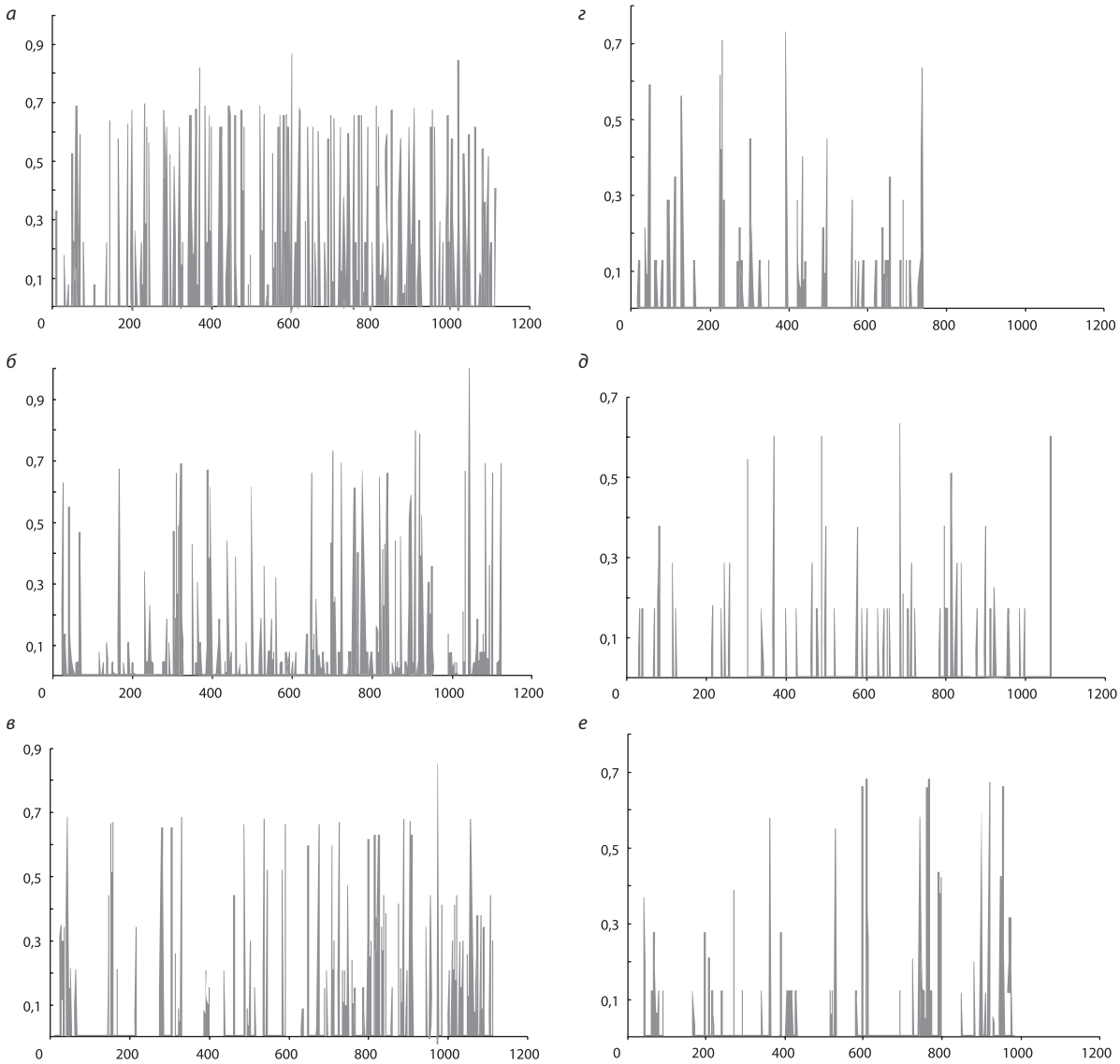


График энтропии нуклеотидной последовательности гена *cytb* в выборке *A. draco* (*а*), *A. ilex* (*б*), *A. latronum* (*в*), *A. agrarius* (Приморье) (*г*), *A. agrarius coreae* (*д*), *A. sylvaticus* (*е*).

По оси абсцисс – позиция нуклеотида в выровненных последовательностях, по оси ординат – Шенноновская энтропия H_x (см. в тексте).

и любая ее часть) в качестве внешней в популяционно-генетическом исследовании или для построения филогений (например, для видов рода *Apodemus* на пространстве Евразии), результаты будут заведомо искажены. Наблюдаемые эффекты можно также приписать гетерогенности скоростей накопления мутаций в митолиниях. Так, нулевая гипотеза гомогенности мутационных скоростей не была отвергнута для *A. agrarius coreae* и *A. agrarius chejuensis*, а также для *A. agrarius* с юга Приморья (в последнем случае рассматривались гаплотипические линии), тогда как для выборок из юго-восточной окраины Тибетского нагорья, как и из Западной Европы, она была отклонена с низкой ($P < 0{,}05$) значимостью. Такой результат, с одной стороны, можно объяснить влиянием низкой эффективной численности на скорость фиксации мутации (для видов к юго-востоку от Тибета), с другой – тем, что в выборку *A. sylvaticus* – вида, населяющего широчайший ареал в Европе от побережья Атлантики до востока Украины, попали образцы, пойманные достаточно далеко друг от друга.

Интересным, на наш взгляд, представляется наличие в выборке *A. draco* образца HM162826, имеющего по сравнению с другими наибольшее число трактов генной конверсии при сопоставлении этой выборки с другими (по 4 с *A. latronum* и *A. agrarius coreae* (и, соответственно, с *A. agrarius chejuensis*), 2 – с *A. ilex* и по одной – с *A. agrarius* с юга Приморья и с *A. sylvaticus* из Западной Европы). Кроме того, при сопоставлении нуклеотидных последовательностей митохондриального гена и псевдогена у *A. sylvaticus* из Западной Европы

Фрагменты гена *cytb* у некоторых представителей рода *Apodemus*, гомологичные тракту генной конверсии у *Cl. glareolus* из работы Малярчука (2012)

Мотив	Вид, номер доступа в GenBank
AATACA**C**TA**T**AC**A**TCAGA**C**	*Cl. glareolus* EU035648
CATACACTA**C**AC**A**TCAGA**C**	*A. agrarius* AM945850, *A. sylvaticus* AF548732, *A. chejuensis* NC 016662, *A. chevrieri* NC 017599
TATACA**T**TA**T**AC**A**TCAGA**T**	*A. latronum* AM945831
TATACACTA**C**AC**T**TCAGA**T**	*A. peninsulae* AM945781
TATACACTA**T**AC**A**TCAGA**T**	*A. latronum* AM945819, *A. draco* HM162767
TATACACTA**C**AC**A**TCAGA**T**	*A. latronum* AM945808, *A. draco* HM162790
TATACACTA**C**AC**G**TCAGA**T**	*A. draco* HM162788
TATACACTA**C**TC**A**TCAGA**T**	*A. draco* HM162798
CAT–CACTA**C**AC**A**TCAGA**C**	*A. agrarius* AM945770
CAT–C–CTA**C**AC**A**TCAGA**C**	*A. agrarius* AM945758

Выделены информативные сайты.

все три участка генной конверсии были связаны лишь с одним псевдогеном FJ389582. Очевидно, что наличие подобных вырожденных последовательностей может оказывать влияние как на филогенетические построения, так и на показатели популяционно-генетической изменчивости. Так, значение среднего нуклеотидного разнообразия в выборке *A. draco* без образца HM162826 уменьшалось почти на 3 %. Сходным образом, не окажись в выборке *A. silvaticus* образца FJ389582, результат поиска трактов конверсии оказался бы отрицательным. Все это, на наш взгляд, может диктовать необходимость предварительного изучения исследуемых выборок на гомогенность их нуклеотидных последовательностей.

Иллюстрацией сказанного выше может являться присутствие у некоторых представителей рода *Apodemus* нуклеотидных трактов, гомологичных фрагменту гена *cytb* мтДНК между информативными сайтами 156 и 174 его полной последовательности, который в работе Б.А. Малярчука (2012) был принят за тракт конверсии между гаплотипами *Cl. glareolus* и *Cl. rutilus*. Как видно из таблицы, на этом участке присутствуют весьма разнообразные «мотивы», включающие, помимо информативных сайтов, одну или даже две делеции, что позволяет рассматривать этот фрагмент гена как насыщенный гомоплазиями, причем нельзя исключать и интерференцию продуктов соответствующих псевдогенов, поскольку число делеций, не кратное 3, приведет к сдвигу рамки считывания. Последнее может быть справедливо и для других последовательностей гена *cytb* у *A. agrarius*, таких как AM945854, AM945856 и AM945857, имеющих инсерции из двух аденинов после 178-го нуклеотида или последовательность AM945773, содержащую в этих же позициях цитозин и аденин.

На наш взгляд, информативность данного участка как маркера генной конверсии может оказаться различной, в зависимости от объекта и цели работы, что заставляет относиться к планированию подобных исследований и интерпретации полученных результатов с известной осторожностью. Вероятно, на этом примере мы сталкиваемся с ситуацией, когда без доступа к первичным материалам (хроматограммы секвенирующих реакций) решить, имеем ли мы дело с паралогизацией митохондриальных генов в ядерном геноме, явлениями интрогрессии и гибридизации или же с высокомутабельным регионом кодирующей последовательности мт генома, весьма затруднительно. На необходимость тщательного изучения хроматограмм реакций секвенирования, помимо упомянутой работы (Dubey et al., 2009), указывает и статья Fietz с соавт. (2013), в которой проведен реанализ собственных данных, депонированных в GenBank, и исходных хроматограмм. Они обнаружили, что около 40 % депонированных гаплотипов содержали ошибки. Хотя этот факт и не привел к изменению сделанных на основании предыдущих данных выводов, авторы заключают, что тщательный контроль необходим на всех этапах – от генерации первичных данных до их интерпретации и депонирования в *on line* депозиториях.

Из сказанного следует, что стратегия использования гена *cytb* в популяционно-генетических и филогенетических исследованиях может оказаться диаметрально противоположной. Например, высокий уровень внутривидовой изменчивости может сделать этот ген ценным маркером в популяционной генетике (например, для изучения пространственной дифференциации популяции *A. draco* к юго-востоку от Тибетского нагорья), но он же может стать фактором, вносящим недопустимый «шум» в филогенетические построения.

Межвидовая гибридизация с последующей генной конверсией в зоне симпатрии разных видов может приводить к парафилии нуклеотидных последовательностей используемого маркера, и этот феномен в ряде случаев будет достаточно трудно отличить как от «энтропийного шума», так и от возможного участия псевдогенов в продуктах секвенирования исследуемых нуклеотидных последовательностей.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Абрамсон Н.И. Филогения: итоги, проблемы, перспективы. Информационный вестник ВОГиС. 2007;11(2):307-331.

Гречко В.В. Проблемы молекулярной филогенетики на примере отряда чешуйчатых рептилий (отряд Squamata): митохондриальные ДНК маркеры. Молекуляр. биология. 2013;47(1): 61-82.

Докучаев Н.Е., Лапинский А.Г., Соловенчук Л.Л. Генетическая изменчивость полевых мышей (*Apodemus agrarius* Pallas, 1771) Дальнего Востока России по результатам RAPD-PCR анализа. Изв. РАН. Сер. биол. 2008;4:429-434.

Зыков С.В. Внутривидовая изменчивость и межвидовая дифференциация мышей родов *Apodemus*, *Mus* и *Sylvaemus* Уральского региона по краниальным признакам: Автореф. дис. … канд. биол. наук. Екатеринбург: УГУ им. А.М. Горького, 2011.

Картавцева И.В. Кариосистематика лесных и полевых мышей (Rodentia, Muridae). Владивосток: Дальнаука, 2002.

Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности. М.: Мир, 1985.

Малярчук Б.А. Генная конверсия митохондриального генома при межвидовой гибридизации у полевок рода *Clethrionomys*. Биохимия. 2012;77(5):642-648.

Переверзева В.В., Павленко М.В. Разнообразие строения гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК полевой мыши *Apodemus agrarius* Pallas, 1771 из популяций юга Дальнего Востока России. Изв. РАН. Сер. биол. 2014;1:5-16.

Челомина Г.Н., Атопкин Д.М. Молекулярно-генетические свидетельства глубокого филогенетического разрыва между европейской и азиатской расами малой лесной мыши по данным изменчивости гена цитохрома *b* мтДНК. Молекуляр. биология. 2010;44(5):792-803.

Avise J.C. Phylogeography: The History and Formation of Species. N.Y.: Harvard Univ. Press, 2000.

Avise J.C., Johns G.C. Proposal for a standardized temporal scheme of biological classification of extant species. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1999;96:7358-7363.

Balakirev E.S., Ayala F.J. Pseudogenes: are they «Junk» or functional DNA. Ann. Rev. Genet. 2003;37:123-151.

Betrán E., Rozas J., Navarro A., Barbadilla A. The estimation of the number and the length distribution of gene conversion tracts from population DNA sequence data. Genetics. 1997;146(1):89-99.

Bosch E., Hurles M.E., Navarro A., Jobling M.A. Dynamics of a human interparalog gene conversion hotspot. Genome Res. 2004;14:835-844.

Calvignac S., Konecny L., Malard F., Douady C.J. Preventing the pollution of mitochondrial datasets with nuclear mitochondrial paralogs (numts). Mitochondrion. 2011;11:246-254.

De Woody J.A., Chesser R.K., Baker R.J. A Translocated mitochondrial cytochrome *b* pseudogene in voles (Rodentia: Microtus). J. Mol. Evol. 1999;48:380-382.

Dubey S., Michaux J., Brünner H., Hütterer R., Vogel P. False phylogenies on wood mice due to cryptic cytochrome *b* pseudogene. Mol. Phylogenet. Evol. 2009;50:633-641.

Esposti D.M., De Vries S., Crimi M., Ghelli A., Patarnello T., Meyer A. Mitochondrial cytochrome *b*: evolution and structure of the protein. Biochim. Biophys. Acta. 1993;1143:243-271.

Fan Z., Liu S., Liu Y., Zhang X, Yue B. How Quaternary geologic and climatic events in the southeastern margin of the Tibetan Plateau influence the genetic structure of small mammals: inferences from phylogeography of two rodents, *Neodon irene* and *A. latronum.* Genetica. 2011;139(3):339-351.

Fan Z., Liu S., Liu Y., Lihuan L., Xiuyue Z., Bisong Y. Phylogeography of the South China field mouse (*Apodemus draco*) on the Southeastern Tibetan plateau reveals high genetic diversity and glacial refugia. PLoS ONE. 2012;7(5):e38184. DOI:10.1371/journal.pone.0038184

Fietz K., Graves J.A., Olsen M.T. Control: a reassessment and comparison of GenBank and chromatogram mtDNA sequence variation in baltic grey seals (*Halichoerus grypus*). PLoS ONE. 2013;8(8):e72853. DOI: 10.1371/journal.pone.0072853

Filippucci M.G., Macholán M., Michaux J.R. Genetic variation and evolution in the genus *Apodemus* (Muridae: Rodentia). Biol. J. Linnean Soc. 2002;75(3):395-419.

Hall T.A. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 1999;41:95-98.

Irwin D.M., Kocher T.D., Wilson A.C. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. J. Mol. Evol. 1991;32:128-144.

Ishii K., Charlesworth B. Associations between allozyme loci and gene arrangements due to hitch-hiking effects of new inversions. Genet. Res. 1977;30:93-106.

Johns G.C., Avise J.C. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome *b.* Mol. Biol. Evol. 1998;15:1481-1490.

Kaneda H., Hayashi J.-I., Takahama S., Taya C., Lindahl K.F., Yonekawa H. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1995;92:4542-4546.

Leslie J.F., Watt W.B. Some evolutionary consequences of the molecular recombination process. Trends Genet. 1986;2:288-291.

Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics. 2009;25: 1451-1452.

Liu Q., Chen P., He K., Kilpatrick C.W., Liu S.Y., Yu F.H., Jiang X.L. Phylogeographic Study of Apodemus ilex (Rodentia: Muridae) in Southwest China. PLoS ONE. 2012;7(2):e31453.

Meyer A. Shortcomings of the cytochrome *b* gene as a molecular marker. Trends Ecol. Evol. 1994;9:278-280.

Michaux J.R., Chevret P., Filippucci M.G., Macholán M. Phylogeny of the genus *Apodemus* with a special emphasis to the subgenus Sylvaemus using the nuclear IRBP gene and two mitochondrial markers: cytochrome *b* and 12S rRNA. Mol. Phylogenet. Evol. 2002;23:123-136.

Michaux J.R., Libois R., Filippucci M.-G. So close and so different: comparative phylogeography of two small mammal species, the yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) and the woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the western Palearctic region. Heredity. 2005;94:52-63.

Oh D.J., Kim T.W., Chang M.H., Han S.H., Oh H.S., Kim S.J. Migration route estimation of the Jeju striped field mouse *Apodemus agrarius chejuensis* (Rodentia, Muridae). Mitochondrial DNA. 2013;24:137-144.

Rocha-Olivares A., Rosenblatt R.H., Vetter R.D. Molecular evolution, systematics, and zoogeography of the rockfish subgenus Sebastomus (Sebastes, Scorpaenidae) based on mitochondrial cytochrome *b* and control region sequences. Mol. Phyl. Evol. 1999;11(3):441-458.

Sakka H., Quéré J.-P., Kartavtseva I., Pavlenko M., Chelomina G., Atopkin D., Bogdanov A., Michaux J. Comparative phylogeography of four Apodemus species (Mammalia: Rodentia) in the Asian Far East: evidence of Quaternary climatic changes in their genetic structure. Biol. J. Linn. Soc. 2010;100(4):797-821.

Sanford J.C. Genetic Entropy and the Mystery of the Genome. N.Y.: Elim, Elim Publ., 2006.

Schneider T.D., Stephens R.M. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. Nucl. Acids Res. 1990;18:6097-6100.

Shannon C.E. A mathematical theory of communication. Bell Syst. Tech. J. 1948;27:379-423.

Shitara H., Hayashi J.I., Takahama S., Kaneda H., Yonekawa H. Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage. Genetics. 1998;148(2):851-857.

Smith M.F., Thomas W.K., Patton J.L. Mitochondrial DNA-like sequence in the nuclear genome of an akodontine rodent. Mol. Biol. Evol. 1992;9(2):204-215.

Suzuki H., Filippucci M.G., Chelomina G.N., Sato J.J., Serizawa K., Nevo E. Biogeographic view of Apodemus in Asia and Europe inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. Biochem. Genet. 2008;46:329-346.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 2011;28:2731-2739.

Индукцию тирозинаминотрансферазы у мышей ингибируют активированные метаболиты орто-аминоазотолуола

В.И. Каледин[1], С.И. Ильницкая[1], Н.А. Попова[1], О.А. Коваль[2], И.А. Пышная[2], Л.Ф. Гуляева[3]

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия; [2] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия; [3] Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Новосибирск, Россия

Аминоазокрасители и другие гепатоканцерогенные вещества ингибируют глюкокортикоидную индукцию адаптивных ферментов печени, в том числе тирозинаминотрансферазы (ТАТ), в печени мышей и крыс. Имеется определенное соответствие между величиной ингибирующего влияния на индукцию ТАТ и канцерогенностью соединения для печени данных животных. Если развитие опухолей, как предполагают, вызывают не сами применяющиеся канцерогены, а их активированные метаболиты, возникает вопрос, ингибируют ли индукцию ферментов также активированные метаболиты канцерогенов или это делают исходные соединения. Мы попытались ответить на этот вопрос. Были использованы инбредные мыши, различающиеся по чувствительности как к канцерогенному, так и к антиглюкокортикоидному (ингибирующему индукцию ТАТ) действию специфичного для мышей гепатоканцерогена орто-аминоазотолуола (ОАТ), в серии экспериментов с изменением статуса половых и глюкокортикоидных гормонов (удалением половых желез и надпочечников), а также с введением ингибиторов ($CoCl_2$, пентахлорфенол) и индукторов (3,4-бензпирен, 20-метилхолантрен, ароклор 1254) активности ферментов метаболизма ксенобиотиков) и др. Полученные результаты однозначно свидетельствуют о том, что глюкокортикоидную индукцию ТАТ у мышей ингибируют активированные метаболиты (метаболит) ОАТ, а не исходное соединение. При этом неспецифические генотоксические агенты, такие как цисплатин и циклофосфамид, не оказывают влияния на индукцию ТАТ глюкокортикоидными гормонами. Массовость (индукция фермента подавляется практически в каждой экспрессирующей его клетке) и быстрая обратимость этого вызываемого канцерогеном антиглюкокортикоидного эффекта указывают на то, что он осуществляется не на генетической, а на эпигенетической основе.

Ключевые слова: мыши, орто-аминоазотолуол, тирозинаминотрансфераза, индукция и ингибирование активности ферментов.

Induction of tyrosine aminotransferase in mice is inhibited by activated metabolites of ortho-aminoazotoluene

V.I. Kaledin[1], S.I. Ilnitskaya[1], N.A. Popova[1], O.A. Koval[2], I.A. Pyshnaya[2], L.F. Gulyaeva[3]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia; [2] Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia; [3] Institute of Molecular Biology and Biophysics SB RAMS, Novosibirsk, Russia

Aminoazo dyes and other hepatocarcinogenic substances inhibit glucocorticoid-mediated induction of adaptive enzymes, including tyrosine aminotransferase (TAT), in mouse and rat liver. There is a specific relationship between the effect of a carcinogen on TAT induction and its liver carcinogenicity in animals. Presuming tumor development being initiated not directly by the chemicals employed but their metabolically activated derivatives, the question arises whether TAT induction is inhibited by carcinogen metabolites or by their parent compounds. The goal of this paper is to shed some light on the issue. Mouse strains differing in the sensitivity to both carcinogenic and antiglucocorticoid (TAT induction inhibitory) effects of the mouse-specific carcinogen ortho-aminoazotoluene (OAT) underwent a set of experimental procedures: ablation of gonadal and adrenal glands, administration of inhibitors ($CoCl_2$, pentachlorophenol), inducers (3,4-benzopyrene, Aroclor 1254, 20-methylcholanthrene) of xenobiotic-metabolizing enzyme activities, and others. The results unequivocally confirm that glucocorticoid induction of TAT activity in mouse liver is inhibited by activated metabolite(s) of OAT rather than by its intact molecules. In contrast, nonspecific genotoxic agents such as cyclophosphamide and cisplatin exert no effect on TAT induction by glucocorticoids. The wide occurrence (practically in each TAT-expressing

УДК 616.006:577.171:577.218
Поступила в редакцию 02.09.2014 г.
Принята к публикации 25.11.2014 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: kaledin@bionet.nsc.ru

hepatocyte) and rapidly reversible inhibition of enzyme induction by the carcinogen point to the epigenetic nature of this phenomenon.

Key words: mice, ortho-aminoazotoluene, tyrosine aminotransferase, enzyme induction and inhibition.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Каледин В.И., Ильницкая С.И., Попова Н.А., Коваль О.А., Пышная И.А., Гуляева Л.Ф. Индукцию тирозинаминотрансферазы у мышей ингибируют активированные метаболиты орто-аминоазотолуола. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):136-143.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Kaledin V.I., Ilnitskaya S.I., Popova N.A., Koval O.A., Pyshnaya I.A., Gulyaeva L.F. Induction of tyrosine aminotransferase in mice is inhibited by activated metabolites of ortho-aminoazotoluene. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):136-143.

Канцерогенные аминоазокрасители характеризуются выраженной видовой и органной специфичностью действия: они вызывают опухоли почти исключительно в печени мышей и крыс и не вызывают их в других органах и у животных других видов. Из множества производных аминоазобензола (АБ) наиболее активными в канцерогенном отношении для крыс являются N,N-диметил-4-аминоазобензол (ДАБ) и его 3′-метильное производное (3′-МеДАБ), а для мышей – 2′,3-диметил-4-аминоазобензол (по старой номенклатуре орто-аминоазотолуол, ОАТ). При этом мыши разных генотипов неодинаково чувствительны к действию ОАТ: вызывая опухоли у 100 % животных одних линий (DD, CBA, SWR, PT), он слабо влияет на других (AKR, BALB/c, CC57BL) (Каледин и др., 1984; Морозкова и др., 2014).

Уже почти 50 лет назад было обнаружено, что у крыс, получавших ДАБ, заметно снижается уровень глюкокортикоидной индукции адаптивных ферментов печени тирозинаминотрансферазы (ТАТ) и триптофандиоксигеназы (Anderson et al., 1966; Kizer et al., 1969). Подобное влияние на индукцию этих ферментов у крыс было показано для афлатоксина B1 (Wogan, Friedman, 1968), этионина и стеригматоцистина (Horikoshi et al., 1988), и у мышей – для ОАТ (Каледин и др., 1979; Каледин, Захарова, 1984) и эстрагола (Каледин и др., 2009). При этом в последнем случае наблюдалась положительная связь между влиянием канцерогенов на индукцию ТАТ и чувствительностью мышей к их гепатоканцерогенному действию (Каледин и др., 1979, 2010; Каледин, Захарова, 1984; Морозкова и др., 2014). С учетом литературных данных о видовой и органной специфичности действия канцерогенов это создавало впечатление, что имеется определенный параллелизм между способностью соединений вызывать образование опухолей в печени и подавлять в ней индукцию адаптивных ферментов глюкокортикоидами, т. е. между их гепатоканцерогенным и антиглюкокортикоидным эффектами. В таком случае изучение механизма действия канцерогенов на индукцию ферментов могло пролить некоторый свет и на механизм их канцерогенного действия. Первое, что, очевидно, следовало выяснить в этом плане, был вопрос о том, вызываются ли опухолеиндуцирующий и антиглюкокортикоидный эффекты канцерогенов теми же самыми или разными их молекулярными формами. Относительно азокрасителей и канцерогенов ряда других классов (нитрозаминов, полициклических углеводородов, ароматических аминов) в литературе утвердилось мнение, что развитие опухолей вызывают не сами эти соединения, а их активированные метаболиты (Турусов и др., 2004). Поэтому в настоящей работе мы предприняли попытку выяснить, исходное соединение или активированные метаболиты ОАТ ответственны за ингибирование им глюкокортикоидной индукции ТАТ в печени чувствительных мышей.

Материалы и методы

В работе использованы ОАТ (фирма «ICN» США), ацетат гидрокортизона и лецитин (объединение «Здоровье», Украина), 3,4-бензпирен («FERAK», ФРГ), дексаметазон-21-фосфат («ICN», США), 20-метилхолантрен, цисплатин (cis-diammineplatinum(II) dichloride), этоксирезоруфин и метоксирезоруфин (все – «Sigma», США), ароклор 1254 («SUPELCO», США), альфа-кетоглутаровая кислота («Serva», ФРГ). Остальные реактивы были отечественного производства квалификации «х.ч.» и «о.с.ч.».

Использованные в работе животные – взрослые и подсосные (12–14-дневные) мыши-самцы линий ICR, DD, CBA, PT и CC57BR – были получены из вивария Института цитологии и генетики СО РАН. Их содержали группами по 6–10 особей в пластиковых ванночках площадью 20 × 36 см при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище (полнорационные брикеты ПК 120-1 и «Чара», AGRO RU, Россия). Все манипуляции с мышами проводили в соответствии с международными правилами работы с животными (European Communities Council Directive (86/609 EEC)).

Для увеличения активности микросомальных монооксигеназ их индукторы – 20-метилхолантрен (МХ), 3,4-бензпирен (БП) и Ароклор 1254 – в виде растворов в оливковом масле вводили животным внутрибрюшинно (в/б) в дозах 80, 100, и 250 мг/кг массы тела соответственно за 2–5 сут до введения канцерогена. Для подавления активности цитохрома P450 использовали

$CoCl_2 \times 6\ H_2O$ ($CoCl_2$), а для ингибирования сульфотрансферазы – пентахлорфенол (ПХФ). Водный раствор $CoCl_2$ вводили под кожу спины трижды по 50 мг/кг за 72, 48 и 24 ч, а ПХФ в оливковом масле – однократно в/б в дозе 11–14 мг/кг за 45 мин до введения ОАТ.

Влияние $CoCl_2$ на содержание цитохрома P450 и активность ферментов печени изучали в экспериментах, в которых микросомы выделяли дифференциальным центрифугированием, а концентрацию P450 и активность его изоформ cyp1a1 и cyp1a2, имеющих отношение к метаболизму ОАТ (Mikhailova et al., 2005), определяли, как указано в работе В.И. Каледина с соавт. (1999), с использованием в качестве функциональных маркеров 7-метоксирезоруфин-О-деметилазы (7-МРОД) и 7-этоксирезоруфин-О-деэтилазы (7-ЭРОД).

В большинстве экспериментов ОАТ использовали в виде 0,1 М раствора в оливковом масле, который вводили в/б однократно по 1 мл на 100 г массы тела животных за 19–20 ч до индукции ТАТ. Это обеспечивало дозу ОАТ 225 мг/кг. Эту дозу в отдельных экспериментах кратно увеличивали или уменьшали (см. при описании результатов). Циклофосфамид и цисплатин вводили мышам в/б в дозах 100 и 4 мг на кг массы тела соответственно за 19 ч до индукции фермента. При приготовлении липосом к спиртовому раствору фосфатидилхолина добавляли ОАТ (в соотношении 3:1), смесь выпаривали под вакуумом и высушенную пленку гидратировали в физиологическом растворе NaCl при механическом встряхивании. Образовавшуюся суспензию расфасовывали в ампулы, замораживали и хранили при –20 °С. Перед использованием суспензию липосом разбавляли физиологическим раствором до содержания ОАТ 12 мг/мл и вводили мышам в латеральную хвостовую вену (по 1 мл на 100 г массы тела) за 30 мин до индукции ТАТ.

Индукцию ТАТ осуществляли введением гидрокортизона в/б в дозе 50 мг/кг или дексаметазон-фосфата в дозе 5 мг/кг массы тела. Через 5 ч после индукции мышей умерщвляли декапитацией, печень гомогенизировали в 1,15 %-м растворе KCl, центрифугировали 30 мин при 9 тыс. g и в индивидуальных супернатантах определяли активность ТАТ по методу Диамондстона, как описано ранее (Каледин, Захарова, 1984). Активность фермента выражали в мкмолях пара-гидроксифенилпирувата на 100 мг белка/ч. Концентрацию белка определяли по методу Лоури.

Статистическую обработку полученных данных производили с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты

Динамика влияния орто-аминоазотолуола на глюкокортикоидную индукцию тирозинаминотрансферазы

В отличие от индукции опухолей, требующей длительного присутствия канцерогена в организме, следовательно, многократного введения его животным, влияние на гормональную регуляцию активности ферментов хорошо выявляется и может быть изучено при однократном применении канцерогенов. При выяснении вопроса о том, является ли в этом случае действующим началом исходное соединение или продукты его метаболизма, осложняющим обстоятельством оказалась высокая гидрофобность ОАТ, обусловливающая его медленное всасывание из масляных растворов, которое протекает на фоне индукции адаптивных ферментов эндогенными гормонами, вызванной инъекционным стрессом. Все это не может не сказываться на динамике активности ТАТ при ее индукции экзогенным глюкокортикоидом после введения ОАТ.

Как показано в табл. 1, в ближайшие полчаса после введения ОАТ уровень индукции ТАТ у чувствительных мышей линии DD довольно слабо отличается от контроля, а у резистентных (CC57BR) может даже превышать контрольный уровень, чего не наблюдается у адреналэктомированых животных. По мере увеличения срока между введением ОАТ и гидрокортизона уровень индукции фермента заметно снижается (у чувствительных мышей более чем в 2 раза по сравнению с контролем) и в дальнейшем медленно восстанавливается, возвращаясь к норме через 2–4 недели (табл. 2). При подкожном введении влияние ОАТ на индукцию ТАТ развивается медленнее и длится несколько дольше, чем при внутрибрюшинном, что, очевидно, обусловлено более медленным его всасыванием. Напротив, увеличение дозы канцерогена сверх оптимальной (225 мг/кг) при внутрибрюшинном введении не приводит к увеличению ингибирующего влияния на индукцию ТАТ (рис. 1). Как морфологическое, так и биохимическое исследование (по активности в крови аланинаминотрансферазы) показало, что ингибирующее индукцию ТАТ влияние ОАТ не обусловлено его токсическим действием на печень (Timofeeva et al., 2008). Это влияние может лимитироваться: а) количеством всосавшегося ОАТ; б) количеством его активированного метаболита, если действует таковой, и в) насыщением реагирующей системы действующим началом. Выяснить, является ли это действующее начало исходным соединением или его метаболитом, можно при изучении влияния на антиглюкокортикоидный эффект ОАТ ингибиторов и индукторов ферментов его метаболизма.

Влияние индукции ферментов метаболизма орто-аминоазотолуола на его антиглюкокортикоидное действие

Метаболическая активация аминоазокрасителей в печени осуществляется через их первичное окисление, катализируемое микросомальными монооксигеназами (цитохромом P450), и этерификацию N-гидроксипроизводных в реакциях второй фазы метаболизма ксенобиотиков главным образом через сульфоконъюгацию

Таблица 1. Влияние орто-аминоазотолуола на последующую индукцию ТАТ гидрокортизоном у нормальных и адреналэктомированных мышей

Группы опыта (линия и статус мышей)	Активность ТАТ в печени при индукции через 30 мин или 19 ч после введения масла (контроль) или ОАТ			
	Индукция гидрокортизоном через 30 мин		Индукция гидрокортизоном через 19 ч	
	мкмоль – ГФП# на 100 мг белка/ч	% от контроля	мкмоль – ГПФ# на 100 мг белка/ч	% от контроля
CC57BR масло (контроль)	78 ± 6,6 (3)	100	74 ± 1,8 (4)	100
CC57BR ОАТ	107 ± 3,7* (3)	137,2	68 ± 5,4 (4)	91,8
CC57BR адреналэктомированные масло (контроль)	97 ± 4,0 (3)	100	–	
CC57BR адреналэктомированные ОАТ	97 ±7,0 (3)	0	–	
DD масло (контроль)	113 ± 4,5 (4)	100	114 ± 3,0 (4)	101
DD ОАТ	93 ± 1,5** (4)	82,3	63 ± 1,9*** (4)	55,3

В скобках указано число животных. # ГПФ – п-гидроксифенилпируват. Достоверное отличие от контроля: * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Таблица 2. Влияние ОАТ на глюкокортикоидную индукцию ТАТ у мышей линии DD в зависимости от времени и способа введения канцерогена

Время после введения ОАТ, сут	Активность ТАТ (% от контроля). Индукция после введения ОАТ	
	в брюшную полость	подкожно
0 (контроль)	100 ± 5,5	100 ± 3,2
1	62 ± 1,9***	–
7	–	73 ± 2,0***
14	95 ± 3,0	76 ± 4,8**
28	98 ± 5,0	89 ± 4,8

В каждой группе по 6 животных. Доза ОАТ в обоих случаях – 225 мг/кг массы тела. Достоверное отличие от контроля: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

(Каледин и др., 1999; Турусов и др., 2004). Поэтому на первом этапе исследования мы изучили влияние индукции ферментов первичного окисления ОАТ на его антиглюкокортикоидное действие. С этой целью использовали известные индукторы этих ферментов: 20-метилхолантрен (МХ), 3,4-бензпирен (БП) и смесь полихлорированных бифенилов (Ароклор 1254), которые вводили животным за 2–5 сут до введения канцерогена. Оказалось, однако, что Ароклор 1254 в поздние сроки после введения сам подавляет индукцию ТАТ (данные не приведены), поэтому при его использовании не представлялось возможным решить, является ли увеличение эффекта (если таковое было бы получено) результатом усиления действия ОАТ или суммированием эффектов индуктора и канцерогена. Для решения поставленной задачи мы постарались исключить влияние всасывания канцерогена, осуществив его прямую доставку в печень в составе фосфолипидных везикул (липосом), которые вводили внутривенно. В предварительных экспериментах было установлено, что при внутрибрюшинном введении в традиционной дозе 225 мг/кг за 19 ч до введения гидрокортизона ОАТ снизил уровень индукции ТАТ на 43 %, а при внутривенном введении 1/2 этой дозы в липосомах за полчаса до индукции – на 49 %, т. е. практически на ту же величину. Липосомы, не содержащие ОАТ, при подобном введении не оказывали большего, чем физиологический раствор, влияния на индукцию ТАТ. Поэтому влияние индукции ферментов метаболизма ОАТ на его антиглюкокортикоидное действие мы изучали на данной модели с использованием в качестве индукторов БП и МХ. Оказалось, что при введении в липосомах, т. е. при непосредственной доставке ОАТ в печень за полчаса до введения гормона, уровень индукции ТАТ снизился у контрольных мышей на 11 %, а у мышей, получавших БП или МХ, – на 38 и 44,5 % соответственно (рис. 2). Таким образом, одно и то же количество ОАТ за полчаса нахождения в печени снизило уровень индукции ТАТ у преиндуцированных животных в 4 раза сильнее, чем у контрольных, из чего следует, что действующим началом в ингибировании

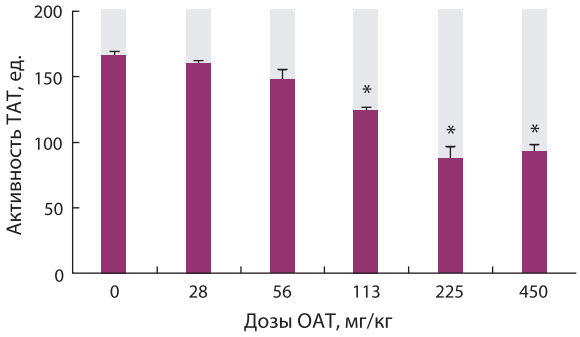


Рис. 1. Влияние ОАТ на глюкокортикоидную индукцию ТАТ в зависимости от его дозы.

Канцероген в масляном растворе вводили в брюшную полость мышам СВА в указанных дозах (мг/кг веса) за 19 ч до индукции. Индукцию осуществляли в/б введением фосфата дексаметазона в дозе 0,5 мг/100 г массы тела животных. Активность ТАТ (по оси ординат) в мкмолях *n*-гидроксифенилпирувата на 100 мг белка супернатанта печени в час определяли через 5 ч после индукции.
Значения, достоверно отличающиеся от контроля: * $p < 0{,}001$.

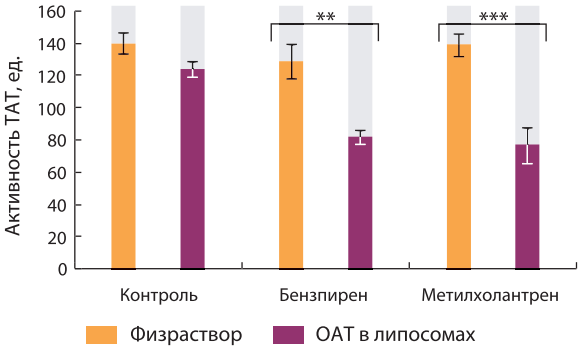


Рис. 2. Влияние ОАТ на глюкокортикоидную индукцию ТАТ у мышей в контроле и на фоне индукции ферментов его метаболизма 3,4-бензпиреном (БП) или 20-метилхолантреном (МХ).

Для стимуляции метаболизирующих ОАТ ферментов печени мышам СВА в брюшную полость вводили БП в дозе 100 мг/кг или МХ в дозе 80 мг/кг массы тела. Через 2 сут половине мышей каждой группы ввели в хвостовую вену физиологический раствор (1 мл/100 г массы тела), а другой половине – аналогичный объем суспензии липосом, содержащих ОАТ (доза ОАТ составила 120 мг/кг). Через 30 мин после этого мышам для индукции ТАТ ввели в/б гидрокортизон (5 мг/100 массы тела), а еще через 5 ч их умертвили декапитацией и в растворимой фракции белков печени определили активность ТАТ. Значения, достоверно отличающиеся от контрольных: ** $p < 0{,}01$; *** $p < 0{,}001$.

глюкокортикоидной индукции ТАТ является не исходный препарат ОАТ, а его метаболит (метаболиты).

Влияние ингибиторов метаболизма на антиглюкокортикоидное действие орто-аминоазотолуола

Подтверждение предположения о роли метаболитов ОАТ в ингибировании глюкокортикоидной индукции ТАТ было получено нами в экспериментах с обратным воздействием, а именно с ингибированием метаболизма ОАТ в организме мышей. Известно, что ионы кобальта, ингибируя (через влияние на 5-аминолевулинатсинтетазу) синтез гема и ускоряя (через увеличение активности гемоксигеназы) окисление цитохрома P420 и других гемопротеидов до билирубина, приводят к дозозависимому снижению содержания цитохрома P450 и активности связанных с ним ферментов в печени (Testa, Jenner, 1981). В условиях наших экспериментов у мышей, получавших $CoCl_2$, уровень содержания P450 в печени снизился более чем на 70 %, что хорошо согласуется с данными, полученными другими исследователями (Testa, Jenner, 1981). Почти в такой же степени (на 62–65 % по сравнению с контролем) у них снижались и активности 7-МРОД и 7-ЭРОД, характеризующие соответственно cyp1a1 и cyp1a2 цитохромы, метаболизирующие канцерогенные аминоазокрасители (Mikhailova et al., 2005).

Как видно из табл. 3, если у контрольных мышей ОАТ снижал уровень индукции ТАТ гидрокортизоном более чем на 40 %, то у мышей, получавших $CoCl_2$, его действие было выражено в значительно меньшей степени, чем в контроле. Сходные результаты были получены и в опытах с ингибированием сульфоконъюгации ОАТ пентахлорфенолом. У мышей, которым перед ОАТ вводили ПХФ, индукция ТАТ ингибировалась не на 30–42 %, а лишь на 1–6,7 % (табл. 4).

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что у мышей антиглюкокортикоидное действие ОАТ, оцениваемое по влиянию на индукцию ТАТ, осуществляется не исходным соединением, а его метаболитами (метаболитом).

Обсуждение

Активированные метаболиты аминоазокрасителей образуются при сульфоконъюгации их N-гидроксипроизводных, катализируемой цитозольным ферментом печени сульфотрансферазой, и характеризуются высокой реакционной способностью, обеспечивающей им возможность взаимодействовать с нуклеофильными центрами клеточных макромолекул, в том числе ДНК (Delclos et al., 1986; Турусов и др., 2004). Доказательство того, что при действии канцерогенов гормональная индукция ТАТ подавляется на уровне транскрипции, позволило некоторым исследователям утверждать, что их влияние на индукцию адаптивных ферментов вызывается прямым действием на генетические локусы этих ферментов (Hamilton et al., 1993; Miller et al., 1993). Авторы даже не рассматривали альтернативные возможности, в частности нарушение канцерогеном механизма индукции. Между тем для снижения уровня транскрипции в той степени, в какой это имеет место в условиях экспериментов (до 50 % и более), при непосредственном взаимодействии с ДНК канцероген (его ак-

Таблица 3. Влияние ОАТ на индукцию ТАТ гидрокортизоном в печени контрольных и предобработанных $CoCl_2$ мышей

Экспериментальные группы	Активность ТАТ#	
	Контроль	Опыт ($CoCl_2$)
Мыши ICR		
Индукция гидрокортизоном (ГК)	167 ± 5,0 (4)	153 ± 4,3 (5)
ОАТ + индукция ГК	99 ± 6,1***(6)	142 ± 6,5 (5)
Снижение, %	40,7	7,2
Мыши DD		
Индукция ГК	131 ± 6,8 (5)	155 ± 10,7 (5)
ОАТ + индукция ГК	95 ± 4,0***(7)	157 ± 10,7 (5)
Снижение, %	27,5	0

мкмоль *n*-гидроксифенилпирувата на 100 мг белка/ч, *** достоверное ($p < 0,001$) снижение уровня глюкокортикоидной индукции ТАТ под действием ОАТ. В скобках указано количество животных.

Таблица 4. Влияние ОАТ на индукцию ТАТ гидрокортизоном у контрольных и получавших пентахлорфенол мышей

Группы опыта	Активность ТАТ#	
	Контроль	Пентахлорфенол
Мыши ICR		
Индукция гидрокортизоном (ГК)	149 ± 8,9 (4)	149 ± 1,0 (3)
ОАТ + индукция ГК	86 ± 9,5**(4)	139 ± 11,9 (5)
Снижение, %	42,3	6,7
Мыши DD		
Индукция ГК	179 ± 12,9 (4)	175 ± 6,5 (4)
ОАТ + индукция ГК	126 ± 8,9*(4)	167 ± 6,5 (4)
Снижение, %	29,6	4,6

мкмоль *n*-гидроксифенилпирувата на 100 мг белка/ч. Достоверное снижение уровня глюкокортикоидной индукции ТАТ под действием ОАТ: * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$. В скобках указано количество животных.

тивированный метаболит) должен подействовать на ген ТАТ практически в каждой экспрессирующей ее клетке. Фактическое же связывание канцерогенных аминоазокрасителей в этих условиях составляет менее 10 аддуков на 10^6 нуклеотидов ДНК, т. е. примерно 1 аддукт на 100 генов (Виленчик, 1977). В силу малых размеров молекулы канцерогенов не способны распознавать сколько-нибудь значительные последовательности нуклеотидов ДНК, поэтому столь удивительная избирательность их действия на те или иные гены может достигаться лишь при участии специальных посредников, распознающих эти гены. В случае глюкокортикоид-зависимых генов такими посредниками могут быть рецепторные белки гормонов и другие факторы транскрипции, которые и составляют механизм индукции этих генов (Kropachev et al., 2001; Merkulova et al., 2005). Сами же по себе в отсутствие белков-посредников активированные метаболиты канцерогенов вступают во взаимодействие не только с ДНК, но и с РНК и белками, причем в последнем случае они взаимодействуют преимущественно с одними белками и не взаимодействуют с другими. Специфичность же взаимодействия определяется, очевидно, не на химическом уровне, поскольку нуклеофильные сайты имеют все белки, но атакуются или не атакуются эти сайты алкилирующим агентом, зависит, в частности, от их доступности, которая определяется стерическими свойствами как белковой молекулы, так и алкилирующего агента. Наиболее ярко это проявляется в случае лигандина печени, транспортного белка с активностью глутатион-S-трансферазы, который связывает до 2 % введенного крысам 3′-Me-ДАБ (Ohmi et al., 1981). Экспериментально показано также функциональное взаимодействие гепатоканцерогенов с серией минорных ядерных белков печени (факторов транскрипции), участвующих в регуляции экспрессии глюкокортикоид-зависимых генов (Kropachev et al., 2001; Merkulova et al., 2005; Каледин и др., 2009). Полученные нами результаты позволяют полагать, что эти белки атакуются активированными метаболитами канцерогенов по нуклеофильным центрам и частично или полностью теряют свою специфическую функцию, что и отражается на экспрессии регулируемых ими генов (Овчинникова

Таблица 5. Влияние ОАТ на глюкокортикоидную индукцию ТАТ у 6-месячных мышей линии ICR контрольных и получавших в 12-дневном возрасте ОАТ в дозе 225 мг/кг

Воздействие		Активность ТАТ (мкмоль парагидроксифенилпирувата на 100 мг белка/ч)
в 12-дневном возрасте	в возрасте 6 мес.	
–	Без индукции	25 ± 2,0
–	Контроль: масло + индукция гидрокортизоном (ГК)	109 ± 8,6
–	ОАТ + индукция ГК	61 ± 5,8**
ОАТ	Контроль: масло + индукция ГК	123 ± 10,5
ОАТ	ОАТ + индукция ГК	64 ± 7,2**

ОАТ в дозе 225 мг/кг вводили мышам за 19 ч до индукции. В каждой группе по 3–4 животных. ** достоверное ($p < 0,01$) снижение уровня индукции ТАТ гидрокортизоном под влиянием ОАТ у взрослых животных.

Таблица 6. Отсутствие влияния генотоксических агентов циклофосфамида и цисплатина на глюкокортикоидную индукцию ТАТ в печени мышей

Группа и воздействие	Число животных	Активность ТАТ (мкмоль *n*-гидроксифенилпирувата на 100 мг белка/ч)
1. Без воздействия	3	22 ± 7,0
2. Индукция дексаметазоном	5	99 ± 1,2
3. Циклофосфамид + индукция дексаметазоном	5	102 ± 7,7
4. Цисплатин + индукция дексаметазоном	5	95 ± 9,4

Циклофосфан в дозе 100 мг/кг и цисплатин в дозе 4 мг/кг вводили мышам линии ICR внутрибрюшинно за 19 ч до индукции фермента, которую осуществляли в/б введением дексаметазон-фосфата в дозе 0,5 мг на 100 г массы тела.

и др., 2012). По мере замещения поврежденного канцерогеном фактора транскрипции на вновь синтезированные молекулы антиглюкокортикоидный эффект канцерогена должен уменьшаться и нормальная индукция фермента должна восстанавливаться. Действительно, после введения ОАТ индуцибельность ТАТ в существенной степени восстанавливается примерно через 2 недели, а через 4 недели она практически не отличается от контроля (табл. 2). В отличие от хронического применения канцерогена, однократное его введение взрослым животных не приводит к сколько-нибудь заметному изменению клеточной популяции печени (Багинская и др., 2007). Полностью восстанавливается к взрослому состоянию индуцибельность ТАТ и при неонатальном введении мышам ОАТ в дозах, достаточных для инициации гепатоканцерогенеза. Так, введение подсосным мышатам ОАТ не оказывает влияния ни на индукцию ТАТ гидрокортизоном, ни на ингибирование ее канцерогеном при его повторном введении в 6-месячном возрасте (табл. 5).

Таким образом, представленные в работе данные показывают, что ингибирующее влияние ОАТ на глюкокортикоидную индукцию ТАТ у мышей осуществляется активированными мутагенными (Овчинникова и др., 2012) метаболитами ОАТ. В то же время неканцерогенные для печени генотоксические агенты цисплатин и циклофосфамид не оказывают влияния на индукцию ТАТ в печени (табл. 6). Следовательно, так называемое антиглюкокортикоидное действие осуществляется мутагенными метаболитами ОАТ (Овчинникова и др., 2012), но на эпигенетической основе. Какое это имеет (и имеет ли) отношение к его канцерогенному действию, предстоит выяснить. В свете данных, которые мы получили в последнее время (Каледин и др., 2010; Каледин, Ильницкая, 2011; Овчинникова и др., 2012) и надеемся обобщить в следующем сообщении, этот вопрос не кажется тривиальным.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Багинская Н.В., Ильницкая С.И., Никитенко Е.В., Каледин В.И. Промотирующее влияние орто-аминоазотолуола на гепатоканцерогенез сопровождается усилением воспалительных и пролиферативных процессов в ткани печени и снижением концентрации свободного тироксина в крови. Бюл. эксперим. биол. медицины. 2007;144:672-675.

Виленчик М.М. Закономерности молекулярно-генетического действия химических канцерогенов. М.: Наука, 1977.

Каледин В.И., Глазко Т.Т., Захарова Н.П. Нарушение индукции тирозинаминотрансферазы в печени мышей, получавших о-аминоазотолуол. Докл. АН СССР. 1979;244:233-237.

Каледин В.И., Гуляева Л.Ф., Вавилин В.А., Макарова С.М., Морозкова Т.С., Рихтер В.А. Активность ферментов метаболизма ксенобиотиков в печени чувствительных к гепатоканцерогенному действию орто-аминоазотолуола мышей линий SWR

и C3HA и резистентных – AKR и CC57BR. Эксперим. онкология. 1999;21:18-23.

Каледин В.И., Захарова Н.П. Влияние гепатоканцерогенных соединений на гормональную индукцию тирозинаминотрансферазы в печени чувствительных и резистентных животных. Исследования по индукции и метастазированию злокачественных опухолей у экспериментальных животных. Новосибирск: ИЦиГ, 1984:146-185.

Каледин В.И., Ильницкая С.И. Торможение метаболизма стимулирует, а активация метаболизма ингибирует канцерогенное действие орто-аминоазотолуола на печень мышей. Вопр. онкологии. 2011;7:216-220.

Каледин В.И., Ильницкая С.И., Багинская Н.В. Ингибирующее влияние о-аминоазотолуола на гепатоканцерогенное действие диэтилнитрозамина при совместном применении у мышей. Вопр. онкологии. 2010;56(2):196-200.

Каледин В.И., Пахарукова М.Ю., Пивоварова Е.Н., Кропачев К.Ю., Багинская Н.В., Васильева Е.Д., Ильницкая С.И., Никитенко Е.В., Кобзев В.Ф., Меркулова Т.И. Соответствие между гепатоканцерогенным действием эстрагола и его влиянием на глюкокортикоидную индукцию печеньспецифичных ферментов и активность факторов транскрипции в печени мышей и крыс. Биохимия. 2009;74:466-475.

Каледин В.И., Серова И.А., Целлариус Ю.Г., Семенова Л.А., Алексеева Г.В. Межлинейные различия по частоте спонтанных и индуцированных орто-аминоазотолуолом опухолей у мышей. Исследования по индукции и метастазированию злокачественных опухолей у экспериментальных животных. Новосибирск: ИЦиГ, 1984:98-123.

Морозкова Т.С., Жукова Н.А., Семенов Д.Е., Попова Н.А. Мыши линии PT/Y чувствительны к ингибирующему глюкокортикоидную индукцию тирозинаминотрансферазы и гепатокканцерогенному действию орто-аминоазотолуола. Бюл. эксперим. биол. медицины. 2014;158(12):757-761.

Овчинникова Л.П., Богданова Л.А., Каледин В.И. Мутагенная активация снижает канцерогенность орто-аминоазотолуола для печени мышей. Бюл. эксперим. биол. медицины. 2012;154(11):623-628.

Турусов В.С., Белицкий Г.А., Пылев Л.Н., Кобляков В.А. Механизмы действия и классификация химических канцерогенов. Канцерогенез. М.: Медицина, 2004:204-225.

Andersen R.A., Raina P.N., Milholland R.J. Altered responses to cortisol in precancerous liver. Oncologia. 1966;20:153-166.

Delclos K.B., Miller E.C., Miller J.F., Liem A. Sulfuric acid esters as major ultimate electrophilic metabolites of 4-aminoazobenzene and its N-methyl derivatives in infant male C57BL /6J × C3H/HeJ F_1 (B6C3F_1.mice. Carcinogenesis. 1986;7:277-287.

Hamilton J.W., Louis C.A., Doherty K.A., Hunt S.R., Reed M.J., Treadwell M.D. Preferential alteration of inducible gene expression *in vivo* by carcinogens that induce bulky DNA lesions. Mol. Carcinog. 1993;8:34-43.

Horikoshi N., Tashiro F., Tanaka N., Ueno Y. Modulation of hormonal induction of tyrosine aminotransferase and glucocorticoid receptor by aflatoxin B_1 and sterigmatocystin in Reuber hepatoma cells. Cancer Res. 1988;48:5188-5192.

Kizer D.E., Cox B., Howel B.A., Shirley B.C. Effect of hepatocarcinogens on hepatocyte DNA synthesis and cortisone induction of tryptophaneoxygenase. Cancer Res. 1969;29:2039-2046.

Kropachev K.Yu., Kaledin V.I., Kobzev V.F., Timofeeva O.A., Ilnitskaya S.I., Vasilyeva E.D., Plisov C.Y., Richkova N.A., Filipenko M.L., Merkulova T.I. Involvement of transcription factor HNF3γ in the effect of *o*-aminoazotoluene on glucocorticoid induction of tyrosine aminotransferase in mice sensitive to its hepatocarcinogenic action. Mol. Carcinog. 2001;31:10-15.

Merkulova T.I., Kropachev K.Yu., Timofeeva O.A., Vasiliev G.V., Levashova Z.B., Ilnitskaya S.I., Kobzev V.F., Pakharukova M.Y., Bryzgalov L.O., Kaledin V.I. Species-specific effects of the hepatocarcinogens 3′-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene and ortho-aminoazotoluene in mouse and rat liver. Mol. Carcinog. 2005; 44:223-232.

Mikhailova O.N., Vasyunina E.A., Ovchinnikova L.P., Timofeeva O.A., Filipenko M.L., Kaledin V.I. O-aminoazotoluene does induce the enzymes of its own metabolism in mouse liver. Toxicology. 2005;211:132-138.

Miller M.S., Buzard G.S., McDowell A.E. *In vivo* inhibition of glucocorticoid-inducible gene expression by dimethylnitrosamine in rat liver. Biochen. Pharmacol. 1993;45:1465-1470.

Ohmi R., Bhargava M., Arias I.M. Binding of 3′-methyl-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzene metabolites to rat liver cytosol proteins and ligandin subunits. Cancer Res. 1981;41:3461-3464.

Testa B., Jenner P. Inhibitors of cytochrome P450s and their mechanism of action. Drug Metab. Rev. 1981;12:1-117.

Timofeeva O.A., Eremeev A.V., Goloshchapov A., Kalashnikova E., Ilnitskaya S.I., Setkov N.A., Kobzev V.F., Buzard G.S., Filipenko M.L., Kaledin V.I., Merkulova T.I. Effect of o-aminoazotoluene on liver regeneration and p53 activation in mice susceptible and resistant to hepatocarcinogenesis. Toxicology. 2008;254: 91-96.

Warwick G.P., Roberts J.J. Persistent binding of butter yellow metabolites to rat liver DNA. Nature. 1967;215:1206-1207.

Wogan G.N., Friedman M.A. Inhibition by aflatoxin B_1 of hydrocortisone induction of rat liver tryptophan pyrrolase and tyrosine aminotransferase. Arch. Bioch. Biophys. 1968;128:509-516.

Эпигенетические «зонды» для мониторинга рака легкого: профиль метилирования элементов LINE-1 в циркулирующей ДНК крови

А.А. Пономарева[1, 3], Е.Ю. Рыкова[2], Н.В. Чердынцева[1, 4], А.А. Бондарь[2], А.Ю. Добродеев[1], А.А. Завьялов[1], С.А. Тузиков[1], Л.О. Брызгалов[5], Т.И. Меркулова[5], В.В. Власов[2], П.П. Лактионов[2]

[1] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский научно-исследовательский институт онкологии», Томск, Россия; [2] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия; [3] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», Томск, Россия; [4] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия; [5] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Основными компонентами аберрантного метилирования ДНК клеток опухоли являются гиперметилирование промоторов некоторых генов и гипометилирование значительной части ДНК, в частности повторяющихся последовательностей ретротранспозонов. В опухолевой ткани при раке легкого (РЛ) выявлено гипометилирование ретротранспозонов семейства LINE-1. Известно, что при онкологических заболеваниях в составе циркулирующей ДНК (цирДНК) плазмы и цирДНК, связанной с поверхностью клеток крови (скп-цирДНК), накапливаются фрагменты опухолеспецифичных аберрантно метилированных ДНК, которые являются потенциальными онкомаркерами. В настоящей работе проведен сравнительный анализ уровня метилирования LINE-1 ретротранспозонов в цирДНК плазмы и скп-цирДНК 21 больного РЛ до лечения и 23 здоровых доноров. Определяли концентрацию метилированных фрагментов LINE-1 района 1 (LINE-1 methylated, LINE-1met) методом количественной метил-специфичной ПЦР. Для нормирования данных по метилированию оценивали концентрацию всех фрагментов LINE-1 района 2 (LINE-1 Independent, LINE-1Ind). Выявлена тенденция снижения концентрации метилированных фрагментов LINE met (в 1,4 раза) во фракции цирДНК, связанной с клетками крови, у больных РЛ (критерий Манна-Уитни, $p = 0{,}16$). Оказалось, что в группе больных РЛ концентрация всех фрагментов LINE-1Ind, которая не зависит от статуса метилирования, в 3 раза ниже (при аденокарциноме – в 4 раза) относительно здоровых доноров. Поэтому в скп-цирДНК крови при РЛ вместе с ожидаемым снижением общей концентрации LINE-1met выявлено неожиданное увеличение их относительной концентрации (LINE-1met/LINE-1Ind) за счет значительного снижения общего количества LINE-1Ind. В цирДНК плазмы индекс метилирования (LINE-1met/LINE-1Ind) у больных РЛ не отличается от здоровых доноров (критерий Манна-Уитни $p = 0{,}40$). Полученные результаты подтверждают более ранние данные о том, что фракция скп-цирДНК является высокоинформативным источником материала для диагностики рака легкого.

Ключевые слова: циркулирующие ДНК крови, аберрантное метилирование, LINE-1 ретротранспозоны, диагностика, рак легкого.

Epigenetic «probes» for lung cancer monitoring: LINE-1 methylation pattern in blood-circulating DNA

A.A. Ponomaryova[1, 3], E.Y. Rykova[2], N.V. Cherdyntseva[1, 4], A.A. Bondar[2], A.Y. Dobrodeev[1], A.A. Zavyalov[1], S.A. Tuzikov[1], L.O. Bryzgalov[5], T.I. Merkulova[5], V.V. Vlassov[2], P.P. Laktionov[2]

[1] Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk, Russia; [2] Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia; [3] The National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia; [4] National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia; [5] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

Malignant cell transformation is accompanied by two processes of DNA methylation changes: promoter hypermethylation of specific genes and hypomethylation of retrotransposons. The composition of circulating DNA (cirDNA) from plasma and cell-surface-bound circulating DNA (csb-cirDNA) was shown earlier to be altered in the blood of cancer patients due to accumulation of tumor-specific aberrantly methylated DNA fragments, which are currently considered valuable cancer markers. The present study compares LINE-1 retrotransposon methylation patterns in plasma cirDNA and csb-cirDNA from 21 untreated lung cancer patients (LC) and 23 healthy donors. Concentrations of methylated LINE-1 region 1 copies (LINE-1met) were assayed by real-time methylation-specific PCR. In order to normalize the LINE-1 methylation level, the LINE-1 region 2 concentration was evaluated, which was independent of the methylation status (LINE-1Ind). The LINE-1met concentration in csb-cirDNA tended to decrease (by a factor of 1.4) in blood from LC patients in comparison to healthy donors (Mann-Whitney test, P=0.16). The LINE-1Ind concentration in csb-cirDNA (methylation-independent) was found to be threefold lower in LC patients and fourfold lower in patients with adenocarcinoma than in healthy donors. That is why, along with the expected decrease in LINE-1met concentration in csb-cirDNA, we recorded an unexpected statistically significant

УДК 616.24–006.6:577.21
Поступила в редакцию 20.10.2014 г.
Принята к публикации 15.12.2014 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: rykova@niboch.nsc.ru

increase of the LINE-1 methylation index determined as (LINE-1met/LINE-1Ind) due to the profound LINE-1Ind decrease. Plasma cirDNA demonstrated no difference in the LINE-1 methylation index (LINE-1met/LINE-1Ind) between LC patients and healthy donors (Mann-Whitney test, P = 0.40). The data obtained agree with our earlier results, which showed that csb-cirDNA was a highly informative material for lung cancer diagnostics.

Key words: blood-circulating DNA, aberrant methylation, LINE-1 retrotransposons, diagnostics, lung cancer.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Пономарева А.А., Рыкова Е.Ю., Чердынцева Н.В., Бондарь А.А., Добродеев А.Ю., Завьялов А.А., Тузиков С.А., Брызгалов Л.О., Меркулова Т.И., Власов В.В., Лактионов П.П. Эпигенетические «зонды» для мониторинга рака легкого: профиль метилирования элементов LINE-1 в циркулирующей ДНК крови. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):144-150.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Cherdyntseva N.V., Bondar A.A., Dobrodeev A.Y., Zavyalov A.A., Tuzikov S.A., Bryzgalov L.O., Merkulova T.I., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Epigenetic «probes» for lung cancer monitoring: LINE-1 methylation pattern in blood-circulating DNA. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):144-150.

Изменение профиля метилирования ДНК – одно из наиболее ранних и распространенных событий канцерогенеза. Основными компонентами аберрантного метилирования являются гиперметилирование промоторов генов опухолевой супрессии и гипометилирование значительной части ДНК, сопровождающееся активацией онкогенов, ретротранспозонов и геномной нестабильностью (Ehrlich, 2002; Bourc'his, Bestor, 2004). Показано во многих случаях, что изменение статуса метилирования предшествует генетическим мутациям и определяет развитие молекулярных событий при канцерогенезе (Esteller, 2008; Kristensen, Hansen, 2009). Достоверно известно, что при раке в составе циркулирующих ДНК (цирДНК) плазмы/сыворотки крови накапливаются фрагменты аберрантно метилированных ДНК, идентичных ДНК опухоли, которые могут быть потенциальными онкомаркерами (Radpour et al., 2011; Carethers, 2012; Schwarzenbach et al., 2014).

Анализ эпигенетического статуса фрагментов ДНК, циркулирующих в крови, является привлекательным для диагностики, однако его применение осложняется низкой концентрацией молекул ДНК, невысоким содержанием опухоле-специфичных ДНК относительно ДНК здоровых клеток и небольшим размером фрагментов (Peters, Pretorius, 2011). Недавно была показана возможность увеличения эффективности определения метилированных фрагментов генов опухолевой супрессии за счет использования фракции циркулирующих ДНК, связанных с поверхностью клеток крови (скп-цирДНК), как эритроцитов, так и лейкоцитов (Ponomaryova et al., 2013). Было установлено, что фракция скп-цирДНК содержит ДНК больше, чем в плазме, представлена более длинными молекулами и эффективнее накапливает «опухолевые» фрагменты (Rykova et al., 2012; Ponomaryova et al., 2013). Кроме того, чувствительность анализа можно увеличить за счет выбора повторяющихся последовательностей ДНК в качестве кандидатных онкомаркеров вместо стандартно используемых известных однокопийных генов опухолевой супрессии, которые инактивированы в опухолях путем гиперметилирования (Ramzy et al., 2011; Hoshimoto et al., 2012). Например, длинные диспергированные ядерные повторы (Long Interspersed Nuclear Elements) многократно представлены в геноме человека и составляют приблизительно 17 % его длины (до 500 000 копий/геном) (LINE-1, LINE-2, LINE-3 и HAL-1) (Lander et al., 2001). Среди них LINE-1 является самым крупным классом автономных ретроэлементов у млекопитающих. Имеются данные о гипометилировании LINE-1 в злокачественных опухолях легких (Saito et al., 2010; Suzuki et al., 2013).

В этой связи исследование уровня метилирования LINE-1 элементов в составе циркулирующих ДНК представляет значительный интерес.

Цели настоящей работы – проведение сравнительного анализа уровня метилирования LINE-1 элементов в цирДНК плазмы и скп-цирДНК крови больных раком легкого и здоровых доноров.

Материалы и методы

В исследование включены образцы крови 23 здоровых лиц, проживающих на территории Западно-Сибирского региона, и 21 больного немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) ($T_{1-3}N_{0-3}M_0$), первично обратившихся в клинику Томского НИИ онкологии, в возрасте 48–65 лет (табл. 1). Диагноз морфологически верифицирован. Все исследования были проведены в соответствии с международными этическими правилами, получено разрешение этического комитета Томского НИИ онкологии.

Венозную кровь собирали в 0,05 М раствор ЭДТА в фосфатно-солевом буфере (соотношение крови и ЭДТА 1 : 5). Образцы крови разделяли на плазму и клетки крови, фракцию цирДНК, связанных с клеточной по-

Таблица 1. Клинико-морфологическая характеристика больных НМРЛ (n = 21)

Возраст, лет		Стадия	
≤ 60	10 (48 %)	I–II	0 (0 %)
> 60	11 (52 %)	III	21 (100 %)
Пол		Курение	
мужской	21 (100 %)	да	21 (100 %)
женский	0 (0 %)	нет	0 (0 %)
Гистологический тип			
плоскоклеточный рак легкого	13 (62 %)		
аденокарцинома	8 (38 %)		

верхностью (скп-цирДНК) получали последовательной обработкой клеток 5 мМ фосфатным буфером и 0,25 % раствором трипсина, как описано ранее (Ponomaryova et al., 2013). ДНК выделяли из 1 мл плазмы, 3 мл ФБ-ЭДТА и 1 мл трипсиновой фракции с помощью наборов «Blood DNA Isolation Kit» фирмы «BioSilica Ltd» (Новосибирск, Россия). ДНК из ФБ-ЭДТА и трипсиновой фракций объединяли, полученные суммарные препараты представляют собой скп-цирДНК. Образцы ДНК модифицировали бисульфитом натрия, очищали с помощью наборов для выделения модифицированной ДНК «Bisulfite ssDNA Isolation Kit» фирмы «BioSilica Ltd» (Новосибирск, Россия).

Анализ уровня метилирования LINE-1 элементов проводили с использованием количественной метил-специфичной ПЦР. Определение концентрации метилированных фрагментов LINE-1 района 1 (LINE-1 methylated (LINE-1met) – последовательность 241–361, GenBank локус X58075) проводилось методом TaqMan ПЦР в режиме реального времени с использованием праймеров 5′-gtgggatatagtttcgtggtgcgcgttt-3′ (прямой), 5′-aaaaaaaa ataacgaacgcacctaaa-3′ (обратный) и флюоресцентный зонд 5′-((5,6)-Tamra) ttgaaaagcgtaatattcgggtgggagtgatt-3-BHQ2′ (Aparicio et al., 2009). Для нормирования данных по метилированию оценивали концентрацию всех фрагментов LINE-1 района 2 (LINE-1 Independent (LINE-1Ind) – последовательность 162925–163131, GenBank локус AL162574.14) методом ПЦР в режиме реального времени с использованием праймеров 5′-ttttggaataggtgtggtgt-3′ (прямой), 5′-acttacactcccacacaata-3′ (обратный) и флюоресцентного красителя EvaGreen (Biotium, Hayward, California, США), как описано ранее (Bryzgunova et al., 2013). Для того чтобы точно определить концентрацию фрагментов LINE-1 районов 1 и 2 в исследуемых образцах, в качестве стандарта для калибровки использовали препарат полностью метилированной бисульфитконвертированной ДНК человека с известной концентрацией (Zymo Research, США). Концентрацию метилированных фрагментов LINE-1 района 1 (LINE-1met) и нормировочных фрагментов LINE-1 района 2 (LINE-1Ind) рассчитывали в геномах-эквивалентах (ГЭ) на 1 мл крови. Индекс метилирования рассчитывали как долю метилированных молекул от общего числа молекул по формуле (%) = 100 × (LINE-1met/LINE-1Ind). Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0». Для каждой выборки вычисляли среднее значение и стандартную ошибку. Статистическую значимость различий определяли с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Анализ чувствительности и специфичности тестов проводили методом построения ROC кривых в программе «MedCalc».

Результаты и обсуждение

В недавней работе Saito с соавт. (2010) для больных НМРЛ уже на стадии IA в ДНК ткани опухоли методом метил-специфичной количественной ПЦР было показано снижение уровня метилирования LINE-1 по сравнению с нормальной тканью. Гипометилирование LINE-1 при раке легкого было выявлено также другим методом: пиросеквенированием бисульфит-модифицированной ДНК, выделенной из опухоли (Suzuki et al., 2013). В настоящей работе мы использовали метод количественной метил-специфичной ПЦР для определения статуса метилирования LINE-1 при раке легкого в циркулирующей ДНК крови.

Полученные нами результаты показали, что есть тенденция к снижению количества копий метилированных фрагментов выбранного нами для анализа LINE-1 района 1 (LINE-1met) в связанной с клетками фракции цирДНК крови у больных НМРЛ, которая более выражена у пациентов с аденокарциномой (АК), чем у больных плоскоклеточным раком (ПКРЛ) (табл. 2). Однако снижение при АК также статистически незначимо по сравнению со здоровыми (12 724 ± 3 202 ГЭ/мл против 26 725 ± 2 781 ГЭ/мл, p = 0,251, критерий Манна-Уитни). В общей группе больных НМРЛ выявленная тенденция согласуется с данными, полученными на опухолевой ткани (Saito et al., 2010; Suzuki et al., 2013). Однако Suzuki с соавт. (2013) при сопоставлении пациентов с разными гистотипами НМРЛ показали более значительное снижение уровня метилирования LINE-1 элементов в ДНК опухолевой ткани у больных ПКРЛ по сравнению с АК. Различия в этих результатах могут быть связаны с анализом разных

Таблица 2. Концентрация метилированных фрагментов LINE-1 района 1 (LINE met) в крови

Группа НМРЛ	*n*	Скп-цирДНК*	Критерий Манна-Уитни	цирДНК плазмы крови*	Критерий Манна-Уитни
Аденокарцинома	8	12724# ± 3202	*p* = 0,167	1202# ± 533	*p* = 0,949
Плоскоклеточный рак легкого	13	24013 ± 3636		1138 ± 5053	
Больные НМРЛ (общая группа)	21	19364 ± 1918	*p* = 0,376	1163 ± 459	*p* = 0,817
Здоровые доноры	23	26725 ± 2781		1012 ± 489	

Здесь и в табл. 3: *p* – уровень значимости; * концентрация рассчитана в геномах-эквивалентах (ГЭ) на 1 мл крови; представлены среднее значение и стандартная ошибка; # сравнение проводилось между группами ПКРЛ и АК; НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого.

Таблица 3. Концентрация фрагментов LINE-1 района 2 (LINE-1Ind) в крови

Группа НМРЛ	*n*	Скп-цирДНК*	Критерий Манна-Уитни	цирДНК плазмы крови*	Критерий Манна-Уитни
Аденокарцинома	8	19495# ± 4132	*p* = 0,143	7755# ± 2351	*p* = 0,106
Плоскоклеточный рак легкого	13	33925 ± 3978		3245 ± 1352	
Больные НМРЛ (общая группа)	21	27317 ± 2156	*p* = 0,009	5048 ± 1310	*p* = 0,985
Здоровые доноры	23	76987 ± 6341		5010 ± 1108	

См. примечание к табл. 2.

районов LINE-1, так же, как с различными источниками ДНК, в нашем случае мы анализируем цирДНК крови, в которой общий профиль метилирования фрагмента определяется комбинацией молекул из разных источников – опухоли и здоровых тканей.

Согласно общепринятой практике анализа статуса метилирования целевых последовательностей, мы определяли не только абсолютное количество, но также относительное содержание метилированых фрагментов LINE-1met в цирДНК. Для этого нормировали количество метилированных фрагментов на общее количество фрагментов LINE-1, циркулирующих в крови. Это количество определяли в бисульфит-модифицированной цирДНК методом ПЦР анализа района 2 (LINE Ind), который был выбран в связи с тем, что в области комплементарности праймеров отсутствуют CpG динуклеотиды, поэтому с помощью одной реакции амплификации можно определять суммарное количество фрагментов в этом районе LINE-1 независимо от статуса метилирования. Данные по концентрации LINE-1Ind представлены в табл. 3, из которой следует, что в скп-цирДНК эта концентрация достоверно снижается у больных РЛ по сравнению со здоровыми донорами. По данным ROC-анализа выбрано оптимальное пороговое значение концентрации фрагментов LINE-1Ind в скп-цирДНК для дискриминирования больных РЛ и здоровых доноров, которое составляет 19 000 ГЭ/мл крови. При этом значении концентрации LINE-1Ind в цирДНК фракции, связанной с поверхностью клеток крови, позволяют с чувствительностью 79 % и специфичностью 64 % отличить больных РЛ от здоровых доноров.

Оказалось, что при РЛ концентрация LINE-1Ind в среднем ниже в 3 раза (при аденокарциноме – в 4 раза), а LINE-1met – только в 1,4 раза в скп-цирДНК больных РЛ относительно здоровых доноров. Поэтому в скп-цирДНК при вычислении индекса метилирования (LINE-1met/LINE-1Ind) мы наблюдаем парадоксальный феномен: значимое увеличение в группе больных РЛ по сравнению со здоровыми донорами ($p = 0,005$, критерий Манна-Уитни) (рисунок). Согласно данным ROC-анализа, оценка индекса метилирования LINE-1 повторов в цирДНК фракции, связанной с поверхностью клеток крови, позволяет с чувствительностью 78 % и специфичностью 80 % отличить больных РЛ от здоровых доноров (при пороговом значении ИМ 53 %).

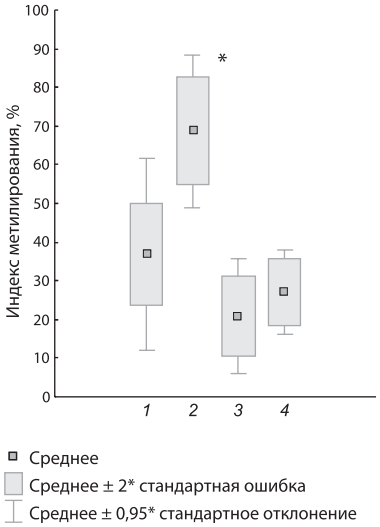
В цирДНК плазмы индекс метилирования (LINE-1met/LINE-1Ind) в общей группе больных не отличается от уровня здоровых доноров ($p = 0,398$, критерий Манна-Уитни), поскольку концентрация LINE-1Ind в плазме снижается только в группе больных ПКРЛ, и не так существенно, как в скп-цирДНК (табл. 4). При анализе связи между индексом метилирования (LINE-1met/LINE-1Ind) в цирДНК крови и гистологическим типом опухоли установлено, что в цирДНК плазмы больных с аденокарциномой индекс метилирования достоверно ниже, чем у больных с ПКРЛ ($p = 0,021$, критерий Манна-Уитни), и в скп-цирДНК для обоих гистотипов наблюдается одинаковое увеличение индекса метилирования по сравнению с контролем (табл. 4).

Таким образом, мы обнаружили в цирДНК крови больных РЛ ожидаемое, хотя и незначительное, снижение абсолютного количества метилированных фрагментов LINE-1 района 1 и неожиданное увеличение их относи-

Таблица 4. Индекс метилирования LINE-1 в цирДНК крови больных НМРЛ и здоровых доноров

Группа НМРЛ	*n*	Скп-цирДНК*	Критерий Манна-Уитни	цирДНК плазмы крови	Критерий Манна-Уитни
Аденокарцинома	8	67# ± 8	$p = 0,832$	17# ± 3	$p = 0,021$
Плоскоклеточный рак легкого	13	70 ± 13		32 ± 5	
Больные НМРЛ (общая группа)	21	69 ± 7	$p = 0,005$	21 ± 4	$p = 0,398$
Здоровые доноры	23	37 ± 6		27 ± 5	

* Индекс метилирования LINE-1 (%), представлены средние значения и стандартная ошибка; # сравнение проводилось между группами ПКРЛ и АК; НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого.



Уровень метилирования последовательностей LINE-1 в цирДНК крови больных раком легкого и здоровых доноров.

1 – здоровые доноры, скп-цирДНК; *2* – больные НМРЛ, скп-цирДНК; *3* – здоровые доноры, цирДНК плазмы крови; *4* – больные НМРЛ, цирДНК плазмы крови; * различия статистически значимы.

тельной концентрации за счет значительного снижения общего количества LINE-1 фрагментов района 2. Ранее было показано, что значимые различия в уровне метилирования фрагментов геномной ДНК, выделенной из ткани, могут не воспроизводиться при анализе цирДНК плазмы (Ponomaryova et al., 2013; Schwarzenbach et al., 2014). Это явление может быть связано с неравномерным фрагментированием молекул ДНК за пределами клеток и в кровотоке, и как следствие, с неоднородной представленностью цирДНК в крови (Skvortsova et al., 2011). Наши данные о снижении концентрации LINE-1 фрагментов в цирДНК крови согласуются с результатами нескольких полногеномных исследований, согласно которым разные классы длинных диспергированных повторов в цирДНК плазмы представлены различным образом: длинные LINE-1 повторы недопредставлены и наоборот, короткие Alu повторы перепредставлены в цирДНК плазмы/сыворотки крови по сравнению с геномной ДНК из клеток (Anker et al., 2001; Beck et al., 2009, 2010; Van der Vaart et al., 2009, Morozkin et al., 2012). Причем пониженное для LINE-1 или повышенное для Alu содержание фрагментов цирДНК становится достоверно более выраженным в цирДНК у больных с опухолями по сравнению со здоровыми донорами (Anker et al., 2001; Beck et al., 2010). Кроме того, значимое снижение концентрации фрагментов LINE-1 фрагментов района 2 в цирДНК крови у больных НМРЛ по сравнению со здоровыми донорами может быть связано с репрессией хроматина в зонах LINE-1 при ослаблении метилирования ДНК, что объясняется активацией защитных механизмов клетки (Dunican et al., 2013).

Нами впервые получены данные об уровне метилирования LINE-1 повторов в цирДНК крови у больных раком легкого. Недавно метилирование LINE-1 было проанализировано в сыворотке крови больных раком печени и больных меланомой (Ramzy et al., 2011; Hoshimoto et al., 2012). Важным итогом нашего исследования является тот факт, что трансляция данных, полученных путем анализа ДНК ткани опухоли, на цирДНК крови не всегда приводит к ожидаемым результатам. Поэтому в дальнейшем для определения панели актуальных эпигенетических маркеров, пригодных для диагностики рака по анализу крови, представляется наиболее перспективным исследование профиля метилирования молекул, непосредственно формирующих пул циркулирующей ДНК. Другой важный результат настоящей работы – это выявленные нами в крови больных НМРЛ более значительные изменения концентрации фрагмента LINE-1 района 2 в цирДНК, связанной с поверхностью клеток, чем в цирДНК плазмы, что говорит о разных механизмах накопления фрагментов ДНК в плазме и связанной с клетками фракции крови. Эти результаты подтверждают наши более ранние данные о том, что фракция скп-цирДНК является высокоинформативным источником материала для диагностики рака, в том числе злокачественных новообразований легкого (Rykova et al., 2012; Ponomaryova et al., 2013). Представляется интересным дальнейшее исследование относительной представленности и профиля метилирования разных районов LINE-1 элементов, которые наряду с другими аберрантно метилированными районами могут войти в состав новых панелей онкомаркеров крови.

Благодарности

Работа поддержана проектом Президиума СО РАН совместно со сторонними организациями № 65 (2012–2014 гг.), Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» на 2014 г., бюджетным проектом

№ VI.58.1.12, а также программой «Постдок в Томском политехническом университете».

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Anker P., Lyautey J., Lederrey C, Stroun M. Circulating nucleic acids in plasma or serum. Clin. Chim. Acta. 2001;313:143-146.

Aparicio A., North B., Barske L., Wang X., Bollati V., Weisenberger D., Yoo C., Tannir N., Horne E., Groshen S., Jones P., Yang A., Issa J.P. LINE-1 methylation in plasma DNA as a biomarker of activity of DNA methylation inhibitors in patients with solid tumors. Epigenetics. 2009;4:176-184.

Beck J., Urnovitz H.B., Mitchell W.M., Schütz E. Next generation sequencing of serum circulating nucleic reveals differences to healthy and nonmalignant controls acids from patients with invasive ductal breast cancer. Mol. Cancer Res. 2010;8(3):335-342. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0314

Beck J., Urnovitz H.B., Riggert J., Clerici M., Schütz E. Profile of the circulating DNA in apparently healthy individuals. Clin. Chem. 2009;55(4):730-738. DOI: 10.1373/clinchem.2008.113597

Bourc'his D., Bestor T.H. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. Nature. 2004;431(7004):96-99.

Bryzgunova O., Laktionov P., Skvortsova T., Bondar A., Morozkin E., Lebedeva A., Krause H., Miller K., Vlassov V. Efficacy of bisulfite modification and recovery of human of genomic and circulating DNA using commercial kits. Eur. J. Mol. Biol. 2013;1(1):1-8. DOI: 10.11648/j.ejmb.20130101.11

Carethers J.M. Proteomics, genomics, and molecular biology in the personalized treatment of colorectal cancer. J. Gastrointest Surg. 2012;16(9):1648-1650. DOI:10.1007/s11605-012-1942-2

Dunican D.S., Cruickshanks H.A., Suzuki M., Semple C.A., Davey T., Arceci R.J., Greally J., Adams I.R., Meehan R.R. Lsh regulates LTR retrotransposon repression independently of Dnmt3b function. Genome Biol. 2013;14(12):R146. DOI:10.1186/gb-2013-14-12-r146

Ehrlich M. DNA hypomethylation, cancer, the immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome and chromosomal rearrangements. J. Nutr. 2002;132. Suppl. 8:2424S-2429S.

Esteller M. Epigenetics in cancer. N. Engl. J. Med. 2008;358(11): 1148-1159.

Hoshimoto S., Kuo C.T., Chong K.K., Takeshima T.L., Takei Y., Li M.W., Huang S.K., Sim M.S., Morton D.L., Hoon D.S. AIM1 and LINE-1 epigenetic aberrations in tumor and serum relate to melanoma progression and disease outcome. J. Invest. Dermatol. 2012;132(6): 1689-1697. DOI: 10.1038/jid.2012.36

Kristensen L.S., Hansen L.L. PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer diagnostics, prognostics, and response to treatment. Clin. Chem. 2009;55(8): 1471-1483. DOI: 10.1373/clinchem.2008.121962

Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., Funke R., Gage D., Harris K., Heaford A., Howland J., Kann L., Lehoczky J., LeVine R., McEwan P., McKernan K., Meldrim J., Mesirov J.P., Miranda C., Morris W., Naylor J., Raymond C., Rosetti M., Santos R., Sheridan A., Sougnez C., Stange-Thomann N., Stojanovic N., Subramanian A., Wyman D., Rogers J., Sulston J., Ainscough R., Beck S., Bentley D., Burton J., Clee C., Carter N., Coulson A., Deadman R., Deloukas P., Dunham A., Dunham I., Durbin R., French L., Grafham D., Gregory S., Hubbard T., Humphray S., Hunt A., Jones M., Lloyd C., McMurray A., Matthews L., Mercer S., Milne S., Mullikin J.C., Mungall A., Plumb R., Ross M., Shownkeen R., Sims S., Waterston R.H., Wilson R.K., Hillier L.W., McPherson J.D., Marra M.A., Mardis E.R., Fulton L.A., Chinwalla A.T., Pepin K.H., Gish W.R., Chissoe S.L., Wendl M.C., Delehaunty K.D., Miner T.L., Delehaunty A., Kramer J.B., Cook L.L., Fulton RS, Johnson D.L., Minx P.J., Clifton S.W., Hawkins T., Branscomb E., Predki P., Richardson P., Wenning S., Slezak T., Doggett N., Cheng J.F., Olsen A., Lucas S., Elkin C., Uberbacher E., Frazier M., Gibbs R.A., Muzny D.M., Scherer S.E., Bouck J.B., Sodergren E.J., Worley K.C., Rives C.M., Gorrell J.H., Metzker M.L., Naylor S.L., Kucherlapati R.S., Nelson D.L., Weinstock G.M., Sakaki Y., Fujiyama A., Hattori M., Yada T., Toyoda A., Itoh T., Kawagoe C., Watanabe H., Totoki Y., Taylor T., Weissenbach J., Heilig R., Saurin W., Artiguenave F., Brottier P., Bruls T., Pelletier E., Robert C., Wincker P., Smith D.R., Doucette-Stamm L., Rubenfield M., Weinstock K., Lee H.M., Dubois J., Rosenthal A., Platzer M., Nyakatura G., Taudien S., Rump A., Yang H., Yu J., Wang J., Huang G., Gu J., Hood L., Rowen L., Madan A., Qin S, Davis R.W., Federspiel N.A., Abola A.P., Proctor M.J., Myers R.M., Schmutz J., Dickson M., Grimwood J., Cox D.R., Olson M.V., Kaul R., Raymond C., Shimizu N., Kawasaki K., Minoshima S., Evans G.A., Athanasiou M., Schultz R., Roe B.A., Chen F., Pan H., Ramser J., Lehrach H., Reinhardt R., McCombie W.R., de la Bastide M., Dedhia N., Blöcker H., Hornischer K., Nordsiek G., Agarwala R., Aravind L., Bailey J.A., Bateman A., Batzoglou S., Birney E., Bork P., Brown D.G., Burge C.B., Cerutti L., Chen H.C., Church D., Clamp M., Copley R.R., Doerks T., Eddy S.R., Eichler E.E., Furey T.S., Galagan J., Gilbert J.G, Harmon C., Hayashizaki Y., Haussler D., Hermjakob H., Hokamp K., Jang W., Johnson L.S., Jones T.A., Kasif S., Kaspryzk A., Kennedy S., Kent W.J., Kitts P., Koonin E.V., Korf I., Kulp D., Lancet D., Lowe T.M., McLysaght A., Mikkelsen T, Moran J.V., Mulder N., Pollara VJ, Ponting C.P., Schuler G., Schultz J., Slater G., Smit A.F., Stupka E., Szustakowski J., Thierry-Mieg D., Thierry-Mieg J., Wagner L., Wallis J., Wheeler R., Williams A., Wolf Y.I., Wolfe K.H., Yang SP, Yeh R.F., Collins F, Guyer M.S., Peterson J., Felsenfeld A., Wetterstrand K.A., Patrinos A., Morgan M.J., de Jong P., Catanese J.J., Osoegawa K., Shizuya H., Choi S., Chen Y.J. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature. 2001;409(6822):860-921.

Morozkin E.S., Loseva E.M., Morozov I.V., Kurilshikov A.M., Bondar A.A., Rykova E.Y., Rubtsov N.B., Vlassov V.V., Laktionov P.P. A comparative study of cell-free apoptotic and genomic DNA using FISH and massive parallel sequencing. Expert Opin. Biol. Ther. 2012;12(1):S141-S153. DOI: 10.1517/14712598.2012.670631

Peters D.L., Pretorius P.J. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA-a new paradigm in genetic behaviour. Clin. Chim. Acta. 2011;412(11/12):806-811. DOI: 10.1016/j.cca.2011.01.026

Ponomaryova A., Rykova E., Cherdyntseva N., Skvortsova T.E., Dobrodeev A.Y., Zav'yalov A.A., Bryzgalov L.O., Tuzikov S.A., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Potentialities of aberrantly methylated circulating DNA for diagnostics and post-treatment follow-up of lung cancer patients. Lung Cancer. 2013;81(3):397-403. DOI: 10.1016/j.lungcan.2013.05.016

Radpour R., Barekati Z., Kohler C., Lv Q., Bürki N., Diesch C., Bitzer J., Zheng H., Schmid S., Zhong X.Y. Hypermethylation of tumor suppressor genes involved in critical regulatory pathways for developing a blood-based test in breast cancer. PLoS ONE. 2011;6(1):e16080. DOI:10.1371/journal.pone.0016080

Ramzy I.I., Omran D.A., Hamad O., Shaker O., Abboud A. Evaluation of serum LINE-1 hypomethylation as a prognostic marker for hepatocellular carcinoma. Arab J. Gastroenterol. 2011;12(3):139-142. DOI:10.1016/j.ajg.2011.07.002

Rykova E.Y., Morozkin E.S., Ponomaryova A.A., Loseva E.M., Zaporozhchenko I.A., Cherdyntseva N.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content. Expert Opin. Biol. Th. 2012;12. Suppl. 1:S141-S153. DOI:10.1517/14712598.2012.673577

Saito K., Kawakami K., Matsumoto I., Oda M., Watanabe G., Minamoto T. Long interspersed nuclear element 1 hypomethylation is a marker of poor prognosis in stage IA non–small cell lung cancer. Clin. Cancer Res. 2010;16(8):2418-2426. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-2819

Schwarzenbach H., Nishida N., Calin G.A., Pantel K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. Nature Rev. Clin. Oncol. 2014;11(3):145-156. DOI: 10.1038/nrclinonc.2014.5

Skvortsova T.E., Bryzgunova O.E., Lebedeva A.O., Mak V.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Methylated cell-free DNA *in vitro* and *in vivo*. Circulating nucleic acids in plasma and serum (Ed. P.B .Gahan). United Kingdom: Springer, 2011:85-194. DOI: 10.1007/978-90-481-9382-0_25

Suzuki M., Shiraishi K., Eguchi A., Ikeda K., Mori T., Yoshimoto K., Ohba Y., Yamada T., Ito T., Baba Y., Baba H. Aberrant methylation of LINE-1, SLIT2, MAL and IGFBP7 in non-small cell lung cancer. Oncol. Rep. 2013;29(4):1308-1314. DOI: 10.3892/or.2013.2266

Van der Vaart M., Semenov D.V., Kuligina E.V., Richter V.A., Pretorius P.J. Characterisation of circulating DNA by parallel tagged sequencing on the 454 platform. Clin. Chim. Acta. 2009;409(1/2):21-27. DOI: 10.1016/j.cca.2009.08.011

e-mail: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090. Отв. секретарь редакции: С.В. Зубова, тел. (383)3634977*5415.
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. Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Зав. отделом: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: А.А. Ончукова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич. Компьютерная графика и верстка: А.В. Харкевич, Т.Б. Коняхина. Подписано в печать 20.03.2015 г. Формат бумаги 60 × 84 1/8. Усл.-печ. л. 17,78. Тираж 150 экз. Заказ № 91.

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН», Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.