

Національна академія наук України
Інститут молекулярної біології і генетики
Українське товариство генетиків і селекціонерів
ім. М.І. Вавилова

ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

**ФАКТОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ**

**FACTORS IN EXPERIMENTAL
EVOLUTION OF ORGANISMS**

Збірник наукових праць

Видається з 2003 р.

ТОМ 14

Присвячено

*180-річчю від часу заснування Київського національного
університету імені Тараса Шевченка*

Київ – 2014

УДК 575.8+631.52+60](082)

Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. /
Національна академія наук України, Інститут молекулярної біології і
генетики, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова; редкол.:
В.А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]. – К.: Укр. т-во генетиків і селекціонерів
ім. М.І. Вавилова, 2014. – Т. 14. – 259 с. – ISSN 2219-3782

Редакційна колегія

Головний редактор **В.А. Кунах**

Заступник головного редактора **Н.М. Дробик**

Я.Б. Блюм, Р.А. Волков, Т.К. Горова, Н.Г. Горовенко, Д.М. Гродзинський,
О.В. Дубровна, Г.В. Єльська, І.С. Карпова, І.А. Козерецька, В.А. Кордюм,
М.В. Кучук, Л.Л. Лукаш, С.С. Малюта, В.Г. Михайлов, В.В. Моргун,
М.А. Пілінська, В.Г. Радченко, С.Ю. Рубан, Ю.М. Сиволап, А.А. Сибірний,
В.А. Сідоров, О.О. Созінов, Т.К. Терновська, О.М. Тищенко

Відповідальний секретар – **М.З. Мосула**

Адреса редакції:

Інститут молекулярної біології і генетики НАНУ, вул. Акад. Заболотного, 150, Київ 03680
e-mail: kunakh@imbg.org.ua <http://www.utgis.org.ua>

Editorial board

Editor-in-Chief **V.A. Kunakh**

Deputy editor **N.M. Drobyk**

Ya.B. Blum, R.A. Volkov, T.K. Gorova, N.G. Gorovenko, D.M. Grodzynskyu,
O.V. Dubrovna, A.V. El'ska, I.S. Karpova, I.A. Kozeretska, V.A. Kordium,
N.V. Kuchuk, L.L. Lukash, S.S. Maliuta, V.G. Mykhailov, V.V. Morgun,
M.A. Pilinska, V.G. Radchenko, S.Yu. Ruban, Yu.M. Syvolap, A.A. Sybirniy,
V.A. Sidorov, O.O. Sozinov, T.K. Ternovska, O.M. Tyshchenko

Responsible secretary – **M.Z. Mosula**

Editorial office address:

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, 150, Zabolotnogo str., Kyiv, 03680
e-mail: kunakh@imbg.org.ua <http://www.utgis.org.ua>

***Затверджено до друку рішенням вченої ради Інституту молекулярної біології
і генетики НАН України (протокол № 8 від 3 червня 2014 р.)***

Свідоцтво про державну реєстрацію друкованого засобу масової інформації
серія КВ № 20100-9900Р від 08.07.2013

©Українське товариство генетиків
і селекціонерів ім. М.І. Вавилова

ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ
ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

ТОМ 14

2014

ФАКТОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ
FACTORS IN EXPERIMENTAL EVOLUTION OF ORGANISMS

ЗМІСТ

Мусієнко М.М., Бацманова Л.М. Минувле і сучасне біологічної науки Київського національного університету імені Тараса Шевченка (1834–2014 pp.)

ЕВОЛЮЦІЙНА ЕКОЛОГІЯ ТА
ЕКОГЕНЕТИКА

Баєр Г.Я., Пидюра М.О., Пірко Я.В., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Біоінформаційний пошук послідовностей генів, що кодують тубуліни у геномі льону

Демкович А.Е., Коршиков І.І., Макогон І.В. Поліморфізм дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) на донецьком краї по мікросателітним локусам

Жук О.І. Еволюція сигнальних систем фітогормонів рослин

Кашин А.С., Кочанова І.С., Лисицька Н.М., Угольнікова Е.В. Изменчивость частоты апомиксиса и половой структуры в популяциях *Antennaria dioica* европейской части России

Нурминская Ю.В., Максимова Л.А., Копытина Т.В., Еникеев А.Г. Устойчивость трансгенных растений табака к неблагоприятной температуре в ряду поколений

Орешкова Н.В., Седельникова Т.С., Пименов А.В., Ефремов С.П. Генетическая дифференциация болотных и суходольных популяций *Pinus sibirica* по данным SSR-маркеров

Созінов І.О., Козуб Н.О., Бідник Г.Я., Дем'янова Н.О., Карелов А.В., Блюм Я.Б., Созінов О.О. Вплив гамма-опромінення на ознаки продуктивності м'якої пшениці в залежності від генотипу і умов вирощування

CONTENTS

9 Musienko M.M., Batsmanova L.M. Past and nowadays of biological science in Taras Shevchenko National University of Kyiv (1834–2014)

EVOLUTIONAL ECOLOGY AND
ECOGENETICS

14 Bayer G.Ya, Pydiura N.A., Yemets A.I., Pirko Ya.V., Blume Ya.B. Bioinformatics search of the tubuline genes in linum genome

17 Demkovych A.Ye., Korshikov I.I., Makogon I.V. Polymorphism of *Quercus robur* L. investigated by microsatellite loci in Donetskii kryazh

21 Zhuk O.I. The evolution of plant signal phytogormonal systems

26 Kashin A.S., Kochanova I.S., Lysytskaya N.M., Ugolnikova E.V., Polyakova Yu.A. Apomixis rate variability and sex structures of population of *Antennaria dioica* of European Russia

30 Nurminskaya Y.V., Maximova L.A., Kopytina T.V. Enikeev A.G. The adaptation ability level of six generations of transformed tobacco plants to adverse temperature

35 Oreshkova N.V., Sedel'nikova T.S., Pimenov A.V., Efremov S.P. Genetic differentiation of bog and dry land populations of *Pinus sibirica* on SSR-marker data

39 Sozinov I.A., Kozub N.A., Bidnyk H.Ya., Demianova N.A., Karelov A.V., Blume Ya.B., Sozinov A.A. The effect of gamma-irradiation on productivity traits of common wheat depending on the genotype and growth conditions

Якимчук Р.А. Цитогенетические нарушения в озимой пшенице при действии радионуклидных загрязнений зоны отчуждения ЧАЭС через 25 лет после аварии

ЕВОЛЮЦІЯ ГЕНОМІВ У ПРИРОДІ ТА ЕКСПЕРИМЕНТІ

Єфіменко Т.С., Федак Ю., Антонюк М.З., Терновська Т.К. Порівняння хромосом 5-ї гомеологічної групи аврори та авротики з використанням специфічних мікросателітів

Коханенко А.А., Артемов Г.Н., Немирович-Данченко Н.М., Стегний В.Н. Организация половой хромосомы XL в пространстве ядер трофоцитов в ходе политенизации у видов *Drosophila* подгруппы «Melanogaster» с кардинальными различиями в архитектуре ядер

Кришчук І.А., Черепанова Е.В., Гайдученко Е.С., Задьра С.В., Левенкова Е.С., Демура Ю.К., Борисов Ю.М. Факторы дифференциации популяций *Sorex araneus* (Mammalia) в междуречье Днепра и Припяти (Беларусь)

Кулинченко М.В., Клименко Е.С., Вебер-Лотфи Ф., Диетриш А., Константинов Ю.М. ДНК как модулятор протонной проницаемости на внутренней мембране митохондрий *Solanum tuberosum*, действующий на уровне переносчика адениннуклеотидов

Михайлик С.Ю., Антонюк М.З., Терновська Т.К. Можливі молекулярні механізми мінливості гліадинових генів в інтрогресивних лініях пшениці

Наваліхіна А.Г., Антонюк М.З., Терновська Т.К. Генетична мінливість інтрогресивних ліній м'якої пшениці за геном бета-амілази

Полищук Л.В., Лукьянчук В.В. Гомология первичного строения гликозилтрансфераз биосинтетического пути ландомицинов у стрептомицетов

Рабокоть А.Н., Постовойтова А.С., Пирко Я.В., Блюм Я.Б. Анализ гомологов генов основных белков цитоскелета у различных видов высших растений

Стегний В.Н. Цитогенетические механизмы адаптации и эволюции видов

44 Yakimchuk R.A. Cytogenetic disorders of winter wheat under the effect of radio nuclide contemination in the ChNPP alienation zone 25 years after the accident

GENOME EVOLUTION IN NATURE AND IN EXPERIMENT

48 Iefimenko T.S., Fedak G., Antonyuk M.Z., Ternovska T.K. Comparison of group 5 chromosome of aurora and aurotica using specific microsatelites

52 Kokhanenko A.A., Artemov G.N., Nemirovich-Danchenko N.M., Stegny V.N. Organization of sex chromosome XL in the space of nuclei nurse cells during polytenization in *Drosophila* species subgroup «Melanogaster» with cardinal differences in the architecture of the nuclei

55 Kryshchuk I.A., Cherepanova E.V., Gajduchenko H.S., Zadyra S.V., Levenkova E.S., Demura Yu.K., Borisov Yu.M. Differentiation of *Sorex araneus* populations in territory between rivers Dnieper and Pripyat (Belarus)

58 Koulintchenko M.V., Klimenko E.S., Ibrahim N., Weber-Lotfi F., Dietrich A., Konstantino Yu.M. DNA as modulator of H⁺-ions permeability of inner membrane of mitochondria in *Solanum tuberosum* acting on the level of adenine nucleotide translocator

62 Mykhailyk S.Yu., Antonyuk M.Z., Ternovska T.K. Possible molecular mechanisms of variability in gliadin genes in the wheat introgressive lines

67 Navalihina A.G., Antonyuk M.Z., Ternovska T.K. Genetic variability of common wheat introgressive lines for beta-amylase gene

71 Polishchuk L., Lukyanchuk V. Primary structures homology of glycosyltransferases from landomycines synthetic ways of streptomyces

76 Rabokon A.N., Postovoytova A.S., Pirko YA.V., Blume Ya.B. Analysis of gene homology of some cytoskeletal proteins in different species of higher plants

79 Stegny V.N. Cytogenetic mechanisms of adaptation and evolution of the species

- Шпильчин В.В., Мартиненко В.С., Терновська Т.К.* Генетичний аналіз авротики (ААВВТТ) за ознакою наявності воскової осуги 82 *Shpylchyn V.V., Martynenko V.S., Ternovska T.K.* Genetic analysis of aurotica (AABBTT) based on glaucousness trait
- Штефюк Т.В., Антонюк М.З.* Мікросателітний аналіз хромосом 6D та 7D інтрогресивних ліній пшениці, стійких до борошнистої роси 86 *Shtefyuk T.V., Antonyuk M.Z.* The SSR analysis of 6D and 7D chromosomes of introgressive wheat lines resistant to powdery mildew

ЕПИГЕНЕТИКА І ГЕНЕТИКА РОЗВИТКУ

Ананьїна Т.В., Стегний В.Н. Изменение актинового цитоскелета и кольцевых каналов питающих клеток *Calliphora erythrocephala* в оогенезе

Виниченко Н.А., Кирикович С.С., Левитес Е.В. Влияние возраста листьев сахарной свеклы на ПЦР-профили ферментных генов

Геращенко Г.А., Рожнова Н.А. Детекция гемизиготного геномного фрагмента у форм *Boechera holboellii* (семейство Brassicaceae) с бесполосеменным размножением

Кирикович С.С., Левитес Е.В. Типы соотношений фенотипических классов при агамоспермии

Левитес Е.В. Генетическое расщепление в семенном потомстве при митотической агамоспермии

Юданова С.С. Изменчивость клеточных популяций у сахарной свёклы при различных способах репродукции

СТРУКТУРА І ФУНКЦІЇ ХРОМОСОМ

Азизов И.В., Кулиев Г.Н., Мамедрзаева Э.Т., Шамилов Э.Н., Абдуллаев А.С., Шамилли В.Э., Кулиев А.Г. Кариотипы *Microtus obscurus* на территории Азербайджанской Республики

Левенкова Е.С. Структурные перестройки хромосом в микроэволюции

Лісовська Т.П., Кузьмішина І.І., Коцун Л.О., Войтюк В.П., Андреева В.В. Мейотична мутація томату що порушує конденсацію хроматину

EPIGENETICS AND DEVELOPMENTAL GENETICS

92 *Anan'ina T.V., Stegny V.N.* Change of the actin cytoskeleton and ring channels in the nurse cells *Calliphora erythrocephala* in oogenesis

95 *Vinichenko N.A., Kirikovich S.S., Levites E.V.* Influence age sugar beet leaves on PCR profiles of enzyme genes

100 *Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A.* Detection of hemizygous genome fragment at forms of *Boechera holboellii* (Brassicaceae family) with seeds-without-sex reproduction

104 *Kirikovich S.S., Levites E.V.* The types of phenotypic class ratios under agamospermy

108 *Levites E.V.* Genetic segregation in seed progeny under mitotic agamospermy

112 *Yudanova S.S.* A variability of cell population in sugar beet by different mode of seed reproduction

STRUCTURE AND FUNCTIONS OF CHROMOSOMES

117 *Azizov I.V., Quliyev G.N., Memmedrzayeva E.T., Shamilov E.N., Abdullayev A.S., Shamilli V.E., Quliyev A.Q.* Karyotypes of *Microtus obscurus* in the territory of the Republic of Azerbaijan

121 *Levenkova E.S.* Structural chromosome rearrangements in the microevolution

125 *Lisovska T.P., Kuzmishyna I.I., Kotsun L.O., Voitiuk V.P., Andreeva V.V.* Tomato meiotic mutation that disorders chromatin condensation

- Полищук Л.В., Мацелюх Б.П. рРНК-гены актиномицетов, гомологичные генам рРНК-кластера *Streptomyces globisporus* 1912-2 129 Polishchuk L.V., Matselukh B.P. rRNA-genes of actinomycetes, which are homologous to *Streptomyces globisporus* 1912-2 rRNA-cluster
- Твардовська М.О., Андреев І.О., Амосова А.В., Спіридонова К.В., Навроцька Д.О., Саматадзе Т.Е., Зоцук С.А., Муравенко О.В., Кунах В.А. Вивчення геномів рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з різних локалітетів прибережної антарктики за допомогою хромосомних та молекулярних маркерів 133 Twardovska M.O., Andreev I.O., Amosova A.V., Spiridonova K.V., Navrotska D.O., Samatadze T.E., Zoschuk S.A., Muravenko O.V., Kunakh V.A. Study of genomes in *Deschampsia antarctica* Desv. from different localities of maritime antarctic using chromosomal and molecular markers

АНАЛІЗ ТА ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНИХ РЕСУРСІВ

- Адамовская В.Г., Молодченкова О.О., Сичкарь В.И., Картузова Т.В., Безкровная Л.Я., Лаврова Г.Д. Характер изменчивости компонентного состава 7S и 11S глобулиновых белков у гибридов F₄ сои 138 Adamovskaya V.G., Molodchenkova O.O., Sichkar V.I., Kartuzova T.V., Bezkravnaya L.Y., Lavrova G.D. Character of component composition variation of 7S and 11S globulins at the F₄ hybrids of soybeen seed
- Андреев І.О., Мосула М.З., Мельник В.М., Бублик О.М., Конвалюк І.І., Дробик Н.М. Порівняння показників інформативності ПЛР-маркерів для аналізу генетичного різноманіття на прикладі *Gentiana lutea* L. 141 Andreev I.O., Mosula M.Z., Mel'nyk V.M., Bubylyk O.M., Konvalyuk I.I., Drobyk N.M. Comparison of informativeness indices of PCR-based markers for genetic diversity analysis as exemplified by *Gentiana lutea* L.
- Баєр Г.Я., Бойчук Ю.М., Пірко Я.В., Корховий В.І., Рахметов Д.Б., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Дослідження селекційного матеріалу рижю посівного (*Camelina sativa* (L.) Crantz) за допомогою ISSR-аналізу 146 Bayer G.Ya., Boichuk Yu.M., Pirko Ya.V., Korkhovoy V.I., Rakhmetov D.B., Yemets A.I., Blume Ya.B. Analysis of breeding false flax (*Camelina sativa* (L.) Crantz) material with ISSR markers
- Зайцева Г.П., Акинина Г.Е., Твердохлеб Е.В., Дугарь Ю.Н., Попов В.Н. Определение Lr генов в сортах пшеницы мягкой озимой украинской селекции 150 Zaitseva G.P., Akinina G.YE., Tverdokhlebe E.V., Dugar Yu.M., Popov V.N. Determination of Lr genes in soft winter wheat varieties of ukrainian selection
- Іващук Б.В., Пірко Я.В., Блюм Я.Б. Ідентифікація алельних станів гена RPG1 у сортів ячменю української селекції 153 Ivaschuk B.V., Pirko Ya. V., Blume Ya.B. Identification of RPG1 gene allelic variations in the ukrainian barley cultivars
- Козуб Н.О., Созінов І.О., Бідник Г.Я., Дем'янова Н.О., Созінов О.О. Різноманітність за локусами запасних білків популяцій *Aegilops biuncialis* vis. західного узбережжя Криму 156 Kozub N.A., Sozinov I.A., Bidnyk H.Ya., Demianova N.A., Sozinov A.A. Genetic diversity at storage protein loci in *Aegilops biuncialis* vis. in populations from the western coast of the Crimea
- Кулик М.І., Юрченко С.О. Формування продуктивності інтродукованого в центральній частині України *Panicum virgatum* L. (проса лозоподібного) 160 Kulyk M.I., Yurchenko S.O. Formation of productivity introduced in central Ukraine *Panicum virgatum* L. (switchgrass)

- Мамедова Н.Х., Шихлинский Г.М., Мамедова Р.Б.* Отбор и оценка некоторых гибридных форм хлопчатника на устойчивость к вилту 165 *Mammadova N.Kh., Shikhliniski H.M., Mammadova R.B.* The selection and qualifying durability a number of wilt diseases cotton hybrid forms
- Полякова Л.В., Гамаюнова С.Г., Журова П.Т.* Биохимические фенотипы деревьев дуба черешчатого в связи с устойчивостью к листогрызущим насекомым и естественным отбором 168 *Polyakova L.V., Hamayunova S.H., Jurova P.T.* Biochemical peculiarities of common oak trees in connection with tolerance to herbivores and nature selection
- Эйгес Н.С., Волченко Г.А., Волченко С.Г.* Толерантность к низкотемпературному фитопатогену, полученная с использованием метода химического мутагенеза у озимой пшеницы 172 *Eiges N.S., Volchenko G.A., Volchenko S.G.* Tolerance to low-temperature phytopathogene, obtained by utilization of the chemical mutagenesis method on winter wheat
- Faidiuk I.V.* Restriction of the growth of T7-like phages by plasmid prophage P1 177 *Faidiuk I.V.* Restriction of the growth of T7-like phages by plasmid prophage P1

ГЕНЕТИКА ЛЮДИНИ ТА МЕДИЧНА ГЕНЕТИКА

- Атраментова Л.А., Горпинченко М.Ю.* О возможности использования украинских фамилий для оценки уровня инбридинга 182 *Atramentova L.A., Gorpichenko M.Y.* About the use of ukrainian surnames to estimate the level of inbreeding in the communities with various population size
- Багацкая Н.В.* Частота спонтанного и индуцированного мутагенеза в лимфоцитах периферической крови детей с депрессивными расстройствами 186 *Bagatskaya N.V.* Spontaneous and induced mutagenesis frequency in peripheral blood lymphocytes of children with depressive disorders
- Бандажеский Ю.И., Дубовая Н.Ф., Швартау В.В., Михальская Л.Н.* Тератогенный эффект зерна овса из района, пострадавшего от аварии на чернобыльской атомной электростанции 190 *Bandazheuski Y.I., Dubova N.F., Schwartau V.V., Mikhalskaya L.N.* Teratogenic effect of oats grown in an area affected by the chernobyl nuclear power plant accident
- Деменкова І.Г.* Малі аномалії розвитку: їх особливості при деяких мультифакторіальних захворюваннях 194 *Demenkova I.G.* Small developmental anomalies: their features in some multifactorial diseases
- Дибков М.В., Завелевич М.П., Глузман Д.Ф., Полищук Л.О., Мalyuta О.В., Мalyuta С.С., Телегеев Г.Д.* Молекулярно-генетична система діагностики хронічних мієлопроліферативних новоутворень 197 *Dybkov M.V., Zavelevich M.P., Gluzman D.F., Polishchuk L.O., Malyuta O.V., Maliuta S.S., Telegeev G.D.* The molecular-genetic system for diagnostics myeloproliferative neoplasms
- Жилкова Е.С., Феськов А.М., Безпечная И.М., Федота А.М.* Генетические факторы нарушения сперматогенеза у мужчин со сниженной репродуктивной функцией 201 *Zhyilkova I.S., Feskov O.M., Bezpechna I.M., Fedota O.M.* Genetic factors of spermatogenesis failures in men with low reproductive function
- Ковалева В.И., Будрейко Е.А., Чумак С.А.* Иммуноцитогенетическая характеристика детей, страдающих сахарным диабетом I типа 204 *Kovaleva V.I., Budreyko E.A., Chumak S.A.* Immunocytogenetic characteristics in children with type I diabetes mellitus

- Левкович Н.М., Горовенко Н.Г.* 208 *Levkovich N.M., Gorovenko N.G.* Genetic structure characteristics of polymorphic variants xenobiotics detoxification system gene in ukrainian population
- Лучко Е.Н.* 211 *Luchko E.N.* Gender difference in aggression and empathy between ukrainian habitants
- Мустафаева Л.А., Козак Н.А.* 214 *Mustafaeva L.A., Kozak N.A.* Eproductive characteristics of crimean tatar women
- Начотова Т.А.* 217 *Nachotova T.A.* Dermatoglyphic patterns of adolescent girls with of different clinical types of secondary amenorrhea
- Підпала О.В., Лукаш Л.Л.* 220 *Pidpala O.V., Lukash L.L.* Composite cluster structure of mobile genetic elements in the MGMT gene intron as a source of regulatory sequences
- Піскун Р.П., Білошицька А.В., Гринчак Н.М., Шевчук Т.І., Горбатюк С.М., Піскун І.І., Ромашкіна О.А., Савицька А.А.* 224 *Piskun R.P., Biloshitska A.V., Grynchak N.M., Shevchuk T.I., Gorbatyuk S.M., Piskun I.I., Romashkina O.A., Savytska A.A.* Gene therapy, its peculiarities and the experience of its application in case of experimental atherosclerosis
- Талан О.А., Шеметун Е.В., Куринный Д.А., Пилинская М.А.* 229 *Talan O.A., Shemetun O.V., Kurinnyi D.A., Pilinskaya M.A.* Cytogenetic examination of people of different ages perfomed using the G-bending of metaphase chromosomes
- Ульянова М.В., Лавряшина М.Б., Дружинин В.Г.* 232 *Ulyanova M.V., Lavryashina M.B., Druzhinin V.G.* Comparison of reproduction features of the indigenous ethnic groups of Siberia

ІСТОРИЯ БІОЛОГІЇ

- Логінов М.І., Росновський М.Г., Логінов А.М.* 236 *Loginov M.I., Rosnovskiy M.H., Loginov A.M.* Lonf fiber flax selection: historical aspect of development
- Малецький С.І.* 240 *Maletskii S.I.* Morphogenesis and biospherocentric paradigm of life V.I. Vernadsky
- Михеев А.Н.* 245 *Mikhyeyev A.N.* Is there necessity for hypothesis of universal genome?
- Стельмах А.Ф.* 250 *Stelmakh A.F.* Could there be a common ground for the views of classical genetics and «michurin's biology»?
- Фомина И.Р.* 254 *Fomina I.R.* The development of ideas about the origin of life on Earth

HISTORY OF BIOLOGY

УДК 94.477.03.092

МУСІЄНКО М.М., БАЦМАНОВА Л.М.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка,

Україна, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, e-mail: l.batsmanova@gmail.com

МИНУЛЕ І СУЧАСНЕ БІОЛОГІЧНОЇ НАУКИ У КИЇВСЬКОМУ НАЦІОНАЛЬНОМУ УНІВЕРСИТЕТІ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА (1834–2014 рр.)

Багатобарвне і змістовне минуле та сучасне нашої *Alma mater* – Київський національний університет імені Тараса Шевченка. За 180 років існування його кращі вихованці зробили безцінний внесок у справу розвитку не лише вітчизняної, а й світової науки та культури. Університет пишається тим, що в ньому здобули освіту представники біологічної науки В.А. Бец (1834–1894), О.М. Бах (1857–1946), Д.К. Заболотний (1866–1929), О.В. Топачевський (1897–1975), І.І. Шмальгаузен (1884–1963), М.Г. Холодний (1882–1953), Д.К. Зеров (1895–1971), Ф.Г. Добжанський (1900–1975) та багато інших вчених, які вписали золоті сторінки в його історію і є гордістю української науки [1].

Рівно 180 років тому здійснилася давня мрія української козацької старшини та шляхетства (Костянтин Острозький, Іван Виговський, Іван Мазепа, Кирило Розумовський) про відкриття в Києві університету європейського зразка. Для університету було обрано місто Київ, яке на думку імператора Миколи I, за давніх літ до заснування університету було призначене, адже воно рівно дороге для всієї Росії, як колиски святої віри наших предків і разом з тим перший свідок громадянської їх самобутності [2, 3]. Це був шостий університет царської Росії (вже існували Московський, Казанський, Дерптський, Харківський, Петербургський).

Історія університету бере свій початок від 25 грудня 1833 р., коли було підтримано подання управляючого міністерства освіти графа С.С. Уварова про заснування Імператорського Університету Святого Володимира на базі перенесеного до Києва польського Кременецького ліцею. В цей день було затверджено тимчасовий статут і штат університету [4]. А вже 15 липня 1834 р., у день пам'яті святого рівноапостольного князя Володимира, відбулося урочисте відкриття університету в складі двох факультетів – філософського і юридичного. Філософський факультет мав два відділи: історико-філологічний та фізико-математичний. 18

жовтня 1834 р. на посаді першого ректора Університету наказом імператора Миколи I був призначений 29-річний професор ботаніки Московського університету, українець за походженням, Михайло Максимович – історик, фольклорист, видатний вчений-енциклопедист того часу. Кременецькі професори викладали в новоствореному університеті більшість фізико-математичних та біологічних наук. У 1835 році почалися заняття і на юридичному факультеті. На думку С.С. Уварова, університет був покликаний забезпечити моральне й розумове єднання польського юнацтва з російським у Києві, цьому колись першопрестольному місті Росії.

Значною проблемою для університету була відсутність власного приміщення, тому впродовж 1837–1842 рр. за проектом професора архітектури Петербурзької академії мистецтв В. Беретті було зведено будівлю у стилі класицизму, яка і досі використовується як головний корпус університету. Перехід університету до власного великого приміщення і прийняття в 1842 р. університетського статуту зумовило послідовну розбудову кафедральної системи університету.

Упродовж 1830–1860-х рр. університет був одним із центрів польського національно-демократичного руху. Микола I жорстоко розправився з учасниками руху і вирішив ліквідувати щойно створений університет. Згодом він обмежився його закриттям на рік, що й було зроблено в березні 1839 року. Слід нагадати, що пізніше в 1845–1847 рр. також розгорнуло свою діяльність Кирило-Мефодіївське братство. І, як свідчить історія, Київський університет з часом перетворився на визнаний національний науковий і культурний центр України. Коридори й аудиторії червоно-колонного красеня нашої *Alma mater* за різних часів і суспільно-політичних формацій пронизані чистими, справедливими ідеями першого ректора Михайла Максимовича, його побратимів Тараса Шевченка і Миколи Костомарова, пізніше Михайла Драгоманова, Михайла Грушевського, Івана Огієнка та

багатьох інших видатних особистостей, які ввійшли в історію університету своїми сміливими демократичними і національно окресленими вчинками в боротьбі за долю свого народу та майбуття України.

Вже з першого року заснування університету, серед 13 кафедр філософського факультету була кафедра ботаніки та зоології, яку очолили викладачі Кременецького ліцею – поляки В.Г. Бессер та А.Л. Андржейовський. Взагалі всі біологічні дисципліни викладали професори бувшого Кременецького ліцею (лекції читались латинською мовою). Курс ботаніки також охоплював фізіологію рослин. Пізніше на кафедрі ботаніки працювали Р.Е. Трауфеттер, О.С. Рогович, І.Ф. Шмальгаузен, І.Г. Борщов та Я.Я. Вальц, який започаткував новий напрямок – ботаніка нижчих рослин. Згідно Університетського статуту від 18 червня 1863 року у складі розряду природничих наук фізико-математичного факультету існували дві самостійні кафедри, кожна з двома відділеннями: (I) ботаніки з відділеннями: 1 – морфології та систематики рослин; 2 – анатомії та фізіології рослин та зоології (II) з відділеннями: 1 – порівняльної анатомії та систематики тварин; 2 – анатомії людини та фізіології тварин. З 1873 р. анатомію та фізіологію рослин розпочав читати Й.В. Баранецький. Впродовж 1873–1898рр. він читав курс анатомії і фізіології рослин. Й.В. Баранецький заснував першу фізіологічну лабораторію і по праву вважається основоположником фізіології рослин в Україні. В 1894 році кафедра ботаніки була розділена на кафедру морфології та систематики рослин (С.Г. Навашин) та кафедру анатомії і фізіології рослин (Й.В. Баранецький). Упродовж наступних 1894–1915 рр. С. Навашин очолював кафедру морфології й систематики рослин Київського університету Святого Володимира [5]. Саме тут С.Г. Навашин дослідив будову ядра і морфологію хромосом різних видів рослин, відкрив супутники хромосом, розробив основи каріології та вперше вказав на її таксономічне значення [7]. У серпні 1898 р. на засіданні XX з'їзду природодослідників і лікарів у Києві він вперше повідомив про відкрите ним унікальне явище – подвійне запліднення у покритонасінних рослин. Його лабораторії стали місцем паломництва вчених з усього світу С.Г. Навашин за час роботи на кафедрі ботаніки (1894–1914) сформував широко відому цитолого-ембріологічну школу, а відкриття подвійного запліднення у покритонасінних

рослин на прикладі *Lilium martagon* та *Fritilaria tenella* влітку 1898р. принесло світову славу Київському університету. Його учнями були М. Цінгер, Г. Левитський, В. Фінни, Л. Делоне, М. Холодний [9]. Ученем вченого був і його син Михайло Навашин – цитолог і цитогенетик, який вперше здійснив аналіз хромосом людини [8]. Впродовж 1900–1916 року кафедру анатомії та фізіології рослин очолював К.А. Пурієвич, основні наукові праці якого присвячені обміну речовин під час дихання та фотосинтезу рослин. Впродовж 1906-1933 рр. на кафедрі анатомії та фізіології рослин працював вчений із світовим ім'ям М.Г. Холодний, який провів блискучі дослідження з фітогормонології, екології рослин, мікробіології [6]. Широковідому наукову ботанічну школу систематикув та флористів нижчих і вищих рослин (Д.К. Зеров, О.В. Топачевський, О.М. Окснер, П.Ф. Оксіюк, О.Л. Липа та ін.) створив О.В.Фомін, який впродовж буремних переломних років (1914–1930 рр.) очолював кафедру, ботанічний сад університету і фактично очолював всю ботанічну науку того періоду на теренах сучасної України.

На кафедрі зоології впродовж різного часу від заснування і до реорганізації університету в 1920 р. працювали О.Ф. Міддендорф, Е.Е. Мірам, К.Ф. Кесслер, О.М. Паульсон, О.О. Ковалевський, М.В. Бобрецький, О.О. Коротнев, В.К. Совинський, О.М. Северцов, М.М. Воскобойников, І.І. Шмальгаузен, С.Ю. Кушакевич, В.П. Поспелов. Світове визнання у галузі порівняльно-ембріологічних досліджень та еволюційного вчення набули роботи вчених університету, корифеїв біологічної науки О.О. Ковалевського, О.М. Северцова та І.І. Шмальгаузена.

У 1841 році в університеті був відкритий медичний факультет, де функціонували кафедри: нормальної анатомії (М.І. Козлов); нормальної фізіології (Е.Е. Мірам); гістології, ембріології та порівняльної анатомії (П.І. Перемежко), фармакології (Ю.П. Лауденбах). На факультеті успішно працювали О.П. Вальтер, В.Б. Томса, В.О. Бец, О.Л. Рева, С.І. Чир'єв та найвидатніший фізіолог Київського університету В.Ю. Чаговець – основоположник сучасної електрофізіології. Біохімічні дослідження проводились на кафедрах загальної хімії та фізики і лише за університетським статутом 1884 р. вперше було засновано кафедру медичної хімії з окремою лабораторією для наукової роботи (О.О. Шеффер, В.Ф. Кістяковський, О.О. Садовень, А.Г. Ракочі). У

1920 р. на базі медичного факультету університету було відкрито Київський медичний інститут, куди перейшла і ця кафедра). За статутом 1842 р. від існуючої кафедри технології, сільського господарства, лісівництва і архітектури було також виділено самостійну кафедру сільського господарства і лісівництва (І.Ф. Якубовський), яку з 1890 р. реорганізовано в кафедру агрономії (С.М. Богданов), яка проіснувала до 1919 року. Професор С.М. Богданов створив перший в Європі сільськогосподарський ботанічний сад та агротехнічну лабораторію. Він науково обґрунтував методи оцінки доступності ґрунтової вологи для рослин, випередивши в цьому майже на чверть століття американських дослідників Л. Брігса та Г. Шанца. Ці результати стали надбанням світової науки, фундаментом вчення про водний режим рослин. Таким чином, в різний час з перших років його заснування в університеті працювали талановиті видатні вчені-біологи (М.О. Максимович, Р.Е. Траутфеттер, О.С. Рогович, Ш.Ф. Шмальгаузен, І.Г. Борщов, С.Г. Навашин, Й.В. Баранецький, К.А. Пурієвич, О.В. Фомін, К.Ф. Кесслер, О.О. Ковалевський, О.О. Коротнєв, О.М. Северцев, М.М. Воскобойніков, І.І. Шмальгаузен, П.І. Перемежко, М.М. Воскресенський, О.П. Вальтер, В.О. Бец, О.Ф. Міддендорф, С.І. Чир'єв, В.Ю. Чаговець, О.А. Садовень та багато інших), які своїми важливими відкриттями принесли світову славу нашому університету. Навіть цей короткий огляд є свідченням того, що біологи університету Св. Володимира впродовж 1833–1917 рр. зробили вагомий внесок в дослідження флори і фауни України, вивчення окремих груп рослин і тварин, формування наукових шкіл, розвиток нових галузей біологічної науки та підготовку кадрів високого фаху [7].

Надзвичайно складні часи пережив Київський університет Святого Володимира в часи першої світової війни та революційних подій 1917 року. Особливо гостра класова боротьба розгорнулася в часи Української Народної Республіки (УНР), Гетьманату, Директорії (1917–1919 рр.) та в період німецької, денікінської, більшовицької окупації. За часів УНР було відкрито Київський народний університет, що працював в стінах університету Св. Володимира в другу зміну. У період існування Української держави за Гетьмана П. Скоропадського Університет Святого Володимира набув офіційного статусу російського університету Києва. Поряд з ним, у

липні 1918 р. було створено Київський український державний університет. Весь цей час на фізико-математичному факультеті працювали кафедри ботаніки, зоології та порівняльної анатомії, штати яких були недоукомплектовані. У лютому 1919 р. більшовики зайняли Київ. Університет Святого Володимира та Київський український державний університет було об'єднано в одну установу – Київський університет – із головним завданням підготовки радянської інтелігенції. Весна 1920 р. була останньою в історії університету Святого Володимира. Більшовики ліквідували всі університети. За розпорядженням Наркомосвіти УРСР № 38 від 23 липня 1920 р. на базі університету, ліквідованого цим же розпорядженням, було створено Вищий інститут народної освіти ім. Драгоманова (ВІНО), який з 1926 р. також називався Київський інститут народної освіти (КІНО). Серед відомих вчених, що успішно працювали у ВІНО, КІНО були – академіки АН УРСР О.В.Фомін, І.І. Шмальгаузен, М.Г. Холодний, професори – В.В. Фінн, Д.К. Зеров, П.Ф. Оксіюк, М.М. Воскобойніков, В.М. Артоболевський. І лише в 1933 р. тринадцятирічний період різноманітних експериментів з вищою освітою в Україні закінчився і було відновлено Київський державний університет. Живучи в постійних злиднях, переслідувані й репресовані за абсурдними звинуваченнями, професорсько-викладацький склад Університету зумів відновити університетську освіту. У 1934 р. університет відзначив свій 100-річний ювілей. Університету було присвоєно ім'я Великого Кобзаря Т.Г. Шевченка. На той момент було відновлено його структуру, розпочато активну наукову та педагогічну діяльність [8]. На біологічному факультеті успішно розвиваються нові напрямки в галузі зоології (І.І. Шмальгаузен), паразитології (О.П. Маркевич), біохімії (О.В. Палладін) іхтіології (М.М. Воскобойніков, К.Л. Татарко), дарвінізму і генетики (С.М. Гершензон). Важливі народногосподарські проблеми розробляв створений у 1936 році Науково-дослідний інститут біології (директор проф. В.В. Фінн). Попри всі негаразди, ідеологічні обмеження та репресії, напередодні Другої світової війни Київський університет був серед провідних вищих навчальних закладів СРСР і посідав третє місце серед радянських університетів. У ньому навчалася 4 тисячі студентів, на 52 кафедрах працювало понад 300 професорів, доцентів, викладачів, з яких – 8 академіків і 6 член-

кореспондентів Академії наук України, 24 доктори, 65 кандидатів наук. Через аспірантуру університет готував молодих спеціалістів вищої кваліфікації із 43 спеціальностей. Та успішна розбудова університету була перервана другою світовою війною. З початком другої війни та наближенням німецько-фашистських військ до Києва, розпочалася евакуація й Київського університету. В Харкові на базі місцевого університету мав розгорнути свою роботу й Київський університет. Однак у вересні лінія фронту швидко наблизилася до міста, тому розпочалася друга евакуація колективів обох університетів до Кзил-Орди. Там, згідно рішення уряду, Київський та Харківський університети тимчасово об'єднувалися і на їх базі було створено Об'єднаний український державний університет (ОУДУ) на чолі з ректором О.М. Русько. Після переможного закінчення війни все було зроблено для відновлення колишньої слави Київського університету. Вагомий внесок в його розвиток внесли і представники біологічної науки: академіки В.І. Палладін, Д.К. Третьяков, Я.С. Модилевський, О.П. Маркевич, С.М. Гершензон, М.М. Гришко, О.В. Топачевський, М.Г. Холодний, Д.К. Зеров, Д.С. Воронцов, В.А. Мовчан, П.А. Власюк, П.Г. Костюк, В.І. Скок, П.Г. Богач, Д.М. Гродзинський, М.Ф. Шуба, М.Є. Кучеренко, В.В. Смирнов, А.Л. Бойко, М.М. Мусієнко, члени-кореспонденти Д.Л. Фердман, В.О. Беліцер, А.І. Ємченко, В.П. Тульчинська, А.М. Окснер, Л.Й. Рубенчик, В.Й. Білай, професори С.М. Морочковський, П.Ф. Оксінок, П.К. Шкварников, В.М. Артоболовський, О.П. Корнєєв, О.Б. Кістяковський, Л.О. Смогоржевський, Г.Й. Щербак, П.О. Ситько, Є.Ф. Сопін, В.Л. Зима, О.П. Кришталь, М.М. Ротмістров, Н.П. Корнюшенко, А.Ю. Вершигора, Г.Д. Бердишев, П.Д. Харченко, Б.Г. Новиков, Д.П. Проценко, І.П. Білоконь, О.Л. Липа, В.М. Гордієнко, Н.П. Масюк, Г.М. Чайченко та багато інших. Особливого значення набув університет в роки незалежності України [9]. 21 квітня 1994 р. Київському університету Указом Президента України Л.М. Кравчука № 176/94 було надано статус «національного», а 25 листопада 1999 р. новим Указом Президента України Л.Д. Кучми № 1496/99 автономний статус університету суттєво розширено. 5 травня 2008 р. видано Указ Президента України В.А. Ющенка № 412/2008, яким передбачено перетворення університету на головний навчально-науковий центр України з підготовки науково-педаго-

гічних та наукових кадрів вищої кваліфікації. 29 липня 2009 р. постановою Кабінету Міністрів України № 795 університету було надано статус самоврядного (автономного) дослідницького національного вищого навчального закладу, передбачено посилене фінансування програм перспективного розвитку університету [9]. Університет здійснює підготовку фахівців за освітньо-кваліфікаційними рівнями «Молодший спеціаліст», «Бакалавр», «Спеціаліст», «Магістр» і кадрів вищої кваліфікації в аспірантурі та докторантурі. Підготовка та перепідготовка фахівців здійснюється за 12 спеціальностями ОКР «Молодший спеціаліст», 47 напрямками ОКР «Бакалавр», 66 спеціальностями ОКР «Спеціаліст» та 91 спеціальністю ОКР «Магістр». Опановують їх більше 26 тис. студентів. Вищу кваліфікацію в університеті здобувають біля 1600 аспірантів та більше 120 докторантів. Навчальний процес забезпечують 192 кафедри, понад 75% науково-педагогічних працівників мають науковий ступінь доктора та кандидата наук; вчене звання професора та доцента мають понад 52% викладачів. Київський університет підтримує широкі міжнародні зв'язки з університетами зі всього світу. На сьогоднішній день університет має партнерські угоди з 175 університетами із 55 країн світу. Для проведення наукової роботи, участі у конференціях, читання лекцій університет щорічно відвідують біля 100 зарубіжних вчених та викладачів із 20 країн світу. Щороку у зарубіжні відрядження до 52–58 країн світу від'їжджає більше ніж 900 викладачів, науковців, студентів. До складу університету входить і Інститут біології, який був створений у травні 2011 р. шляхом об'єднання біологічного факультету, Ботанічного саду імені академіка О.В. Фоміна та Канівського природного заповідника. В його складі кафедри: біохімії, біофізики, загальної та молекулярної генетики, мікробіології та загальної імунології, вірусології, фізіології людини і тварин, фізіології та екології рослин, зоології, ботаніки, цитології, гістології та біології розвитку, теоретичної медицини, екології та охорони навколишнього середовища. Крім того науково-дослідна робота проводиться на базі відділення експериментальної біології (8 науково-дослідних лабораторій), відділення біологічних і біомедичних технологій (4 науково-дослідні лабораторії), Науково-дослідний інститут імені академіка Петра Богача (4 науково-дослідних відділи), Ботанічний сад імені академіка О.В. Фоміна, Канівський

природний заповідник, зоологічний музей. Інститут готує фахівців за спеціальностями та спеціалізаціями: біофізика, біохімія, радіобіологія, молекулярна біологія, біотехнологія, лабораторна діагностика, ботаніка вищих і нижчих рослин, генетика, зоологія безхребетних і хребетних, мікробіологія, імунологія, вірусологія, фітофізіологія, клітинна біологія та генна інженерія, фізіологія людини та тварин, цитологія, гістологія та біологія розвитку, екологія та охорона навколишнього середовища. Директор: Людмила Іванівна Остапченко,

доктор біологічних наук, професор, заслужений діяч науки і техніки України. Отже, біологічна наука в Київському національному університеті імені Тараса Шевченка має багату і славу історію. Вчені-біологи, які працювали в різний час, зокрема і впродовж існування біологічного факультету, збагатили її важливими відкриттями, сформували нові сучасні її галузі, підготували чисельну низку висококваліфікованих кадрів, чим створили своєму університетові світове визнання і славу.

Література

1. Історія Київського університету. – К.: Вид. КДУ, 1959. – 617 с.
2. Миловидов Л. Проекти університету у Києві у другій половині XVIII ст. Київські збірники історії й археології, побуту й мистецтва. – К, 1931. – Збірник 1. – С. 295–306.
3. ЦДІАЛ. – ф.733. – оп.69. – 1833 р. – спр.111. – арк.5-9.
4. ЦДІАЛ. – ф.744. – «Височайші» укази, рескрипти і «найвідданіші» доповіді по міністерству народної освіти (колекція). – оп.1, 1833. – спр.1003. – арк.1-7.
5. Навашин С.Г. Автобіографія // Журн. Рус. Бот.об-ва. – 1928. – 18, № 1–2. – С. 7–14.
6. Мусієнко М.М. Золоті імена України, народжені університетом імені Святого Володимира: Микола Григорович Холодний // Укр. ботан. журн. – 2003. – 60, № 3. – С. 326–347.
7. Нариси історії біологічного факультету. – К.: «Фітосоціоцентр», 2004. – 276 с.
8. Розвиток науки в Київському університеті за 100 років. – К.: вид. КДУ, 1935. – 325 с.
9. Нариси історії Київського національного університету імені Тараса Шевченка. – К.: «Наша культура і наука», 2004. – 440 с.

MUSIENKO M.M., BATSMANOVA L.M.

*Taras Shevchenko National University of Kyiv,
Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str., 64/13, e-mail: l.batsmanova@gmail.com*

PAST AND NOWADAYS OF BIOLOGICAL SCIENCE IN TARAS SHEVCHENKO NATIONAL UNIVERSITY OF KYIV (1834–2014)

The historical account of the biological science development in Taras Shevchenko National University of Kyiv from 1834–2014 's period has been shown.

ЕВОЛЮЦІЙНА ЕКОЛОГІЯ ТА ЕКОГЕНЕТИКА

УДК 633.52:577.21:632.165

БАСР Г.Я., ПИДЮРА М.О., ПІРКО Я.В., ЄМЕЦЬ А.І., БЛЮМ Я.Б.

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А, e-mail: galinabayer@mail.ru

БІОІНФОРМАЦІЙНИЙ ПОШУК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ГЕНІВ, ЩО КОДУЮТЬ ТУБУЛІНИ У ГЕНОМІ ЛЬОНУ

Льон (*Linum usitatissimum* L.) є однією з основних технічних культур, здавна забезпечує потреби людини у високоякісному волокні. Надзвичайно довгі (≤ 77 мм) волокна льону утворюються на зовнішніх тканинах стебла між флоемою і епідермісом [1]. Основним полімером льоноволокна є целюлоза, вміст якої може досягати 70% від маси зрілого волокна. Даний полімер переважно накопичується в клітинах флоєми (луб'яне волокно), де відкладається в клітинній стінці [2]. Молекулярні механізми біосинтезу целюлози поки що вивчені недостатньо, але основний компонент уже визначений – це сукупність 36-ти поліпептидів, що утворюють целюлозосинтазну розетку, зв'язану з елементами цитоскелету [3]. Важливим етапом в дослідженні рослинної клітини стала візуалізація руху целюлозосинтазного комплексу вздовж мікротрубочок в живих клітинах [4]. Припускають, що мікротрубочки слугують не лише «матрицею» для руху целюлозосинтазних комплексів [4–7], а і орієнтиром для їх вбудовування та видалення з плазматичної мембрани [6, 8]. Протягом останніх 15 років відкрито ряд генів, асоційованих з синтезом целюлози. Однак, лише для целюлозосинтазо-активного (CS11) білка встановлено безпосередній зв'язок з целюлозосинтазним комплексом та мікротрубочками [9–12]. Подальші роботи в напрямку вивчення різних механізмів взаємодії целюлозосинтазного комплексу і мікротрубочок, а також взаємодія останніх з мікрофібрилами льняних волокон, що формуються, можуть відкрити нові можливості для створення сортів льону з покращеною якістю волокна.

Тому метою роботи було проведення біоінформаційного пошуку та аналіз послідовностей генів, що кодують синтез α - і β -тубуліну (основних білків мікротрубочок) у льону для подальшого вивчення експресії відповідних генів.

Матеріали і методи

Пошук генів аналіз послідовностей генів, що кодують синтез α - і β - тубуліну у льону здійснювали за допомогою інструменту TBLASTN версії 2.2.26+ в базі даних Phytozome v9.1 (Phytozome. www.phytozome.net). Даний тип пошуку передбачає пошук на основі порівняння заданих амінокислотних послідовностей з трансльованою у амінокислотні послідовності базою даних нуклеотидів. Для цього було використано налаштування програми TBLASTN за замовчуванням. Відібрано амінокислотні послідовності, для яких поріг відсіву випадкових співпадінь (e-value) складало не більше 1^{-10} . Отримані послідовності були перевірені за допомогою алгоритму Hidden Markov Model у програмі HMMER3 (HMMER. <http://hmmer.janelia.org>) з використанням референтної бази даних родин білків Pfam-A (версія 25.0) [13]. Генетичні локуси, транскрибовані послідовності яких були віднесені за даними бази даних Pfam до родини тубулінів, було визначено як гени тубулінів льону. Для вирівнювання генетичних послідовностей та побудови філогенетичного дерева використовували програму ClustalW [14].

У базі даних Uniprot (<http://www.uniprot.org/help/sequence-alignments>) на даний момент не міститься жодної достовірно анотованої послідовності α - чи β -тубулінів, закодованих у геномі льону (*Linum usitatissimum*). Як правило, у геномах вищих рослин міститься від 3 до 11 ізоформ α - і β -субодиниць тубулінів. Так, наприклад, у геномі *A. thaliana*, який є досить добре дослідженим, анотовано 6 ізоформ α - тубуліну і 9 ізоформ β -тубуліну [15, 16]. Середня кількість амінокислот у послідовностях α - і β -тубуліну вищих рослин складає близько 445–450 амінокислот [17]. Відомо, що α - і β -тубуліни філогенетично мають суттєві відмінності, тому для пошуку

генів тубуліну у геномі льону нами було взято по одній послідовності α - і β -тубуліну *A. thaliana*, а саме – ізоформи alpha-1 (TBA1_ARATH) і beta-1 (TBB1_ARATH). У результаті проведеного дослідження, у геномі льону було виявлено 17 генів, які кодують послідовності тубулінів. До них віднесено гени, які закодовані у локусах Lus10021094, Lus10017217, Lus10036069, Lus10026813, Lus10002000, Lus10035497, Lus10008528, Lus10023348, Lus10038458, Lus10039231, Lus10027476, Lus10016448, Lus10040712, Lus10007851, Lus10005705, Lus10020281 і Lus10035422. Середня кількість амінокислот у послідовностях, які транскрибуються на основі даних генів тубулінів льону, складає близько 450 амінокислот, вказані гени мають невеликий розмір і подібну структуру. На основі філогенетичної подібності генів, що кодують α - і β -тубуліни льону, виділено групи найбільш подібних послідовностей (рис. 1). На основі цих даних зроблено припущення, що у геномі льону може бути закодовано до 7 ізоформ тубуліну α - і до 10 ізоформ β -тубуліну.

Далі, до множинного вирівнювання було включено по одній ізоформі α - і β -тубулінів *A. thaliana* – ті ж послідовності, що брали для пошуку генів льону. У результаті вирівнювання виявлених генів α - і β -тубуліну льону, транскрибованих у амінокислотні послідовності та десяти типів α - і β -тубуліну *A. thaliana* виділено дві групи генів тубуліну льону, які виявляють значну подібність до анотованих фрагментів α - і β -тубулінів *A. thaliana* з бази даних UniProt (рис. 2), тобто, можна виділити локуси, що кодують тубуліни різних типів. Так, генетичні локуси

Lus10007851, Lus10005705, Lus10020281 і Lus10035422 з високою долею ймовірності кодують ізоформи тубуліну α , а локуси Lus10021094, Lus10017217, Lus10036069, Lus10026813, Lus10023348, Lus10038458, Lus10039231, Lus10027476, Lus10016448 і Lus10040712 кодують ізоформи β -тубуліну. Локуси Lus10002000, Lus10035497 і Lus10008528 найбільш ймовірно кодують послідовності ізоформ α -тубуліну. Нами було висунуте припущення, що геном льону може містити 7 ізоформ α -тубуліну і 10 ізоформ β -тубуліну.

Для всіх даних генів отримані генетичні та транскрибовані амінокислотні послідовності. Виявлено, що дані гени мають у своїй послідовності 3 екзони і 2 інтрони. Використовуючи отримані амінокислотні послідовності та онлайн програму Primer3: WWW primer tool (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) було розроблено дизайн праймерів, які в подальшому будуть використані для оцінки експресії генів, що кодують α - і β -тубуліни льону.

Висновки

Таким чином, нами передбачено 17 генів тубуліну льону. За гомологією амінокислотних послідовностей до анотованих послідовностей *A. thaliana* гени льону вдалося віднести до 7 типів ізоформ α -тубуліну і 10 ізоформ β -тубуліну.

Робота була виконана при підтримці Фонду фундаментальних досліджень України, грант № Ф54.4/025 (2013–2014).

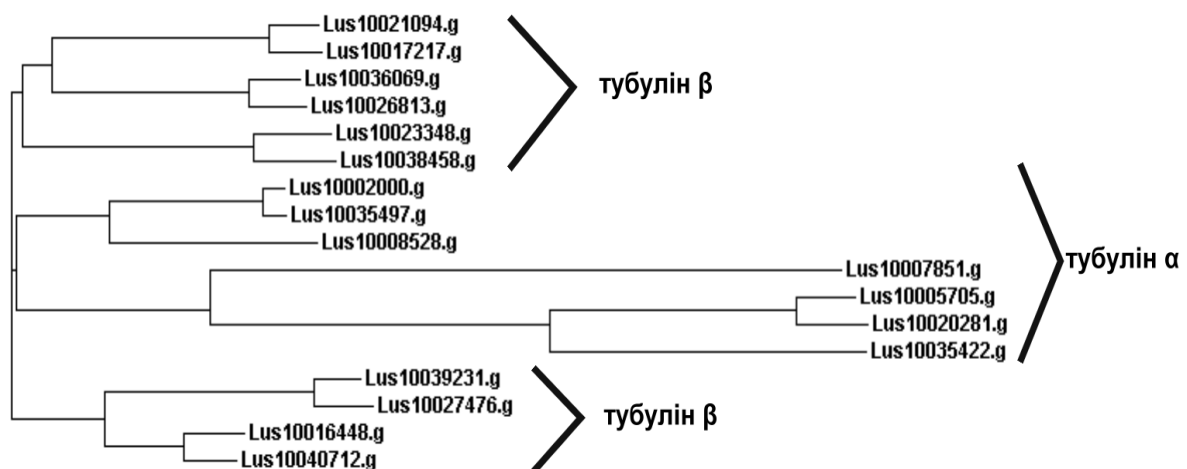


Рис. 1. Філогенетичне дерево подібності визначених нами генів, що кодують α - і β -тубуліни льону

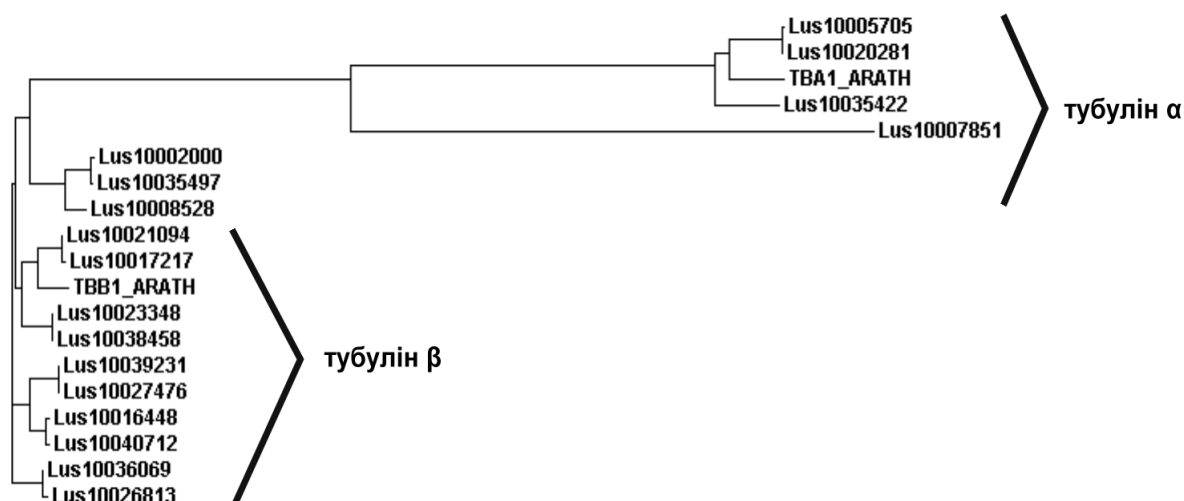


Рис. 2. Філогенетичне дерево подібності виявлених генів, що кодують α - і β -тубуліни льону, по одній ізоформі α - і β -тубулінів *A. thaliana* – ті ж послідовності, які брали для пошуку генів льону (TBA1_ARATH і TBB1_ARATH)

Література

1. Reddy N., Yang Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications//Trends in Biotech. – 2005. – 23. – P. 22–27.
2. Titok V., Leontiev V., Shostak L., Khotyleva L. Thermogravimetric analysis of the flax bast fiber bundle // J. Nat. Fibers. – 2006. – 3, № 1. – P. 35–41.
3. Doblin M.S., Kurek I., Jacob-Wilk D., Delmer D.P. Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes // Plant Cell Physiol. – 2002. – 43. – P. 1407–1420.
4. Paredez A.R., Somerville C.R., Ehrhardt D.W. Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules // Sci. – 2006. – 312. – P. 1491–1495
5. Emons A.M.C., Hofte H., Mulder B.M. Microtubules and cellulose microfibrils: how intimate is their relationship? // Trends Plant Sci. – 2008. – 12. – P. 279–281.
6. Crowell E.F., Bischoff V., Desprez T., Rolland A., Stierhof Y.D., Schumacher K., Gonneau M., Hofte H., Vernhettes S. Pausing of Golgi bodies on microtubules regulates secretion of cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*// Plant Cell. – 2009. – 21. – P. 1141–1154.
7. Chan J., Crowell E., Eder M. The rotation of cellulose synthase trajectories is microtubule-dependent and influences the texture of epidermal cell walls in *Arabidopsis* hypocotyls // J. Cell Sci. – 2010. – 123. – P. 3490–3495.
8. Gutierrez R., Lindeboom J. J., Paredez A. R., Emons A. M., Ehrhardt D. W. Arabidopsis cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments // Nat. Cell Biol. – 2009. – 11. – P. 797–806.
9. Gu Y., Kaplinsky N., Bringmann M., Cobb A., Carroll A., Sampathkumar A., Baskin T.I., Persson S., Somerville C.R. Identification of a cellulose synthase-associated protein required for cellulose biosynthesis // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2010. – 107. – P. 12866–12871.
10. Li Y., Shen Y., Cai C., Zhong C., Zhu L., Yuan M., Ren H. The type II *Arabidopsis* formin14 interacts with microtubules and microfilaments to regulate cell division // Plant Cell. – 2010. – 22. – P. 2710–2726.
11. Bringmann M., Li E., Sampathkumar A., Kocabek T., Hauser M.T., Persson S. POM- POM2/cellulose synthase interacting1 is essential for the functional association of cellulose synthase and microtubules in *Arabidopsis* // Plant Cell. – 2012. – 24. – P. 163–177.
12. Mei Y., Gao H.B., Yuan M., Xue H.W. The arabidopsis ARCP protein CS11 which is required for microtubule stability is necessary for root and anther development // Plant Cell. – 2012. – 24. – P. 1066–1080.
13. Punta M., Coghill P.C.I., Eberhardt R.Y., Mistry J., Tate J., Boursnell C., Pang N., Forslund K., Ceric G., Clements J., Heger A., Holm L., Sonnhammer E.L.L., Eddy S.R., Bateman A., Finn R.D. The Pfam protein families database // Nucleic Acids Res. – 2012. – 40. – P. 290–301.
14. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. Clustal-W – improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucleic Acids Res. – 1994. – 22. – P. 4673–4680.
15. Snustad D.P., Haas N.A., Koczak S.D., Silflowa C.D. The small genome of *Arabidopsis* contains at least nine expressed β -tubulin genes // Plant Cell. – 1992. – 4. – P. 549–556.

16. Koczak S.D., Haas N.A., Hussey P.J., Silflow C.D., Snustad D.P. The small genome of *Arabidopsis* contains at least six expressed α -tubulin genes // *Plant Cell*. – 1992. – 4. – P. 539–547.
17. Blume Ya.B., Baird W.V., Yemets A.I., Breviario D. *The Plant Cytoskeleton: Key Tool for Agro-Biotechnology*. – Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, 2008. – 457 p.

BAYER G.YA., PYDIURA N.A., YEMETS A.I., PIRKO YA.V., BLUME YA.B.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: galinabayer@mail.ru*

BIOINFORMATICS SEARCH OF THE TUBULINE GENES IN LINUM GENOME

Aims. Flax (*Linum usitatissimum*) is the most important industrial crop that covers human needs in the cellulose-rich fibers of high quality. Molecular mechanisms of cellulose biosynthesis are still poorly understood, but a basic component consisting of 36-polypeptides is already known. It is cellulose synthase complex associated with cytoskeleton elements. Obviously, both physical and chemical properties of cellulose biopolymer as well as the characteristics of newly-formed fiber depend on the genes expression during the cell wall biogenesis. **Methods.** Using *Arabidopsis* tubulin genes we have performed the similarity search of genes via TBLASTN predicted proteins of the *Linum* genome available at Phytozome v9.1. **Results.** A total of 17 tubulin gene candidates were found in *Linum* genome. Using ClustalW software we have made a multiple amino acid sequence alignment of the tubulin type specific regions of these genes with the sequences of *Arabidopsis* tubulin genes and obtained a phylogenetic tree for these sequences. **Conclusions.** We provide 17 genes of α - and β -tubulin in flax genome. Homology of amino acid sequences to sequences annotated *A. thaliana* genes flax able to carry up to 7 types of isoforms of α -tubulin and 10 isoforms of β -tubulin.

Key words: *Linum usitatissimum*, α -tubulin, β -tubulin, gene.

УДК 575.2:634.942 (477.62)

ДЕМКОВИЧ А.Е., КОРШИКОВ И.И., МАКОГОН И.В.

*Донецкий ботанический сад НАН Украины,
Украина, 83059, г. Донецк, пр. Ильича, 110, e-mail: dbsgenetics@gmail.com*

ПОЛИМОРФИЗМ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО (*QUERCUS ROBUR* L.) НА ДОНЕЦКОМ КРЯЖЕ ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ

Аборигенный вид украинской флоры и одна из главных лесообразующих пород Украины – дуб черешчатый (*Quercus robur* L.) – отличается высоким адаптационным потенциалом. Об этом свидетельствует его природная распространенность: от севера Скандинавии до юга Европы, от Пиренейского полуострова до Уральских гор. *Q. robur* – анемофильный вид с высоким уровнем ауткроссинга, доля самоопыления у растений в популяциях составляет 2–5% [1]. При этом жизнеспособная пыльца может распространяться до 80 км, обеспечивая опосредованный поток генов [2]. Изменчивость *Q. robur* давно является предметом исследований [3], а генетическое разнообразие с использованием молекулярных маркеров изучается в пределах ареала вида в Европе уже более 20 лет [4, 5]. В этом плане *Q. robur* на территории Украины изучен фрагментарно и то

зарубежными учеными, которые исследовали его популяционно-генетическую изменчивость в пределах определенной части ареала. Краевые популяции, находящиеся вне зоны экологического оптимума, где возможен дрейф генов, в поле зрения пока не попадали. На территории Украины природные дубравы встречаются в степной зоне, где их разнообразие лимитировано действием неблагоприятных факторов среды и влиянием человека.

В изучении популяционно-генетического разнообразия древесных растений активно применяются микросателлитные локусы. Их рассматривают в качестве эффективных маркеров, позволяющих проводить разносторонние исследования генетической изменчивости видов рода *Quercus* L. [2, 6, 7]. Многолокусный анализ микросателлитов, которые наследуются кодоминантно, позволяет идентифицировать каждый из двух аллелей

локуса, т.е. определить является ли исследуемая особь гомо- или гетерозиготной по этому локусу. В этом микросателлитный анализ имеет явное преимущество перед другими методами, например, RAPD и AFLP. Однако применение микросателлитов в анализе генетической изменчивости *Q. robur* в ряде случаев затруднено из-за присутствия в популяциях по многим локусам null-аллелей, которые не амплифицируются [7]. В анализе молекулярно-генетической изменчивости видов рода *Quercus* на основе ДНК чаще используют ядерные микросателлитные маркеры *ssrQrZAG* [2, 7], *ssrQpZAG* [8], *guru-GA* [9].

Цель работы – анализ генетического полиморфизма *Q. robur* в популяциях Донецкого края по четырем ядерным микросателлитным локусам.

Материалы и методы

Объектом исследований послужили растения *Q. robur* из двух популяций. В первой (НПП «Святые горы», пойменный лес на левом берегу р. Северский Донец, N 49°1'42", E 37°33'44" – N 49°1'43", E 37°32'19", Демкович А.Е.) исследовали 14 деревьев, во второй (Певчая балка на юго-восток от г. Зугреса, напротив с. Певчее, на склонах, N 47°59,663', E 38°18,428'; байрачный лес, на каменистых склонах, N 47°59,834', E 38°18,663'; 03.07.2013, Остапко В.М.) – 5 деревьев. ДНК получали из высушенных листьев гербарных образцов с использованием коммерческих наборов для выделения ДНК из животных тканей «Diatom DNA prep» (Изоген, Россия). Предварительно листья очищали от загрязнений, при необходимости проводили отмывку 96%-ным этанолом. Для сорбции фенольных соединений из растительных тканей применялся высокомолекулярный поливинилпирролидон (ПВП, K90), 7%-ный раствор которого добавлялся до начала гомогенизации на первом шаге протокола. Использовали четыре пары праймеров: GA-1C08, GA-1F02, GA-1I15, GA-0C19 [9] (табл.). Для каждого из анализируемых образцов ДНК была проведена полимеразная цепная реакция (ПЦР) при предварительно оптимизированной температуре с каждой парой праймеров к соответствующему микросателлитному локусу. Полученные ампликоны разделяли в вертикальном неденатурирующем 7%-ом полиакриламидном геле с последующей окраской бромистым этидием. В качестве

стандарта молекулярного веса использовали O'Range ruler 200 bp ДНКмаркер (Fermentas). Изображения гелей, полученные с помощью цифрового фотоаппарата или сканера, обрабатывали в свободно доступном программном обеспечении «GelAnalyser 2010a» [10], статистическую обработку данных проводили с помощью «GenAlEx» [11], «PopGen» [12].

Результаты и обсуждение

Для четырех ядерных микросателлитных локусов растений *Q. robur* были получены интерпретируемые спектры продуктов амплификации (рис.). Размеры ампликонов четырех локусов у *Q. robur* Донецкого края были близкими к ранее обнаруженным у этого вида в европейской части ареала [13]. Общее количество выявленных аллелей – 24, что на шесть аллелей больше чем, например, в популяциях этого вида во Франции по данным локусам (табл.). Одинаковое количество аллелей (2) у растений обеих частей ареала выявлено только по наименее изменчивому локусу – GA-1I15. Уровень наблюдаемой гетерозиготности по четырем микросателлитным локусам у *Q. robur* Донецкого края был ниже, чем в популяциях Франции. Если это снижение гетерозиготности для локуса GA-1C08 составило 21,2%, то по другим локусам оно было заметно больше: GA-1F02 = 53,0%, GA-1I15 = 70,6% и GA-0C19 = 83,6%. Одной из причин низкой изменчивости *Q. robur* украинской части ареала может быть проявление эффекта основателя в анализируемых выборках.

Другой возможной причиной обнаруженного по микросателлитным локусам избытка гомозигот является невозможность точного учета в ограниченной выборке всех гетерозигот по null-аллелям. Для их выявления необходимо заметно увеличить объем выборки, что позволит математически оценить их частоту. Так, в исследованиях изменчивости *Q. robur* по 6 из 32 микросателлитных локусов выявлены null-аллели. Однако обнаружены они были в результате аналитического скрещивания [7]. Генная множественность *Q. robur* в 12 популяциях Боснии и Герцеговины, исследуемых по другим микросателлитным локусам (QpZAG), была значительно выше, чем на основе анализируемых нами локусов в популяциях Донецкого края.

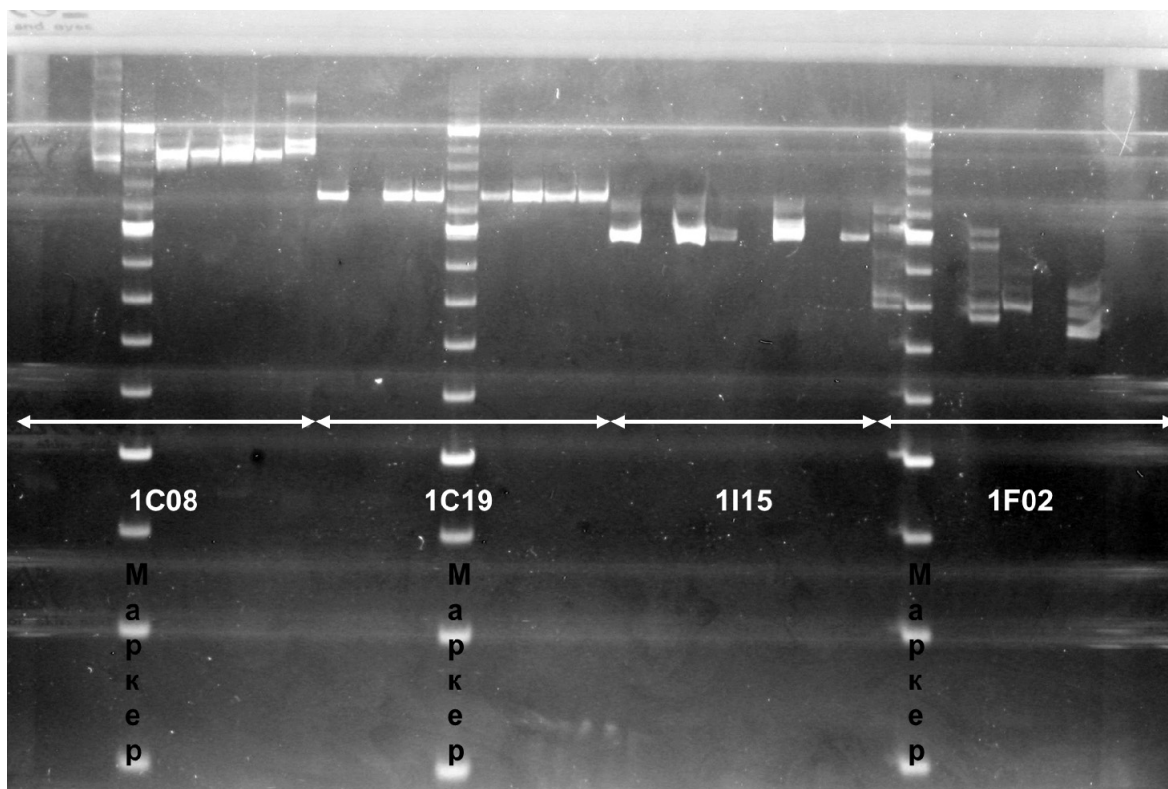


Рис. Электрофоретические варианты ампликонов по четырем ядерным микросателлитным локусам *Quercus robur* L.

Таблица. Показатели генетической изменчивости по четырем микросателлитным локусам *Quercus robur* L. на Донецком кряже

Локус	Последовательность праймеров (5'-3')	Температура отжига (°C)	Количество аллелей Na	Гетерозиготность		Размеры аллелей (пар нуклеотидов)
				ожидаемая H_E	наблюдаемая H_O	
quru-GA-1C08	F: TCCCAATCGATGTTTGATAA GG	60	<u>9</u>	<u>0,78</u>	<u>0,26</u>	<u>259–284</u>
	R: GGGCTCTTGAGAGGATGTA GG		7	-	0,33	224–276
quru-GA-0C19	F: TTAGCTTTTACGCAGTGTCG	60	<u>4</u>	<u>0,28</u>	<u>0,11</u>	<u>216–241</u>
	R: CGGCTTCGGTTTCGTC		2	-	0,67	216–226
quru-GA-1115	F: CAGCCTCATCGATTACCCCA AAC	50	<u>2</u>	<u>0,05</u>	<u>0,05</u>	<u>203–210</u>
	R: GGTCGCTGAGGGGAAAG		2	-	0,17	196–198
quru-GA-1F02	F: CCAATCCACCCTTCCAAGTT CC	50	<u>9</u>	<u>0,759</u>	<u>0,47</u>	<u>148–182</u>
	R: TGGTTGTTTTGCTTTATTCA GCC		7	-	1,00	154–168

Примечания: курсивом – литературные данные [13]; подчеркнуты оценки для *Q. robur* украинской части ареала.

В выборке 215 деревьев из 12 популяций *Q. robur* на Балканском полуострове выявлено 108 аллелей. При этом средняя наблюдаемая гетерозиготность (H_O) варьировала между популяциями от 0,563 до 0,833, хотя всегда была ниже ожидаемой гетерозиготности (H_E) [8]. Значения коэффициента инбридинга F_{IS} изменялись в пределах 0,074–0,362, составив в среднем 0,234. В популяциях *Q. robur* Донецкого края гетерозиготность деревьев по микросателлитным локусам составила в среднем 22,0%, во французских популяциях по этим локусам – 54,0% [13], что меньше, чем у *Q. robur* на Балканском полуострове – 67,4% [8]. Значение F_{IS} для исследуемой нами выборки *Q. robur* равнялось 0,43. Для трех микросателлитных локусов этой выборки установлено достоверное отклонение фактического распределения генотипов от теоретически ожидаемого согласно закону Харди-Вайнберга из-за избытка гомозигот. Средний коэффициент инбридинга в популяциях *Q. robur* из Греции, Болгарии, Германии, северной Британии варьировал от 0,100 до 0,590 [14–16]. Установленный нами с помощью четырех микросателлитных локусов уровень гетерозиготности *Q. robur* соответствовал фактически тому, что выявляется с помощью аллозимных маркеров. Так, например, в насаждениях *Q. robur* в Белорусском Полесье среднее значение H_O , определенное по 13 аллозимным локусам,

равнялось 0,227 [17]. В результате анализа ядерной ДНК методом PCR–RFLP девяти генетических резерватов и насаждений *Q. robur* в Беларуси установлено, что средние значения H_O и H_E варьировали соответственно 0,243–0,250 и 0,254–0,265 [18]. На Южном Урале средние значения H_O и H_E , определенные с помощью аллозимных локусов, были 0,248 и 0,323, а в случае использования девяти микросателлитных локусов QpZAG эти значения существенно возрастали: 0,746–0,847 и 0,685–0,805 соответственно [19]. Для двух популяций *Q. robur* на восточной границе природного распространения (Башкирское Зауралье и макросклоны Южно-Уральских гор) средние значения H_O и H_E , установленные в анализе изменчивости 17 аллозимных локусов, составили соответственно 0,138–0,145 и 0,118–0,124. Для этих популяций был свойствен некоторый избыток гетерозигот [20].

Выводы

На Донецком крае *Q. robur* отличается высоким уровнем генной множественности и средним уровнем генного разнообразия. Необходимы более детальные исследования популяционно-генетического разнообразия *Q. robur* как в степной зоне юго-востока Украины, так и в пределах всей украинской части ареала для создания генетических резерватов. Для таких исследований эффективными могут быть ядерные микросателлитные локусы.

Литература

1. Petit R.J., Csaikl U.M., Bordács S., Burg K., Coart E., Cottrell J., Van Dam B., Deans J.D., Dumolin-Lapigüe S., Fineschi S., Finkeldey R., Gillies A., Glaz I., Goicoechea P.G., Jensen J.S., Кцниг A.O., Lowe A.J., Madsen S.F., Мбтыбс G., Munro R.C., Olalde M., Pemonge M.-H., Popescu F., Slade D., Tabbener H., Turchini D., Sven de Vries G.M., Ziegenhagen B., Kremer A. Chloroplast DNA variation in European white oaks // For. Ecol. Manag. – 2002. – 156, № 1–3. – P. 5–26.
2. Buschbom J., Yanbaev Y., Degen B. Efficient Long-Distance Gene Flow into an Isolated Relict Oak Stand // J. of Heredity. – 2011. – 102, № 4. – P. 464–472.
3. Семериков Л.Ф. Изменчивость дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) на восточной границе ареала // Экология. – 1976. – № 5. – С. 13–21.
4. Kremer A., Petit R.J. Gene diversity in natural populations of oak species // Ann. Sci. For. – 1993. – 50 (Suppl. 1 “Genetics of Oaks”). – P. 186–202.
5. Hampe A., Pemonge M.-H., Petit R.J. Efficient mitigation of founder effects during the establishment of a leading-edge oak population // Proc. Biol. Sci. – 2013. – 280, № 1764. – P. 20131070.
6. Muir G., Schlütterer C. Evidence for shared ancestral polymorphism rather than recurrent gene flow at microsatellite loci differentiating two hybridizing oaks (*Quercus* spp.) // Mol. Ecol. – 2005. – 14, № 2. – P. 549–561.
7. Kampfner S., Lexer C., Glüssl J., Steinkellner H. Characterization of (GA)_n microsatellite loci from *Quercus robur* // Hereditas. – 1998. – 129, № 2. – P. 183–186.
8. Ballian D., Belletti P., Ferrazzini D., Boguni F., Kajba D. Genetic variability of Pedunculate Oak (*Quercus robur* L.) in Bosnia and Herzegovina // Periodicum Biologorum. – 2010. – 112, № 3. – P. 353–362.
9. Aldrich P.R., Michler C.H., Sun W., Romero-Severson J. Microsatellite markers for northern red oak (Fagaceae: *Quercus rubra*) // Mol. Ecol. – 2002. – 2, № 4. – P. 472–474.

10. GelAnalyser [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http://www.GelAnalyser.com /downloads/ users_manual_2010.pdf](http://www.GelAnalyser.com/downloads/users_manual_2010.pdf)
11. Peakall R., Smouse P. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Mol. Ecol.* – 2006. – 6. – P. 288–295.
12. POPGENE [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html
13. Aldrich P.R., Jagtap M., Michler C.H., Romero-Severson J. Amplification of North American red oak microsatellite markers in European white oaks and Chinese chestnut // *Silvae Genet.* – 2003. – 52, № 3–4. – P. 176–179.
14. Neophytou C., Aravanopoulos F., Fink S., Dounavi A. Detecting interspecific and geographic differentiation patterns in two interfertile oak species (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. robur* L.) using small sets of microsatellite markers // *For. Ecol. Manag.* – 2010. – 259, № 10. – P. 2026–2035.
15. Cottrell J.E., Munro R.C., Tabbener H.E., Milner A.D., Forrest G.I., Lowe A.J. Comparison of fine-scale genetic structure using nuclear microsatellites within two British oakwoods differing in population history // *For. Ecol. Manag.* – 2003. – 176, № 1–3. – P. 287–303.
16. Vranckx G., Jacquemyn H., Mergeay J., Cox K., Kint V., Muys B., Honnay O. Transmission of genetic variation from the adult generation to naturally established seedling cohorts in small forest stands of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) [Электронный ресурс] // *For. Ecol. Manag.* – 2013. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foreco.2013.10.027>
17. Каган Д.И. Популяционно-генетическая структура дуба черешчатого в лесосеменных плантациях и насаждениях Белорусского Полесья: автореф. дис. на соискание уч. степени кандидата биол. наук: спец. 06.03.01 «Лесные культуры, селекция, семеноводство». – Гомель, 2012. – 23 с.
18. Ковалевич О.А. Геногеография дуба черешчатого на территории Беларуси по данным анализа хлоропластной ДНК: автореф. дис. на соискание уч. степени кандидата биол. наук: спец. 06.03.01 «Лесные культуры, селекция, семеноводство». – Гомель, 2013. – 24 с.
19. Габитова А.А. Дуб черешчатый (*Quercus robur* L.) на Южном Урале: эколого-генетический анализ популяционной структуры: автореф. дис. на соискание уч. степени кандидата биол. наук: спец. 03.02.08 «Экология» (биологические науки) и 03.02.07 «Генетика». – Уфа, 2012. – 18 с.
20. Муллагулов Р.Ю., Редькина Н.Н., Янбаев Ю.А. Аллозимная изменчивость дуба черешчатого *Quercus robur* L. (Fagaceae) в изолированных популяциях на восточной границе ареала // *Вестник ОГУ.* – 2008. – № 81. – С. 107–110.

ДЕМКОВИЧ А.Е., KORSHIKOV I.I., MAKOGON I.V.

Donetsk Botanical Garden, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 83059, Donetsk, Pr. Illicha, 110, e-mail: dbsgenetics@gmail.com

POLYMORPHISM OF *QUERCUS ROBUR* L. INVESTIGATED BY MICROSATELLITE LOCI IN DONETSKIY KRYAZH

Aims. Analysis of tree genetic polymorphism at four nSSR loci in two highland populations of *Quercus robur* L. in Donetskii Kryazh. **Methods.** To determine plant genotype, we used electrophoretic analysis in polyacrylamide gel of PCR-products of four nSSR loci. **Results.** There were detected 2 to 9 (total 24) alleles at the investigated loci. Observed heterosigosity (H_O) = 0.22, expected (H_E) = 0.47. A significant excess of homozygous genotypes was detected. **Conclusions.** Microsatellite loci provide more exact determination of the allele diversity and heterozygosity of *Q. robur*.

Key words: *Quercus robur* L., population, polymorphism, microsatellite loci, Donetskii Kryazh.

УДК 581.1

ЖУК О.И.

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Украина, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: zhuk_bas@voliacable.com

ЭВОЛЮЦИЯ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ ФИТОГОРМОНОВ РАСТЕНИЙ

В процессе эволюции растительных организмов сформировались сложные сигнальные системы, координирующие экспрессию генов, клеточную активность в

процессе роста и развития, формирование ответа на стресс [1]. Критической детерминантой эволюции наземных растений является необходимость формирования органов для

поглощения воды, питательных веществ и элементов минерального питания из почвы. Существенный вклад в эти процессы вносят сигнальные системы фитогормонов. К одним из наиболее эволюционно ранних относят сигнальный комплекс ауксинов, которые были идентифицированы у водорослей, микроорганизмов, грибов, растений и необходимы для инициации роста [2]. Эволюционная дистанция между микроводорослями и наземными растениями значительна, однако уже у водорослей был идентифицирован AUX-IAA-ARF сигнальный комплекс.

Материалы и методы

Ключевую роль в ауксиновом сигналинге играют рецепторный белок TIR1-AFB, репрессор AUX-IAA и транскрипционный фактор ARF. ARF и AUX-IAA содержат консервативные участки и домены для их взаимодействия в сигнальном каскаде. ARF контактирует с TGTCTC промоторным элементом, который реагирует на ауксин и является главным транскрипционным регулятором экспрессии генов ответа на этот фитогормон. Последний функционирует как молекулярный клей, повышая взаимодействие между AUX-IAA и рецептором TIR-AFB-семейства, который также является компонентом комплекса протеинкиназ, регулирующих вступление клеток в S-фазу клеточного цикла.

У наземных растений описаны альтернативные ауксиновые сигнальные пути, в которых функционируют белки ABP1 и IBR5. Растительный белок ABP1 является членом суперсемейства запасных белков семян 7S и связывается с ауксином через домен BoxA. ABP1 локализован в растительных клетках преимущественно внутри эндоплазматического ретикулума и в значительно меньшем количестве – на внешней стороне плазмалеммы. Этот белок участвует в деполяризации мембран, росте клетки растяжением, контроле клеточных делений.

Результаты и обсуждение

Для ауксинов характерен векторный или полярный тип транспорта, который лежит в основе регуляции всех процессов морфогенеза. Полярные потоки ауксина контролируют эмбриогенез, апикальное доминирование, формирование почек и побегов, филлотаксис, опадение листьев, развитие сосудистой системы и боковых корней, цветение и тропизмы [3].

Система сигналинга ауксинов

непосредственно взаимодействует с сигнальной сетью микро РНК (mi RNA) в контроле функционирования апикальной меристемы побега растений, процессе образования листового примордия. Образование микро РНК происходит в зоне прокамбия, откуда они распределяются по листу и взаимодействуют с факторами ответа на ауксин [4]. В последние годы установлена важная роль в эволюционном процессе малых РНК, представленных некодирующими регуляторными элементами, которые идентифицированы в клетках большинства эукариот [5]. Определены 132 числовых последовательности 3343 генов кодирующих микроРНК. Показано, что в ходе эволюции стабилизация генома происходила по признакам, связанным с основаниями аденином или урацилом. В растениях микроРНК выполняют сигнальные функции, участвуют в регуляции экспрессии генов, процессов роста и развития, стрессовых реакциях растений на дефицит элементов минерального питания, воды, механические повреждения [7].

Малые интерферирующие РНК, имеющие 21–22 нуклеотидных последовательности, участвуют в создании позиционной информации в апексе побега, распределяются в пространстве отдельных зон апикальной меристемы [8]. Для формирования таких РНК необходима сборка комплекса из белка семейства AGO, микро РНК, малой РНК (tasi RNA от trans-acting small interfering RNA). Малые РНК транспортируются по плазмодесмам до листовых примордиев. Мишенью действия tasiRNA являются факторы ответа на ауксин AUXIN RESPONSE FACTOR 3 и 4 (ARF3 и ARF4). При этом формируется позиционная информация позволяющая создать верхнюю (адаксиальную) и нижнюю (абаксиальную) стороны листа, флоэмный и ксилемный прокамбий. Для обеспечения этого процесса направленные потоки ауксинов передвигаются по апопласту. Вектор распределения ауксинов по слоям туники апекса вегетативного побега обуславливает места инициации примордиев листьев и тяжелой прокамбия [9]. Сигнал о формировании проводящей системы необходим для обеспечения меристемы фотоассимилятами и элементами минерального питания и поддержания пролиферации.

Сигнал ауксинов находится в тесной взаимосвязи с экспрессией гена WUS (WUSCHEL) из подсемейства WOX. Ген WUS кодирует белок, содержащий 291 аминокислоту, и контролирует размеры пула стволовых клеток

апекса побега *Arabidopsis* [10]. Установлена отрицательная обратная связь между направлением и интенсивностью потоков ауксина, формирующих тяжи прокамбия и экспрессией гена WUS. Этот ген контролирует пределы центральной зоны меристемы побега в пространстве. Сигнал WUS по плазмодесмам достигает слоев туники и блокирует связь между клетками туники и центральной зоны, формирует купол. Временное снижение экспрессии гена WUS приводит к тому, что часть стволовых клеток может переходить в состав периферической зоны. Мутация *wus* приводит к преждевременному исчерпанию пула стволовых клеток в стеблевом апексе. Сигнальная роль ауксина в процессах формирования строения апикальной меристемы известна не только для высших цветковых растений, но и для таких древних представителей растительного царства как папоротники.

В контроле процессов морфогенеза у растений принимают участие также цитокинины и стриголактоны [11]. Стриголактоны (СЛ) относят к классу фитогормонов с сигнальной активностью, которые характеризуются общей структурой из двух лактонов и являются производными каротиноидов. Предшественником СЛ считают β -каротен, который последовательно метаболизируется с помощью CAROTENOID CLEAVAGE DIOXIGENASE 7 (CCD7) и CCD8. СЛ контролируют ветвление побега, могут служить вторичными месенджерами для ауксина и способны регулировать уровни цитокининов в клеточном соке, блокировать образование придаточных корней, снимая эффект ауксина [12]. В формировании СЛ принимает участие Fe-связывающий белок, представляющий собой бета-каротинизомеразу. Она превращает олл-транс-бета каротин до альдегида с 9 цис-конфигурацией, который в дальнейших превращениях образует карлактон, обладающий СЛ биоактивностью [13]. С помощью мутанта гороха показано, что экспрессия гена *P₃BRC1* в верхушечной почке усиливала синтез СЛ и фенотип ветвления, который мог быть подавлен применением цитокинина бензиламинопурина [14]. Участие сигналинга СЛ в процессах формирования архитектоники растения продемонстрировано также для кукурузы [15]. Использование мутантов *Arabidopsis* позволило установить, что регуляция СЛ ветвления побегов опосредована геном *MAX2* и коррелирует с индукцией рецептора ауксина

TIR1 и транспортом фосфора корнями, особенно в условиях его дефицита в среде [16]

Использование синтетического биоактивного СЛ GR24 показало, что он подавлял ветвление корней, однако стимулировал удлинение корневых волосков [17]. Недавно выявлено взаимодействие сигналинга ауксинов и стриголактонов в процессах формирования арбускулярной микоризы у растений гороха, особенно ранних событий колонизации корней [18]. Известно, что растущие в почве растения с помощью арбускулярной микоризы обеспечивают эффективное поглощение элементов минерального питания корнями. Симбиоз растений и грибов арбускулярной микоризы считают древним и относят к периодам выхода первых растений на сушу.

Участие сигналинга цитокининов в регуляции ростовых процессов эволюционно древних растений было продемонстрировано на примере хвощей, которые появились в девоне палеозойской эры и достигли расцвета в каменноугольном периоде и практически все вымерли до начала мезозойской эры [19]. В настоящее время отдел хвощеподобных представлен одним родом Хвощ, который насчитывает 25 видов, выживших в течение 300 миллионов лет. В листьях хвоща вида *Equisetum arvense* L. были найдены изопентениладенозин и изопентениладенин. В весенних генеративных побегах были также идентифицированы зеатин, зеатинрибозид, зеатин-о-глюкозид в высоких концентрациях. Наиболее значительные количества зеатиновых цитокининов были идентифицированы в корневище. Авторы допускают, что уменьшение размеров хвощей в процессе эволюции обусловлено мутациями, которые привели к доминированию гена *ZOG*, кодирующего фермент о-глюкозилтрансферазу и катализирующего образование о-глюкозидов цитокининов, повышением содержания связанных форм цитокининов.

Исследования последних десятилетий продемонстрировали, что взаимодействие цитокининового и ауксинового сигналинга является ключевым и наиболее древним звеном в контроле роста и развития растений [20]. Главной сигнальной и регуляторной молекулой в процессах формирования побегов и корней считают N⁶-аденин. Изопентениладенин, транс-зеатин и дегидрозеатин относятся к главным цитокининам растений, активность которых контролируется балансом их синтеза и катаболизма. Скорость лимитирующим шагом

биосинтеза цитокининов у *Arabidopsis* является АТФ/АДФ-изопентенилтрансфераза (IPT). Изучение экспрессии генов семейства IPT свидетельствует, что цитокинины продуцируются в разных частях растений, включая корни, побеги, созревающие семена. Необратимая деградация цитокининов осуществляется цитокининовой оксидазой/дегидрогеназой. Цитокинины в качестве основной формы транспортной РНК (tRNA) встречаются у большинства организмов, а изопентениловый тип цитокининов считают наиболее распространенным. Однако в растениях встречаются также производные аденина [21]. Пространственный образец экспрессии генов, контролирующих метаболизм цитокининов, неравномерный тип распределения в проводящей транспортной системе позволяют полагать, что они действуют как локальные и дальние сигналы и медиаторы. Ответ на цитокинины формируется посредством двухкомпонентного сигнального пути, в котором задействованы в качестве трансмембранных рецепторов гистидинкиназы ANK2, ANK5, AUK4/WOL1/CRE1. Они передают сигнал посредством фосфорилирования к ядру, активируют два класса регуляторов ARR_s типа А и В. Тип В ARR_s индуцирует экспрессию генов первичного ответа на цитокинин. Рецепторы ANK4/CRE1 и ANP6 у *Arabidopsis* контролируют развитие проводящей системы стеблей и листьев, ANK3 – листа, ANK3/ARR1 – размеры корневой меристемы и скорость дифференциации клеток корня [20]. Цитокининовый сигналинг по двухкомпонентному пути идентифицирован также у бактерий и грибов,

что свидетельствует о его эволюционной древности.

Ауксины контролируют биосинтез цитокининов путем активации транскрипции гена SHY2, продукт которого также регулирует транспорт ауксина. Цитокинины и ауксины взаимодействуют как антагонисты в процессах развития корня, стебля и эмбриона растений, однако способны однонаправленно влиять на экспрессию многих генов, обслуживающих движение клеток по митотическому циклу [22].

Выводы

Сигнальная сеть растений сложна и разнообразна и не ограничивается участием какой-либо одной группы регуляторов. В формировании сигнальных растений в процессе эволюции принимали активное участие фитогормоны ауксины, цитокинины, стригулактоны, а также малые некодирующие РНК. Они тесно взаимодействуют между собой в контроле процессов морфогенеза, образования корней, листьев, проводящей системы. Эволюционная древность сигнальных систем фитогормонов подтверждена исследованием различных биологических объектов и идентификацией компонентов транспорта и акцепторов, экспрессии генов первичного ответа на фитогормоны. В сигнальной сети тесно взаимодействует множество компонентов различной природы, однако их роль в процессе эволюции все еще изучена слабо, полученные результаты фрагментарны и порой противоречивы. Интерес к этой проблеме продолжает возрастать, и обусловлен необходимостью сохранения биоразнообразия планеты для будущих поколений.

Литература

1. Barajas-Lopez Ide D., Blanco N.E., Strand A. Plastid-to nucleus communication, signals controlling the running of the plant cell // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – 1833, N 2. – P. 425–437.
2. Lau S., Shao N., Bock R., Jurgens G., Smet I. Auxin signaling in algae lineages: fact or myth? // *Trends Plant Sci.* – 2009. – 14, N 4. – P. 182–188.
3. Медведев С.С. Механизмы формирования и физиологическая роль полярности в растениях // *Физиол. раст.* – 2012. – 59, N 4. – С. 543–556.
4. Чуб В.В., Синюшин Ф.Ф. Фасциация цветка и побега: от феноменологии к построению моделей преобразования апикальной меристемы // *Физиол. раст.* – 2012. – 59, N 4. – С. 574–590.
5. Zhu R., Li X., Chen Q. Discovering numerical laws of plant microRNA by evolution // *Biochim. Biophys. Acta Res. Commun.* – 2011. – 415, N 2. – P. 313–318.
6. Zhu R., Li X., Chen Q. Discovering numerical laws of plant of plant microRNA by evolution // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 2011. – 415, N 2. – P. 313–318.
7. Guleria P., Mahajan M., Bhardwaj J., Yadav S.K. Plant small RNAs: biogenesis mode of action and their roles in abiotic stresses // *Genomic, Proteomics, Bioinf.* – 2011. – 9, N 6. – P. 183–199.
8. Chen H.-M., Chen L.-T., Patel K., Li Y.-H., Baulcombe D.C., Wu S.-H. 22-Nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plant // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – 107. – P. 15269–15274.
9. Vernoux F., Kronenberger J., Greandjean O., Laufs P., Traas J. PIN-FORMED 1 regulates cell fate at the periphery of the shoot apical meristem // *Development.* – 2000. – 127. – P. 5157–5165.

10. Mayer K.F.X., Schoof H., Haecker A, Lenhard H., Jurgens G., Laux T. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem // *Cell*. – 1998. – 95. – P. 805–815.
11. Dun E.A., de Saint Germain A., Rameau C., Beveridge C.A. Antagonistic action of strigolactone and cytokinin in bud outgrowth control // *Plant Physiol*. – 2012. – 158, N 1. – P. 487–498.
12. Rasmussen A., Mason M.G., De Cuyper C., Brewer P.B., Herold S., Agusti J., Geelen D., Greb T., Goormachtig S., Beekman T. Strigolactones suppress adventitious rooting in Arabidopsis and pea // *Plant Physiol*. – 2012. – 158, N 4. – P. 1976–1987.
13. Aldes A., Januel M., Marzorati M., Bruno M., Vermathen M., Bigler P., Chisla S., Bouwmeester H., Beyer P., Al-Babili S. The path from β -carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone // *Science*. – 2012. – 335, N 6074. – P. 1348–1351.
14. Braun N., de Saint G.A., Pillot J.-P., Boutet-Mercey S., Dalmais M., Antoniadis I., Li X., Maia-Grondard A., Le Signor Ch., Bouteiller N. The pea TCP transcription factor P₅BRC1 acts downstream of strigolactones to control shoot branching // *Plant Physiol*. – 2012. – 158, N 1. – P. 225–238.
15. Guan J.Ch., Koch K.E., Suzuki M., Wu S., Labshaw S., Petrucci T., Goulet Ch., Klee H.J., McCarty D.K. Diverse roles of strigolactone signaling in maize architecture and the uncoupling of a branching-specific subnetwork // *Plant Physiol*. – 2012. – 160, N 3. – P. 1303–1317.
16. Mayzlish-Gati E., De-Cuyper C., Goormachtig S., Beekman T., Vuylsteke M., Brewer Ph., Beveridge Ch.A., Yermiyahu Uri, Kaplan Y. Strigolactones are involved in root response to low phosphate conditions in Arabidopsis // *Plant Physiol*. – 2012. – 160, N 3. – P. 1329–1341.
17. Kapulnik V., Delaux P.-M., Resnick N., Mayzlish-Gati E., Wininger S., Bhattacharya Ch., Sejalon-Delmas N., Combier J.-P., Becard G., Belauson E., Beekman E. Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in Arabidopsis // *Planta*. – 2011. – 233, N 1. – P. 209–216.
18. Foo E. Auxin influences strigolactones in pea mycorrhizal symbiosis // *J. Plant Physiol*. – 2013. – 170, N 5. – P. 523–528.
19. Веденичова Н.П., Ситник К.М. Локалізація і динаміка цитокінінів у різних частинах рослин *Equisetum arvense* L. // *Доп. НАН України*. – 2013. – N 11. – С. 150–157.
20. Moubayidin L., Mambro R.D., Sabatini S. Cytokinin-auxin crosstalk // *Trend. Plant Sci*. – 2009. – 14, N 10. – P. 557–562.
21. Haber G., Kieber J.J. Cytokinins. New insights into classic phytohormones // *Plant Physiol*. – 2002. – 128. – P. 354–362.
22. Новикова Т.В., Носов А.В., Степанченко Н.С., Фоменков Ф.Ф., Мамаева Ф.С., Мошков І.Е. Пролиферація кліток рослин і її регулятори // *Фізіол. раст.* – 2013. – 60, N 4. – С. 529–536.

ZHUK O.I.

*Institute of Plant Physiology and Genetics NAS Ukraine,
Ukraine, 03022, Kiev, Vasylykivska str., 31/17, e-mail: zhuk_bas@volicable.com*

THE EVOLUTION OF PLANT SIGNAL PHYTOGORMONAL SYSTEMS

Aims. Aim of this work was to examine the evolutionary formation of signaling systems phytohormones – auxin, cytokinins and strigolactones that have been identified in algae, microorganisms, fungi, plants.

Methods. The evolution of signaling systems was conducted using mutants that allowed the identification of individual components of the signaling cascade and the interaction of plant hormones in the regulation of morphogenesis, stress response. **Results.** Receptor protein TIR1-AFB, AUX-IAA repressor and transcription factor ARF play key role in auxin signaling. Auxin signaling system interacts directly with the signaling network of micro RNA (mi RNA) in monitoring the functioning of the shoot apical meristem of plants, leaf primordia formation process. Auxin signal strongly correlates with the expression of the gene WUS (WUSCHEL) of subfamily WOX. Strigolactones and cytokinins also participate in the control processes of morphogenesis in plants. Strigolactones and cytokinins are characterized by the general structure of the two lactones and are derived from carotenoids. **Conclusions.** Investigations of recent decades have demonstrated that the interaction between cytokinin and auxin signaling is the key and the most ancient bridge in the control of plant growth and development.

Key words: signal systems, phytohormones, evolution.

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЧАСТОТЫ АПОМИКСИСА И ПОЛОВОЙ СТРУКТУРЫ В ПОПУЛЯЦИЯХ *ANTENNARIA DIOICA* ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ

Из рода *Antennaria* Gaertn. (Asteraceae) на территории европейской части России широко распространён только вид *A. dioica* (L.) Gaertn. [1]. В средней полосе России этот вид во всех областях довольно обычен, хотя к югу и юго-востоку встречается реже [2]. По Саратовской области проходит юго-восточная граница ареала вида в европейской части России. Вид спорадически встречается лишь в северных и центральных районах Правобережья [3].

Известно, что в роде широко распространён автономный гаметофитный апомиксис в регулярной форме (апоспория + нередуцированный партеногенез). Он описан примерно у 20 видов рода, в т.ч. и у *A. dioica* [4–7]. Изучение особенностей репродуктивной биологии данного вида в экстремальных условиях обитания на границе ареала и в центральной его части представляет безусловный интерес.

Материалы и методика

Исследовали 13 популяций *A. dioica*, произрастающих в Саратовской, Пензенской, Ульяновской, Кировской областях и Республиках Чувашии, Мари-Эл, Коми по градиенту географических координат (51°30' СШ, 45°30' ВД – 60°00' СШ, 49°30' ВД). Основные исследования проводили в четырёх популяциях *A. dioica* из Татищевского, Б.-Карабулакского, Хвалынского и Вольского районов Саратовской области.

Исследования проводили в 2007–2012 гг. Частоту апомиксиса диагностировали на основе сравнения семенной продуктивности растений при свободном опылении и беспыльцевом режиме цветения. Исследовали в среднем 30 растений каждого вида, отбор которых осуществляли случайным образом. Для обеспечения беспыльцевого режима соцветия «женских» растений за 2–3 дня до цветения краевых цветков помещали под пергаментные изоляторы, под которыми они находились до полного созревания семян. Сбор семян, завязавшихся при свободном опылении, собирали по достижению ими зрелого состояния. При подсчете семена разделяли на два морфологических класса по степени

выполненности (выполненные и шуплые). Затем вычисляли частоту завязываемости семян, как процентное отношение числа выполненных семян к общему числу цветков в соцветии.

Соцветия для цитоэмбриологического анализа фиксировали за 1–3 суток до начала цветения в фиксаторе Кларка. Для просветления семязачатков использовали просветляющую жидкость Герра [8]. Методика приготовления препаратов «просветлённых» семязачатков модифицирована нами. Цветки выдерживали в железоммонийных квасцах 20 минут, затем подкрашивали в ацетокармине 5–12 часов. Из цветков выделяли семязачатки и мацерировали их с помощью цитазы 1 час. После этого под стереомикроскопом Stemi 2000 (Karl Zeiss, Германия) удаляли внешние слои клеток, оставляя зародышевый мешок, окружённый интегументальным тапетумом. Эту структуру переносили на предметное стекло в каплю просветляющей жидкости, накрывали покровным стеклом и оставляли не менее чем на 1 час, после чего анализировали препараты под микроскопом Axiostar-plus (Karl Zeiss, Германия) в режиме фазового контраста при увеличении $\times 400$.

Вариационные ряды обсчитывали с помощью программного продукта Microsoft Office Excel 2007. Сравнение вариационных рядов осуществляли по критерию Стьюдента (t_{st}) при уровне значимости $P \leq 0,95$. В случае близости величин среднеарифметической к 0 или 100% для определения доверительного интервала использовали метод ср. Для сравнения качественных признаков использовали метод вычисления средней ошибки при альтернативном распределении [9, 10].

Результаты и обсуждение

Семенная продуктивность *A. dioica* при различных режимах цветения. На территории Саратовской области в популяциях растения *A. dioica* ведут себя почти как исключительно амфимитичные. Из 6 лет наблюдений (2007–2012 гг.) при среднем (30–70%) и низком (0–20%) уровне семенной продуктивности при цветении в условиях свободного опыления семенная продуктивность при беспыльцевом

режиме цветения во всех 4-х исследованных популяциях Саратовской области была равна 0. Исключение составляет только популяция из Б.-Карабулакского района, в которой в 2012 г. семенная продуктивность при данном режиме цветения была на уровне $13,77 \pm 0,62 \%$. Интересно, что в популяциях Пензенской области, произрастающих на 100–300 км севернее Саратовских популяций, во все годы наблюдений имела место завязываемость семян при беспыльцевом режиме цветения на фоне низкой семенной продуктивности при цветении в условиях свободного опыления. С учётом этого частота формирования семян путём апомиксиса в этих популяциях *A. dioica* была на уровне 10–60%.

Частота апомиксиса в популяциях *A. dioica* по цитоэмбриологическим маркёрным признакам. При цитоэмбриологическом изучении в 2007–2010 гг. у растений *A. dioica* из популяций Саратовской области признаков апомиксиса обнаружено не было. При этом формировались нормально дифференцированные эуспорические мегагаметофиты, морфологически подобные *Polygonum*-типу. В 2012 г. исключение составили только популяции из Татищевского и Б.-Карабулакского районов. В них в 2007–2010 гг. подобных признаков также не выявлено, но в 2012 г. с частотой около 1,0 % обнаружена апоспория или преждевременная эмбриония.

В то же время у растений популяций, произрастающих в Пензенской области в годы наблюдения (2009, 2010, 2012) чаще всего обнаруживались цитоэмбриологические признаки апомиксиса с частотой 5–30 %. При этом имело место как формирование апоспорических инициалей, так и преждевременная эмбриония. Только в одной популяции в 2010 г. признаков гаметофитного апомиксиса на уровне цитоэмбриологического контроля не обнаружено. Однако и в этой популяции в данный год наблюдения семена в условиях беспыльцевого режима цветения завязывались. Всё это однозначно указывает на то, что популяции *A. dioica* из Пензенской области во все годы наблюдения вели себя как факультативно апомиктические с варьирующей по годам частотой гаметофитного апомиксиса. При этом наряду с преждевременной эмбрионией у растений данной популяции выявлены и случаи развития апоспорических инициалей вблизи нормально сформированного эуспорического мегагаметофита ($16,4 \pm 0,8 \%$). Примечательно, что в данной популяции в 2010 г. Эмбри-

ологических признаков гаметофитного апомиксиса обнаружено не было, но в $5,0 \pm 0,4 \%$ семязачатков мегагаметофиты эуспорической природы дегенерировали.

Сходным образом вели себя и исследованные в разные годы популяции *A. dioica* в Ульяновской и Кировской областях. У растений популяции из Ульяновской области в 2010 г. обнаружены цитоэмбриологические признаки апомиксиса в виде преждевременной эмбрионии на уровне ($12,9 \pm 0,5 \%$). В популяции 672 из Кировской области также в 2010 г. выявлены эмбриологические признаки апомиксиса, правда, в форме апоспорических инициалей в семязачатках, – причём рядом с дегенерировавшим эуспорическим мегагаметофитом, в то время как в 2011 г. такие признаки отсутствовали. В популяции, произрастающей в Республике Чувашии выявлены цитоэмбриологические признаки гаметофитного апомиксиса в форме преждевременной эмбрионии с частотой $1,1 \pm 0,2 \%$, а у растений популяции из Республики Мари-Эл – с частотой $3,00 \pm 0,21 \%$.

В ряде семязачатков у растений *A. dioica* были выявлены и случаи развития в одном семязачатке двух мегагаметофитов. Правда, по результатам исследования ничего нельзя сказать о природе этих мегагаметофитов. Однако на том основании, что в семязачатках растений данного вида с достаточно высокой частотой обнаруживались апоспорические инициалы в присутствии мегагаметофитов эуспорической природы, логично предположить, что один из таких мегагаметофитов имеет эуспорическую, а другой – апоспорическую природу.

Таким образом, в популяциях *A. dioica*, исследованных в Ульяновской области, Республиках Чувашия и Мари-Эл, и в одной из популяций, исследованной на юге Кировской области, с различной частотой, варьирующей по годам, по крайней мере, в отдельные года наблюдения обнаружены цитоэмбриологические признаки апомиксиса (в популяции из Ульяновской области – в 2 из трёх лет наблюдения, Республики Чувашия – в оба года наблюдения, Республики Мари-Эл – в один из двух лет наблюдения, на юге Кировской области – в один из 3-х лет наблюдения). Только в популяциях севера Кировской области и популяции Республики Коми способность к апомиксису даже на уровне цитоэмбриологических признаков не обнаружена. Фактически речь идёт о популяциях, находящихся вблизи северной границы ареала исследуемого вида.

Из всего вышеизложенного напрашивается вывод о том, что в отношении склонности к гаметофитному апомиксису, а, скорее, и в отношении реализации апомиксиса как способа семенной репродукции по градиенту географических широт в европейской части России ближе к южной и северной границам ареала растения *A. dioica* ведут себя как облигатно амфимиктичные, а в центральной части ареала – как факультативно апомиктичные.

Половая структура популяций *A. dioica*. Известно, что *A. dioica* свойственна диэция. Как показали наши исследования, популяции вида существенно различаются по половой структуре, как между собой, так и внутри одной популяции по годам. Так в 2008 г. в популяции Татищевского района Саратовской области доля цветущих «мужских» растений составила около 80% от числа проанализированных растений, а в популяциях Б.-Карабулакского и Хвалынского районов – лишь около 2/5 и 1/3 цветущих растений, соответственно, были «мужскими».

В 2009 г. в популяции Татищевского района доля цветущих «мужских» и «женских» растений была примерно равной, в популяции Б.-Карабулакского района доля «мужских» растений составила около 2/3 от общего числа цветущих в ней растений. В популяции Хвалынского района доля таких растений составила почти 90%, а в популяции Вольского района – все 100% цветущих особей.

В 2010 г. в популяциях Татищевского и Хвалынского районов соотношение цветущих «мужских» и «женских» особей сохранилось на уровне 2009 г. Однако в популяции Хвалынского района доля цветущих «мужских» и «женских» растений была относительно близкой, притом, что в 2009 г. «мужские» растения составили почти 90% от общего числа цветущих особей. В популяции Вольского района в этот год цвели только «женские» растения.

После чрезвычайно засушливых условий 2010 г. во всех четырёх исследуемых популяциях Саратовской области в 2011 г. отсутствовали цветущие растения.

В 2012 г. в популяции Татищевского района среди цветущих растений доля «мужских» составила 90%. В популяции Б.-Карабулакского района доля таких растений составила лишь около 1/3, в Хвалынском и Вольском районах цвели только «мужские» растения. Причём в Вольском районе «женские» растения в популяции после засухи 2010 г.

элиминировали полностью, а в популяции Хвалынского района – в подавляющем большинстве.

В популяциях *A. dioica* из Пензенской области соотношение цветущих «мужских» и «женских» растений изменялось по годам скоррелированно и в каждый из лет наблюдений было близким. Так в 2009 и 2010 гг. это соотношение было смещено в сторону «мужских» растений (около 2/3 от числа цветущих). В 2011 г., – после засухи 2010 г., – растения в популяциях фактически не цвели, а в 2012 г. в обеих исследованных популяциях соотношение «мужских» и «женских» цветущих растений было близко к 1:1.

Интересная картина с половой структурой популяций *A. dioica* складывалась в годы исследования и в регионах европейской части России, расположенных севернее выше описанных. Так в 2011 г., в котором в популяциях Саратовской области растения вообще не цвели, а в популяциях Пензенской области цвели лишь отдельные растения, в популяциях Ульяновской и Кировской областей, а также Республики Мари-Эл не очень обильное цветение растений всё же наблюдалось, причём более 2/3 цветущих растений составляли «мужские» особи.

В 2012 г. во всех этих популяциях баланс цветущих «мужских» и «женских» особей был близок к соотношению 1 : 1. Только в самой северной популяции из Республики Коми он был смещён в сторону «мужских» особей и был близок к соотношению 2 : 3.

Таким образом, популяции *A. dioica* из Саратовской области очень нестабильны в отношении половой структуры. Это, вероятно, связано с ограниченным размером этих популяций и экстремальностью условий обитания для растений данного вида на юго-восточной границе его ареала в европейской части России. При этом чаще всего в популяциях Саратовской области доминируют цветущие «мужские» особи. Это может быть одной из причин того, что южнее Татищевского района для существования растений нет приемлемых условий обитания, в т.ч. и за счёт резкого снижения числа женских особей, а соответственно и резкого снижения семенной продуктивности популяций вида.

Экстремально засушливый 2010 год по широтному градиенту в европейской части России всюду сказался на численности цветущих растений в популяциях *A. dioica* и на балансе «мужских» и «женских» растений в

последующий за ним год, сместив последний в сторону «мужских» особей. При этом на южной границе ареала условия этого года привели к тому, что в 2011 г. в популяциях имело место не развитие генеративных органов, т.е. цветение растений в них было полностью подавлено. В более северных районах условия 2010 года снизили общую численность цветущих растений в последующий год, сместив баланс цветущих растений в сторону доли «мужских» особей.

Выводы

Изучена частота апомиксиса и половая структура в популяциях *A. dioica* в европейской части России по градиенту географической широты. Показано, что растения *A. dioica* ближе к южной и северной границам ареала ведут себя

как облигатно амфимиктичные, а в центральной части ареала – как факультативно апомиктичные. Выявлено, что в аридных условиях южных регионов в последующий после засухи год цветение растений *A. dioica* полностью подавляется, а в регионах с меньшей аридностью климата – баланс цветущих растений смещается в сторону «мужских» особей. Относительно не засушливые условия предыдущего цветения года приводят к тому, что в последующий год в популяциях наблюдается относительный баланс цветущих «мужских» и «женских» особей. «Женские» особи в неблагоприятных условиях засухи элиминируются из популяции первыми.

Литература

1. Иконников С.С. Кошачья лапка – *Antennaria* Gaertn. // Флора европейской части СССР. – СПб.: Наука, 1994. – 7. – С. 92–94.
2. Маевский П.Ф. Флора средней полосы европейской части СССР. – М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2006. – 600 с.
3. Березуцкий М.А., Серова Л.А. Кошачья лапка двудомная – *Antennaria dioica* (L.) Gaertn. // Красная книга Саратовской области: Грибы. Лишайники. Растения. Животные. – Саратов: Изд-во Торгово-промышл. палаты Сарат. обл., 2006. – С. 224–225.
4. Хохлов С.С., Зайцева М.И., Куприянов П.Г. Выявление апомиктичных растений во флоре цветковых растений СССР. – Саратов, 1978. – 224 с.
5. Carman J.G. Gametophytic angiosperm apomicts and the occurrence of polyspory and polyembryony among their relatives // *Apomixis Newsletter*. – 1995. – № 8. – P. 39–53.
6. Carman J.G. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony // *Biol. J. Linn. Soc.* – 1997. – 61. – P. 51–94.
7. Noyes R.D. Apomixis in the Asteraceae: Diamonds in the Rough // *Functional plant science and biotechnology*. – 2007. – 1, N 2. – P. 207–222.
8. Herr J.M. A new clearing-squash technique for study of ovule, development in angiosperms // *Amer. J. Bot.* – 1971. – 20, N 8. – P. 785–790.
9. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
10. Зайцев Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. – М.: Наука, 1984. – 424 с.

KASHIN A.S., KOCHANOVA I.S., LYSYTSKAYA N.M., UGOLNIKOVA E.V., POLYAKOVA YU.A.

Saratov State University,

Russia, 410010, Saratov, Astrakhanskaya str., 83, e-mail: kashinas2@yandex.ru

APOMIXIS RATE VARIABILITY AND SEX STRUCTURES OF POPULATION OF *ANTENNARIA DIOICA* OF EUROPEAN RUSSIA

Aims. 13 populations of *A. dioica*, growing in Saratov, Penza, Ulyanovsk, Kirov Regions and the Republic of Chuvashia, Mari-El, Komi were studied to identify apomixis rate variability and sex structure along a gradient of geographical coordinates (51°30' NL, 45°30' EL – 60°00' NL, 49°30' EL). **Methods.** Frequency of apomixis was diagnosed on the basis of comparative data on seed production of plants in the free pollination and flowering pollenless mode, as well as featured cytoembryologically. For cytoembryological analysis inflorescences were fixed 1–3 days before flowering in the latch Clark. The enlightening liquid Guerra (Herr, 1971) was used to enlighten ovules. Methodology of preparation of "enlightened" ovules was modified by us. **Results.** The frequency of apomixis and sex structure of populations of *Antennaria dioica* were studied in the European part of Russia on the gradient of latitude. It was shown that closer to the southern and northern boundaries of the range plants *A. dioica* behave as obligatory amfimictic, while in the central part of the area – as facultatively apomictic. It was revealed that under arid conditions in the southern regions a year after a drought flowering of *A. dioica* plants is completely suppressed, and in regions with the less arid climate the

balance of flowering plants shifts towards "male" individuals. Relatively dry conditions of the previous before the flowering year led to the fact that in the following year the populations featured a relative balance of flowering for "male" and "female" individuals. Under the adverse conditions of drought "female" items get eliminated from the population first. **Conclusions.** *A. dioica* populations at the northern and southern boundaries of the range behave as amfimictic, while in the central part of the area – as facultatively apomictic. The ratio of flowering of "female" and "male" individuals in the populations of this species is essentially dependent on the latitude and weather conditions.

Key words: *Antennaria dioica*, gametophytic apomixis, dioecious, sex structure of populations.

УДК 575.23:62.37.29

НУРМИНСКАЯ Ю.В., МАКСИМОВА Л.А., КОПЫТИНА Т.В., ЕНИКЕЕВ А.Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,

Россия, 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, e-mail: nurminskaya@sifibr.irk.ru

УСТОЙЧИВОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА К НЕБЛАГОПРИЯТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ В РЯДУ ПОКОЛЕНИЙ

С развитием сельскохозяйственного применения ГМР активно ведутся исследования об экологических рисках, связанных с возделыванием этих культур. Выяснилось, что существует угроза рисков снижения биологического разнообразия в связи с переопылением ГМР с дикорастущими близкородственными видами [1]. Возможность необратимого изменения диких популяций, несомненно, требует всестороннего изучения, так как последствия таких изменений необратимы.

Для разработки подходов к безопасному применению трансгенных растений необходимы знания об особенностях физиологии и биохимии ГМР как новой искусственно созданной биологической системы.

Механизмы встраивания, копияность и наследование вставки молекулярными биологами изучены достаточно детально, однако эти исследования, к сожалению, не позволяют увидеть реакцию растения на внедрение в свой геном чужеродной ДНК в целом, как единого организма.

На данный момент предпринято несколько попыток гипотетически обрисовать особенности физиологии трансгенного растения.

Так, Еникеев А.Г. с соавторами предложили концепцию агробактериальной трансформации как комплексного стрессующего фактора [2].

Известно, что воздействие стрессовых факторов приводит к увеличению рекомбинаций и количества мутаций, к усилению онтогенетического шума [3, 4]. Это приводит к

увеличению различий между величиной признака у билатеральных структур с правой и с левой стороны (флуктуирующая асимметрия, ФА) [4].

Жученко А.А. предполагал, что вставка ДНК может приводить к нарушению работы коадаптированных генных комплексов. Эти комплексы, сформированные в процессе эволюции, выполняют важную роль в процессах адаптации у растений [5]. Косвенным признаком разбалансировки коадаптированных комплексов генов у трансгенных растений может служить снижение устойчивости к неблагоприятным факторам.

Таким образом, изучение уровня флуктуирующей асимметрии у трансформантов, а также их устойчивости к неблагоприятным факторам могло бы дать первичные экспериментальные данные об особенностях таких растений на уровне физиологии.

Целью настоящей работы было исследовать изменчивость морфометрических параметров и величину ФА у растений *Nicotiana tabacum* L., трансформированных агробактериальным штаммом А699 (без целевых генов) в ряду семенных поколений в нормальных условиях и в условиях пониженной и повышенной температуры.

Материалы и методы

Трансгенные растения табака (сорт Самсун) получали по стандартным протоколам [6] с использованием штамма *Agrobacterium tumefaciens* А699, содержащего вектор CNL 65 с селективным геном *nptII*, кодирующим белок неомицинофосфотрансферазы. Отбор трансген-

ных линий проводили на средах с канамицином (100 мг/л). Интеграцию гена *nptII* у T_0 подтверждали ПЦР-анализом [7].

Семена растений T_0 были фертильными, что дало возможность получить семенные поколения T_1 - T_6 . У растений всех поколений экспрессию гена *nptII* подтверждали тестом на канамицинустойчивость, у растений поколений T_1 , T_2 интеграцию гена подтверждали также с помощью ПЦР-анализа.

При постановке вегетационного опыта контрольные и трансгенные растения выращивали одновременно в климатической камере фитотрона. По завершении вегетационного опыта все листья, фиксировали в фиксаторе Кларка, а затем фотографировали с масштабированием на стеклянной пластине в проходящем свете. С помощью графического редактора Image Pro Plus (version 4.5.0.29 for Windows Media Cybernetics Inc), измеряли площади левой и правой сторон листа. Ошибка измерения составляла 2,76 %. Интегральный показатель асимметричности площади листовой пластинки оценивали по методике, предложенной Захаровым [8].

Статистическую обработку результатов выполняли при помощи программ Excel 2007 (Microsoft Office) и Statistica 6.0. (StatSoft, Inc. 2001). Проводилась описательная статистика (оценивались медиана, 25–75 % квартили, минимаксные значения). Данные представляли в виде диаграмм размаха («ящик-усы») [9]. Степень рассеивания определяли по величине межквартильного интервала. Достоверность отличий оценивали с помощью теста Манна-Уитни ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

У трансгенных растений в нормальных условиях параметры общей площади листовой поверхности и сухой массы надземной части менялись в поколениях, сначала несколько увеличиваясь к T_4 , а затем уменьшаясь в T_5 . Длина стебля постепенно уменьшалась в ряду поколений. В T_6 снова наблюдали некоторое увеличение вегетативных параметров (рис. 1–3).

Росшие в условиях повышенной температуры растения табака выглядели более мощными. При этом они не формировали цветонос тогда, когда растения, росшие при температуре +25 °С, уже начали подготовку к вступлению в генеративную фазу развития. В целом как контрольные растения, так и

трансформанты при температуре +35 °С имели большую чем при нормальной температуре высоту стебля и площадь листьев. Значения таких параметров, как площадь всех листьев и сухая масса были наименьшими у T_4 .

В условиях низкой температуры растения формировали характерную биоморфу – короткий стебель с розеткой мелких листьев. Параметры трансформантов были понижены по сравнению с контролем и имели тенденцию к снижению в поколениях. Самыми низкими значениями вегетативных параметров при +15 °С имели растения T_5 и T_6 .

Результаты вычисления величины ФА для растений представлены на рис. 4. Следует отметить, что ни в одном случае не было выявлено статистически достоверного отличия от контроля. В связи с этим можно лишь отметить, что в результате стрессового воздействия наблюдали некоторое увеличение онтогенетического шума и, как следствие, снижение уровня стабильности развития у всех растений при +15 °С. Из них наименьшим уровнем обладали растения T_5 и T_6 . Интересно, что растения этих поколений имели повышенные значения ФА и в условиях роста при +25 °С.

Отсутствие увеличения флуктуирующей асимметрии у растений, росших при температуре +35 °С, и увеличение у них ростовых параметров говорит о том, что растения табака достаточно устойчивы к такому повышению температуры: она не сказывается на росте растений.

Однако такая повышенная температура всё же не являлась оптимальной для роста и развития табака. Об этом свидетельствует не только то, что при такой температуре растения длительное время не вступали в генеративную фазу. У контрольных и трансформированных растений табака наблюдали увеличение изменчивости средних значений ФА при +35 °С (рис. 4). Такое же увеличение изменчивости наблюдали и при стрессе, вызванном гипотермией. Увеличение изменчивости этих значений, по нашему мнению, может быть признаком нестабильной работы генома, вызванной неоптимальными условиями среды.

Таким образом, изучение параметров у нормальных и шести поколений трансгенных растений табака, находившихся в различных температурных условиях, показало, следующее.

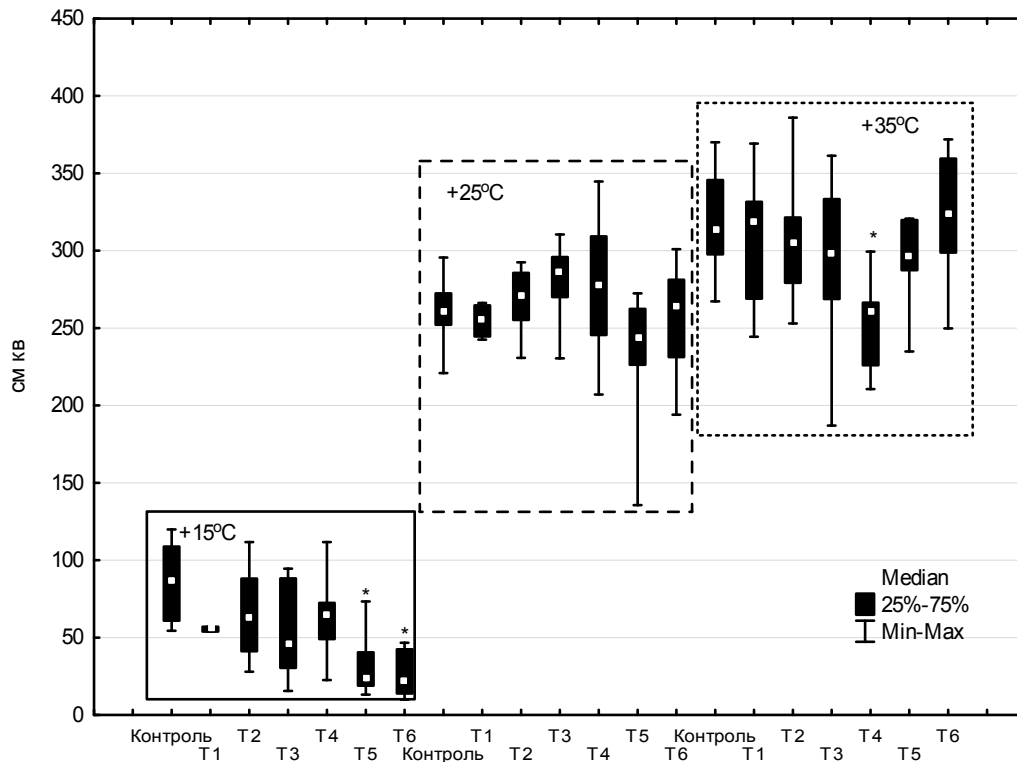


Рис. 1. Общая площадь листовой поверхности у нормальных и трансформированных растений табака, выращенных при разных температурных условиях. N = 6. Здесь и далее астерисками (*) отмечены достоверно отличающиеся от контроля варианты ($p < 0,05$)

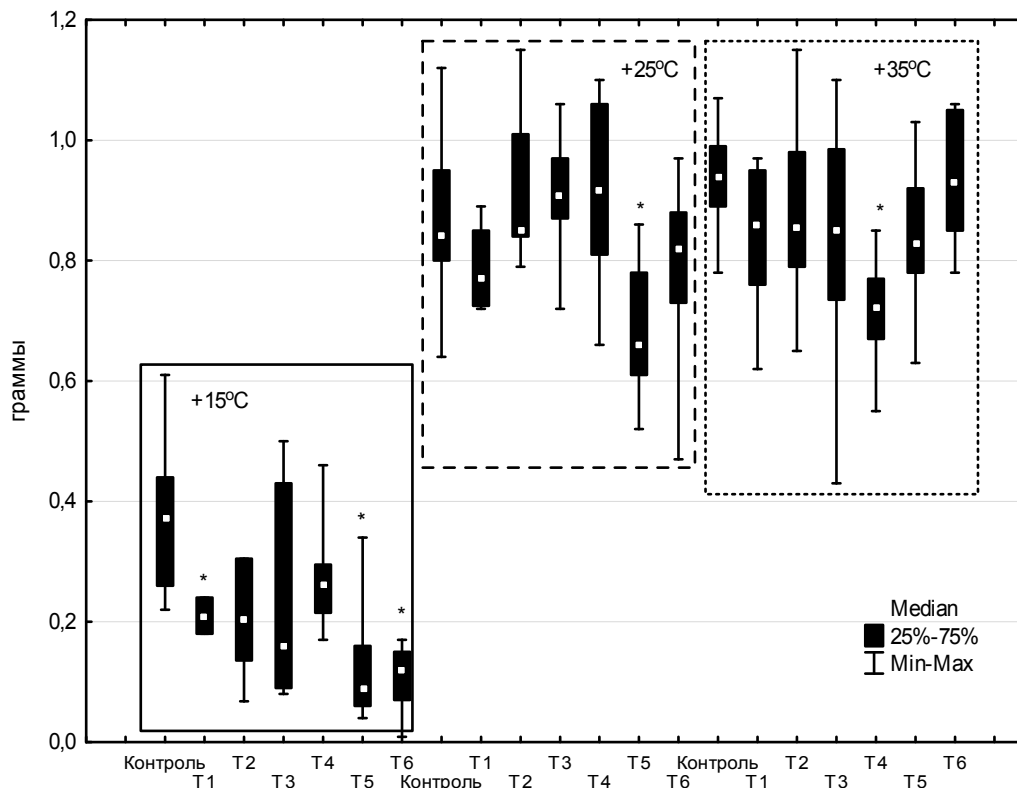


Рис. 2. Сухая масса наземной части у нормальных и трансформированных растений табака, выращенных при разных температурных условиях

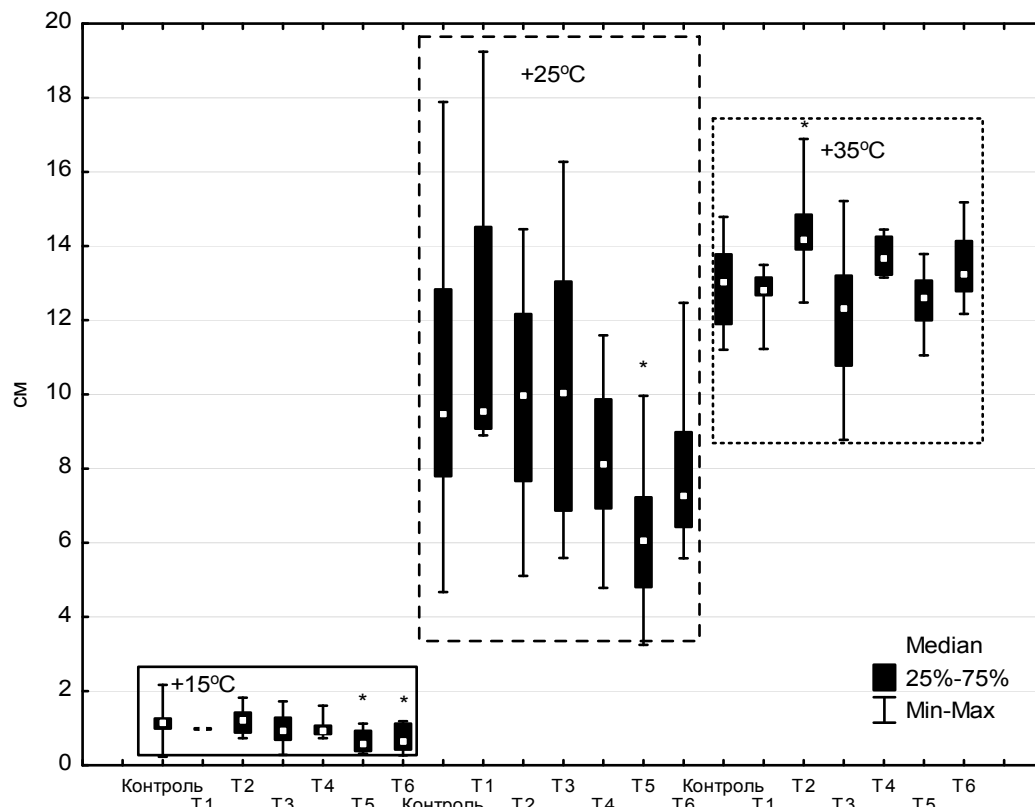


Рис. 3. Длина стебля у нормальных и трансформированных растений табака, выращенных при разных температурных условиях

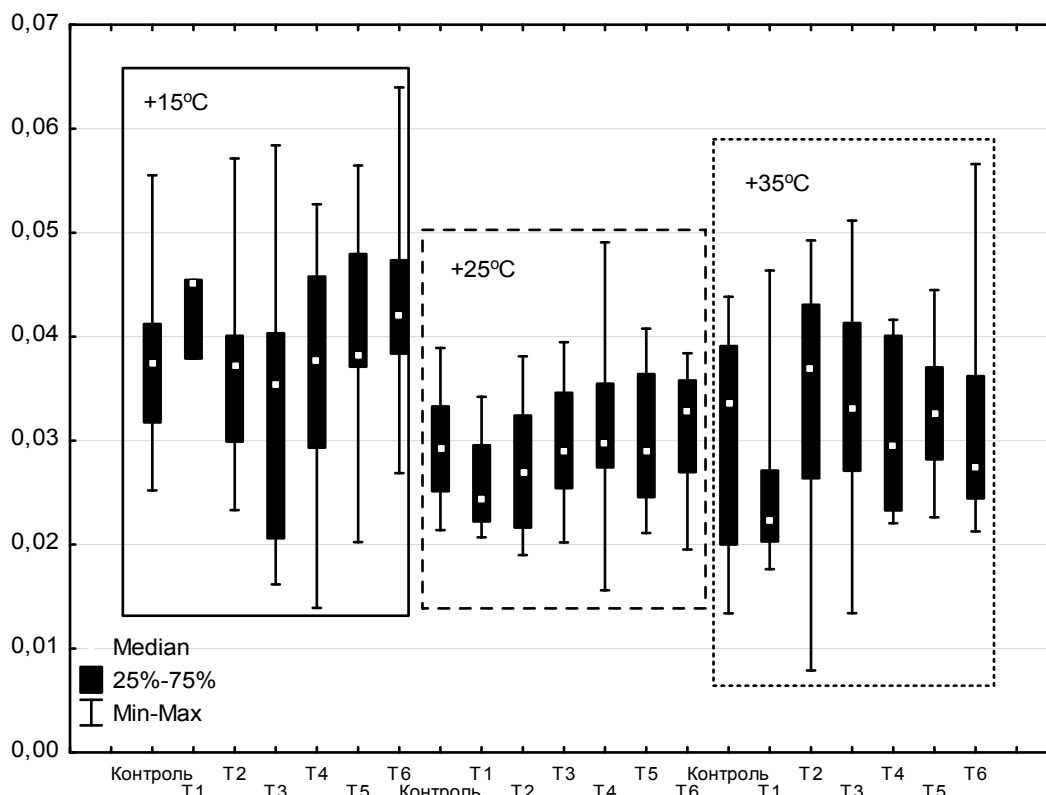


Рис. 4. Интегральный показатель флуктуирующей асимметрии у нормальных и трансформированных растений табака, выращенных при разных температурных условиях

Растения табака, трансформированные генетической конструкцией, не имевшей целевого гена, в целом (за исключением T₄) были устойчивы к повышенной температуре, но демонстрировали пониженную устойчивость к низкой положительной температуре по сравнению с контрольными растениями. При этом достоверных отличий уровня стабильности развития не было обнаружено.

Исходя из вышеприведённых данных, можно сделать вывод, что факт трансформации негативно отразился на адаптивном потенциале растений. Это может косвенно свидетельствовать о нарушении работы коадаптированных комплексов генов. Нужно заметить, что у изученных трансгенных растений даже у T₆ не наблюдается восстановления нормальной работы генома.

Очевидно, что стабильность популяции трансгенных растений может быть достигнута только с восстановлением стабильности работы комплексов генов. То, что это возможно, доказывает существование в природе видов растений (виды *Nicotiana* и *Linaria*), геном которых в результате горизонтального переноса генов содержит последовательности Т-ДНК *Agrobacterium rhizogenes* [10]. Однако скорость

восстановления стабильности работы генома после трансформационных событий остаётся неизвестной.

Выводы

1. Выявили, что при пониженной (+15 °С) температуре трансгенные растения табака имели сниженные показатели вегетативных параметров по сравнению с контрольными растениями, причём в ряду поколений эти параметры понижались и были минимальными у T₆. Достоверных отличий величин параметров у растений, росших при +35 °С, не выявили.

2. При вычислении величины ФА не обнаружили статистически значимых отличий между трансформантами и контролем ни в одной исследуемой группе. Однако отметили несколько повышенные значения ФА у растений T₅, T₆, росших при (+15 °С и имевших наиболее низкие величины фенотипических признаков.

3. Предположили, что снижение устойчивости к пониженной температуре может косвенно свидетельствовать о нарушении работы коадаптированных генных комплексов у трансгенных растений.

В работе использовалось оборудование ЦКП Фитотрон СИФИБР СО РАН.

Литература

1. Wegier A., Piceyro-Nelson A., Alarcyn J., Galvez-Meriscal A., Alvarez-Buylla E.R., Picero D. Recent long-distance transgene flow into wild populations conforms to historical patterns of gene flow in cotton (*Gossypium hirsutum*) at its centre of origin. // *Molecular Ecology*. – 2011. – 20, № 19 – P. 4182–4194.
2. Еникеев А.Г., Копытина Т.В., Семёнова Л.А., Натяганова А.В., Гаманец Л.В., Волкова О.Д. Агробактериальная трансформация как биотический стрессирующий фактор [Электронный ресурс] // *Журнал стресс-физиологии и биохимии растений*. – 2008. – 4, № 1. – С. 11–15. – Режим доступа: http://www.jspb.ru/issues/2008/N1/JSPB_2008_1_11-19.
3. Жученко А.А. Экологическая генетика культурных растений и проблемы агросферы (теория и практика). – М.: ООО «Издательство «Агрорус», 2004. – I. – 690 с.
4. Захаров В.М. Онтогенез и популяция: оценка стабильности развития в природных популяциях // *Онтогенез*. – 2001. – 32, № 6. – С. 404–421.
5. Жученко А.А. Роль генетической инженерии в адаптивной системе селекции растений (мифы и реалии) // *Сельскохозяйственная биология*. – 2003. – № 1. – С. 3–33.
6. Дрейпер Дж., Скот Р., Армидж Ф., Уолдена Р. Генетическая инженерия растений. Лабораторное руководство. – М.: Мир, 1991. – 408 с.
7. Maximova L.A., Nurminskaya J.V., Kopytina T.V., Enikeev A.G. Agrobacterium-mediated transformation of *Nicotiana tabacum* by disarmed strain At 699 resulted in considerable raising of growth and development of transgenic plants [Электронный ресурс] // *Journal of Stress Physiol. and Biochem.* – 2012. – 8, № 1. – P. 138–148. – Режим доступа: http://www.jspb.ru/issues/2012/N1/JSPB_2012_1_138-148.html
8. Захаров В.М., Баранов А.С., Борисов В.И., Валецкий А.В., Кряжева Н.Г., Чистякова Е.К., Чубинишвили А.Т. Здоровье среды: методика оценки. – М.: Центр эколог. Политики России, 2000. – 68 с.
9. McGill R., Tukey J.W., Larsen W.A. Variations of Box Plots // *The American Statistician*. – 1978. – 32, № 1. – P. 12–16.
10. Matveeva T.V., Bogomaz D.I., Pavlova O.A., Nester E.W., Lutova L.A. Horizontal gene transfer from genus *Agrobacterium* to plant *Linaria* in nature // *МРМ*. – 2012. – 25, № 12. – P. 1542–1551.

NURMINSKAYA Y.V., MAXIMOVA L.A., KOPYTINA T.V. ENIKEEV A.G.

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,

Russia, 664030, Irkutsk, Lermontov str., 132, e-mail: nurminskaya@sifibr.irk.ru

THE ADAPTATION ABILITY LEVEL OF SIX GENERATIONS OF TRANSFORMED TOBACCO PLANTS TO ADVERSE TEMPERATURE

Aims. Were assessed the fluctuating asymmetry level and morphometric parameters of tobacco plants, transformed by gene *ntpIII*. Plants were grown under normal (+25 °C) and extremal (+15 °C, +35 °C) conditions. **Methods.** The level of fluctuating was estimated how a difference between left and right halves of the leaf. **Results.** Transgenic plants were more low temperature-sensitive than control ones, these plants demonstrated decreased morphometric parameters and raised fluctuating asymmetry level, T₅ and T₆ generations particularly. **Conclusions.** Coadapted gene complexes are the base of organism adaptation. Low rate of stress adaptation ability of transgenic plants can be the result of transformation procedure, which had perturbed gene complexes work.

Key words: transgenesis, tobacco, adaptation ability.

УДК 575.174.015.3:582.475.2

ОРЕШКОВА Н.В., СЕДЕЛЬНИКОВА Т.С., ПИМЕНОВ А.В., ЕФРЕМОВ С.П.

ФГБУН Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения РАН,

Россия, 660036, г. Красноярск, Академгородок, 50/28, e-mail: tss@ksc.krasn.ru

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ БОЛОТНЫХ И СУХОДОЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *PINUS SIBIRICA* ПО ДАННЫМ SSR-МАРКЕРОВ

Сосна кедровая сибирская (*Pinus sibirica* Du Tour) является одним из основных лесообразующих видов во многих районах Западной Сибири, где кедровые леса занимают 7667 тыс. га, или около 24 % всей площади хвойных лесов [1]. В Западной Сибири *P. sibirica* произрастает на суходолах, включая припоселковые насаждения, а также является типичным представителем болотных и заболоченных экотопов, занимая разнообразные по трофности местообитания. Вопросам дифференциации популяций *P. sibirica* в болотных и суходольных условиях произрастания посвящены лишь несколько работ [2–4]. Полученные к настоящему времени данные оставляют ряд вопросов относительно экотопической дивергенции болотных и суходольных популяций сосны кедровой сибирской и их возможной генетической дифференциации. В настоящей работе приводятся данные по оценке генетической изменчивости, структуре и дифференциации популяций *P. sibirica*, произрастающих в болотных и суходольных экотопах южно-таежной подзоны Западной Сибири, основанные на исследовании полиморфизма ДНК с использованием SSR-маркеров ядерного генома.

Материалы и методы

Объектами исследования послужили выборки из 4 популяций сосны кедровой сибирской, произрастающих в южно-таежной подзоне Западной Сибири (Томская область): междуречье Иксы и Яри, суглинистый суходол, кедровник елово-пихтовый низкотравно-зеленомошный (56°54'с.ш., 83°04'в.д.); пос. Мельниково, супесчаный суходол, припоселковый кедровник осочково-разнотравный (56°33'с.ш., 84°04'в.д.); долина р. Жуковка, евтрофное болото, кедровник елово-лиственнично-пихтовый разнотравно-гипновый (56°20'с.ш., 84°34'в.д.); Междуречье Иксы и Бакчара, олиготрофное болото, сосняк сфагново-кустарничково-пушицевый в сочетании с куртинами и одиночными деревьями кедра (56°53'с.ш., 82°40' в.д.).

Индивидуальные препараты тотальной ДНК выделены из 100–200 мг высушенной хвои, собранной с 30 деревьев в каждой из 4 популяций (всего 120 образцов). Выделения проводили по протоколу для растительных тканей с применением цетилтриметиламмонийбромидом (СТАВ-метод) [5]. В качестве генетических маркеров в работе использовали ядерные микросателлитные локусы. Выделенную ДНК использовали для

проведения ПЦР с шестью парами праймеров (таблица), разработанных для сосны кедровой европейской (*Pinus cembra* L.) и апробированных для работы с *P. sibirica* [6]. Для ПЦР использовали набор реагентов для амплификации ДНК «GenePak PCR Core» ООО «Лаборатория Изоген». Амплификацию отобранных ядерных микросателлитных локусов проводили при следующем режиме: предварительная денатурация ДНК 94 °С – 15 мин; далее 30 циклов, включающие 30 сек. плавления при 94 °С, отжиг праймеров 30 сек. при 54 °С и 50 сек. элонгации при 72 °С. Завершающий цикл элонгации проходил при 72 °С в течение 15 мин. Электрофоретическое разделение амплифицированных фрагментов ДНК проводили в 6 %-м полиакриламидном геле с использованием Трис-EDTA-боратного электродного буфера в камерах для вертикального электрофореза при напряжении 300 В в течение 2–2,5 ч. Окрашивание гелей проводили раствором бромистого этидия с дальнейшей визуализацией продуктов амплификации в УФ-свете. В качестве маркера стандартных длин использовали ДНК плазмиды рBR322, обработанной рестриктазой *Hpa II*. Для выявления и исключения возможных вариантов ошибок генотипирования микросателлитных локусов использовали программу MICRO-SHECKER [7], при помощи которой провели оценку частот возможных нуль-аллелей в локусах и скорректировали число гомозиготных генотипов, а также частоту амплифицированных аллелей в популяциях. Исправленные генотипы четырех исследованных популяций сосны кедровой сибирской использовали для проведения расчета основных показателей внутри- и межпопуляционной генетической изменчивости с помощью программы GenAlEx 6.41 [8]. Для анализа связи между географическими и генетическими расстояниями использовали тест Мантелла [9].

Результаты и обсуждение

Анализ 6 ядерных микросателлитных локусов в 4 популяциях *P. sibirica* показал, что все локусы оказались полиморфными. Наиболее высокополиморфным во всех 4 исследованных популяциях являлся локус *Pc 1b*, у которого наблюдалось 9 аллельных вариантов. Высокую изменчивость показали также локусы *Pc 7*, *Pc 22*, в изученных популяциях у них были идентифицированы 5 и 6 аллелей, соответственно. Самой низкой изменчивостью характеризовался локус *Pc 35* – всего 2 аллеля. Примеры электрофореграмм, представляющие изменчивость всех исследованных микросателлитных локусов, приведены на рис. 1.

При помощи программы MICRO-SHECKER были выявлены скрытые нуль-аллели в локусе *Pc 1b* во всех 4-х исследованных популяциях *P. sibirica* (К-1 – К-4), а также в локусах *Pc 7* и *Pc 22* в популяции с олиготрофного болота (К-4). Всего при анализе 4 популяций *P. sibirica* было выявлено 30 аллельных вариантов. Частоты скрытых нуль-аллелей были рассчитаны исходя из предположения о том, что популяции находятся в равновесном состоянии, согласно правилу Харди-Вайнберга [10]. В изученных популяциях *P. sibirica* выявленные ядерные микросателлитные локусы отличались по частоте встречаемости и составу аллелей. Наибольшее аллельное разнообразие наблюдается в популяции данного вида с олиготрофного болота (К-4).

Для выявления уровня генетического разнообразия в каждой из 4 исследованных популяций *P. sibirica* были рассчитаны основные показатели генетической изменчивости. Расчет основных параметров генетической изменчивости показал, что включенные в исследование популяции *P. sibirica* различаются по уровню генетического разнообразия.

Таблица. Характеристика ядерных микросателлитных локусов, отобранных для анализа генетической изменчивости *Pinus sibirica*

Локус	Мотив	Температура отжига, °С	Размер фрагмента	N_A	Литература
<i>Pc 1b</i>	(GT) ₁₉	54	174–212	9 (9)*	Salzer et al., 2009
<i>Pc 7</i>	(CT) ₆ (AT) ₄ (GT) ₂₅	54	354–378	7 (5)*	
<i>Pc 18</i>	(TG) ₁₂	54	152–158	4 (4)*	
<i>Pc 22</i>	(CA) ₇ TA(CA) ₁₂ (TA) ₂	54	342–354	5 (6)*	
<i>Pc 23</i>	(TG) ₆ CG(TG) ₂	54	205–235	4 (4)*	
<i>Pc 35</i>	(GTT) ₇	54	152–162	2 (2)*	

Примечание: *число аллелей в ядерных микросателлитных локусах, выявленных в нашей работе.

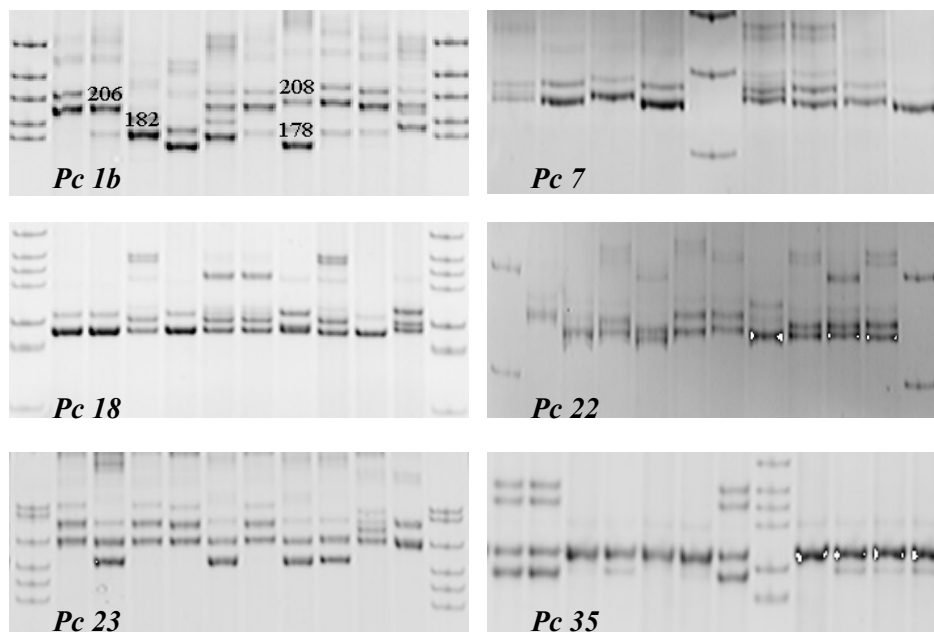


Рис. 1. Электрофореграммы ядерных микросателлитных локусов *Pc 1b*, *Pc 7*, *Pc 18*, *Pc 22*, *Pc 23*, *Pc 35* у сосны кедровой сибирской. Значения 178, 182, 206, 208 на электрофореграмме *Pc 1b* – пример обозначения аллелей по длине амплифицируемого фрагмента ДНК

Самые высокие значения почти всех параметров генетической изменчивости ($N_A = 5,000$; $N_E = 3,122$; $H_E = 0,611$; $F = 0,107$), за исключением наблюдаемой гетерозиготности ($H_O = 0,550$), были выявлены у популяции *P. sibirica* с олиготрофного болота (К-4). Самый высокий уровень наблюдаемой гетерозиготности ($H_O = 0,583$) выявлен в популяции *P. sibirica* из припоселкового кедровника (К-2). В популяциях *P. sibirica* с суходола (К-1) и евтрофного болота (К-3) наблюдаемая гетерозиготность составила $H_O = 0,506$ и $H_O = 0,483$, соответственно. В целом, значения основных показателей генетического полиморфизма свидетельствуют о достаточно высоком в среднем уровне генетического разнообразия *P. sibirica* в болотных и суходольных экотопах, и близки к аналогичным показателям, приведенным для кедровых сосен [6, 11].

В болотных (К-3, К-4) и суходольной (К-1) популяциях *P. sibirica* выявлен дефицит гетерозиготных генотипов. Одним из объяснений дефицита гетерозигот и повышенного уровня инбридинга ($F = 0,107$) в популяции *P. sibirica* с олиготрофного болота (К-4) может служить наличие фенологически и территориально обусловленного фактора ее репродуктивной изоляции от насаждений данного вида на суходолах. Дефицит гетерозигот, составляющий в популяции

P. sibirica с суходола (К-1) $F = 0,057$ и в популяции данного вида с евтрофного болота (К-3) $F = 0,045$, можно объяснить возможным наличием экранирующего эффекта, создаваемого другими видами хвойных и затрудняющего обмен пыльцой между деревьями в данных высокополнотных смешанных насаждениях. Популяция припоселкового кедровника (К-2), напротив, испытывает избыток гетерозигот ($F = -0,091$), что, вероятно, является результатом длительной плюсовой селекции, проводимой населением в данном насаждении, сформировавшемся вблизи поселка при содействии местных жителей путем вырубki низкопродуктивных особей *P. sibirica* и удаления примеси сопутствующих древесных видов, изначально присутствовавших в составе коренного лесного сообщества.

Анализ популяционной структуры *P. sibirica* с помощью индексов фиксации Райта [12] показал, что в среднем каждое дерево обнаруживает почти 4 %-ный дефицит гетерозиготных генотипов ($F_{IS} = 0,037$) относительно популяции и 6 %-ный дефицит гетерозигот ($F_{IT} = 0,061$) относительно вида в целом. Полокусные значения F_{IS} и F_{IT} показывают, что наиболее значимый дефицит гетерозигот наблюдается в локусах *Pc 1b*, *Pc 7*, *Pc 23*, *Pc 18*.

Коэффициент инбридинга популяций относительно вида в целом (F_{ST}), отражающий

степень подразделенности популяций, варьирует от 0,007 (*Pc* 7) до 0,035 (*Pc* 22), составляя в среднем 0,024. Это свидетельствует о том, что только 2,4 % выявленной генетической изменчивости у изученных популяций *P. sibirica* распределяется между популяциями. Внутри популяций сосредоточено около 97,6 % всего генетического разнообразия. Результаты χ^2 теста свидетельствуют о том, что статистически высокодостоверная гетерогенность аллельных частот в исследованных популяциях наблюдается по трем (*Pc* 1b, *Pc* 18, *Pc* 22) из шести изученных локусов.

Оценка степени генетических различий между исследованными популяциями *P. sibirica* с помощью генетических дистанций (D_N) М. Нея [13], показала, что популяции данного вида с суходола (К-1) и евтрофного болота (К-3) наиболее близки по генетической структуре ($F_{ST} = 0,012$; $D_N = 0,028$). Дифференциация их с популяцией из припоселкового кедровника (К-2) оказалась чуть выше и составила $F_{ST} = 0,014$; $D_N = 0,031$. Максимальные же различия в генетической структуре выявлены между популяцией *P. sibirica* с олиготрофного болота (К-4) и тремя другими ($F_{ST} = 0,019$; $D_N = 0,053$). Установленный уровень дифференциации включенных в исследование популяций сосны кедровой сибирской наглядно показывает расположение популяций на плоскости двух координат (рис. 2). Согласно тесту Мантела

($r = 0,274$, $P = 0,31$) корреляция значений генетического расстояния (D_N) с географическим отсутствует.

Выводы

Таким образом, в результате исследования полиморфизма ДНК болотных и суходольных популяций *P. sibirica* выявлено их значительное генетическое разнообразие по ядерным микросателлитным локусам и высокая степень генетической дифференциации. Существенная генетическая неоднородность исследованных популяций *P. sibirica* связана с контрастными различиями условий водно-минерального питания, и, вследствие этого, изменением векторов естественного отбора на олиготрофных, евтрофных болотах и суходолах, а также влиянием многолетней плюсовой селекции в припоселковом кедровнике.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 30 «Живая природа: современное состояние и проблемы развития». Авторы благодарят научного руководителя центра геномных исследований Сибирского Федерального Университета (г. Красноярск), в.н.с. Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (г. Москва), проф. Техасского агро-механического университета (США) и Гёттингенского университета (Германия) К.В. Крутовского за консультации и помощь в интерпретации материала.

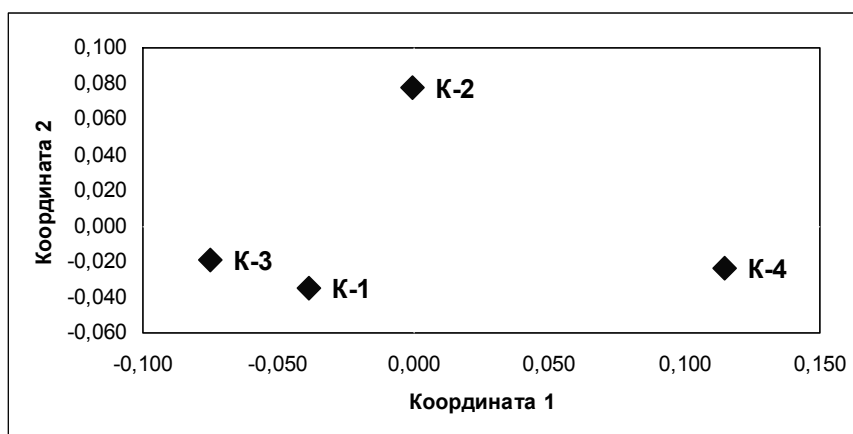


Рис. 2. Проекция изученных популяций *P. sibirica* на плоскости двух координат по данным PCA-анализа матрицы генетических расстояний М. Нея

Литература

1. Ефремов С.П., Ефремова Т.Т., Блойтин В. Биологическая продуктивность и углеродный пул фитомассы лесных болот Западной Сибири // Сибирский экологический журнал. – 2005. – № 1. – С. 29–44.
2. Авров Ф.Д. Генетический обмен между насаждениями кедров сибирского в различных лесорастительных условиях // Проблемы кедров. Выпуск 5. Экология кедровых лесов / Под ред. В.Н. Воробьева. Томск: Изд-во ИЭПК СО РАН, 1992. – С. 61–68.

3. Велисевич С.Н., Петрова Е.А., Бендер О.Г., Зотикова А.П. Формирование структуры популяций сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) в заболоченных экотопах юга Томской области // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2008. – № 1. – С. 13–22.
4. Седелникова Т.С., Мурадова Е.Н. Кариологические особенности сосны кедровой сибирской // Экология. – 2002. – № 5. – С. 323–328.
5. Devey M.E., Bell J.C., Smith D.N., Neale D.B., Moran G.F. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD, and microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. – 1996. – 92, № 6. – P. 673–679.
6. Salzer K., Sebastiani F., Gugerli F., Buonamici A., Vendramin G.G. Isolation and characterization of polymorphic nuclear microsatellite loci in *Pinus cembra* L. // Molecular Ecology Resources. – 2009. – № 9. – P. 858–861.
7. Van Oosterhout C, Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data // Molecular Ecology Notes. – 2004. – № 4. – P. 353–358.
8. Peakall R., Smouse P.E. GenAEx V6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Molecular Ecology Notes. – 2006. – 6, № 1. – P. 288–295.
9. Mantel N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach // Cancer Research. – 1967. – 27. – P. 209–220.
10. Chakraborty R., De Andrade M., Daiger S.P., Budowle B. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications // Ann. Hum. Genet. – 1992. – 56. – P. 45–57.
11. Мудрик Е.А., Белоконь М.М., Белоконь Ю.С., Жулина Е.В., Политов Д.В. Генетическая изменчивость и доля перекрестного опыления *Pinus cembra* L. в Украинских Карпатах и Австрийских Альпах по аллозимным и микросателлитным локусам // Вестник МГУЛ. Лесной вестник. – 2012. – 84, № 1. – С. 112–117.
12. Guries R.P., Ledig F.T. Gene diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.) // Evolution. – 1982. – 36. – P. 387–402.
13. Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Natur. – 1972. – 106. – P. 283–291.

ORESHKOVA N.V., SEDEL'NIKOVA T.S., PIMENOV A.V., EFREMOV S.P.

Sukachev Institute of Forest SB RAS,

Russia, 660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50/28, e-mail: tss@ksc.krasn.ru

GENETIC DIFFERENTIATION OF BOG AND DRY LAND POPULATIONS OF *PINUS SIBIRICA* ON SSR-MARKER DATA

Aims. The evaluation of population structure of bog and dry land populations of Siberian pine (*P. sibirica*) in Western Siberia was studied by markers of a nuclear genome. **Methods.** Six pairs of nuclear microsatellite loci were used for this analysis. 30 allelic variants were detected in 120 individuals of four populations of *P. sibirica*. **Results.** The most essential genetic distinctions were observed between of *P. sibirica* population from oligotrophic bog and the group of populations from a dry land, eutrophic bog and near settlement *P. sibirica* forest ($F_{ST} = 0.019$; $D_N = 0.053$). The differentiation of West Siberian populations of *P. sibirica* on SSR markers exceeded 2.4 % ($F_{ST} = 0.024$). **Conclusions.** The studied populations differ on the genetic structure due to various environmental conditions of ecotopes.

Key words: populations of *Pinus sibirica*, microsatellite loci, genetic differentiation.

УДК 575.167 + 57.043

СОЗІНОВ І.О.¹, КОЗУБ Н.О.^{1, 2}, БІДНИК Г.Я.^{1, 2}, ДЕМ'ЯНОВА Н.О.^{1, 2}, КАРЕЛОВ А.В.^{1, 2}, БЛЮМ Я.Б.², СОЗІНОВ О.О.^{1, 2}

¹ Інститут захисту рослин НААН,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 33, e-mail: sia1@i.com.ua

² ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України»,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а

ВПЛИВ ГАММА-ОПРОМІНЕННЯ НА ОЗНАКИ ПРОДУКТИВНОСТІ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ГЕНОТИПУ І УМОВ ВИРОЩУВАННЯ

Відомо, що гамма-опромінення у високих дозах (150–200 Гр і більше) сухих зерен приводить до пригнічення показників

фізіологічного стану рослин, яке проявляється, зокрема, у зниженні ознак продуктивності [1, 2]. У дослідженнях різних авторів показано

відмінності в реакції сортів пшениці м'якої *Triticum aestivum* L. на гамма-опромінення за зниженням ознак продуктивності [2–6]. Однак становить інтерес дослідження генетичної основи цих відмінностей. Для цього зручним генетичним матеріалом можуть бути популяції рекомбінантно-інбредних ліній, дигапloidних ліній, а, в окремих випадках, і майже-ізогенні лінії. Для дослідження реакції різних генотипів за маркерними локусами (гомозигот і гетерозигот) на гамма-опромінення за проявом ознак продуктивності в якості моделі нами використано майже-ізогенні лінії озимої м'якої пшениці за гліадиновими локусами [7] на основі сорту Безоста 1. Ці лінії відрізняються лише за присутністю житньої 1BL/1RS транслокації та за локусом *Gli-D1* і мають найбільш поширені серед сучасних українських сортів алелі за маркерним локусом *Gli-B1* [8] – алель *Gli-B1b* та *Gli-B1l* – маркер житньо-пшеничної 1BL/1RS транслокації [9]. Ця транслокація несе ряд генів стійкості до фітопатогенів – *Pm8* (ген стійкості до борошнистої роси), *Sr31* (ген стійкості до стеблової іржі), *Lr26* (ген стійкості до бурої іржі), *Yr9* (ген стійкості до жовтої іржі) [10]. Незважаючи на її негативний вплив на хлібопекарну якість [11], частка сортів з цією транслокацією, створених в селекційних установах Лісостепу України, залишається високою (40 %) [8], що свідчить про адаптивне значення цієї транслокації. Задачею даної роботи було вивчення впливу гамма-опромінення на продуктивність рослин, що відрізняються за дозою 1BL/1RS транслокації, при вирощуванні в різних умовах.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження слугувала популяція рослин F_2 від схрещення майже ізогенних ліній озимої м'якої пшениці *T. aestivum* L. за гліадиновими локусами GLI-D1-4 × GLI-B1-3 на основі сорту Безоста 1. Лінії створено д.б.н. М.М. Копусем [7]. Вихідні лінії відрізняються лише за присутністю пшенично-житньої транслокації 1BL/1RS (її маркером є гліадиновий алель *Gli-B1l* [10]) та за гліадиновим локусом *Gli-D1* і мають наступні генотипи за маркерними локусами (позначення алелів за каталогом [9]): лінія GLI-B1-3: *Gli-B1l Gli-D1b*; лінія GLI-D1-4: *Gli-B1b Gli-D1j*. Сухі зерна F_2 були опромінені гамма-радіацією в дозах 150, 200 і 300 Гр. Контрольні та опромінені зерна F_2 були посіяні у 2005 р. широкорядним посівом у двох місцевостях на дослідній ділянці (м. Київ, Інститут агроєкології та біотехнології НААН) в оптимальні строки

(початок вересня) (далі – Лісостеп) та в м. Одеса (Селекційно-генетичний інститут) (далі – Степ) в пізні строки (кінець жовтня) з чергуванням рядів «контроль», «варіант з гамма-опроміненням зерен дозою 150 Гр», «варіант з гамма-опроміненням зерен дозою 200 Гр», «варіант з гамма-опроміненням зерен дозою 300 Гр». Розмір ділянок та кількість посіяних зерен і вирощених рослин кожного варіанту в м. Києві описано раніше в [12]. Нижче наведено інформацію про дослід в м. Одеса: Довжина ряду – 2,50 м, відстань між рядами – 30 см, відстань між рослинами в ряду – 5 см. Посіяно по 880 зерен кожного варіанту. Вирощено 801 рослину F_1 контрольного варіанту, 611 рослин варіанту з гамма-опроміненням зерен дозою 150 Гр, 317 рослин варіанту з гамма-опроміненням зерен дозою 200 Гр, рослин варіанту з гамма-опроміненням зерен дозою 300 Гр практично не отримано. Кожну рослину F_2 охарактеризовано – за ознаками «кількість продуктивних стебел», «маса зерна з рослини» та «маса зерна з колоса».

Для визначення генотипу за локусами гліадинів з кожної рослини F_2 проаналізовано суміш 7 зернівок F_2 (1–3 повторності) електрофорезом гліадинів за методикою [8]. Виживання рослин визначали як відношення кількості рослин F_2 до кількості висіяних зерен F_2 . Відносне зниження ознаки порівняно з контролем визначали як відношення різниці між значенням у контролі (К) та у варіанті з опроміненням (О) до значення ознаки у контролі * 100 %: $(K-O) * 100 / K$. Достовірність різниці за кількісними ознаками оцінювали за критерієм Стьюдента.

Результати і обговорення

Умови вирощування досліджуваної популяції рослин F_2 поділяли на «сприятливі» і «несприятливі» на основі середньопопуляційного значення маси зерна з рослини в контрольному варіанті, яка становила $5,92 \pm 0,13$ г в умовах зони Степу (несприятливі умови) та $12,36 \pm 0,31$ г при вирощуванні в зоні Лісостепу [12] (сприятливі умови).

Виживання популяції рослин F_2 у несприятливих умовах зони Степу становило $0,892 \pm 0,010$ у контролі, $0,667 \pm 0,016$ після опромінення сухих зерен дозою гамма-опромінення 150 Гр, (76% від виживання у контролі) (табл. 1). Після опромінення дозою 200 Гр виживання рослин становило лише 40% від виживання у контролі. При опроміненні сухих зерен дозою 300 Гр рослин практично не отримано при даних умовах вирощування. У сприятливих умовах вирощування (в умовах

Лісостепу в оптимальні строки посіву [12]) зниження виживання у два рази (ЛД50) у гібридній популяції на базі сорту Безоста 1 спостерігається при 300 Гр, тоді як при вирощуванні в умовах Степу (засушливі умови) дозою ЛД50 є доза, близька до 200 Гр. Ці дані показують, що рівень виживання рослин озимої м'якої пшениці після опромінення сухих зерен гамма-променями залежить від умов вирощування.

Гамма-опромінення сухих зерен призвело до суттєвого зниження ознак продуктивності популяції рослин F₂ порівняно з контролем (табл. 2).

Найістотніше зменшення ознаки при опроміненні спостерігалось для маси зерна з рослини. Так, при опроміненні дозою 200 Гр маса зерна з рослини зменшується на 60%, число продуктивних стебел – на 22 %, тоді як маса зерна з колоса – на 48%. Отже, при вирощуванні рослин у відносно несприятливих умовах при пізніх строках посіву вплив гамма-опромінення сухих зерен F₂ на зниження урожайності рослин озимої пшениці в значній мірі реалізується через формування меншої маси зерна з колоса, а не через закладку меншого числа стебел при осінньому кушненні, як спостерігалось при оптимальних строках сівби і відносно сприятливих умовах [12].

Досліджено значення ознак продук-

тивності рослин F₂ при опроміненні сухих зерен у залежності від генотипу за присутністю житньої транслокації. Середні значення ознак продуктивності рослин F₂ з певним генотипом за *Gli-B1* в контролі і при опроміненні сухих зерен наведено в табл. 3. Наведені групи рослин відрізняються за коротким плечем хромосоми 1В. *Gli-B11.1* – гомозиготи за присутністю житньої 1BL/1RS транслокації (дві дози житнього плеча 1RS), *Gli-B1b.1* – гетерозиготи (мають одну дозу плеча 1RS), рослини з генотипом *Gli-B1b.b* мають пшеничне плече 1BS.

Проаналізовано відносно зниження (порівняно з контролем) у різних генотипів за локусом *Gli-B1* при використаних дозах гамма-опромінення (табл. 4).

Виявлено, що у варіантах з опроміненням (150 Гр і 200 Гр) при вирощуванні у відносно несприятливих умовах найменше знижує число продуктивних стебел і масу зерна з рослини гомозигота за житньою транслокацією, а найбільше – гомозигота без транслокації. При 150 Гр рівень зниження продуктивного кушнення у генотипів *Gli-B11.1* в два рази менший, ніж у гомозигот *Gli-B1b.b*, а за масою зерна з рослини – в півтора рази. Подальше збільшення дози гамма опромінення (200 Гр) нівелює відмінності за рівнем зниження цих ознак продуктивності.

Таблиця 1. Виживання рослин F₂ гібридній популяції на базі сорту Безоста 1 після опромінення сухих зерен гамма-променями при вирощуванні в різних умовах

Варіант	Виживання		Частка від контролю	
	Степ	Лісостеп	Степ	Лісостеп
Контроль	0,892 ± 0,010	0,754 ± 0,014		
150 Гр	0,667 ± 0,016	0,755 ± 0,014	76 %	100 %
200 Гр	0,335 ± 0,016	0,714 ± 0,015	40 %	95 %
300 Гр	-*	0,385 ± 0,016	-*	51 %

Примітка: * рослин практично не отримано.

Таблиця 2. Середні значення ознак продуктивності ± стандартна похибка у популяції рослин F₂ (Степ) у контролі та після гамма-опромінення зерен, в дужках – відносне зниження ознак (порівняно з контролем), %

Варіант	Число продуктивних стебел	Маса зерна з рослини, г	Маса зерна з колоса, г
Контроль	4,40 ± 0,07	5,92 ± 0,13	1,33 ± 0,02
150 Гр	3,93 ± 0,08* (10,7%)	4,27 ± 0,11* (28,0%)	1,09 ± 0,02* (18,2%)
200 Гр	3,43 ± 0,11* (22,0%)	2,38 ± 0,12* (59,8%)	0,69 ± 0,02* (48,2%)

Примітка: * відрізняється від значення в контролі при P < 0,001.

Таблиця 3. Середні значення ознак продуктивності рослин F₂ (Степ) з певним генотипом за *Gli-B1* в контролі і при опроміненні сухих зерен

Варіант	<i>Gli-B1b.b</i>	<i>Gli-B1b.l</i>	<i>Gli-B1l.l</i>
Число продуктивних стебел			
Контроль	4,44 ± 0,132	4,556 ± 0,107	3,924 ± 0,147
150 Гр	3,894 ± 0,145**	4,036 ± 0,108***	3,663 ± 0,183
200 Гр	3,276 ± 0,209***	3,571 ± 0,154***	3,255 ± 0,280*
Маса зерна з рослини			
Контроль	5,8 ± 0,23	6,26 ± 0,197	5,211 ± 0,283
150 Гр	4,025 ± 0,187***	4,448 ± 0,157***	4,142 ± 0,334*
200 Гр	1,977 ± 0,172***	2,668 ± 0,171***	2,164 ± 0,278**
Маса зерна з колоса			
Контроль	1,309 ± 0,034	1,356 ± 0,025	1,311 ± 0,049
150 Гр	1,06 ± 0,034***	1,11 ± 0,025***	1,084 ± 0,053**
200 Гр	0,603 ± 0,035***	0,75 ± 0,031***	0,655 ± 0,054***

Примітка: відрізняється від значення в контролі при ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Таблиця 4. Відносне зниження ознак продуктивності рослин F₂ з різним генотипом за локусом *Gli-B1* після гамма-опромінення зерен (порівняно з контролем),% (С – Степ, Л – Лісостеп [12])

Варіант	<i>Gli-B1b.b</i>		<i>Gli-B1b.l</i>		<i>Gli-B1l.l</i>	
	С	Л	С	Л	С	Л
Число продуктивних стебел						
150 Гр	12,30	19,92	11,41	7,84	6,65 ^{h**}	16,27
200 Гр	26,22	23,22	21,62	19,04	17,05	12,69
300 Гр	–*	51,74	–	49,85	–	48,81
Маса зерна з рослини						
150 Гр	30,60	26,11	28,95	7,47 ^h	20,51 ^h	20,19
200 Гр	65,91	27,27	57,38	24,17	58,47	14,90 ^h
300 Гр	–	60,62	–	66,24	–	61,11
Маса зерна з колоса						
150 Гр	19,02	6,06	18,14	-0,96 ^h	17,32	7,98 ^h
200 Гр	53,93	5,30 ^h	44,69	8,38	50,04	5,59 ^h
300 Гр	–	23,13	–	9,34	–	27,27

Примітка: * рослин практично не отримано; ** h – відмінності від значення в контролі статистично неістотні.

За рівнем зниження маси зерна з рослини у різних генотипів варіант з дозою опромінення 150 Гр при вирощуванні у відносно несприятливих умовах (Степ) є близьким до варіанту з дозою опромінення 200 Гр при вирощуванні у сприятливих умовах [12]) (Лісостеп, табл. 4). Величини зниження ознак продуктивності, отримані в цих популяціях, дозволяють припустити більшу нечутливість генотипів з присутністю 1BL/1RS транслокацією до стресових факторів (опромінення сухого насіння гамма-променями у високих дозах) порівняно з генотипами без цієї інтрогресії.

Висновки

У варіантах з гамма-опроміненням високими дозами сухих зерен пшениці при

вирощуванні у відносно несприятливих умовах найменше знижує число продуктивних стебел і масу зерна з рослини гомозигота за житньою транслокацією, а найбільше – гомозигота без транслокації. За рівнем зниження маси зерна з рослини у різних генотипів варіант з дозою опромінення 150 Гр при вирощуванні у відносно несприятливих умовах є близьким до варіанту з дозою опромінення 200 Гр при вирощуванні у сприятливих умовах. Отримані результати вказують на меншу чутливість генотипів з присутністю 1BL/1RS транслокацією до стресових факторів (опромінення сухого насіння гамма-променями у високих дозах) порівняно з генотипами без даної транслокації.

Література

1. Гродзинский Д.М. Радиобиология растений.– Киев: Наук. думка.– 1989.– 384 с.
2. Моргун В.В., Логвиненко В.Ф. Мутационная селекция пшеницы. – Киев: Наук. думка, 1995. – 626 с.
3. Din R., Qasim M., Ahmad K. Radio sensitivity of various wheat genotypes in M₁ generation // Int. J. of Agriculture&Biology. – 2004. – 6, N 5.– P. 898–900.
4. Оксьом В.П. Вплив мутагенних чинників на рослини M₁ озимої пшениці та його зв'язок із частотою змінених форм у другому поколінні // Физиол. и биохим. культ. раст. – 2010. – 42, № 5. – С. 153–162.
5. Назаренко М.М. Вживаність і структура врожайності як показники мутагенної депресії у першому поколінні мутантів сортів озимої м'якої пшениці // Физиол. и биохим. культ. раст. – 2007. – 39, № 5. – С. 438–446.
6. Irfaq M., Nawab K. Effect of gamma irradiation on some morphological characteristics of three wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars // OnLine J. Biol. Sci. – 2001. – 1, N 10. – P. 935–937.
7. Копусь М.М. О естественной географии глиадиновых аллелей у озимой мягкой пшеницы // Селекция и семеноводство. – 1994. – № 5. – С. 9–14.
8. Kozub N.A., Sozinov I.A., Sobko T.A., et al. Variation at storage protein loci in winter common wheat cultivars of the Central Forest-Steppe of Ukraine // Цитология и генетика. – 2009. – 43, № 1. – С. 69–77.
9. Metakovsky E.V. Gliadin allele identification in common wheat. II Catalogue of gliadin alleles in common wheat // J. Genet. Breed. – 1991. – 45. – P. 325–344.
10. Rabinovich S.V. Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. // Euphytica. – 1998. – 100. – P. 323–340.
11. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции – М. : Наука, 1985. – 272 с.
12. Козуб Н.О., Созинов І.О., Бідник Г.Я., Дем'янова Н.О., Карелов А.В., Блюм Я.Б., Созинов О.О. Вплив гамма-опромінення сухих зерен на продуктивність рослин м'якої пшениці, що відрізняються за присутністю житньої 1BL/1RS транслокації // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К.: Логос, 2013. – 12. – 2013. – С. 42–46.

SOZINOV I.A.^{1, 2}, KOZUB N.A.^{1, 2}, BIDNYK H.Ya.^{1, 2}, DEMIANOVA N.A.^{1, 2}, KARELOV A.V.^{1, 2},
BLUME Ya.B.², SOZINOV A.A.^{1, 2}

¹ Institute of Plant Protection, NAAS,

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 33, e-mail: sia1@i.com.ua

² Institute of Food Biotechnology and Genomics, NAS of Ukraine,

Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskogo str., 2a

THE EFFECT OF GAMMA-IRRADIATION ON PRODUCTIVITY TRAITS OF COMMON WHEAT DEPENDING ON THE GENOTYPE AND GROWTH CONDITIONS

Aims. The effect of gamma-irradiation on productivity of common wheat plants differing in the dose of the 1BL/1RS translocation under different growth conditions was studied. **Methods.** Dry F₂ seeds from crossing Bezostaya 1 lines were treated with gamma-radiation at 150, 200, and 300 Gy and grown in two localities. Each F₂ plant was characterized with respect to yield traits. The presence of the translocation was analyzed by electrophoresis of gliadins. **Results.** Under unfavorable conditions the LD50 dose was close to 200 Gy, whereas under favorable ones it was 300 Gy. In variants with irradiation under unfavorable conditions homozygotes for the rye translocation showed the least decrease in the main productivity traits, the highest decrease was observed in homozygotes without it. **Conclusions.** The results suggest lower sensitivity of genotypes with the 1BL/1RS translocation to stress factors (high-dose gamma-irradiation of dry seeds) in comparison with genotypes without it.

Key words: *Triticum aestivum* L., 1BL/1RS translocation, gamma-irradiation, productivity.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЕ ПРИ ДЕЙСТВИИ РАДИОНУКЛИДНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ ЗОНЫ ОТЧУЖДЕНИЯ ЧАЭС ЧЕРЕЗ 25 ЛЕТ ПОСЛЕ АВАРИИ

Авария на Чернобыльской АЭС значительно усложнила экологическую ситуацию в Украине и на фоне уже существующего техногенного загрязнения привела к контакту значительной части ее населения с одним из наиболее универсальных мутагенов – ионизирующим излучением. Вследствие естественного распада нуклидов – ^{137}Cs и ^{90}Sr , их миграции и дезактивационных мер радиационный фон в сравнении с 1986 г. уменьшился в сотни раз. Тем не менее, в последнее время обострилось внимание на повышении в 30-км зоне загрязнения ^{241}Am [6], количество которого вследствие относительно быстрого распада ^{239}Pu до 2059 г. увеличится в 40 раз [1]. Учитывая, что в ближней зоне аварии доля ^{239}Pu в суммарной активности трансурановых элементов составляет приблизительно 83% и длительность угрозы радионуклидного загрязнения может измеряться тысячелетиями [3, 9], проблема генетической оценки влияния облучения на биоту для этой территории очень актуальна. Изучение индукции цитогенетических аномалий как прямых биомаркеров облучения [5] в наибольшей мере может приблизить к пониманию эффектов, наблюдаемых в реальных условиях радионуклидного загрязнения среды обитания, и их прогнозирования.

Материалы и методы

С целью определения мутагенной активности радионуклидного загрязнения в зоне отчуждения через 25 лет после аварии на ЧАЭС проведен цитогенетический анализ меристематических клеток первичных корней проростков озимой пшеницы (*T. aestivum* L.) сортов Альбатрос одесский и Зимоярка. Семена в течении 40 ч. выдерживали во влажной загрязненной радионуклидами почве, отобранной вблизи сел Копачи, Чистоголовка, Янов (мощность экспозиционных доз составляла $7,2 \cdot 10^{-1}$ – $0,5 \cdot 10^{-6}$ А/кг).

Контролем служила почва с территории опытного хозяйства Института физиологии растений и генетики НАН Украины (пгт Глеваха Васильковского р-на Киевской обл.), где на протяжении многих лет изучается спонтанный уровень мутационной изменчивости растений озимой пшеницы. Пробы почвы отбирали по стандартным методикам [2].

Семена проращивали при температуре 24–26 °С. Первичные корни длиной 0,8–1,0 см фиксировали в «уксусном алкоголе» и подвергали мацерации действием 1 н раствором соляной кислоты. С апикальной меристемы корней, окрашенных ацетоорсеином, изготавливали временные давленные препараты. Во время определения частоты нарушений митоза и хромосомных aberrаций во внимание принимали клетки, находящиеся в анафазе и ранней телофазе. Выборка составляла не менее 1000 клеток для каждого варианта.

Результаты и обсуждение

Уровень нарушений целостности хромосом и аномалий митоза, обусловленных радионуклидным загрязнением почвы исследуемых территорий зоны отчуждения, значительно превышает контрольные показатели. Частота aberrантных клеток в зависимости от сорта пшеницы и плотности загрязнения почвы выше спонтанного уровня в 2,0–7,6 раза (табл.). Максимальное количество цитогенетических нарушений – $2,89 \pm 0,52$ и $2,21 \pm 0,41\%$ соответственно у сортов Альбатрос одесский и Зимоярка плотностями радионуклидного загрязнения (села Чистоголовка, Янов). Значительно возрастает частота aberrантных клеток и в условиях влияния на семена радионуклидов почвы с наименьшей плотностью загрязнения (с. Копачи) – превышает контрольные показатели сортов Альбатрос одесский и Зимоярка соответственно в 1,9 и 3,6 раза.

Таблица. Частота и спектр хромосомных aberrаций в озимой пшенице в условиях пролонгированного влияния радионуклидов зоны отчуждения ЧАЭС (2011 г.)

Место отбора образцов	Изучено		Митозы с нарушениями и хромосомными aberrациями		Спектр нарушений митоза и хромосомных aberrаций				
	корней, шт.	ана-телофаз митозов, шт.	шт.	%	фрагменты, шт.	мости, шт.	мости + фрагменты, шт.	микроядра, шт.	отстающие хромосомы, шт.
пгт Глеваха	18	1063	4	0,38±0,12	1	3	0	0	0
с. Копачи	18	1084	8	0,74±0,26	3	4	0	1	0
с. Чистоголовка	26	1038	30	2,89±0,52*	11	17	1	0	1
с. Янов	24	1218	32	2,63±0,46*	10	21	0	0	1
Зимоярка									
пгт Глеваха	13	1006	4	0,40±0,20	2	2	0	0	0
с. Копачи	18	1053	15	1,43±0,37*	8	6	0	1	0
с. Чистоголовка	15	1257	18	1,43±0,34*	9	7	0	0	2
с. Янов	21	1265	28	2,21±0,41*	13	10	0	1	4

Примечание: * различия по сравнению с контролем достоверные при $P < 0,05$.

Радионуклидное загрязнение почвы с. Чистогаловка, которое в 1,6 раза выше суммарной плотности загрязнения почвы с. Копачи, индуцирует в сорта Альбатрос одесский аномалии митоза и хромосомные aberrации в 7,6 раза чаще, чем в контроле и в 3,9 раза превышает их частоту в условиях влияния радионуклидов почвы с. Копачи.

Несмотря на более высокую удельную радиоактивность почвы с. Чистогаловка, по сравнению с почвой с. Копачи, частота aberrантных клеток в сорта Зимоярка остается на уровне 1,43%. Отсутствие прямой зависимости частоты aberrантных клеток от плотности радионуклидного загрязнения и мощности экспозиционной дозы подтверждается результатами исследований, проведенных на других биологических объектах, а именно на *Arabidopsis thaliana* Henh. (L.), *Crepis tectorum* L., *Pinus sylvestris* L. [13, 14].

Спектр хромосомных нарушений, обнаруженных во время цитогенетического анализа вследствие действия радионуклидных загрязнений всех исследуемых территорий, включает наиболее характерные в условиях влияния ионизирующего излучения парные фрагменты и дицентрические мосты. Возрастание по сравнению с контролем частоты хроматидных aberrаций (одиночных фрагментов и хроматидных мостов) обусловлено пролонгированным облучением клеток корневой меристемы на репликативной и пострепликативной стадиях клеточного цикла [8]. Радионуклидное загрязнение почвы сел Копачи, Янов сопровождается индукцией в обоих сортах пшеницы микроядер, множественных нарушений митоза и мультиaberrантных клеток. Несмотря на то, что микроядра при действии радиации образуются преимущественно с ацентрических

фрагментов [10], количественной зависимости между числом aberrантных метафаз и клеток с микроядрами не выявлено.

Среди цитогенетических нарушений выявлено аномалии клеточного деления – трехполосные митозы и отстающие хромосомы. Отстающие хромосомы появлялись только при влиянии более высоких фоновых значений радиационного загрязнения почвы сел Чистогаловка и Янов, что свидетельствует об анеугенном действии ионизирующего излучения, связанного с повреждением внутриклеточных механизмов контроля сегрегации хромосом и нормального протекания отдельных этапов клеточного цикла [4, 7, 11, 12].

Выводы

Таким образом, радионуклидное загрязнение почвы зоны отчуждения даже через 25 лет после аварии на ЧАЭС вызывает возрастание частоты хромосомных aberrаций в озимой пшеницы, что в 2,0–7,6 раза превышает их уровень в контроле. Спектр хромосомных нарушений преимущественно включает парные фрагменты и дицентрические мосты, что является характерным в условиях влияния ионизирующего излучения. Отстающие хромосомы появляются только в условиях влияния более высоких фоновых значений радиационного загрязнения почвы, что свидетельствует об анеугенном действии ионизирующего излучения. Отсутствие прямой зависимости частоты aberrантных клеток от плотности радионуклидного загрязнения почвы ставит под сомнение возможность использования в условиях радионуклидного загрязнения показателей удельной радиоактивности и мощности экспозиционной дозы для прогнозирования генетических нарушений организмов.

Литература

1. Бездробная Л.К., Цыганок Т.В., Романова Е.П. и др. Динамическое исследование цитогенетических эффектов в лимфоцитах крови людей, несанкционированно проживающих в зоне отчуждения Чернобыльской АЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2002. – 42, № 6. – С. 727–730.
2. Беккер А.А., Агаев Т.Б. Охрана и контроль загрязнения природной среды. – Ленинград: Гидрометеоздат, 1989. – 286 с.
3. Гудков И.Н. Современные задачи и проблемы сельскохозяйственной радиоэкологии // Агроекологічний журнал. – 2005. – № 3. – С. 22–26.
4. Инге-Вечтомов С.Г. Фундаментальная и прикладная экологическая генетика // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. – К.: Логос, 2011. – 10. – С. 33–37.
5. Кравец А.П., Гатилова Г.Д., Гродзинский Д.М. Динамика образования цитогенетических аномалий в меристеме проростков при хроническом облучении семян // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2008. – 48, № 3. – С. 313–317.

6. Куцоконь Н.К., Рашидов Н.М., Гродзинский Д.М. Цитогенетические эффекты ^{241}Am в Allium-тесте // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2002. – 42, № 6. – С. 675–677.
7. Лазюк Г.И., Зацепин И.О., Верже П. и др. Синдром Дауна и ионизирующая радиация: причинно-следственная связь или случайная зависимость // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2002. – 42, № 6. – С. 678–683.
8. Мазник Н.А. Роль факторов нерадиационной природы в формировании цитогенетических эффектов у эвакуантов из 30-км зоны Чернобыльской АЭС // Цитология и генетика. – 2004. – 38, № 6. – С. 33–44.
9. Моргун В.В., Якимчук Р.А. Генетичні наслідки аварії на Чорнобильській АЕС. – К.: Логос, 2010. – 400 с.
10. Шмакова Н.Л., Насонова Е.А., Красавин Е.А. и др. Индукция хромосомных aberrаций и микроядер в лимфоцитах периферической крови человека при действии малых доз облучения // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2006. – 46, № 4. – Р. 480–487.
11. Bentley K.S., Kirkland D., Murphy M. et al. Evaluation of thresholds for benomyland carbendazim-induced aneuploidy in cultured human lymphocytes using fluorescence in situ hybridization // Mutat. Res. – 2000. – 464. – Р. 41–51.
12. Duesberg P., Rasnick D. Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own // Cell Motility and Cytoskeleton. – 2000. – 47. – Р. 81–107.
13. Geras'kin S.A., Dikarev V.G., Zyablitskaya Ye.Ya. et al. Genetic consequences of radioactive contamination by the Chernobyl fallout to agricultural crops // J. Environ. Radioact. – 2003. – 66. – Р. 155–169.
14. Kovalchuk O., Dubrova Y.E., Arkhipov A. et al. Wheat DNA mutation rate after Chernobyl // Nature. – 2000. – 407. – Р. 583–584.

YAKIMCHUK R.A.

Pavlo Tychyna Uman State Pedagogical University,

Ukraine, 20300, Uman, Sadova str., 2, e-mail: peoplenature@rambler.ru

CYTOGENETIC DISORDERS OF WINTER WHEAT UNDER THE EFFECT OF RADIO NUCLIDE CONTEMINATION IN THE ChNPP ALIENATION ZONE 25 YEARS AFTER THE ACCIDENT

Aims. To make a cytogenetic analysis of meristematic cells of primary roots of winter wheat rootlets and to identify the frequency and specter of chromosome disorders induced by radio nuclide contamination of the alienation zone 25 years after the accident at ChNPP. **Methods.** To make crushed preparations of primary winter wheat roots and their cytogenetic analysis. **Results.** The frequency of variable cells depending on the winter wheat variety and the soil contamination density is 2.0–7.6 times higher than a spontaneous level. A maximum quantity of cytogenetic disorders was identified when seeds were kept in moist soil with the highest total densities of radio nuclide contamination. The specter of chromosome disorders, found during a cytogenetic analysis as a result of the effect of radio nuclide contamination of all the areas studied, includes the most typical paired fragments and dicentric bridges when ionizing radiation occurs. **Conclusions.** As there is no correlation between the frequency of variable cells and soil radio nuclide contamination, it questions the possibility of using the indicators of specific radio activity and exposure doze power, in the conditions of radio nuclide contamination, to predict genetic disorders of organisms.

Key words: radio nuclide contamination, *T. aestivum* L., the ChNPP alienation zone.

ЕВОЛЮЦІЯ ГЕНОМІВ У ПРИРОДІ ТА ЕКСПЕРИМЕНТІ

УДК 631.523:581.13

ЄФІМЕНКО Т.С.¹, ФЕДАК Ю.², АНТОНЮК М.З.¹, ТЕРНОВСЬКА Т.К.¹

¹ Національний університет «Києво-Могилянська Академія» МОН України,

Україна, 04070, м. Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: centaureinae@gmail.com

² Канадський інститут сільського господарства і продовольства. Східний центр дослідження злакових і олійних культур

ПОРІВНЯННЯ ХРОМОСОМ 5-Ї ГОМЕОЛОГІЧНОЇ ГРУПИ АВРОРИ ТА АВРОТИКИ З ВИКОРИСТАННЯМ СПЕЦИФІЧНИХ МІКРОСАТЕЛІТІВ

Диплоїдний вид *Aegilops mutica* (Т). – один із небагатьох, що досі майже не вніс свого вкладу до генетичного пулу пшениць, що культивуються. На сьогодні створено лише чужинно-додану та телосомно-додані лінії за участю його В-хромосоми [1]. Та всі його 7 пар А-хромосом увійшли до складу геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротика (ААВВТТ) на додаток до тетраплоїдного компоненту АВ сорту м'якої пшениці Аврора [2]. 20-річне спостереження за цим гексаплоїдом свідчить, що він був та залишається стійким до польових популяцій збудників борошнистої роси, всіх трьох видів іржи, септоріозу, фузаріозу та характеризується високою зимо-морозостійкістю. Нами розпочато роботу зі створення інтрогресивних ліній м'якої пшениці, які б включали різні обсяги хроматину цього егілопсу до геному Аврори, і отримано 237 нащадків F₅ від схрещування Авротика х Аврора, кількість хромосом в яких коливається в межах 41–43 та які стануть цитологічно стабільними лініями протягом одного-двох самозапилень [3]. Лінії варто вивчати щодо згаданих ознак стійкості до руйнівних чинників довкілля, в тому числі дії низьких температур. Відомо, що у м'якій пшениці здатність переносити вплив цього фактору пов'язують з хромосомами 5-ої гомологічної групи [4, 5]. Метою нашої роботи було вивчити хромосоми цієї групи Аврори (ААВВDD) та Авротика щодо можливості використання мікросателітних локусів, специфічних до хромосом 5А, 5В, 5D, для ідентифікації чужинних включень з геному Т.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал: сорт Аврора, амфідиплоїд Авротика. ДНК виділяли з листків дорослих рослин за методикою з буфером на основі СТАВ. Праймери добирали за літературними даними [6–8]. Було перевірено пар праймерів: для плеча 5AS – 18, 5AL – 44,

5BS – 8, 5BL – 20, 5DS – 6, 5DL – 16. ПЛІР проводили: 30 мкл реакційної суміші містила 250 нМ кожного праймера, 50 нг ДНК, по 0,2 мМ кожного дезокситрифосфату, 1,5 мМ MgCl₂, 1,2 у Taq-полімерази (Fermentas, Литва), умови проходження ампліфікації – у відповідності до рекомендацій оригіатора певного SSR-локусу.

Результати та обговорення

Продукти ампліфікації було отримано з ДНК Аврори та Авротика з кожною зі 112 перевірених пар праймерів. Виходячи із специфічності перевірених SSR-локусів до кожної з хромосом 5-ї гомологічної групи пшениці [6–8] та з геномного складу Авротика, який випливає з її походження (рис. 1) ми очікували такі результати. Спектри ампліфікації з праймерами, специфічними для хромосом 5А та 5В, не повинні розрізнятися для Аврори і Авротика, оскільки ці геноми у зазначених генотипах мають бути однаковими (рис. 2, *Xwmc524-5A*). З праймерами, специфічними для хромосоми 5D, суворо кажучи, продуктів з ДНК Авротика утворюватися не повинно, оскільки замість генома D вона має геном Т (рис. 2, *Xcfd189-5D*). Це було правильно для 46 локусів хромосоми 5А з 62 перевірених, 22 локусів хромосоми 5В з 28 перевірених та 2 локусів з 33 хромосоми 5D (рис. 3). Останнє відхилення від очікуваного найбільш виразне, проте легко пояснюється. По-перше, хромосоми D та Т геномів кон'югують майже регулярно [9, 10]. Отже рівень гомології в них достатній, щоб пояснити, що мікросателітні локуси, ідентифіковані як специфічні до геному D, виявились специфічними до геному Т також. Гомологія між вказаними геномами підтверджується і в нашій роботі: гібриди F₂ були самофертильними, чого ніколи не спостерігалось для гібридів від схрещування інших геномно-заміщених амфідиплоїдів, в яких хромосоми третього субгеному не кон'югували [2, 3].

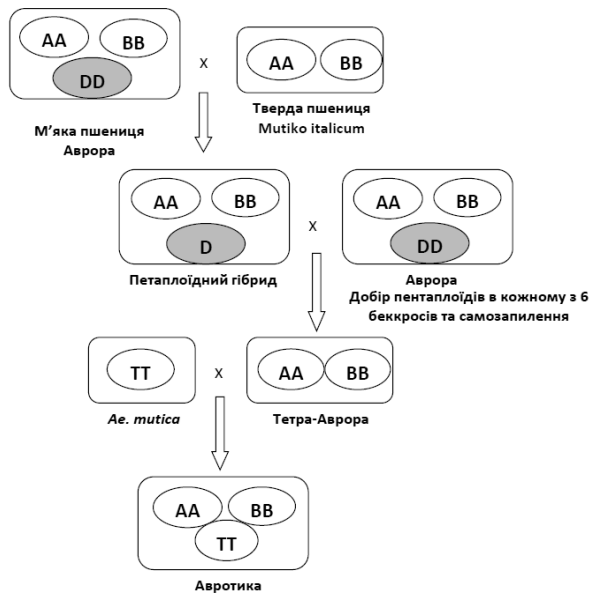


Рис. 1. Схема створення геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротика та його очікуваний геномний склад

По-друге, існує добре задокументоване явище перенесення специфічності мікросателітних локусів між хромосомами в межах однієї і тієї самої гомеологічної групи у *Triticinae*. Так, у нашому дослідженні 10 праймерів із 112 специфічні до двох хромосом із трьох, що вивчаються, а 3 пари – для всіх трьох (рис. 3). Спільна специфічність локусів для кількох хромосом 5-ї групи робить легітимним однаковий спектр ампліконів Аврори та Авротика для локусів *Xcfa2104-5A/5D*, та *Xbarc232-5A/5B/5D*. Однаковий спектр, що дають праймери локусів *Xwmc233*, *Xcfd18*, *Xcfd8*, *Xgpm5098*, *Xgwm292*, *Xcfd29*, *Xcfd183*, *Xwmc765*, *Xwmc443*, *Xgwm654*, дає підстави вважати, що вказані локуси є специфічними не

лише для D-геному, а і для T-геному також. Отже 12 перелічених SSR-локусів з 22, локалізованих на хромосомі 5D, матимуть обмежене значення для ідентифікації інтрогресій D/T, оскільки кожен з них позбавлений власного діагностичного значення. Таким значенням характеризуються 8 локусів: *Xcfd189*, *Xcfd102*, *Xgwm190*, *Xgwm272*, *Xgwm182*, *Xgdm68(A,B)*, *Xgwm293(A,B)*, *Xwmc289(B)*, оскільки на отриманих з відповідними праймерами спектрах Авротика характеризується специфічним ампліконом. Те, що три з них дають продукт з геномами А та В, не має значення, оскільки за цими геномами Аврора та Авротика збігаються, а специфічність характеризується спектр саме Авротика (рис. 3). Ті два локуси, *Xcfd57* та *Xcfa2141(A)*, що не дають амплікона з ДНК Авротика, дозволяють припустити відсутність (або перебудову) відповідної ділянки хромосом 5D Але для хроматину T-хромосоми ці локуси не інформативні, оскільки не засвідчують наявності ДНК цього геному.

Обговорюючи можливості використання хромосомно-специфічних мікросателітних локусів для вивчення структури геному інтрогресивних ліній Авротика/Аврора, які створюються, потрібно дати пояснення тому факту, що за 16 локусами генома А (26% від вивчених) та 6 локусами хромосоми В (21% вивчених) спостерігається різниця у спектрах ампліконів ДНК Аврори та Авротика, хоча бути її не повинно через те, що геноми А та В в цих генотипах однакові. Для трьох локусів, *Xgdm68(A,D)*, *Xgwm293(A,D)* та *Xwmc289(D)* пояснення дуже просте: вони специфічні не лише для 5В, а і для 5D-хромосоми. Відмінність спектрів Аврори і Авротика може виникати, якщо специфічність розповсюджується на хромосом 5Т.

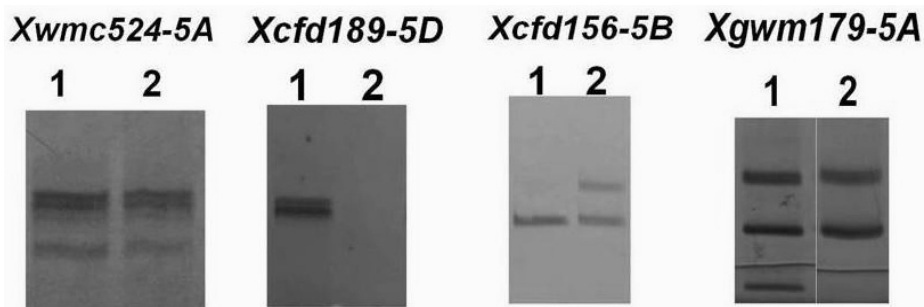
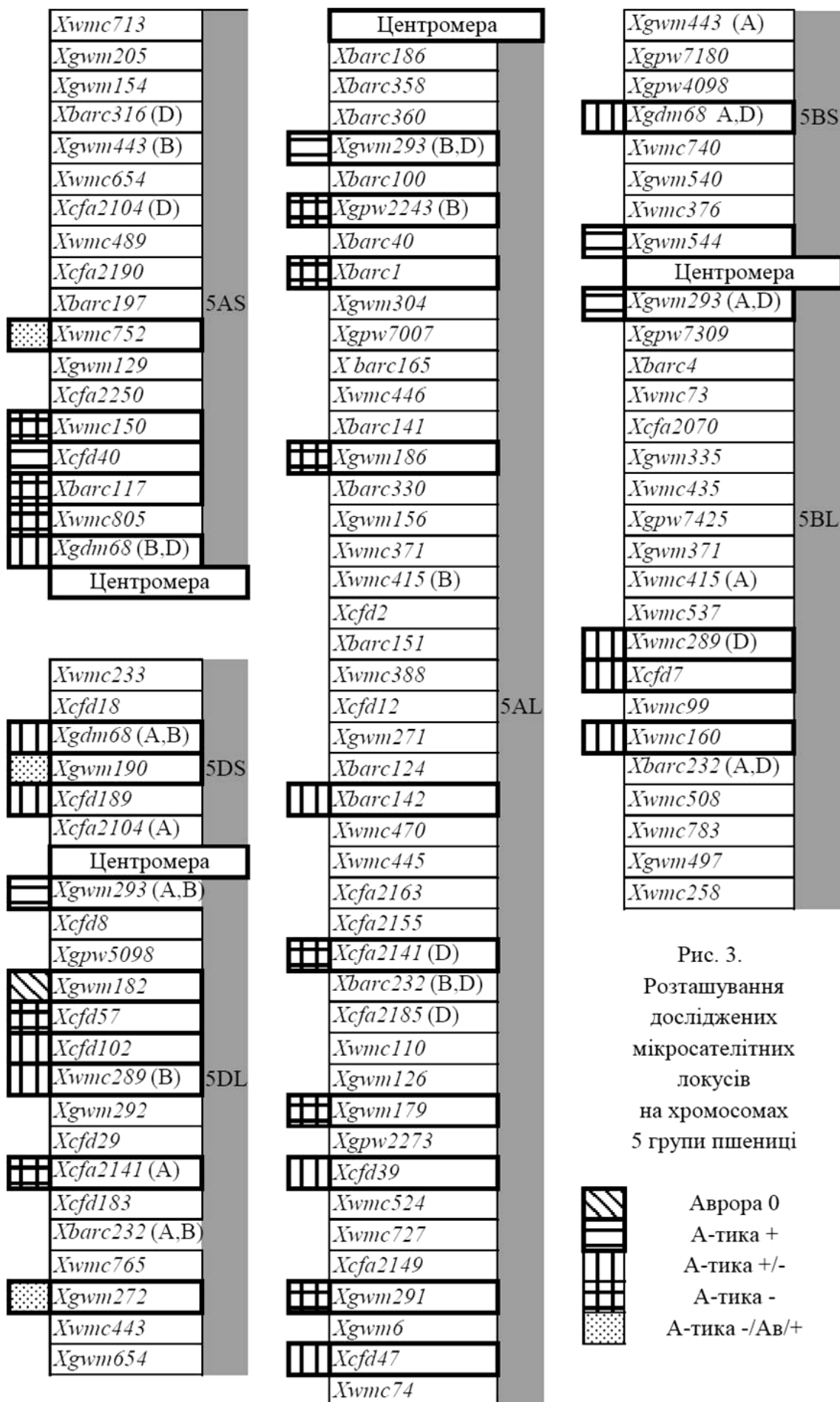


Рис. 2. Спектри ампліконів за SSR-локусами: 1 – Аврори, 2 – Авротика. За локусом *Xwmc524-5A* немає різниці у спектрах ампліконів; *Xcfd189-5D* – нуль-алель у Авротика; *Xcfd156-5B* – Авротика має зайвий амплікон; *Xgwm179-5A* – у Авротика не вистачає амплікона



І ці локуси вже наведені серед тих, які мають діагностичне значення для визначення хроматину хромосоми 5Т за результатами аналізу хромосоми D. Щодо локусів *Xgwm544*, *Xcfd7*, *Xwmc160*, розбіжності в ампліконах Аврори та Авротики можуть бути викликані будь-яким з двох чинників. По-перше, під час виділення тетракомпоненту AABV із геному AABVDD м'якої пшениці, яке відбувалося через схрещування сорту Аврора з твердою пшеницею та шестикратним беккросуванням з Аворою пентаплоїдних гібридів попереднього покоління, звичайно відбувалася рекомбінація між хромосомами А та В геномів м'якої і твердої пшениці. Через це ідентичність тетра-Аврори та Аврори за геномами АВ могла дещо втратитися. По-друге, і це більш просте пояснення, інформацію про перенесення специфічності мікросателітних локусів між хромосомами в межах однієї гомологічної групи було отримано не на Аврорі, а на інших генотипах [6–8]. Можливо, що в геномі Аврори вказані три локуси є специфічними не лише для хромосоми 5В, а і для хромосоми 5D, а також для хромосоми 5Т Авротики. Оскільки це припущення виключити не можна, вказані алелі варто залучати до аналізу при вивченні інтрогресивних ліній на наявність інтрогресій за хромосомами 5-ої групи.

Для хромосоми 5А три локуси з 16, за якими є розбіжності між картинами ампліфікації ДНК Аврори та Авротики, *Xgdm68(B,D)*, *Xgwm293(A,D)*, *Xcfa2141(D)*, специфічні також до хромосоми 5D, перші два вже згадувалися серед діагностично значущих алелів для хромосоми 5Т. Серед решти 13 для локусів *Xwmc752*, *Xwmc150*, *Xbarc117*, *Xwmc805-5A*, *Xgprw2243(B)*, *Xbarc1*, *Xgwm186*, *Xbarc142*, *Xgwm179*, *Xcfd39*, *Xgwm291*, *Xcfd47* здається правдоподібною друга причина виникнення відмінностей між ампліконами,

тому що у всіх випадках в ампліконі Авротики немає компоненту, властивого спектру Аврори. У спектрі Авротики з праймерами локусу *Xcfd40* є зайвий компонент. Можливо, локус специфічний до 5Т хромосоми та його можна залучати до аналізу ліній.

Висновки

Порівняльний мікросателітний аналіз генотипів м'якої пшениці (AABVDD) та отриманого через об'єднання її тетраплоїдного компонента AABV та геному ТТ *Ae. mutica* геномно-заміщеного амфідиплоїда із застосуванням праймерів мікросателітних локусів, картованих на хромосомах А, В та D геномів, підтвердив можливість використання вказаних SSR-локусів для ідентифікації у геномі амфідиплоїда хроматину 5-ої хромосоми іншого геному (Т). Із 112 вивчених локусів, специфічних для трьох хромосом 5-ої гомологічної групи, виявлено 13, які мають діагностичну цінність для ідентифікації хроматину хромосоми 5Т за умов наявності у геномі інших хромосом тієї самої гомологічної групи: *Xcfd189*, *Xcfd102*, *Xgwm190*, *Xgwm272*, *Xgwm182*, *Xgdm68(A,B)*, *Xgwm293(A,B)*, *Xwmc289(B)*, *Xgwm544*, *Xcfd7*, *Xwmc160*, *Xcfa2141(D)*, *Xcfd40*. Діагностична значущість полягає у наявності у спектрі ампліконів Авротики, що утворюються з праймерами вказаних локусів, компонентів, які ясно відрізняються за рухливістю від ампліконів, що утворюються з ДНК Аврори. Локуси *Xcfd57* та *Xcfa2141(A)* мають обмежене значення для вивчення інтрогресивних ліній Авротика/Аврора через відсутність амплікону, характерного для ДНК з хромосомою 5Т. Крім того, 12 SSR-локусів з 22, локалізованих на хромосомі 5D, матимуть обмежене значення для ідентифікації інтрогресій D/Т у сполученні з іншими хромосомно-специфічними молекулярно-генетичними маркерами.

Література

1. Badaeva E.D., Friebe, B., Gill, B.S. Genome differentiation in *Aegilops* L. Distribution of highly repetitive DNA sequences on chromosomes of diploid species // *Genome*. – 1996. – 39. – P. 293–306.
2. Жиров Е.Г. Геномы пшеницы: исследование и перестройка: Дис. ... докт. биол. наук: 03.00.15. – Краснодар. – 1989. – 366 с.
3. Єфіменко Т.С., Антонюк М.З., Мартиненко В.С. Створення чужинно-заміщених та чужинно-доданих ліній *Triticum aestivum* / *Aegilops mutica* // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. – Київ: Логос, 2013. – 12. – С. 114–118
4. Vagujfalvi A., Galiba G., Cattivelli L., Dubcovsky J. The cold-regulated transcriptional activator *Cbf3* is linked to the frost-tolerance locus *Fr-A2* on wheat chromosome 5A // *Molecular and General Genetics*. – 2003. – 269, N 1. – P. 60–67.
5. Toth B., Galiba G., Fehér E., Sutka J., Snape J.W. Mapping genes affecting flowering time and frost resistance on chromosome 5B of wheat // *Theor. Appl. Genet.* – 2003. – 107, N 3. – P. 509–514.

6. GrainGenes: A Database for *Triticeae* and *Avena* [Электронный ресурс]. – <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>
7. KOMUGI: Wheat Genetic Resources Database. Composite Wheat Map [Электронный ресурс]. – <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/maps/markerMap.jsp;jsessionid=40E62A525FB63D69D63275DF645E308C.lb1?chromosome=5>
8. Somers D.J., Isaac P, Edwards K. "A high-density microsatellite consensus map for bread wheat" // *Theor Appl Genet.* – 2004. – 109. – P. 1105–1114.
9. Jones J.K., Majisu B.N. The homoeology of *Aegilops mutica* chromosomes. // *Canadian Journal of Genetics and Cytology.* – 1968. – 10, N 3. – P. 620–626.
10. Ohta S. Phylogenetic relationship of *Aegilops mutica* Boiss. with the diploid species of congeneric *Aegilops-Triticum* complex, based on the new method of genome analysis using its B-chromosomes // *Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ.* – 1991. – N 137. – P. 1–116.

IEFIMENKO T.S.¹, FEDAK G.², ANTONYUK M.Z.¹, TERNOVSKA T.K.¹

¹ *National University of "Kyiv-Mohyla Academy",*

Ukraine, 04070, Kyiv, Skovorody str., 2, e-mail: centaureinae@gmail.com

² *Agriculture and Agri-Food Canada. Eastern Cereal and Oilseed Research Center, Ottawa, Ontario*

COMPARISON OF GROUP 5 CHROMOSOME OF AURORA AND AUROTICA USING SPECIFIC MICROSATELITES

Aims. Determine the possibility to use microsatellite loci specific to chromosomes of homeologous group 5-th for distinction of Aurora (AABBDD) and Aurotica (AABBTT) chromosomes. **Methods.** PCR with primers specific to SSR loci mapped at chromosomes 5A, 5B, and 5D. **Results.** From 112 studied SSR loci specific to 3 homeologous chromosomes of group 5, 13 loci were selected as diagnostically valuable for identification of 5T chromosome fragments in conditions when other homeologous chromosomes of the same group are present in the genome. **Conclusions.** Microsatellite loci specific to 5A, 5B, and 5D common wheat chromosomes can be used for identification of alien chromatin of chromosome 5T in the genome of amphidiploid.

Key words: wheat, genome-substitution amphidiploid, microsatellite analysis, chromosome distinction.

УДК 576.31; 576.316.2; 576.365

КОХАНЕНКО А.А., АРТЕМОВ Г.Н., НЕМИРОВИЧ-ДАНЧЕНКО Н.М., СТЕГНИЙ В.Н.

Томский государственный университет,

Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36, e-mail: alinakokhanenko@gmail.com

ОРГАНИЗАЦИЯ ПОЛОВОЙ ХРОМОСОМЫ XL В ПРОСТРАНСТВЕ ЯДЕР ТРОФОЦИТОВ В ХОДЕ ПОЛИТЕНИЗАЦИИ У ВИДОВ *DROSOPHILA* ПОДГРУППЫ «*MELANOGASTER*» С КАРДИНАЛЬНЫМИ РАЗЛИЧИЯМИ В АРХИТЕКТУРЕ ЯДЕР

Пространственная организация хромосом в ядре – один из разделов современной клеточной биологии, который получил широкое распространение и весьма актуален в современной клеточной биологии. Сегодня молекулярные биологи выделяют, по крайней мере, три механизма, которыми может осуществляться регуляция активности генома. Они тесно связаны между собой: Первый механизм осуществляется посредством транскрипционных факторов, которые способны связываться с определенными последовательностями генома [1]; Второй регуляторный механизм включает метилирование ДНК и пост-

трансляционную модификацию гистонов [2]; Третьим механизмом регуляции генов является определенная организация хромосом в пространстве ядра. Первые два механизма довольно широко изучены по отношению дифференциации эмбриональных стволовых клеток, в то время, как относительно третьего фактора известно очень немного. Пространственная организация и функционирование ядра обеспечиваются наличием двух типов связей – хромосомно-мембранных и межхромосомных [3–5]. Крупномасштабные хромосомные перемещения регулируют генную экспрессию путем

локализации генов рядом с определенными ядерными субкомпартаментами, что ингибирует или активирует транскрипцию [5].

Одним из главных вопросов, возникающих при изучении архитектуры ядра, является вопрос относительно кинетики хромосом в пространстве ядра и законов, которым это движение подчиняется. Исследование тонких механизмов поддержания пространственной организации хромосом и обеспечения их динамики представляется чрезвычайно важной задачей, которая будет иметь большие перспективы для понимания того, как работает клеточное ядро. Ранее нами было показано, что в ядрах трофоцитов *C. erythrocephala*, для которых характерны морфологические изменения ядра в ходе политенизации происходят крупномасштабные перемещения хромосом. На начальных этапах политенизации половая хромосома расположена в центре ядра. А вот на завершающих этапах политенизации происходит перемещение материала половой хромосомы на периферию. Кроме того в пространстве ядра выявляется большое количество мелких сигналов ДНК-зонда половой хромосомы 6 [6, 7].

Согласно данным по изучению пространственной организации ядер трофоцитов видов, подгруппа «*melanogaster*» включает виды, которые имеют разные типы взаиморасположения хромосом в пространстве ядра [8]. В ядрах трофоцитов вида *D. simulans* хромосомы образуют диффузный хромоцентр, что проявляется в наличии тонких тяжелей хроматина, которые объединяют центрмерные районы хромосом [9]. У вида *D. mauritiana* в ядрах трофоцитов хромоцентр отсутствует, хромосомы расположены отдельно друг от друга, однако плечи хромосом взаимодействуют друг с другом. А вот у вида *D. melanogaster* в ядрах трофоцитов обнаруживаются районы прикрепления хромосом к ядерной оболочке, сходные с таковыми у малярийных комаров [8]. Исследование закономерностей преобразования ядерной архитектуры у *Drosophila* в подгруппе «*melanogaster*» крайне интересно, так как в этой филогенетической группе мы можем наблюдать кардинальные преобразования архитектуры хромосом с хромоцентром, без хромоцентра и с прикреплением к ядерной оболочке.

Материалы и методы

ДНК-пробы половых хромосом видов *Drosophila* подгруппы «*melanogaster*»: *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. mauritiana*

получали с помощью метода микродиссекции материала политенных хромосом [10] с внесенными в нее модификациями. Для исследования расположения половой хромосомы в пространстве ядра на разных стадиях политенизации и морфологических изменений был использован метод 3D флуоресцентной *in situ* гибридизации (3D FISH), адаптированный для изучения организации хромосом в пространстве политенных ядер [6] и удачно зарекомендовавший себя в работах по изучению организации половой хромосомы в пространстве ядер трофоцитов *Calliphora erythrocephala* Mg. [6]. Анализ результатов и их документирование проводился с помощью флуоресцентного микроскопа AxioImager Z1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием системы контрастирования изображения ApoTome (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения AxioVision 4.8.1. (Carl Zeiss, Германия).

Результаты и обсуждение

С помощью метода 3D флуоресцентной *in situ* гибридизации нами была изучена организация XL хромосомы в пространстве ядер трофоцитов видов *Drosophila* подгруппа «*melanogaster*» с характерными различиями в архитектуре хромосом в ядре на разных стадиях политенизации и морфологических организаций ядра.

В результате проведенного исследования нами было показано, что в ядрах трофоцитов в подгруппе «*melanogaster*» видов *Drosophila* не обнаружено характерного для ядер трофоцитов *C. erythrocephala* перемещения половой хромосомы из центральной части ядра на периферию в ходе политенизации и изменения морфологии ядер трофоцитов. На всех стадиях политенизации у всех изученных видов подгруппы с хромоцентральной организацией (*D. simulans*), без хромоцентра (*D. mauritiana*) и с прикреплением хромосом к оболочке ядра (*D. melanogaster*) половая хромосома локализована на периферии ядра. Однако для всех изученных видов была отмечена небольшая динамика XL хромосомы в ходе политенизации. Так с увеличением степени политениции ядер, хромосома XL рассредотачивается на периферии ядра и занимает более обширную область.

Также было показано, что в ядрах трофоцитов *D. melanogaster*, для которых характерно наличие прикреплений хромосом к оболочке ядра, на поздних стадиях политенизации выявляются районы локализации

XL хромосомы на значительном расстоянии от основной массы материала XL хромосомы. На противоположном полюсе ядра от расположения основной массы хромосомы XL выявляются компактные районы локализации XL хромосомы. У других изученных видов, подобного явления не было обнаружено.

Таким образом, можно судить о том, что в отличие от трофоцитов *C. erythrocephala*, в ядрах которых происходят крупномасштабные изменения организации половой хромосомы в объеме ядра в ходе политенизации, в ядрах трофоцитов видов *Drosophila* подгруппы «*melanogaster*» подобной динамики не происходит. Описанные нами различия в локализации XL хромосомы в объеме ядер на ранних и поздних стадиях политенизации могут свидетельствовать лишь о незначительном изменении экспрессионного уровня XL хромосомы в ходе политенизации. Лишь у

D. melanogaster в ядрах трофоцитов описана динамика XL хромосомы в ходе политенизации, что свидетельствует о разном уровне активности половой хромосомы как в ходе политенизации ядер трофоцитов *D. melanogaster*, так и разном уровне активности половой хромосомы у разных видов в одной подгруппе.

Выводы

Проведенный анализ позволил судить о том, что имеются различия в функционировании ядер в ходе политенизации как между разными семействами (*Calliphoridae* и *Drosophilidae*), так и между представителями одной подгруппы видов (подгруппа «*melanogaster*» видов *Drosophila*: *D. simulans*, *D. mauritiana*, *D. melanogaster*).

Работа выполнена при финансовой поддержке стипендии Президента РФ СП-1037.2013.4 и частичной финансовой поддержке гранта РФФИ -14-04-32078-мол_а.

Литература

1. Hochedlinger K., Plath K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency // *Development*. – 2009. – 136. – P. 509–523.
2. Mohn F., Schubeler D. Genetics and epigenetics: stability and plasticity during cellular differentiation // *Trends Genet.* – 2009. – 25. – P. 129–136.
3. Куличков В.А., Жимулев И.Ф. Анализ пространственной организации генома *Drosophila melanogaster* на основе данных по эктопической конъюгации политенных хромосом // *Генетика*. – 1976. – 12, № 5. – С. 81–89
4. Стегний В.Н. Архитектоника генома, системные мутации и эволюция. – Н.: Изд-во Новосибирского ун-та. – 1993. – 110 с.
5. Dekker J. Gene regulation in the third dimension // *Science*. – 2008. – 319. – P. 1793–1794.
6. Коханенко А.А., Ананьина Т.В., Стегний В.Н. Внутрядерная динамика хромосомы 6 в трофоцитах *Calliphora erythrocephala* Mg. (Diptera: Calliphoridae) // *Генетика*. – 2010. – 46, № 9. – С. 1178–1180.
7. Kokhanenko A.A., Anan'ina T.V., Stegny V.N. The changes in chromosome 6 spatial organization during chromatin polytenization in the *Calliphora erythrocephala* Mg. (Diptera: Calliphoridae) nurse cells // *Protoplasma*. – 2013. – 250, N 1. – P. 141–149.
8. Стегний В.Н., Вассерлауф И.Э. Особенности взаимного расположения политенных хромосом в генеративной ткани у *Drosophila melanogaster* // *Генетика*. – 1991а. – 27, № 7. – С. 1163–1168.
9. Стегний В.Н., Вассерлауф И.Э. Межвидовые отличия коордации первично политенных хромосом трофоцитов у *Drosophila melanogaster*, *D. simulans* и *D. mauritiana* // *Генетика*. – 1991б. – 27, № 7. – С. 1196–1173.
10. Рубцов Н.Б., Алексеенко А.А., Беляева Е.С. и др. Микрочлонирующее и характеристика ДНК из районов прицентромерного гетерохроматина политенных хромосом *Drosophila melanogaster* // *Генетика*. – 1999. – 35, № 1. – С. 55–61.

KOKHANENKO A.A., ARTEMOV G.N., NEMIROVICH-DANCHENKO N.M., STEGNIY V.N.

Tomsk state university,

Russia, 634050, Tomsk, Lenin avenue, 36, e-mail: alinakokhanenko@gmail.com

ORGANIZATION OF SEX CHROMOSOME XL IN THE SPACE OF NUCLEI NURSE CELLS DURING POLYTENIZATION IN DROSOPHILA SPECIES SUBGROUP «MELANOGASTER» WITH CARDINAL DIFFERENCES IN THE ARCHITECTURE OF THE NUCLEI

Aims. Investigation of regularities conversion of nuclear architecture in *Drosophila* subgroup «*melanogaster*». **Methods.** 3D Fluorescence *in situ* hybridization (3D FISH). **Results.** As a result of this study, we have shown that in the nuclei of nurse cells in the subgroup «*melanogaster*» *Drosophila* species were don't found characteristic for nuclei nurse cells *C. erythrocephala* move sex chromosome from the

central part of the nucleus to the periphery during polytenization and changes in the morphology of the nuclei nurse cells. At all stages of polytenization in all species studied subgroups: with chromocenter (*D. simulans*), without chromocenter (*D. mauritiana*) and with the attachment of chromosomes to the nuclear envelope (*D. melanogaster*) sex chromosome is localized at the periphery of the nucleus. However, for all species studied was noted a small dynamic of XL chromosomes during polytenization. So with increasing degree of polytene nuclei chromosome XL become spread on the periphery of the nucleus and occupies a more extensive area. **Conclusions.** The analysis allowed to judge that there are differences in the functioning of the nuclei during polytenization as between different families (Calliphoridae and Drosophilidae), and between members of one species subgroup (subgroup «melanogaster» species of *Drosophila*: *D. simulans*, *D. mauritiana*, *D. melanogaster*).

Key words: spatial organization of chromosomes, *Drosophila*, sex chromosome, 3D FISH.

УДК 599.323.4:576.3151.316

КРИЩУК И.А.², ЧЕРЕПАНОВА Е.В.¹, ГАЙДУЧЕНКО Е.С.³, ЗАДЫРА С.В.⁴, ЛЕВЕНКОВА Е.С.¹, ДЕДУРА Ю.К.⁴, БОРИСОВ Ю.М.¹

¹ Федеральное государственное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова Российской Академии наук,

Россия, 119071, г. Москва, пр. Ленинский, 33, e-mail: boris@sevin.ru

² ГНПО «Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам»,

Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: ikryshchuk@yandex.by

³ Мозырский государственный педагогический университет имени И.П. Шамякина, Беларусь, 247760, г. Мозырь, ул. Студенческая, e-mail: a-posteriori@yandex.ru

⁴ Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,

Украина, 01601, г. Киев, ул. Владимирская, 60, e-mail: detjula@gmail.com

ФАКТОРЫ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПОПУЛЯЦИЙ *SOREX ARANEUS* (MAMMALIA) В МЕЖДУРЕЧЬЕ ДНЕПРА И ПРИПЯТИ (БЕЛАРУСЬ)

Среди хромосомно-полиморфных видов мелких млекопитающих обыкновенная бурозубка, *Sorex araneus* L., занимает особое место. На ареале вида, от Байкала до Британских островов, известно более 70 хромосомных рас, которые различаются по хромосомным мутациям, Робертсоновским (Rb) транслокациям хромосом, и занимают определенные территории [1, 2].

Исходным для вида считается кариотип, целиком состоящий из акроцентрических хромосом, который изменялся в ходе робертсоновских соединений, приводящих к формированию метацентрических кариотипов современных рас (Wojcik, Searle, 1998). Акроцентрический кариотип был выявлен только в эндемичных популяциях горных изолятов Балкан (хромосомная раса Pelister) и Альп (раса Cordon) [2].

На территории Беларуси в области междуречья Днепра и Припяти у рас Западная Двина, Киев и Віаіовіея выявлено клинальное снижение частоты диагностических метацентриков. На южной границе ареала расы Западная Двина и на восточной границе расы Віаіовіея

встречались кариотипы с 10 парами акроцентриков [3, 4], которых не было обнаружено в полиморфных популяциях на территории Западной Европы [5, 6]. Мы предположили, что на формирование полиморфных кариотипов оказали влияние автохтонные популяции с акроцентрическими диагностическими хромосомами, распространенные на этой территории в прошлом [3, 4].

Материалы и методы

Изучены кариотипы 133 особей обыкновенной бурозубки, отловленных в июле-августе 2013 г. в 15 пунктах междуречья Днепра и Припяти. Хромосомные препараты приготовлены по стандартной методике из клеток костного мозга и селезенки. Идентификация хромосом проведена по рисунку G-окраски (обработка препаратов трипсином и 2 x SSC) согласно общепринятой номенклатуре хромосом *S. araneus* [7].

Результаты и обсуждение

Все изученные популяции *S. araneus* в междуречье Днепра и Припяти оказались полиморфны по числу метацентриков ($2NA = 25-28$). В популяциях из двух южных пунктов

(д. Скрыгалов и окр. г. Ельска) на правом берегу реки Припять были выявлены диагностические метацентрики хромосомной расы Киев: *gm*, *hi* и *ko*. В пунктах севернее – д. Паричи, окр. г.г. Жлобин, Светлогорск и Речица – распространены два диагностических Rb соединения, *hi* и *ko*. В двух северных популяциях (окр. г. Жлобина), кроме кариотипов с метацентриками *hi* и *ko*, встречались и кариотипы с 10 парами диагностических акроцентриков.

В популяциях вдоль рек Птичь и Припять (д.д. Рожанов, Хвоенск, Борки и окр. г. Туров) распространены диагностические метацентрики *h/n* и *ik* расы *Białowięcia*. Двух других диагностических метацентриков расы *Białowięcia*, *gr* и *mp*, в этих популяциях не наблюдалось, а частота метацентриков *hn* и *ik* оказалась несколько ниже, чем в ранее изученной популяции этой расы на правобережье р. Птичь.

В трех выборках с востока и юго-востока изученной области (окр. г.г. Гомеля и Добруша, д. Красное) зарегистрированы метацентрики *hi*, *kr* и *mn*, диагностические для хромосомной расы Нерусса. Двух других метацентриков этой расы, *go* и *pq*, не было обнаружено.

Однонаправленные хромосомные клины метацентриков в популяциях хромосомных рас Нерусса, Киев, *Białowięcia*, а также высокая частота акроцентриков в популяциях между речья Днестра и Припяти свидетельствуют о прошедших процессах гибридизации метацентрических рас Нерусса, Киев, *Białowięcia* и существовавшей на этой территории в прошлом автохтонной акроцентрической расы [3]. В результате, на этой территории образовались популяции *S. araneus*, характеризующиеся определенным набором диагностических метацентриков и акроцентриков, отличающиеся от исходных рас отсутствием одного из диагностических метацентриков. Популяции, отличающиеся от соседних популяций наличием или отсутствием какой-либо Робертсоновской транслокации, рассматривают как отдельные хромосомные расы [1].

Действительно, только популяции *S. araneus* из двух пунктов на юге изученной территории, на правобережье реки Припять (окр. д. Скрыгалов и г. Ельска), могут быть отнесены к хромосомной расе Киев с диагностическими метацентриками (*g/m*, *hi*, *k/o*). Основная часть ареала этой расы находится на территории Украины [8]. Полиморфные популяции обыкновенной буроzubки, населяющие территорию

междуречья Днестра и Припяти (4 пунктов – всего 50 особей), в которых отсутствует диагностический для расы Киев метацентрик *gm*, мы предлагаем обозначать как новую расу – Светлогорск (*Sv*), кариотип которой: XX/XY1Y2, *af*, *bc*, *g*, *h/i*, *jl*, *k/o*, *m*, *n*, *p*, *q*, *r*, *tu*.

Подобная клинальная изменчивость (с запада на восток) прослеживается и в популяциях расы *Białowięcia* от территории Польши до бассейна реки Птичь в Беларуси [4, 9]. Отсутствие в популяциях *S. araneus*, распространенных вдоль р. Птичь, нет присущих расе *Białowięcia* метацентриков *gr* и *mp* позволяет нам выделить эти популяции (из 6 пунктов: Октябрьский, Рожанов, Затишье, Татарка, Хвоенск, Борки; всего 68 особей) в новую расу, Октябрьский с кариотипом: XX/X Y1Y2, *af*, *bc*, *jl*, *g*, *h/n*, *i/k*, *m*, *o*, *p*, *q*, *r*, *tu*.

Раса Нерусса мономорфна на протяжении почти всего своего ареала, и лишь в Брянской обл. (Россия, вблизи границы с Беларусью), обнаружен полиморфизм по соединениям *go*, *kr* и *pq* [10, 11]. Отсутствие диагностического метацентрика *go* в 3 популяциях Гомельской обл. (всего 25 особей), удаленных друг от друга на 50 км, позволяет определить эти популяции как новую хромосомную расу, Гомель. Кариотип расы Гомель (*Gomel'* - *Gm*): XX/XY1Y2, *af*, *bc*, *g*, *jl*, *h/i*, *k/r*, *m*, *n*, *o*, *p*, *q*, *tu*.

По-видимому, в междуречье Днестра и Припяти в прошлом обитала автохтонная акроцентрическая раса [3], которая оказала влияние на формирование полиморфизма рас Западной Двина, Нерусса, Киев и *Białowięcia*, проникших в этот регион в послеледниковые с других территорий. Судя по современному распространению диагностических метацентриков, проникновение хромосомных рас, различающихся 2–4 метацентриками монобразильной гомологии, на территорию Днестра и Припяти происходило с разных сторон: раса Западная Двина (*gm*, *hk*, *ip*, *no*, *qr*) с севера [3], раса *Białowięcia* (*g/r*, *hn*, *ik*, *m/p*) – с запада [4], раса Киев (*g/m*, *hi*, *k/o*) – с юга, а раса Нерусса (*go*, *hi*, *kr*, *mn*, *pq*) – с востока.

Изменчивость частот разных метацентриков, являющихся диагностическими для хромосомной расы, неодинакова: метацентрики *hi* и *ko* расы Киев формируют более широкие клины, по сравнению с метацентриком *gm*, клина частоты метацентрика *hk* расы Западная Двина – шире, чем клины частоты *gm*, *no* и *qr* [3], а клина метацентриков *hn* и *ik* расы *Białowięcia* – шире, чем клина метацентриков *gr* и *mp* [4]. Одной из вероятных причин неодина-

кового распространения и фиксации Робертсоновских транслокаций могут быть селективные преимущества генных комплексов, сцепленных с акроцентрическим или метацентрическим вариантом определенных хромосом [2, 9]. Следовательно, на формирование клинальной изменчивости частот метацентриков могут влиять и экологические факторы.

Выводы

Формирование клинальной изменчивости частот метацентрических хромосом *S. araneus* в междуречье Днепра и Припяти обусловлено взаимодействием существующей в прошлом на

данной территории автохтонной акроцентрической расы и метацентрических рас, расселяющихся в этот регион из рефугиумов в связи с изменением климата в послеледниковье. Распространение метацентриков по ареалу популяций с акроцентрическим кариотипом привело к исчезновению акроцентрической расы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 12-04-00551) и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития», подпрограмма «Динамика и сохранение генофондов».

Литература

1. Hausser J., Fedyk S., Fredga K., Searl J.B., Volobouev V., Wyjck J.M., Zima J. Definition and nomenclature of the chromosome races of *Sorex araneus* // *Folia Zool.* – 1994. – 43, Suppl. 1. – P. 1–9.
2. Wyjck J.M., Ratkiewicz M., Searle J.B. Evolution of the common shrew *Sorex araneus*: chromosomal and molecular aspects // *Acta Theriol.* – 2002. – 47, N 1. – P. 139–167.
3. Borisov Yu.M., Cherepanova E.V., Orlov V.N. A wide hybrid zone of chromosome races of the common shrew, *Sorex araneus* Linnaeus, 1758 (Mammalia), between the Dnieper and Berezina Rivers (Belarus) // *Compar. Cytogenet.* – 2010. – 3, N 2. – P. 195–201.
4. Borisov Yu.M., Kryshchuk I.A., Cherepanova E.V., Gajduchenko H.S., Orlov V.N. Chromosomal polymorphism of populations of the common shrew, *Sorex araneus* L., in Belarus // *Acta Theriol.* – 2014. – 59, N 2. – P. 243–249.
5. Вгъннер Н., Турн Н., Капичке Н.Д., Штруббе М., Вогел П. New *Sorex araneus* karyotypes from Germany and the postglacial recolonization of Central Europe // *Acta Theriol.* – 2002. – 47, N 3. – P. 277–293.
6. Zima J., Slivkovb L., Томбъковб L. New data on karyotypic variation in the common shrew, *Sorex araneus*, from the Czech Republic: an extension of the range of the Laska race // *Mammalia.* – 2003. – 68, N 2. – P. 209–215.
7. Searle J.B., Fedyk S., Fredga K., Hausser J., Volobouev V.T. Nomenclature for the chromosomes of the common shrew (*Sorex araneus*) // *Мѣм. Soc. Vaud. Sci. Nat.* – 1991. – 19. – P. 13–22.
8. Mishta A.V., Searle J.B., Wyjck J.M. Karyotypic variation of the common shrew *Sorex araneus* in Belarus, Estonia, Latvia, Lithuania and Ukraine // *Acta Theriol.* – 2000. – 45, N 1. – P. 47–58.
9. Wyjck J.M., Wyjck A.M., Zalewska H. Chromosome and allozyme variation of the common shrew, *Sorex araneus*, in different habitats // *Proc of the ISAACC's 5th Intern Meeting. Hereditas.* – 1996. – Offprint V. 125. – P. 183–189.
10. Bulatova N.Sh., Searle J.B., Bystrakova N., Nadjafova R., Shchipanov N., Orlov V. The diversity of chromosome races in *Sorex araneus* from European Russia // *Acta Theriol.* – 2000. – 45, N 1. – P. 33–46.
11. Bystrakova N., Bulatova N., Kovalskaya Y., et al. Geographical limits of chromosome races of common shrew *Sorex araneus* L. in the Middle Volga (east European Russia) // *Mammalia.* – 2003. – 67, N 2. – P. 187–193.

KRYSHCHUK I.A.², CHEREPANOVA E.V.¹, GAJDUCHENKO H.S.³, ZADYRA S.V.⁴, LEVENKOVA E.S.¹, DEMURA YU.K.⁴, BORISOV YU.M.¹

¹ *A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Russia, 119071, Moscow, Leninsky Pr., 33, e-mail: boris@sevin.ru*

² *Scientific-Practical Center of Belarus National Academy of Sciences on Bioresources, Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27, e-mail: ikryshchuk@yandex.by*

³ *I.P. Shamyakin Mozyr State University, Belarus, 247760, Mozyr, Studentcheskaya str., e-mail: a-posteriori@yandex.ru*

⁴ *Taras Shevtchenko Kiev National University, Ukraine, 01601, Vladimirskaya str., 60, e-mail: demjula@gmail.com*

DIFFERENTIATION OF SOREX ARANEUS POPULATIONS IN TERRITORY BETWEEN RIVERS DNEIPEER AND PRIPYAT (BELARUS)

Aims. To clarify the origin of unusual polymorphism in metacentric and acrocentric number revealed in *Sorex araneus* populations between the Dnieper and Pripyat rivers we carried out the study of the distribution of diagnostic metacentrics. **Methods.** Cytogenetic analysis. **Results.** Frequencies of diagnostic metacentrics of three races, Kiev, Biaiowieia and Neroosa, in studied populations revealed a clinal

variability. Karyotyped derivative of these race were observed in polymorphic populations, such populations were defined as new races. **Conclusions.** Climatic changes in postglacial period caused the migration of the metacentric races thus leading to the spread of metacentrics across the area of the acrocentric race.
Key words: *Sorex araneus*, chromosomal polymorphism.

УДК 576.315

КУЛИНЧЕНКО М.В.¹, КЛИМЕНКО Е.С.¹, ВЕБЕР-ЛОТФИ Ф.², ДИЕТРИШ А.²,
КОНСТАНТИНОВ Ю.М.¹

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН НАН,
Россия, 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, e-mail: yukon@sifibr.irk.ru

² Институт молекулярной биологии растений НЦНИ,
Франция, F-67084, ул. г. Страсбург, ул. Генерала Циммера, 12, e-mail: andre.dietrich@ibmp-cnrs.unistra.fr

ДНК КАК МОДУЛЯТОР ПРОТОННОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ НА ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЕ МИТОХОНДРИЙ *SOLANUM TUBEROSUM*, ДЕЙСТВУЮЩИЙ НА УРОВНЕ ПЕРЕНОСЧИКА АДЕНИННУКЛЕОТИДОВ

Ранее нами установлено, что растительные митохондрии обладают природной способностью к поглощению чужеродной ДНК [1–3]. При этом в механизм трансмембранного переноса ДНК у растений и дрожжей вовлечены, по всей вероятности, такие компоненты поры митохондриальной мегапроницаемости как порин в составе наружной мембраны митохондрий и переносчик АДФ и АТФ (адениннуклеотидтранслоказа) в составе внутренней мембраны этих органелл [3, 4]. Как показано ранее с использованием митохондрий печени крыс, АДФ и пальмитиновая кислота способны изменять ионную проводимость митохондриальных мембран [5, 6]. Обнаружено также, что АДФ в достаточно низких концентрациях (10 мМ) ингибирует импорт ДНК в растительные митохондрии [3]. В настоящее время остается, однако, неизученным вопрос, оказывает ли такая макромолекула как ДНК какое-либо влияние на ионную проницаемость мембран митохондрий растений. Нельзя исключить, что при определенных обстоятельствах в организме (бактериальные и вирусные инфекции и другие ситуации, при которых значительно повышается содержание ДНК в цитоплазме) не учитываемый ранее эффект ДНК как полианиона на мембранную проницаемость мембран митохондрий может иметь важные физиологические последствия как для функционирования органелл, так и судьбы клетки в целом. Целью настоящей работы было проведение с использованием системы *in organello* сравнительного исследования влияния ДНК, адениннуклеотидов (АДФ, АТФ),

пальмитиновой кислоты и пальмитоил-КоА, а также таких высокоспецифических ингибиторов адениннуклеотидтранслоказы как атрактилозид и карбоксиатрактилозид на проницаемость внутренней мембраны митохондрий картофеля для ионов водорода.

Материалы и методы

В экспериментах использовали изолированные митохондрии клубней картофеля (*Solanum tuberosum*), выделенные по методу [7]. В качестве ДНК использовали полинуклеотидную последовательность длиной 200 пн, получаемую с помощью ПЦР со специфическими праймерами к митохондриальной ДНК картофеля, используемой в качестве матрицы. Проницаемость митохондриальных мембран к ионам водорода оценивали путем регистрации набухания митохондрий в среде, содержащей 100 мМ NH₄NO₃, 20 мМ трис-НСl (рН 7,4). Регистрацию набухания митохондрий производили путем измерения поглощения на волне 540 нм с помощью спектрофотометра LKB Ultrospec II UV-Visible. Все эксперименты по изучению влияния ДНК и других агентов на набухание митохондрий проведены в 7–9-кратной повторности.

Результаты и обсуждение

Путем регистрации набухания органелл в среде, содержащей 100 мМ NH₄NO₃, 20 мМ трис-НСl (рН 7,4), обнаружено, что ДНК в концентрации 1 мМ (рис. 1), подобно таким высокоспецифическим лигандам как карбоксиатрактилозид и атрактилозид (данные не приводятся), стимулирует набухание митохондрий, по-видимому, путем связывания с

адениннуклеотидтранслоказы. При этом эффект ДНК на набухание митохондрий не проявляет чувствительности к циклоспорино А (данные не приводятся). АДФ в отличие от карбоксиатрактилозида и atraктилозида зависимым от используемой концентрации образом вызывал торможение набухания митохондрий (рис. 2). Установлено, что аденозиндифосфат (но не аденозинтрифосфат) эффективно устраняет стимулирующий эффект ДНК на набухание митохондрий (рис. 2), по-видимому, за счет более высокого сродства к сайтам связывания переносчика адениннуклеотидов. В то же время, как это видно из данных рис. 2, карбоксиатрактилозид и atraктилозид не устраняли, а напротив, усиливали эффект ДНК на скорость набухания митохондрий.

Обнаруженные отличия в действии ингибиторов адениннуклеотидтранслоказы и АДФ на набухание митохондрий можно объяснить, по-видимому, топологическими отличиями в их связывании с переносчиком адениннуклеотидов: известно, что карбоксиатрактилозид и atraктилозид связываются с переносчиком в его *c*-конформации, что приводит к увеличению протонной проводимости внутренней мембраны митохондрий [5]. В то же время АДФ связывается с переносчиком

в его *m*-конформации [5], что приводит к снижению протонной проводимости мембраны, как это можно видеть в наших экспериментах по снижению скорости набухания митохондрий в присутствии аденозиндифосфата. Сравнение обнаруженного нами эффекта ДНК на набухание митохондрий с таковым atraктилозида, карбоксиатрактилозида и АДФ позволяет с высокой долей вероятности заключить, что стимулирующий эффект ДНК на набухание реализуется, по-видимому, через связывание нуклеиновой кислоты с адениннуклеотидтранслоказой. При этом ДНК взаимодействует с сайтами связывания адениннуклеотидтранслоказы в случае ее *c*-конформации, т.е. подобно действию таких классических ингибиторов этого переносчика как atraктилозид и карбоксиатрактилозид.

Для выяснения возможного механизма действия ДНК на протонную проводимость внутренней митохондриальной мембраны мы изучили действие низких концентрации пальмитиновой кислоты на набухание митохондрий картофеля в тех же условиях. Как видно из представленных на рис. 3 данных, пальмитиновая кислота вызывает значительную индукцию набухания митохондрий, которая может быть устранена путем добавления увеличивающихся концентраций АДФ.

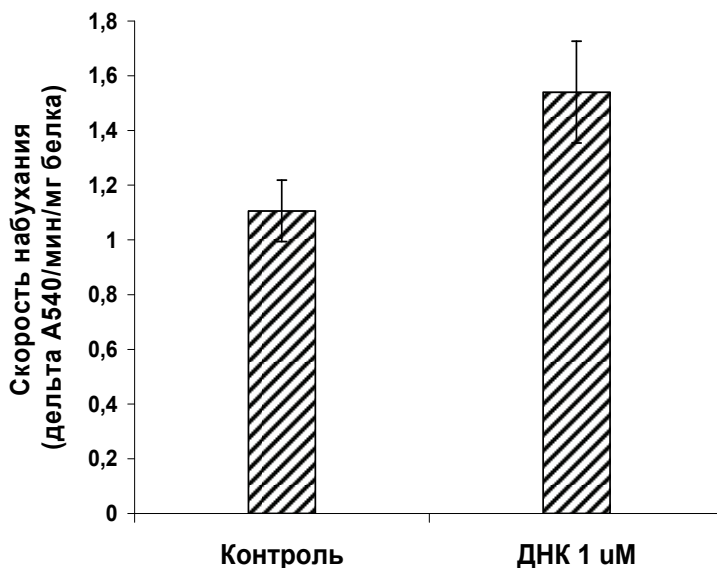


Рис. 1. Эффект ДНК на набухание митохондрий картофеля (*Solanum tuberosum*)

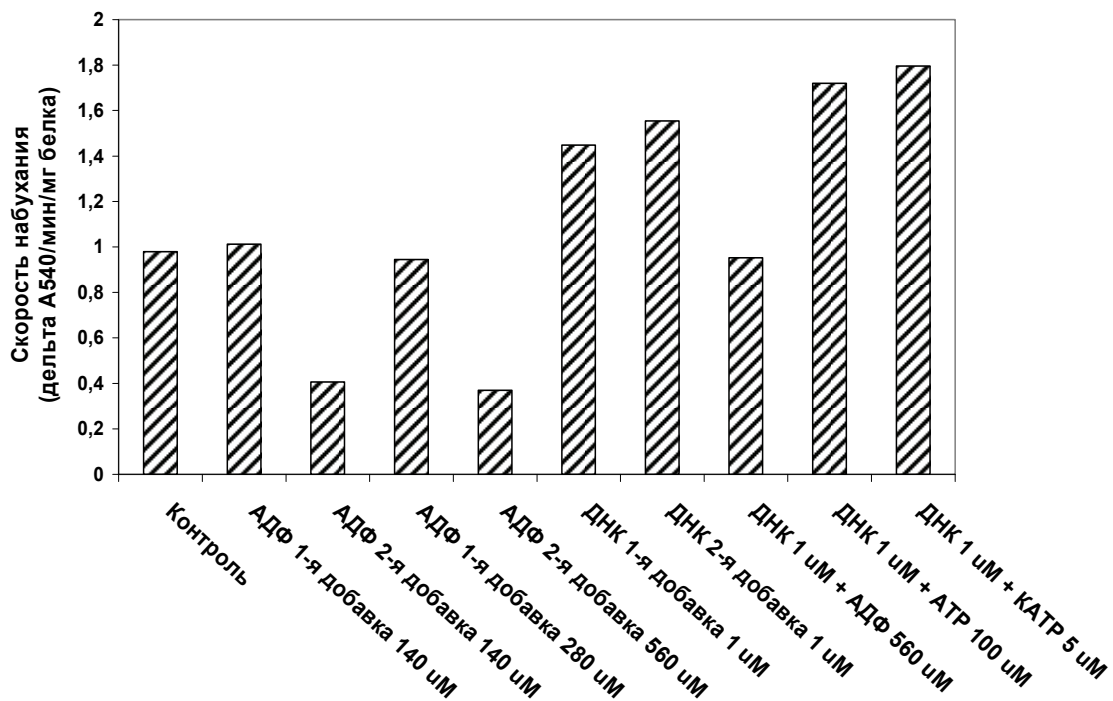


Рис. 2. Эффекты АДФ, аттрактилозида, карбоксиаттрактилозида и ДНК на набухание митохондрий картофеля (*Solanum tuberosum*). АТР – аттрактилозид, КАТР – карбоксиаттрактилозид

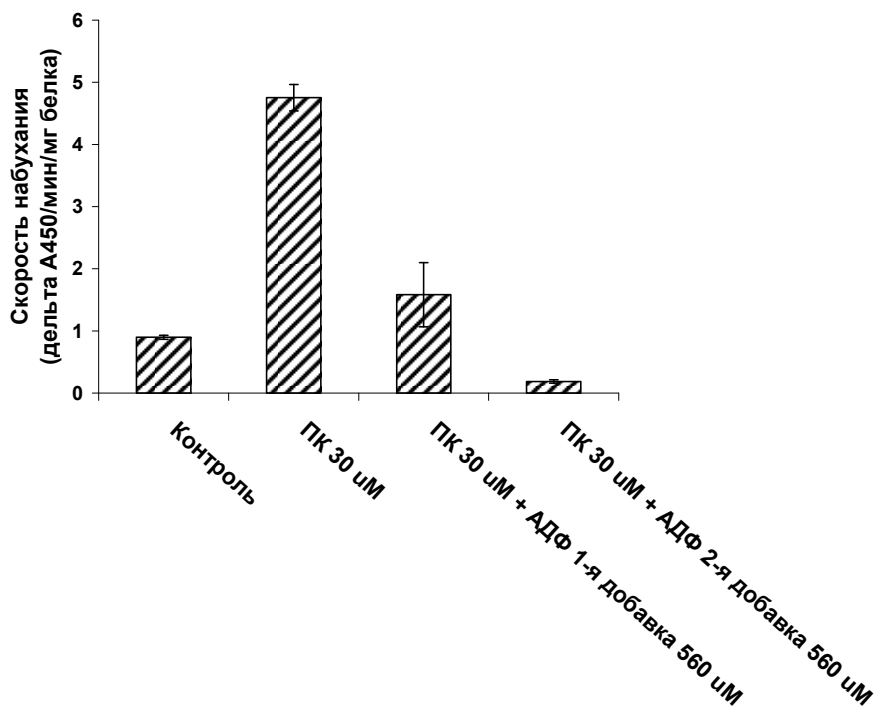


Рис. 3. Тормозящий эффект АДФ на индукцию набухания митохондрий под влиянием пальмитиновой кислоты. ПК – пальмитиновая кислота

Ранее с использованием митохондрий печени крыс [6] установлена способность пальмитиновой кислоты в тех же концентрациях

индуцировать открытие в митохондриях «неклассической» (нечувствительной к циклоспорино А) поры мегапроницаемости.

Установлено также, что низкие концентрации пальмитиновой кислоты (15 μM) способны повышать протонную проводимость внутренней мембраны митохондрий гороха путем взаимодействия с адениннуклеотидтранслоказой [8]. Мы предполагаем, что в наших экспериментах по набуханию митохондрий картофеля под влиянием использованных нами соединений также происходило открытие митохондриальной поры мегапроницаемости (permeability transition pore, mPTP). Из всех исследованных нами модуляторов набухательной способности митохондрий наибольшее влияние на проницаемость митохондрий к ионам водорода оказывала пальмитиновая кислота. ДНК в концентрации 1 мМ оказывала сходный, но менее выраженный эффект на набухание митохондрий. Отметим, что стимулирующий эффект на набухание как ДНК, так и пальмитиновой кислоты мог быть обращен добавлением АДФ. Данный факт дает основание предполагать, что ДНК оказывает свой эффект на набухание, по всей вероятности, путем связывания с адениннуклеотидтранслоказой, являющейся, как известно, одним из важных компонентов митохондриальной поры мегапроницаемости. В целом, полученные данные свидетельствуют в пользу важности исследований, направленных на выявление метаболических (несвязанных с информационной функцией этой макромолекулы) эффектов немитохондриальной ДНК на функции митохондрий в условиях *in vivo*.

Выводы

ДНК (длиной 200 п.н.) в концентрации 1 мМ, подобно таким высокоспецифическим лигандам как карбоксиаатрактилозид и атрактилозид, стимулирует набухание изолированных митохондрий клубней картофеля (*Solanum tuberosum*), по всей вероятности, путем связывания с переносчиком АДФ и АТФ внутренней митохондриальной мембраны, что и приводит к увеличению ее проницаемости к ионам водорода. АДФ в физиологических концентрациях (560 мМ) способен обращать эффект ДНК на протонную проводимость митохондрий. На основе результатов сравнительного изучения влияния ДНК, длинноцепочечных жирных кислот, ацил-КоА и АДФ на набухание митохондрий предложена гипотеза о способности немитохондриальной ДНК выступать в качестве одного из факторов метаболической модуляции проницаемости мембран митохондрий подобно длинноцепочечным жирным кислотам и при определенных физиологических состояниях клетки увеличивать проницаемость внутренней митохондриальной мембраны путем изменения свойств митохондриальной поры мегапроницаемости (permeability transition pore). Мы полагаем, что в определенных критических ситуациях в клетке такой эффект ДНК на митохондрии может быть одним из факторов, запускающих апоптоз.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (12-04-01400) и Междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН (проект № 59).

Литература

1. Константинов Ю.М., Подсосонный В.А., Луценко Г.Н. Синтез ДНК бактериальной векторной плазмиды pBR322 в изолированных митохондриях кукурузы // Докл. АН СССР. – 1988. – 298. – С. 502–504.
2. Константинов Ю.М., Подсосонный В.А., Луценко Г.Н., Ривкин М.И. Транслокация бактериальных векторных плазмид в митохондрии проростков кукурузы // Биохимия. – 1989. – 54. – С. 154–158.
3. Koulintchenko M., Konstantinov Y., Dietrich A. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex // EMBO J. – 2003. – 22. – P. 1245–1254.
4. Weber-Lotfi F., Ibrahim N., Boesch P., Cosste A., Konstantinov Y., Lightowers R., Dietrich A. Developing a genetic approach to investigate the mechanism of mitochondrial competence for DNA import // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – 1787. – P. 320–327.
5. Panov A., Filippova S., Lyakhovich V. Adenine nucleotide translocase as a site of regulation by ADP of the rat liver mitochondria permeability to H^+ and K^+ ions // Arch. Biochem. Biophys. – 1980. – 199. – P. 420–426.
6. Sultan A., Sokolove P.M. Palmitic acid opens a novel cyclosporine A-insensitive pore in the inner mitochondrial membrane // Arch. Biochem. Biophys. – 2001. – 386. – P. 37–51.
7. Neuburger M., Journet EP, Bligny R, Carde JP, Douce R. Purification of plant mitochondria by isopycnic centrifugation in density gradients of Percoll // Arch Biochem Biophys. – 1982. – 217. – P. 312–323.
8. Vianello A., Petrusa E., Macri F. ATP/ADP antiporter is involved in uncoupling of plant mitochondria induced by low concentrations of palmitate // FEBS Lett. – 1994. – 349. – P. 407–410.

KOULINTCHENKO M.V. ¹, KLIMENKO E.S. ¹, IBRAHIM N. ², WEBER-LOTFI F. ², DIETRICH A. ², KONSTANTINOY u.M. ¹

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Russian Federation, 664033, Irkutsk, Lermontov str., 132, e-mail: yukon@sifibr.irk.ru

² Institut de Biologie Moleculaire des Plantes CNRS, France, F-67084, Strasbourg, 12 rue du general Zimmer, e-mail: andre.dietrich@ibmp-cnrs.unistra.fr

DNA AS MODULATOR OF H⁺-IONS PERMEABILITY OF INNER MEMBRANE OF MITOCHONDRIA IN *SOLANUM TUBEROSUM* ACTING ON THE LEVEL OF ADENINE NUCLEOTIDE TRANSLOCATOR

Aims. To study the potential metabolic consequences of DNA import into mitochondria we investigated the effect of 200 bp length DNA on the permeability of inner membrane of tuber mitochondria in *Solanum tuberosum* in comparison with such an effect of adenine nucleotides (ADP, ATP), palmitic acid, palmitoyl-CoA and highly specific inhibitors of adenine nucleotide translocator as atractyloside and carboxyatractyloside. **Methods.** Freshly-isolated highly purified mitochondria from potato tuber (*Solanum tuberosum*) were used in all experiments. To evaluate the permeability of the inner mitochondrial membrane to H⁺-ions the swelling of mitochondria in the medium containing 100 mM NH₄NO₃, 20 mM tris-HCl (pH 7.4) was measured using LKB Ultrospec II UV-Visible spectrophotometer. **Results.** We showed that DNA in concentration 1 mM is able to induce swelling of potato tuber mitochondria like such highly specific ligands of adenine nucleotide translocator as carboxyatractyloside and atractyloside. Therefore the increase in permeability of inner mitochondrial membrane to H⁺-ions is presumably explained by binding of DNA to active sites of ADP/ATP carrier. The stimulation of mitochondrial swelling by addition of DNA was removed by the addition of ADP in physiological concentrations. As for carboxyatractyloside and atractyloside, both these ligands increase DNA effect on mitochondrial swelling. **Conclusions.** We conclude that DNA is able to bind to specific binding sites of adenine nucleotide translocator in plant mitochondria and through conformational changes of this key membrane carrier to induce the increase of inner mitochondrial membrane permeability to H⁺-ions. We hypothesize that in some critical states of plant cell (bacterial and viral infections leading to increase of DNA concentration in cytoplasm) the DNA effect on ion membrane permeability observed in this study may serve as one from a set of signals inducing apoptosis.

Key words: mitochondria, *Solanum tuberosum*, DNA, mitochondrial swelling, adenine nucleotide translocator, inner membrane permeability to H⁺-ions.

УДК 575.22+575.222

МИХАЙЛИК С.Ю., АНТОНІЮК М.З., ТЕРНОВСЬКА Т.К.

Національний університет «Києво-Могилянська Академія» МОН України, Україна, 04070, м. Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: sermuraha@gmail.com

МОЖЛИВІ МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ МІНЛИВОСТІ ГЛІАДИНОВИХ ГЕНІВ В ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЯХ ПШЕНИЦІ

Гени, що кодують гліадини пшениці, є однією з найзручніших моделей, яку можна використати для вивчення молекулярної природи тих процесів, які відзначаються сьогодні як генетична нестабільність геномів гібридного походження. Попереднє вивчення трьох наборів інтрогресивних ліній м'якої пшениці, які мають інтрогресії від трьох видів егілопсу [1], за електрофоретичними спектрами гліадинів виявило високий рівень мінливості між різними лініями та між рослинами однієї і тієї самої лінії. Гліадини кодуються двома серіями ортологічних генних кластерів, *Gli-1*

Gli-2, розташованих на коротких плечах хромосом 1-ої та 6-ої гомеологічних груп, відповідно. Вони складаються з мономерних протеїнів, які утворюють у електрофоретичному спектрі зони ω, γ, β та α. в напрямку збільшення електрофоретичної рухливості. Рекомбінація усередині генних кластерів відбувається вкрай рідко [2]. В гліадинових спектрах інтрогресивних ліній нові компоненти найчастіше зустрічалися у ω-зоні, рідше у γ- та β-зонах та зовсім рідко у α-зоні [3], що можна пояснити частково розмірами та роздільною здатністю електрофоретичних спектрів цих зон.

До складу генів, що кодують гліадини, входить повторювальний домен, консенсусна послідовність якого подібна в різних генів та містить велику кількість тринуклеотидів, що кодують глутамін, САА та САГ [4]. Наявність у складі гену таких повторів підвищує їхню поліморфність, яка може виникати за двома механізмами: через помилки при рекомбіногенезі, які спричинюються численими повторами, та через проковзування полімерази при реплікації ДНК [5]. Іншою причиною поліморфності гліадинів може слугувати велика кількість ретроелементів, що наявні у міжгенному просторі цих генів [6]. Наявність великої кількості ретроелементів у міжгенному просторі підвищує частоту проходження нерівного кросинговеру, що є причиною дуплікації генів гліадинів [7]. Метою нашого дослідження було встановити, чи супроводжується фенотипна мінливість, яку спостерігаємо на спектрах гліадинів, мінливістю у послідовності нуклеотидів гліадинових генів, чи потрібно шукати інші механізми виникнення поліморфізму в інтрогресивних лініях пшениці.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал: 19 ліній – похідних Авродесу, представлені 49 генераціями, вирощеними у різні роки. ДНК виділяли з паростків чотирьох різних зернівок за стандартною методикою з метою відстеження внутрішньогенераційних відмінностей. ПЛР здійснювали з 9 парами праймерів, специфічних до САА та САГ мікросателітів гліадинових генів, що кодують білки трьох зон гліадинового спектра, α , β , ω .

Секвенували п'ять ампліконів: два після ПЛР з праймерами P3-a1-L/R до генного мікросателіту α -гліадину AJ133604.1, три після ПЛР з праймерами N-o1-R/L, специфічними до генного мікросателіту ω -гліадину DQ861428.1 (GenBank). Аналіз результатів сиквенсу проводився з використанням програмного

забезпечення Sequence Alignment Programs. Секвеновані послідовності порівнювали з очікуваними, отриманими з бази даних сиквенсів GeneBank. Для порівняння послідовностей використовувалося програмне забезпечення Clustal 2.1 (Cluster alignment) [8]. Праймерами для REMAP-технології слугувала консервативна послідовність ретротранспозону *Sukkula* та мікросателіт (CT)_nG.

Результати та обговорення

Реакція амплікації з використанням праймерів wggm-P3-a1-L/R, що є специфічними до поліглутамінового повтору α -гліадину AJ133604.1, продемонструвала від 2 до 3 компонентів на електрофоретичному спектрі. Маса більшості компонентів була очікувана, 164 н. Однак у спектрі ампліконів зернівки 2 лінії ges 32-1 з'явився новий компонент з розміром 230 н.

Наявність нових компонентів було виявлено при аналізі мікросателітного повтору гену ω -гліадину DQ861428.1 з використанням праймерів wggm-N-o1-L/R. У спектрі ампліконів однієї зернівки в одній з генерацій лінії ges 7 був компонент, важчий від інших компонентів, отриманих з використанням вказаного праймера, 220 н. В зернівках цієї ж лінії двох інших генерацій з'явився компонент масою 230 н. (рис. 1). Компонент масою 220 н. виявився у спектрі тієї самої зернівки лінії ges32-1, в якій був нетиповий спектр з праймерами до повтору α -гліадину AJ133604.1. Одна з зернівок лінії ges 12 мала додатковий компонент з розміром близько 300 нуклеотидів.

Використання пари праймерів P3-b1-L/R, специфічних до поліглутамінового регіону гену β -гліадину AF419254.1 також виявило поліморфізм компонентів ПЛР спектру. Спектри усіх зернівок можна поділити на два типи: ті, що у своєму спектрі мали два компоненти та ті, що мали один. Така відмінність у спектрі очевидно вказує на перебудови, що відбулися у поліглутамінових регіонах β -гліадину AF419254.1.

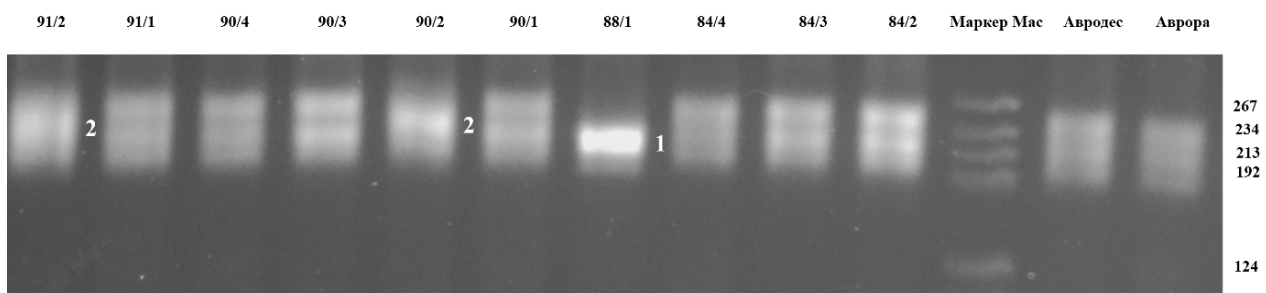


Рис. 1. Електрофоретичний спектр продуктів амплікації з парою праймерів wggm-N-o1-L/R. 1 та 2 – компоненти, що відрізнялися за масою від очікуваного продукту

Деякі з ампліконів, що не відповідають очікуваній масі, було піддано секвенсу. Перша послідовність – це продукт, отриманий з праймерами wggm-P3-a1-L/R. Його довжина складала 230 нуклеотидів, однак в процесі секвенування вдалося встановити лише 155 перших нуклеотидів. Послідовність отриманого продукту в тій частині, що була секвенована, порівнювали з послідовністю очікуваного для даної пари праймерів фрагменту гена. Ідентичність послідовностей, що порівнювалися, складала 57,3 %. Секвенована послідовність мала 5 делецій розміром від 2-х нуклеотидів до 6-ти та дві вставки: перша з 7-го по 12-й нуклеотиди, друга з 20-го по 32-й нуклеотид.

Другим об'єктом для секвенування було обрано компонент, що мав очікувану масу на електрофореграмі та був отриманий з ДНК тієї самої зернівки, що і продукт неочікуваної маси. Ідентичність послідовностей складала 56,4 %. Отримана в результаті секвенування послідовність мала три делеції та одну інсерцію з шести нуклеотидів, що знаходилася в кінці послідовності. Найбільша делеція мала довжину 31 нуклеотид і розташовувалася на початку послідовності. Загалом секвенована послідовність демонструвала коротший мікросателітний повтор від такого, що очікувався, оскільки мала однонуклеотидну інсерцію цитозину після 31 нуклеотиду, що розбиває сателітну послідовність на дві частини.

Було секвеновано три амплікони, отримані з праймерами до мікросателітної ділянки щ-гліадину номер DQ861428.1. Перша послідовність з лінії *res7*, яка відрізнялась від продуктів інших зернівок за масою. Очікувана послідовність становила 206 нуклеотидів, секвенована послідовність мала масу 179 нуклеотидів. Ідентичність послідовностей складала 69,9 %. Секвенована послідовність мала одну тринуклеотидну інсерцію, одну делецію 29 нуклеотидів довжиною на початку послідовності, та однонуклеотидну делецію у 45-му положенні. Сайти нагромадження кодонів глутаміну CAA та CAG майже не зазнали змін. Друга послідовність – це важкий нетиповий компонент лінії *res7*. Очікувана послідовність становила 206 нуклеотидів, секвенована послідовність мала масу 165 нуклеотидів. Ідентичність послідовностей складала 67,0%. Секвенована послідовність мала одну тринуклеотидну інсерцію, 7 делецій довжиною від 20-ти нуклеотидів до 1-го. Переважна

більшість делецій розташовані на початку та в кінці секвенованої послідовності. Сайти нагромадження глутамінових кодонів залишаються, переважно, без змін. Третій компонент було отримано з електрофореграми продуктів ампліфікації ДНК зернівки лінії *res70*, що відрізнявся від інших за масою. Очікувана послідовність становила 206 нуклеотидів, водночас секвенована послідовність мала розмір 179 нуклеотидів. Ідентичність послідовностей складала 71,8%. Секвенована послідовність мала одну тринуклеотидну інсерцію в кінці послідовності, як і у попередніх зразках, дві делеції, довжиною 11 та 19 нуклеотидів. В районі 60-го нуклеотиду секвенованої послідовності встановлено наявність сайленс мутації: кодон, що кодує глутамін CAA став глутаміновим кодоном CAG. Сайти нагромадження кодонів глутаміну CAA та CAG майже не зазнали змін.

Розгляд даних до секвенсу показує, що для всіх секвенованих послідовностей мала місце одна і та сама особливість профілю пиків секвенатора: для всіх зразків у ділянках гена, які розташовані між сайтами гібридизації праймерів та мікросателітною послідовністю, пики ставали слабо вираженими. Так буває у випадках, коли ДНК не характеризується мономорфністю, тобто гомологічні ділянки різних молекул мають певну кількість однонуклеотидних замін, SNP. Це примушує нас припустити, що ампліфікації піддається ДНК не лише того конкретного гена, до якого були підібрані праймери, а й ще інших генів з того самого кластера, адже гліадинові гени в межах кластера характеризуються близькою молекулярною структурою та можуть мати однакові послідовності для зв'язування з праймером.

Порівнювали два продукти ампліфікації, отримані з парою праймерів P3-a1-L/R на ДНК зернівки лінії *res32-2*, яка з двома іншими праймерами показала наявність неочікуваних ампліконів. Одна секвенована послідовність мала розмір 134 н. (*Seq-α-1*), інша – 155 (*Seq-α-2*). Послідовності демонстрували ідентичність між собою у 63,3 %, що виявилось більшою ніж при порівнянні отриманих секвенованих послідовностей з очікуваною послідовністю. Послідовність, яка була отримана з компоненту, що демонстрував меншу молекулярну масу, має довшу мікросателітну ділянку у порівнянні з іншою послідовністю, проте має велику кількість делецій від одного нуклеотиду до восьми у порівнянні з нею. Також

ідентифіковано велику кількість однонуклеотидних мутацій, як транзицій, так і трансверсій.

На ДНК зернівок ліній *res7* та *res32-2*, які мали нетипові компоненти спектрів, були отримані ПЛР-продукти з використанням праймерів N-01-L/R. Їх секвенували та порівняли одну з одною під назвами Seq- ω -1, Seq- ω -2, Seq- ω -3. Seq- ω -1 та Seq- ω -3 були 179-нуклеотидними, Seq- ω -2 – 165 нуклеотидною. Послідовності Seq- ω -1 та Seq- ω -2 демонстрували ідентичність у 73,7%, Seq- ω -1 та Seq- ω -3 мали вкрай високу ідентичність у 93,3%, Seq- ω -2 та Seq- ω -3 були ідентичними на 74,9%. Мікросателітний локус САА послідовності Seq- ω -2 складається з 18 повторів, в той час локус САА у послідовностях Seq- ω -1 та Seq- ω -3 – з 10 повторів. Така відмінність у кількості повторів, можливо, спричинена проковзуванням полімерази. Встановлено велику кількість однонуклеотидних мутацій, як транзицій так і трансверсій. Ідентичність секвенованих послідовностей виявилася вищою за таку в порівнянні секвенованих послідовностей з очікуваною.

Відмінності у розмірах та складі послідовностей надають можливість зрозуміти природу поліморфізму серед ампліконів мікросателітних повторів генів гліадинів, який може бути чинником поліморфізму гліадинових білків.

Відомо, що геноми рослин, які зазнали інтрогресій, демонструють зміну рівня метилювання та мобілізацію ретротранспозонів [9, 10]. Перемищення ретротранспозонів по геному можуть мати значні наслідки для геному рослин. Міжгенні ділянки гліадинів вкрай багаті на ретроелементи [6]. Метод REMAP надає можливість для ідентифікації руху ретроелементів по відношенню до мікросателітних повторів у геномі. Як донор консервативної ділянки ретротранспозону була використана послідовність найактивнішого ретротранспозона родини *Sukkula* [11], мікросателітний праймер – (CT)₉G.

На геномній ДНК Аврори було отримано 14 компонентів спектру (рис. 2).

Кожен з них є результатом ампліфікації ділянки ДНК, що знаходиться між ретротранспозоном *Sukkula* та мікросателітом (CT)₉G. Таким чином, зміна ПЛР спектру отриманого з використанням методики REMAP є свідченням або переміщення ретротранспозона, або змін у розташуванні чи структурі відповідного мікросателітного повтору. У REMAP-спектрі ДНК декотрих

зернівок були у наявності не всі компоненти, властиві аналогічному спектру ДНК Аврори (рис. 2). Загалом було проаналізовано 19 ліній – похідних Авродесу, які були представлені у 49 генераціях, і в 45 з них методом REMAP було зареєстровано внутрішньогенераційну мінливість за компонентами спектру.

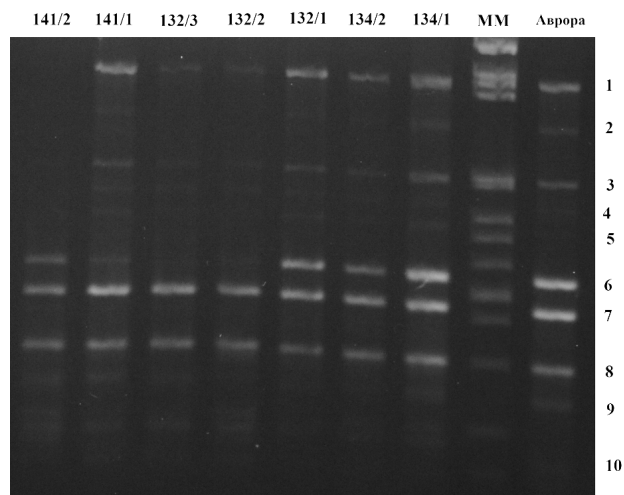


Рис. 2. REMAP-спектри ампліконів ДНК Аврори та деяких ліній

Така мінливість є свідченням переміщень ретротранспозонів у геномі інтрогресивних ліній або зміни положення чи структури мікросателіту (CT)₉G. Повністю повторювали спектр генотипу Аврора лише чотири генерації ліній *res*: 83, 102, 103 та 119. У решти генерацій зустрічалися окремі зернівки, що повторювали REMAP-спектр Аврори, це стосується ліній *res*: 7, 12, 13, 15, 16, 22, 70, 79. Усі інші генерації демонстрували відмінності у REMAP спектрі які проявлялися у наявності нових компонентів чи у відсутності компонентів, що є притаманними REMAP-спектрові Аврори.

Висновки

З використанням праймерів до мікросателітних повторів генів гліадинів було встановлено поліморфізм у ПЛР-спектрі гену α -гліадину AJ133604.1, β -гліадину AF419254.1 та ω -гліадину DQ861428.1. Виявлений поліморфізм свідчить про наявність перебудов у поліглутамінових трактах генів гліадинів або прилеглих до них ділянок. Секвенс ампліконів, отриманих з використанням праймерів P3-a1-L/R та N-01-L/R підтверджує наявність значних відмінностей у секвенованих послідовностях стосовно до очікуваних послідовностей, отриманих з баз даних секвенсів. Секвеновані послідовності відрізняються від очікуваних

певною кількістю делецій, деяких інсерцій, а також однонуклеотидних мутацій, як транзицій так і трансверсій. Встановлено подовження САА повторів у секвенованій послідовності, що отримана з продукту ампліфікації ДНК зернівки лінії *res7* з використанням праймерів N-01-L/R. Секвеновані послідовності демонстрували на 10–20% більшу ідентичність одна до одної, ніж до очікуваної послідовності. Вочевидь, це

свідчить про певні відмінності у послідовностях генів гліадинів пшениці м'якої та генів інтрогресивних ліній. Переважна більшість ліній, що досліджувалися, мала відмінності у спектрі REMAP у порівнянні з аналогічним спектром ДНК Аврори. Це вказує на значну рухливість ретроелементів у геномі інтрогресивних ліній пшениці, який знаходиться у стані стресу через своє гібридне походження.

Література

1. Антонюк М.З., Терновська Т.К. Створення чужинно-заміщених ліній м'якої пшениці методом «змішування» хромосом у межах одного субгеному // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. – Київ: Логос, 2001. – 2. – С. 368–375.
2. Shewry P.R., Holford N.G., Lafandra D. Genetics of wheat gluten proteins // *Advanced in Genetics*. – 2003. – 49. – P. 111–171.
3. Михайлик С.Ю., Антонюк М.З., Терновська Т.К. Генетична варіабільність інтрогресивних ліній м'якої пшениці за генами *Gli* // Наукові записки НаУКМА. – 2011. – Біологія та екологія. – 119. – С. 8–14.
4. Anderson O.D., Huo N., Gu Y.Q. The gene space in wheat: the complete α -gliadin gene family from the wheat cultivar Chinese Spring // *Funct Integr Genomics*. – 2013. – 13. – P. 261–273.
5. Eckert K.A., Hile S.E. Every microsatellite is different: Intrinsic DNA features dictate mutagenesis of common microsatellites present in the human genome // *Mol Carcinog*. – 2009. – 48. – P. 379–388.
6. Gu Y.Q., Crossman C., Kong X., Luo M., You F.M., Coleman-Derr D., Dubcovsky J., Anderson O.D. Genomic organization of the complex alpha-gliadin gene loci in wheat // *Theor Appl Genet*. – 2004. – 109. – P. 648–657.
7. Xie Z., Wang C., Wang K., Wang S., Li X., Zhang Z., Ma W., Yan Y. Molecular characterization of the celiac disease epitope domains in 6-gliadin genes in *Aegilops tauschii* and hexaploid wheats (*Triticum aestivum* L.) // *Theor Appl Genet*. – 2010. – 121. – P. 1239–1251.
8. Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega // *Mol Syst Biol*. – 2011. – 7. – P. 539–544.
9. Zhang X., Ge X., Shao Y., Sun G., Li Z. Genomic change, retrotransposon mobilization and extensive cytosine methylation alteration in *Brassica napus* introgressions from two intertribal hybridizations [Електронний ресурс] // *PLoS One*. – 2013. – Режим доступу: doi: 10.1371/journal.pone.0056346.
10. Feldman M., Levy A. Genome evolution due to allopolyploidization in wheat // *Genetics*. – 2012. – 192. – P. 763–774.
11. Leigh F., Kalendar R., Lea V., Lee D., Donini P., Schulman A.H. Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques // *Mol Genet Genomics*. – 2003. – 269. – P. 464–474.

MYKHAILYK S. YU., ANTONYUK M.Z., TERNOVSKA T.K.

National University of "Kyiv-Mohyla Academy",

Ukraine, 04070, Kyiv, Skovorody str., 2, e-mail: sermuraha@gmail.com

POSSIBLE MOLECULAR MECHANISMS OF VARIABILITY IN GLIADIN GENES IN THE WHEAT INTROGRESSIVE LINES

Aims. To determine whether phenotypic variability in gliadin spectra of introgression lines was caused by changes in DNA sequences of *Gli* genes. **Methods.** PCR using primers specific to *Gli* genes and retrotransposon. Sequence of PCR products and results alignment comparison. **Results.** Polymorphism in nucleotide sequences of three *Gli* genes encoding proteins in α -, β - and ω -zone of spectrum was identified. The alterations include deletions, insertions and single nucleotide transitions and transversions. The mobility of *Sukkula* retrotransposon relatively to microsatellite (CT)_nG was shown. **Conclusions.** The gliadin electrophoretic spectra variability is based on changes in the nucleotide sequences of *Gli* genes such as deletions, insertions and single nucleotide substitutions.

Key words: gliadin, wheat introgression line, gene microsatellite, retrotransposon.

ГЕНЕТИЧНА МІНЛИВІСТЬ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ЗА ГЕНОМ БЕТА-АМІЛАЗИ

Проблема генетичної стабільності рослинного матеріалу гібридного походження набула останнім часом гострої актуальності [1]. Інтрогресивні лінії пшениці беруть початок від віддалених гібридів, і природним є питання, чи супроводжується їхня цитологічна стабільність стабільністю генетичною. Бета-амілазу було обрано через легкість ідентифікації компонентів електрофоретичного спектру та добру вивченість їхнього генетичного контролю у генотипу озимої м'якої пшениці Аврора, на генетичному тлі якого було створено низку інтрогресивних ліній [2]. Їхній геном включе різні обсяги чужинного хроматину від *Aegilops speltoides* (SS), *Ae. umbellulata* (UU), *Ae. sharonensis* ($S^{sh}S^{sh}$). Електрофоретичний спектр ізоферментів бета-амілази генотипу Аврора складається з чотирьох компонентів (рис. 1). Компоненти 1 та 2 контролюються геном β -Amy-D1 (хромосома 4D), компонент 4 – геном β -Amy-B1 (4A) та компонент 6 – геном β -Amy-A1 (5A). Спектр Аврозиса крім компонентів 4 та 6 має специфічний, найбільш рухливий у спектрах пшеничних зразків, що досліджуються, компонент. Спектр Авролати має тільки компоненти 4 та 6, а спектр Авродеса від спектра Аврори майже не відрізняється з рухливістю нижнього подвійного компоненту.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал: 1) інтрогресивні лінії, походження яких пов'язано зі схрещуванням генотипу Аврора з одним з геномно-заміщених амфідиплоїдів, Авродесом (AABBSS), 13 ліній, Аврозисом (AABBS $^{sh}S^{sh}$), 16 ліній, Авролатою (AABBUU), 9 ліній, де AABB – тетраплоїдний компонент геному Аврори; 2) сорт озимої м'якої пшениці *Triticum aestivum* ($2n = 6x = 42$, AABBDD) Аврора та згадані амфідиплоїди; 3) диплоїдний вид *Aegilops sharonensis* ($2n = 14$, $S^{sh}S^{sh}$).

Електрофоретичний спектр β -амілази отримували за методикою Девіс. Спектр вивчали на шести зернівках, взятих від чотирьох рослин з кожної лінії. Праймери для ПЛР до гена β -амілази розробляли, аналізуючи Transcriptome Shotgun Assembly сиквенсу мРНК гену бета-амілази *Triticum aestivum* (номер

послідовності у GeneBank JP213065.1) із бази даних NCBI [3]. Для генерації праймерів використовували сервіс PrimerBLAST. Реакцію ПЛР проводили за методом tdПЛР (touch down).

Результати та обговорення

Порівняння спектрів всіх вивчених генотипів показало, що між ними в жодному випадку не було мінливості за компонентом 4, який властивий генотипу Аврора та контролюється геном β -Amy-B1 (4A). Тому з подальшого розгляду він був виключений. Серед інтрогресивних ліній були такі, що мають алелі β -Amy, які не властиві ні Аврорі, ні геномно-заміщеному амфідиплоїду, отже є новими. За геном β -Amy-D1 таких ліній було 2, 1 та 4 серед похідних Авродесу, Аврозису та Авролати, відповідно, для гена β -Amy-A1 – 5, 4 та 2. Деякі лінії виявилися поліморфними за алелями одного гена, тобто, суворо кажучи, чистими лініями не є. Беручи до уваги походження ліній, слід було очікувати, що будь-яка з них за геном β -Amy-D1 буде виявляти наявність або алелю «12», властивого генотипу Аврори, або чужинного алелю для ліній – похідних Аврозису та Авродесу. Для ліній – похідних Авролати компоненти «12» можуть бути відсутні (нуль-алель). За геном β -Amy-A1 в лініях очікували наявність лише одного алелю «6», властивого генотипу Аврори, адже за хромосомами геномів А та В схема створення ліній заміщень та перебудов не передбачала. Отримані результати від очікуваних відрізнялись. Спектри ліній res16, res60, res106 та res254 не мали компонентів 1 та 2, їхній алельний стан за геном β -Amy-D1 було записано як "0", що є легітимним лише для res254, похідної Авролати.

Лінії res214, res221 та res243 мали компонент 3 (рис. 1), рухливість якого дещо менша за компоненти 1 та 2. Цей алель не притаманний жодному з ініціальних компонентів схрещування при створенні інтрогресивних ліній, отже є новим у цьому матеріалі. Те саме стосується компонентів 5 та 7 спектру бета-амілази (рис. 1), які не були властивими ні Аврорі ні амфідиплоїдам, від яких було отримано інтрогресивні лінії. Їхне

походження не може бути пов'язано з перезапиленням досліджуваних ліній з сторонніми генотипами. Про це свідчить наявність двох хромосом із супутниками, що характерно для сорту Аврори, замість чотирьох, властивих всім генотипам м'якої пшениці, які не мають транслокації 1RS/1BL. Отже, походження нових алелів пов'язане з якимось внутрішньогеномними процесами, такими як нелегітимна пшенично-пшенична рекомбінація, дія транспозонів та інші процеси, які супроводжують становлення геному гібридного походження [1, 4, 5]. Деякі лінії виявляють внутрішньолінійну мінливість. Це показує, що лінія тепер не є однорідною та складається з субліній, які відрізняються за алелями одного з генів β -Аму. За спектром бета-амілази лінію характеризували за результатом вивчення чотирьох рослин. Ті лінії, які за даними вивчення виглядають стабільними, цілком можливо такими не є, просто насіння було взято від рослин, які не відрізнялися за генами β -Аму-А1 та β -Аму-Д1.

Алельність нових генів визначали генетичним аналізом з використанням 19-ти популяцій F₂ від схрещування інтрогресивних ліній одна з однією. Генотипи рослин F₂ встановлювали за спектрами насінин F₃. Було з'ясовано, що компоненти 1 і 2, 3 та 0 контролюються алельними генами, тобто алелями гена β -Аму-Д1, а компоненти 5 та 7 – алелями гену β -Аму-А1.

Лінії різного походження порівнювали за частотою появи в них нового алелю за кожним з двох генів бета-амілази. Через маленькі вибірки у всіх випадках для статистичного порівняння використовували точний критерій Фішера. Всі три групи ліній, що походять від різних геномно-заміщених форм, не відрізнялися одна від однієї за частотою виникнення зміни за геном β -Аму-А1. Щодо гена β -Аму-Д1, не відрізнялися одна від однієї групи ліній-похідних Авродеса та Аврозиса. Після їхнього об'єднання від них із статистичною достовір-

ністю при $p < 0,05$ відрізнялась більшою частотою зміни алелю «1 і 2» на алель «3» група ліній-похідних Авролати ($P = 0,041$). На наш погляд, такі результати є наслідком невеликої кількості досліджених груп і можуть стати іншими при тотальному дослідженні всіх ліній з нашої колекції.

При вивченні популяцій F₂ було зафіксовано феномен, який поки зрозуміти не вдається. У 7 комбінаціях схрещування з 19, судячи зі спектрів насінин F₃, деякі рослини F₂ мали не два, а три алелі гену β -Аму-Д1. У всіх таких комбінаціях у якості одного з компонентів схрещування брала участь лінія – похідна Аврозису з гаметоцидною хромосомою 4S^{sh}, що є гомеологічною хромосомі 4D, на якій знаходиться β -Аму-Д1. Крім того, розщеплення за алелями β -Аму-Д1 було значно зсунуто на користь гетерозигот у порівнянні з кожною гомозиготою. Аналогічну картину спостерігали на результатах розщеплення за геном β -Аму-А1: наявність рослин F₂, які, судячи з їхніх нащадків F₃, повинні були мати не два алелі гена β -Аму-А1. Звичайно, для обох генів третій алель був новим, не властивим жодному з генотипів, які були засновниками ліній. Оскільки для гену β -Аму-А1 можна було відрізнити всі гомозиготи від гетерозигот, було перевірено та відкинуто припущення про стійку гетерозиготність ліній з гаметоцидною хромосомою, як наслідок хромосомних аберацій, викликаних дією гена Gc: гетерозигот серед рослин ліній знайдено не було. Серед гібридів не було жодного спектру з компонентами, які відповідають трьом алелям, 5, 6 та 7. Це примушує зробити припущення, що зміна алелю бета-амілази, яка призводить до появи на спектрі нового компоненту, відбувається при формуванні гамет гібридом, гемізіготним за хромосомою 4S^{sh}, а в генотипі рослини F₂ такого алелю не було. Можна припустити, що і для гена β -Аму-Д1 поява нових алелів відбувається протягом гаметогенезу і їх не було у рослині F₂.

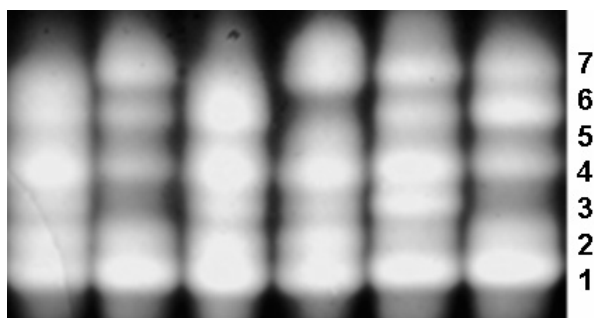


Рис. 1. Електрофоретичний спектр β -амілази інтрогресивних ліній пшениці

Виникає питання, чи пов'язана поява нових компонентів спектру зі змінами у нуклеотидній послідовності гена β -амілази, чи ми маємо справу зі змінами, які у сучасній генетиці називають епігенетичними, або з результатами посттрансляційної модифікації білка. Для отримання та порівняння спектрів ампліконів після ПЛР сформували дві групи ліній-похідних Аврозиса: з гаметоцидною хромосою або її частиною – з геном *Gc* (res115, res117, res118, res127, res128) та без неї (res121, res122-1, res122-2, res130, res132, res139, res141, res148). Підбір праймерів відбувався таким чином, щоб послідовності, що будуть ампліфікуватися, перекривались між собою і повністю вкривали всю послідовність гену (рис. 2). Тим не менш, до прикінцевих ділянок гену на 5'-кінці (1785–1931 н.) підібрати праймери не вдалось через те, що жодна із створених для цієї послідовності пар, не відповідала обраним нами вимогам до праймерів. Ампліфікація фрагментів гену β -амілази Аврори дає два компоненти для праймерів NAmu3, NAmu4, NAmu5, NAmu7, для решти – один компонент. ДНК егілопса Шарона ампліфікується подвійним компонентом лише парою праймерів NAmu4. Для праймерів NAmu5 та NAmu7 утворюється один амплікон, важкий, з праймером NAmu3 – також один, але легкий. З праймером NAmu12 ампліфікація не відбувається, отже між послідовностями пшениці та егілопсу, які відповідають цій парі праймерів, є розбіжності. Для ДНК Аврозиса ця розбіжність вже не має значення, оскільки для ампліфікації ДНК цей геном має не один ген β -амілази, як егілопс, а три: два на хромосомах 4A та 5A, а один у геномі S^{sh} . Спектр ампліконів ДНК Аврозиса відрізняється від спектра Аврори лише

за праймером NAmu5, один компонент, важкий, замість двох. Коли на спектрах ДНК Аврори та Аврозису у наявності два продукти ампліфікації, а таку картину дають чотири пари праймерів з дев'яти використаних, обидва компоненти мають однакову інтенсивність флюоресценції. На нашу думку, два амплікона формується через те, що гексаплоїдний геном має три ортологічних гени β -амілази, між нуклеотидними послідовностями яких можуть бути розбіжності, в тому числі делеції або інсерції. В такому випадку, кількість нуклеотидів, яка знаходиться між лівим та правим праймером, буде в різних генах різна і при збереженні ідентичності послідовностей, з якими гібридується праймер, будуть утворюватися продукти різної маси, отже кількість ампліконів збільшується. Утворення двох ампліконів ДНК диплоїдного егілопсу може свідчити про існування у геномі псевдогена $\psi\beta$ -Amy. Можливість наявності псевдогенів як чинника виникнення другого амплікона для низки праймерів не може бути відкинута і для гексаплоїдних генотипів.

Для характеристики інтрогресивних ліній досліджували ДНК від 2–6 рослин окремо. Проте це були не саме ті рослини, для яких визначали електрофоретичний спектр β -амілази, тому зіставити зміни у спектрах ампліконів та спектрах бета-амілази ми могли лише в узагальненому для лінії вигляді. Перш за все лінії оцінювались на внутрішньолінійну мінливість між рослинами. При цьому відсутність амплікона у спектрі не розглядали як прояв поліморфізму, якщо така відсутність характеризувала спектри, отримані за кількома праймерами для однієї і тієї самої рослини. В такому випадку піддавалась сумніву специфічність картини.

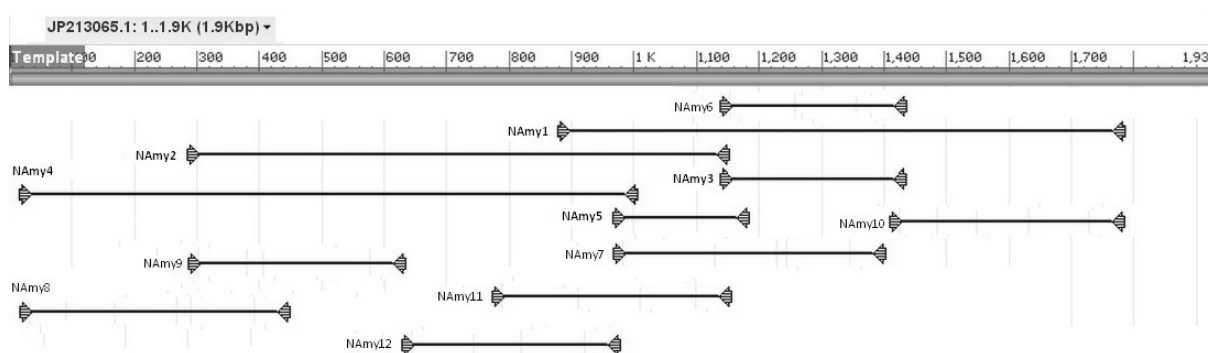


Рис. 2. Розташування послідовностей (лінії, обмежені стрілками), що фланкуються зазначеною парою праймерів на основі сиквенсу TSA гену β -амілази *Triticum aestivum* JP213065.1 (суцільна лінія згори)

Крім того, поліморфним вважався продукт, якщо частота його більш рідкісного варіанта (в даному випадку – відсутність продукту) була $\geq 0,05$ (довірча імовірність 95%). За цими двома критеріями, мономорфні продукти ампліфікації для всіх ліній отримуються для трьох праймерів з тих п'яти, що дають поодинокий амплікон: NAmu2, NAmu9, NAmu12. Крім того, виявлено поліморфізм за участю нового компоненту спектра, який утворюється з парою праймерів NAmu4 (рис. 3).

Сегмент гена, що фланкується праймерами NAmu2, включає обидва сегменти, що фланкуються парами праймерів NAmu9 та NAmu12 (рис. 2). Можна припустити, що цей сегмент є консервативним та однаковим для всіх генів бета-амілази. Тому у гексаплоїдів він ампліфікується поодиноким продуктом, мономорфним навіть в тих лініях, для яких було встановлено наявність нових компонентів спектру бета-амілази «5» та «7», що контролюються геном *β -Amy-A1*.

Праймер NAmu5 – єдиний, за яким ДНК Аврори та Аврозису дають різні результати: два амплікони для Аврори та один – для Аврозису. Лінії, які за даними попереднього вивчення [6] мають у складі хромосому 4S^{sh} (res117, res118, res127, res141) або її плече з геном *β -Amy-S^{sh}1* (res115) мають на спектрі один важкий амплікон, як у Аврозису та егілопса Шарона. ДНК решти ліній, без заміщень 4S^{sh}/4D, утворює два амплікони. Зрозуміло, що легкий компонент 1 утворюється за рахунок гена *β -Amy-D1*, тому його й немає в спектрі Аврозиса. Отже, ми знайшли пару праймерів, специфічних до гена *β -Amy-D1*, які можна використовувати далі при його аналізі.

Спектри бета-амілази лінії res121, res122, res141, res148, для яких показано появу нового амплікону з праймером NAmu4, або не відрізняються від спектру Аврори, або мають новий компонент на зимограмі ферменту, що контролюється геном *β -Amy-A1*. Перші дві лінії остисті, дві останні – напівостисті. Нами було показано раніше, що розвиток остей у інтрогресивних ліній Аврори зв'язаний зі зміною домінантного стану гена *B1*, локалізованого на хромосомі 5A, і, за результатами мікросателітного аналізу, це могло бути наслідком певних перебудов цієї хромосоми [7]. Ген *β -Amy-A1* розташований на цій самій хромосомі. Не можна виключити, що пара праймерів NAmu4, ПЛР з якими дає продукт, не властивий прабатьківським геномам ліній, є специфічними до гена *β -Amy-A1*. Тоді їх можна використовувати для подальшого вивчення змін у нуклеотидних послідовностях цього гена.

Висновки

Вивчення електрофоретичних спектрів бета-амілази в інтрогресивних лініях м'якої пшениці та зразках, які брали участь у ініціальних схрещуваннях, виявило наявність компонентів спектру, не властивих жодному з компонентів схрещування. Генетичний аналіз з використанням F₂ та F₃ від 19 комбінацій схрещування між різними інтрогресивними лініями показав, що алелі, які кодують нові компоненти спектру, є членами алельних серій генів *β -Amy-A1* та *β -Amy-D1*.

Три групи ліній, що походять від різних геномно-заміщених амфідиплоїдів, не відрізнялись одна від одної значуще за частотою виникнення змін за генами бета-амілази.

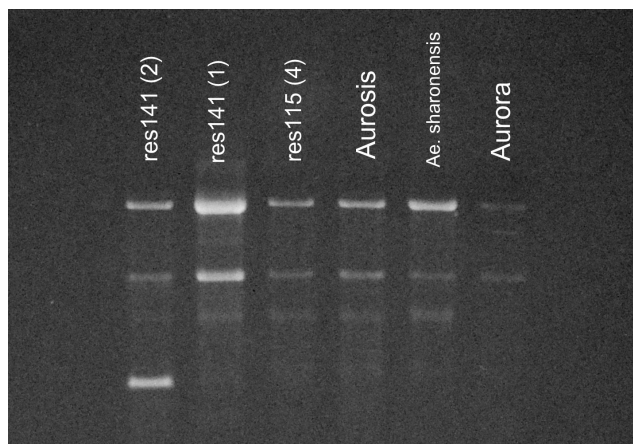


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гену бета-амілази, що фланкується парою праймерів NAmu4. Найлегший компонент на лівому спектрі – новий

Порівняння спектрів ампліконів, отриманих із праймерами до різних частин гена бета-амілази для ДНК Аврори, Аврозиса, егілопса Шарона та інтрогресивних ліній

показало, що нуклеотидні послідовності гена у деяких ліній відрізняються одна від одної у гені β -Amy-D1 та, можливо, β -Amy-A1.

Література

1. Zhao N., Xu L., Zhu B., Li M., Zhang H., Qi B., Xu C., Han F., Liu B. Chromosomal and genome-wide molecular changes associated with initial stages of allohexaploidization in wheat can be transit and incidental // *Genome*. – 2011. – 54, N 8. – P. 692–699.
2. Антонюк М.З., Терновская Т.К. Изоферменты бета- и альфа-амилазы для идентификации генетического материала трех видов *Aegilops*, включенного в геном мягкой пшеницы // *Цитология и генетика*. – 1995. – 29, N 2. – С. 3–9.
3. TSA: *Triticum aestivum* contig07261.TraeRec mRNA sequence [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/346480564>
4. Bento M., Tomas D., Viegas W. Silva M. Retrotransposons represent the most labile fraction for genomic rearrangements in polyploid plant species // *Cytogenet Genome Res*. – 2013. – 140. – P. 286–294.
5. Yuan Zh., Liu D., Zhang L., Zhang L., Chen W., Yan Z., Zheng Y., Zhang H., Yen Y. Mitotic illegitimate recombination is a mechanism for novel changes in high-molecular-weight glutenin subunits in wheat-rye hybrids [Електронний ресурс] // *PLoS One*. – 2011. – 6 (8). – Режим доступу: DOI: 10.1371/journal.pone.0023511.
6. Antonyuk M.Z., Bodylyova M.V., Ternovskaya T.K. Genome structure of introgressive lines *Triticum aestivum/Aegilops sharonensis* // *Cytology and Genetics*. – 2009. – 43. – N 6. – С. 58–67.
7. Антонюк М.З., Прокопик Д.О., Мартиненко В.С., Терновська Т.К. Ідентифікація генів-промоторів остистості в інтрогресивній лінії *Triticum aestivum / Aegilops umbellulata* // *Цитология и генетика*. – 2012. – 46, № 3. – С. 10–19.

NAVALIHINA A.G. ANTONYUK M.Z., TERNOVSKA T.K.

National University of Kyiv-Mohyla Academy, Ministry of Education, Ukraine, 04070, Kyiv, H. Skovoroda str., 2, e-mail: tern@ukma.kiev.ua

GENETIC VARIABILITY OF COMMON WHEAT INTROGRESSIVE LINES FOR BETA-AMYLASE GENE

Aims. To explore electrophoretic spectra of beta-amylase in common wheat introgressive lines and explain the nature of spectra variability. **Methods.** PAAG, agarose gel electrophoresis, PCR, bioinformatical and statistical methods. **Results.** In beta-amylase electrophoretic spectra of introgressive wheat lines new components that were absent in the spectra of initial crosses, have appeared. Alleles encoding new components of the spectrum are members of allelic series of β -Amy-A1 and β -Amy-D1 genes. Three groups of lines that include introgressions from three *Aegilops* species do not differ in the frequency of changes in beta-amylase genes. Comparison of amplicon spectra after PCR showed pairs of primers that can be used to analyze changes in sequences of β -Amy-D1 and presumably, β -Amy-A1. **Conclusions.** Introgressive lines variability, that lies in the appearance of new components in electrophoretic spectra of beta-amylase has a genetic basis. It is associated with changes in gene sequences of β -Amy-D1 and conceivably, β -Amy-A1. **Key words:** genetic variability, wheat introgressions, beta-amylase, PCR analysis.

УДК 579.873.71:577.152.24:004.9

ПОЛИЩУК Л.В., ЛУКЪЯНЧУК В.В.

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.Л. Заболотного НАН Украины, Украина, Д03680, Киев МСП, ул. Акад. Заболотного, 154, e-mail: LVPolishchuk@ukr.net

ГОМОЛОГИЯ ПЕРВИЧНОГО СТРОЕНИЯ ГЛИКОЗИЛТРАНСФЕРАЗ БИОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПУТИ ЛАНДОМИЦИНОВ У СТРЕПТОМИЦЕТОВ

В настоящее время полностью определено нуклеотидное строение и организация более 5 тысяч бактериальных хромосом и продолжаются

работы над последовательностями еще нескольких тысяч. Для многих штаммов продуцентов антибиотиков полностью определено

нуклеотидное строение кластеров генов, детерминирующих синтез антибиотиков: например, *S. kanamyceticus* ATCC12853 (канамицин), *S. antibioticus* Tu 6040 (симоциклин), *Streptomyces* sp. JP95 (гризеородин), *S. fradia* Tu 2717 (урдамицин) и многие другие. Составлены базы данных об аминокислотном строении бактериальных протеинов, в которые включены последовательности более 50000 соединений, выполняющих различные функции в клетках микроорганизмов (например, NCBI Reference Sequence project). Для анализа информации, собранной в таких базах, специалистами разработано ряд компьютерных программ. Особый интерес представляет анализ имеющейся в базах данных информации об аминокислотном строении протеинов микробных для выявления гомологии генов, участвующих в биосинтетических процессах. Такое изучение имеет как практическое значение, так и теоретический интерес. Выявление распространения и гомологии генов биосинтетических кластеров среди микроорганизмов различных таксонов необходимо для получения новых продуцентов так, как у ряда микроорганизмов уже установлено наличие криптических кластеров генов биосинтеза антибиотиков. Теоретический интерес представляет и выявление сродства энзимов, выполняющих одни и те же функции (например, гликозилтрансфераз участвующих в синтезе ландомицинов) у одного и того же микроорганизма и разных продуцентов.

Материалы и методы

Проводился *in silico* анализ гомологии аминокислотного строения гликозилтрансфераз (Е.С. 2.4.1), принимающих участие в синтезе углеводной цепочки ландомицинов у трех

штаммов микроорганизмов – продуцентов указанных антибиотиков (табл. 1).

Результаты анализа информации о первичном строении этих энзимов из доступных Интернет базы данных сервера NCBI (GenBank) представлены в данной работе. Выравнивание аминокислотных последовательностей проводилось с использованием программы BLASTP 2.2.29 [1].

Результаты и обсуждение

В настоящее время установлено существование большого семейства ангуациклиновых антибиотиков – ландомицинов. Сообщается о синтезе различных ландомицинов двумя wild-type штаммами (*S. globisporus* 1912 и *S. cyanogenus* S136) и их производными вариантами, а так же некультивируемым микроорганизмом, выделенным из почвы Аризоны, США. У микроорганизмов продуцентов полностью определено строение кластера генов синтеза антибиотиков; у 2-х последних из них установлено нуклеотидное строение всех генов кластеров [2–4].

Основные отличия в строении молекул соединений семейства ландомицинов обнаружены в составе и длине их углеводной составляющей. Полисахариды могут содержать от 1 до 6 гексозных остатков, в их состав могут входить оливоза, родиноза, амицетоза. Молекула ландомицина А содержит 2 повтора трисахарида оливоза-оливоза- родиноза, в то время как ландомицин Е только один такой трисахарид. Определение биоцидного действия ландомициновых антибиотиков показало значительное влияние длины и состава углеводной цепочки на антибактериальную и противоопухолевую активность [5, 6].

Таблица 1. Гликозилтрансферазы штаммов стрептомицетов продуцентов ландомицинов

Антибиотики	Микроорганизмы - продуценты антибиотиков	Гликозилтрансферазы		
		Энзим	Размер пептида, ак	Accession, GenBank
Ландомицин Е	<i>Streptomyces globisporus</i> 1912	LndGT1	389	AAS20331
		LndGT2	227*	AAS13326
		LndGT4	416	AAR16418
	Некультивируемый микроорганизм (клон AZ97)	Orf27	391	AEM44235
		Orf29	389	AEM44237
		Orf32	416	AEM44241
Ландомицин А	<i>Streptomyces cyanogenus</i> S136	LanGT1	390	AAD13555
		LanGT2	373	AAD13553
		LanGT3	401	AAD13559
		LanGT4	417	AAD13562

Примечание: * – частичный сиквенс аминокислотной последовательности протеина.

Доказано, что полимеризацию углеводной цепочки молекул ландомицинов осуществляют по несколько гликозилтрансфераз: у *S. globisporus* 1912 и у клона AZ97 по 3 энзима, а у *S. cyanogenus* S136 – 4 (табл. 1). У всех 3 микроорганизмов выявлена субстратная специфичность гликозилтрансфераз, участвующих в синтезе ландомицинов. Определено аминокислотное строение указанных энзимов.

Интересным представлялось определить степень подобия первичного строения энзимов, катализирующих реакции элонгации углеводной цепочки ландомицинов у трех штаммов их продуцентов и гликозилтрансфераз одного и того же микроорганизма. Была выявлена различная степень попарной гомологии аминокислотных последовательностей энзимов как катализирующих одни и те же этапы образования углеводной цепочки ландомицинов, так разные (табл. 2).

Установлено, что присоединение оливозы к ландомицинону катализируют гликозилтрансферазы (Д-оливозилтрансферазы) LndGT2, LanGT2 и Orf27. Д-оливозилтрансферазы LndGT1, LanGT1 и Orf29 катализируют присоединение второй молекулы оливозы к образовавшемуся в предыдущей стадии ландомицину Н. Л-родинозилтрансферазы LndGT4, LanGT4 и Orf32 осуществляют присоединение третьего остатка (родинозы) углеводной цепочки ландомицина Е ранее к образовавшемуся ландомицину F. Анализ *in silico* взаимного сродства (попарного выравнивания) первичного строения энзимов, катализирующих одинаковые реакции (LndGT2/LanGT2/Orf27, LndGT1/LanGT1/Orf29, LndGT4/LanGT4/ Orf32) показал, что их аминокислотный состав идентичен соответственно на 75 %, 78 % и 76 % (табл. 2).

В биосинтетических кластерах 3 микроорганизмов продуцентов наблюдается одинаковое расположение генов, детерминирующих энзимы, катализирующие аналогичные этапы синтеза углеводных цепочек ландомицинов. Кроме того, такие энзимы, имеют почти идентичные молекулярные размеры. Например, гликозилтрансферазы LndGT4 (AAR16418) и Orf33 (AEM44241) состоят из 416 аминокислотных остатков, а LanGT4 (AAD13562) – из 417 (табл. 1). Предположение об общности эволюционного происхождения биосинтетических кластеров

свидетельствуют и результаты проведенных нами ранее исследований аминокислотных последовательностей (ABB84178, AEM442386 AF080235, GenBank), кодирующих трансмембранные антипортеры ландомицинов у 3 указанных продуцентов [7].

В биосинтезе ландомицина А клетками *S. cyanogenus* S136 принимает участие Д-оливозилтрансфераза LanGT3, катализирующая присоединение оливозы к остатку родинозы в углеводной цепочке ландомицина Е. Для выявления гомологии аминокислотного строения шести аминокислотных последовательностей Д-оливозилтрансфераз трех продуцентов с последовательностью AAD13559 (LanGT3) *S. cyanogenus* S136 проводился попарный сравнительный анализ строения (попарное выравнивание) (табл. 2).

Показана идентичность выше 50 % аминокислотного строения трех Д-оливозилтрансфераз LndGT1, LanGT1, Orf29 и последовательности Д-оливозил-трансферазы LanGT3 (таблица 2).

Энзимы LndGT1, LanGT1 и Orf29 катализируют присоединение второй молекулы оливозы. Как показано выше, гликозилтрансферазы LndGT1, LanGT1 и Orf29 – возможные ортологичные энзимы. Основываясь на том, что оба фермента (LanGT3 и LanGT1) переносят остатки оливозы; имеют близкие молекулярные размеры аминокислотных последовательностей (соответственно, 401 ак и 390 ак) и детерминирующие их гены в биосинтетических кластерах расположены по соседству, высказано предположение, что упомянутые гликозилтрансферазы являются паралогичными ферментами.

Определена идентичность выше 50 % аминокислотного строения трех Д-оливозилтрансфераз LndGT1, LanGT1 и Orf29 последовательности Д-оливозилтрансферазы LanGT3. Попарные выравнивания последовательностей данных энзимов характеризуются также и более высоким показателем выравнивания (Maximum score) в сравнении с LanGT2 и Orf27.

Энзимы LndGT1, LanGT1 и Orf29 катализируют присоединение второй молекулы оливозы. Как показано выше, гликозилтрансферазы LndGT1, LanGT1 и Orf29 – возможные ортологичные энзимы.

Таблица 2. Попарное выравнивание нуклеотидного строения гликозилтрансфераз микроорганизмов продуцентов ландомицинов

Энзимы	Степени идентичности и подобия первичного строения гликозилтрансфераз микроорганизмов								
	LndGT1	LndGT2	LndGT4	Orf27	Orf29	Orf32	LanGT1	LanGT2	LanGT3
LndGT2 Score	33*/48** 101								
LndGT4 Score	31/45 150	32/50 60,1							
Orf27 Score	34/49 671	88/89 390							
Orf29 Score				33/48 162					
Orf32 Score			93/96 738	28/43 111	33/46 177				
LanGT1 Score	78/85 587				81/87 629				
LanGT2 Score		81/86 342		83/90 607			33/51 162		
LanGT3 Score	51/62 315	28/41 82,8		29/44 126	52/64 358		51/64 357	28/44 110	
LanGT4 Score	30/45 150		78/86 610			80/89 629	33/46 145	26/42 83,5	30/45 108

Примечание: * – степень идентичности, %, ** – степень подобия, %; частичный сиквенс аминокислотной последовательности протеина LndGT2; Score – статистическая значимость выравнивания аминокислотных последовательностей протеинов.

Основываясь на том, что оба фермента (LanGT3 и LanGT1) переносят остатки оливозы; имеют близкие молекулярные размеры аминокислотных последовательностей (соответственно, 401 ак и 390 ак) и детерминирующие их гены в биосинтетических кластерах расположены по соседству, высказано предположение, что упомянутые гликозилтрансферазы являются паралогичными ферментами.

Определение взаимной гомологичности строения гликозилтрансфераз, обеспечивающих синтез углеводной цепочки ландомицина у каждого из микроорганизмов, является важным для выявления эволюционного происхождения детерминирующих их генов одного биосинтетического кластера.

Как упоминалось выше, в синтезе трисахарида (оливоза-оливоза-родиноза) ландомицина Е штаммов *S. globisporus* 1912 принимают участие энзимы LndGT2 и LndGT1 (Д-оливозилтрансферазы) и LndGT4 (Л-родинозилтрансфераза). *In silico* анализ выявил степень идентичности первичного строения энзимов, даже имеющих одинаковую субстратспецифичность, – 33% (табл. 2).

Полимеризацию углеводной составляющей молекулы ландомицина Е у

метагеномного клона AZ97 осуществляют также 3 гликозилтрансферазы: 2 Д-оливозилтрансферазы (Orf29 и Orf27) и Л-родинозилтрансфераза (Orf32). Анализ их аминокислотного строения также выявил степень идентичности первичного строения энзимов, в том числе и Д-оливозилтрансферазы, – 33% (табл. 2).

Полученные данные о низкой (менее 35 %) степени идентичности аминокислотного строения энзимов одного и того же продуцента позволяют предположить, что биосинтетический кластер арizonского некультивируемого микроорганизма детерминирует 3 гликозилтрансферазы (Orf27, Orf29, Orf32), не являющихся паралогами друг друга (табл. 2).

Мажорным компонентом комплекса ландомицинов, синтезированных штаммом *S. cyanogenus* S136 является ландомицин А. Данный антибиотик характеризуется наличием гексасахаридной цепочки, состоящей из 2 трисахаридов, выявленных у ландомицина Е. В кластере генов биосинтеза ландомицина А выявлено наличие дополнительного гена lanGT3, детерминирующего гликозилтрансферазу (Д-оливозилтрансферазу) LanGT3. Сравнение аминокислотных последовательностей гликозилтрансфераз данного кластера

выявило степень гомологии выше 40 % первичного строения энзимов как осуществляющих перенос одинаковых моносахаров, так и различных (табл. 2).

Наибольшая гомология выявлена между Д-оливозилтрансферазами LanGT3 и LanGT1 – 52 %. Основываясь на представленных данных *in silico* анализа, возможно предположить, что Д-оливозилтрансферазы LanGT3 и LanGT1 *S. cyanogenus* S136 являются паралогичными энзимами. Показатель попарного выравнивания также значительно выше при анализе гомологии пары последовательностей LanGT3 - LanGT1.

Зная расположение генов гликозилтрансфераз (lanGT2 - lanGT1 - lanGT3 - lanGT4) в ландомициновом кластере и последовательность участия в синтезе углеводной цепочки (LanGT2 – LanGT1- LanGT4- LanGT3), можно сделать предположение о возможности возникновения гена lanGT3 последним из гликозилтрансферазных генов данного кластера в результате дубликации гена lanGT1.

Литература

1. The National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
2. Luzhetskyy A., Bechthold A. Features and applications of bacterial glycosyltransferases: current state and prospects // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – 80, N 6. – P. 945–952.
3. Kharel M.K., Pahari P., Shepherd M.D., Tibrewal N., Nybo S.E., Shaaban K.A., Rohr J. Angucyclines: Biosynthesis, mode-of-action, new natural products, and synthesis // *Nat. Prod. Rep.* – 2012. – 29, N 2. – P. 264–325.
4. Feng Z., Kallifidas D., Brady S.F. Functional analysis of environmental DNA-derived type II polyketide synthases reveals structurally diverse secondary metabolites // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – 108, N 31. – P. 12629–12634.
5. Мацелюх Б.П., Коновалова Т.А., Поліщук Л.В., Бамбура О.І. Чутливість до ландоміцину А і Е стрептоміцетів, продуцентів полікетидних антибіотиків // *Мікробіол. журн.* – 1998. – 60, № 1. – С. 31–36.
6. Korynevskaya A., Heffeter P., Matselyukh B., Elbling L., Micksche M., Stoika R., Berger W. Mechanisms underlying the anticancer activities of the angucycline landomycin E // *Biochem. Pharmacol.* – 2007. – 74, N 12. – P. 1713–1726
7. Polishchuk L., Lukyanchuk V. Search *in silico* of microorganisms' patterns, which are homologs of *Streptomyces globisporus* 1912 LndJ-pattern // *Europ. Appl. Sciences.* – 2003. – 1, N 1. – P. 18–22.

POLISHCHUK L., LUKYANCHUK V.

Zabolotny institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine,

Ukraine, UA-03680, Kyiv-143, Acad. Zabolotny str., 154, e-mail: LVPolishchuk@ukr.net

PRIMARY STRUCTURES HOMOLOGY OF GLYCOSYLTRANSFERASES FROM LANDOMYCINES SYNTHETIC WAYS OF STREPTOMYCES

Aims. defining of evolutionary relationship of glycosyltransferases which catalyzing synthesis of carbohydrate chain of landomycines in producing microorganisms (*Streptomyces globisporus* 1912, *S. cyanogenus* S 136 and uncultivated microorganisms from soil of Arizona, USA). **Methods.** Information about the aminoacid sequences of the enzymes from the available Internet databases was used in this study. *In silico* analysis of patterns structures was performed using the technical capabilities of the program BLAST. **Results.** Degree of homology of enzymes structures (D-olivosyltransferases and L-rhodinyltransferases) within the same organism and different producers was determined. The amino acid

Выводы

Основываясь на данных *in silico* анализа аминокислотного строения гликозилтрансфераз трех микроорганизмов – продуцентов ландомицинов А и Е (*S. cyanogenus* S136, *S. globisporus* 1912 и клона AZ97, содержащего фрагмент хромосомы некультивируемого микроорганизма из Аризоны), были сделаны заключения: **1.** о возможности эволюционного сродства (ортологичности) энзимов, катализирующих аналогичные биосинтетические реакции Д-оливозилтрансфераз (LanGT1/LndGT1/Orf27 и LanGT2/LndGT2/Orf29) и Л-родинозилтрансфераз (LanGT4/LndGT4/Orf32); **2.** гликозилтрансферазы, синтезирующие углеводную цепочку ландомицина Е клона AZ97, вероятнее всего не являются белками-паралогами; **3.** у штамма *S. cyanogenus* S136 из 4 гликозилтрансфераз, участвующих в синтезе ландомицина А, только Д-оливозилтрансферазы LanGT3 и LanGT1 могут быть паралогичными энзимами.

structures of analogous glycosyltransferases (LanGT1/LndGT1/Orf27, LanGT2/LndGT2/Orf29 and LanGT4/LndGT4/Orf32) synthesizing carbohydrate chain of landomycin E all three producers were identical more than 75 %, meanwhile there was less than 33 % identity of enzymes structures (LanGT1/LanGT2/LanGT4, LndGT1/LndGT2/LndGT4, Orf27/Orf29/Orf32) within each particular microorganism. **Conclusions.** Evolutionary relationship between analogous enzymes was revealed: they are orthologs. Two enzymes (LanGT3 and LanGT1) of *S. cyanogenus S136* were identified as paralogous ones. *Key words:* structure, *in silico* analysis, homology, ortholog, paralog, glycosyltransferase.

УДК 633.52:577.21:632.165

РАБОКОНЬ А.Н., ПОСТОВОЙТОВА А.С., ПИРКО Я.В., БЛЮМ Я. Б.

Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины,

Украина, 04123, г. Киев, Осиповского, 2а, e-mail: nastya-rabokon@rambler.ru

АНАЛИЗ ГОМОЛОГОВ ГЕНОВ ОСНОВНЫХ БЕЛКОВ ЦИТОСКЕЛЕТА У РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Гены цитоскелетных белков, часть из которых относится к генам «домашнего хозяйства» (housekeeping genes), необходимы для поддержания важнейших жизненных функций как отдельно взятых клеток, так и всего организма в целом [1]. Недавние исследования показали, что длина интронов некоторых из них, точнее ILP (Intron Length Polymorphism), может быть удобным и надежным инструментом для изучения генетического разнообразия и филогенетических связей между различными видами растений. Также ILP неплохо зарекомендовал себя для предварительной характеристики и распознавания различных генотипов растений [2]. В связи с этим изучение экзон-интронной структуры генов, кодирующих цитоскелетные белки (прежде всего актина, α - и β -тубулина) у различных видов растений представляет практический интерес с точки зрения расширения возможного спектра молекулярных маркеров за счет более глубокого анализа именно экзон-интронной структуры этих генов [3]. В связи с этим, целью работы было проведение биоинформационного анализа последовательностей генов актина (основного белка микрофиламентов), α - и β -тубулина (базовый белок микротрубочек) у видов ризовидки Таля (*Arabidopsis thaliana*), риса (*Oriza sativa*), картофеля (*Solanum tuberosum*) и томата (*Solanum lycopersicum*) для изучения их интрон-экзонной структуры.

Материалы и методы

Полные последовательности генов актина и тубулина *A. thaliana* были взяты из базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). В геноме этого растения

аннотировано 8 последовательностей генов актина (At2g37620(Act1), At3g18780(Act2), At3g53750(Act3), At5g59370(Act4), At5g09810(Act7), At1g49240(Act8), At3g12110(Act11), At3g46520(Act12)), 6 последовательностей генов α -тубулина (At1g64740(Tua1), At1g50010(Tua2), At5g19770(Tua3), At1g04820(Tua4), At5g19780(Tua5), At4g14960(Tua6)) и 9 последовательностей генов β -тубулина (At1g75780(Tub1), At5g62690(Tub2), At5g6270(Tub3), At5g44340(Tub4), At1g20010(Tub5), At5g12250(Tub6), At2g29550(Tub7), At5g23860(Tub8), At4g20890(Tub9)). В дальнейшем полные последовательности, отдельно кодирующие области, а также их продукты были использованы для поиска и анализа гомологов у *O. sativa*, *S. tuberosum* и *S. lycopersicum*. Геномы выше упомянутых видов полностью секвенированы, но в базе данных GenBank до сих пор отсутствует их аннотация. Для множественного выравнивания исследуемых нуклеотидных секвенсов были использованы программы Clustal 2.0 и UGENE [5, 6].

В качестве матрицы для поиска потенциальных гомологов были использованы гены: актина – actin-1 (ACT1_ARATH), α -тубулина – tubulin alpha-1 (TBA1_ARATH) и β -тубулина tubulin beta-1 (TBB1_ARATH) из *A. thaliana*. С помощью инструмента BLASTN был проведен поиск в базе данных Phytozome v9.1 (www.phytozome.net). Отбор гомологов был основан на процентных показателях идентичности и сходства генов, а также на полноте нуклеотидных последовательностей и транслируемых продуктов.

Результаты и обсуждение

В результате анализа генома риса выявлено 11 нуклеотидных последователь-

ностей, кодирующих актин: Os01g73310, Os02g38340, Os03g50885, Os03g56970, Os03g61970, Os05g01600, Os05g36290, Os08g03440, Os10g36650, Os11g06390, Os12g06660. В среднем последовательности имели 5 экзонов (90–2280 п.н.) и 4 интрона (длиной от 74 п.н. до 1694 п.н.). Обнаружено 4 гена тубулина: Os07g38730, Os03g11970, Os03g51600, Os11g14220, которые содержат в среднем по 4 экзона (200–1010 п.н.) и 3 интрона (90–990 п.н.); 9 генов β -тубулина: Os03g56810, Os03g45920, Os03g01530, Os01g59150, Os01g18050, Os06g46000, Os02g07060, Os05g34170, Os06g07280 – 3 экзона (250–1080 п.н.) и 2 интрона (90–1110 п.н.) соответственно.

В геноме томата также обнаружено 11 гомологов гена актина: Solyc00g017210, Solyc01g104770, Solyc03g078400, Solyc04g011500, Solyc04g071260, Solyc05g054480, Solyc06g076090, Solyc10g080500, Solyc10g086460, Solyc11g005330, Solyc11g065990. Они содержали в среднем 4 экзона (40–2700 п.н.) и 3 интрона (68–860 п.н.). В геноме *S. lycopersicum* было 4 гена α -тубулина: Solyc08g006890, Solyc04g077020, Solyc02g087880, Solyc02g091870 – в среднем 4 экзона (90–895 п.н.) и 3 интрона (100–1150 п.н.); и 9 генов β -тубулина: Solyc04g081490, Solyc10g085620, Solyc10g085020, Solyc10g080940, Solyc12g089310, Solyc06g035970, Solyc06g005910, Solyc03g025730, Solyc03g118760 – 4 экзона (110–2020 п.н.) и 3 интрона (50–1630 п.н.).

В геноме картофеля было выявлено 9 нуклеотидных последовательностей потенциальных генов актина: PGSC0003DMG400003985, PGSC0003DMG400000439, PGSC0003DMG400018449, PGSC0003DMG400027746, PGSC0003DMG400023708, PGSC0003DMG400019204, PGSC0003DMG400008912, PGSC0003DMG400030319, PGSC0003DMG400023429; среднее количество интронов составило 3 (71–

479 п.н.), а экзонов – 4 (30–2600 п.н.). Найдено 5 генов α -тубулина: PGSC0003DMG400004272, PGSC0003DMG400011537, PGSC0003DMG400001320, PGSC0003DMG400030627, PGSC0003DMG400008752 – 4 экзона (100–1245 п.н.) и 3 интрона (90–4410 п.н.); 9 генов β -тубулина:

PGSC0003DMG400009938, PGSC0003DMG400011088, PGSC0003DMG400028193, PGSC0003DMG400019131, PGSC0003DMG400029337, PGSC0003DMG400014296, PGSC0003DMG400029926, PGSC0003DMG400020850, PGSC0003DMG400030431 – 3 экзона (100–2050 п.н.) и 2 интрона (79–1266 п.н.).

Следует отметить, что у *A. thaliana* в нуклеотидных последовательностях, кодирующих актин, выявлено 4 экзона и 3 интрона (кроме АСТ3 – 3 экзона, 2 интрона); в генах α -тубулина в среднем также 4 экзона и 3 интрона; все гены β -тубулина содержат 3 экзона (270–690 п.н.) и 2 интрона (80–790 п.н.).

В результате проведенного биоинформационного анализа установлено, что уровни идентичности кодирующих областей (экзонов) у изучаемых растений составляли в среднем: для генов актина – 77%, α -тубулина – 75%; β -тубулина – 78%. Степень идентичности в процентах приведена в табл. 1–3. Поскольку интроны и регуляторные участки генов являются более вариабельными как по длине, так и по нуклеотидному составу, уровни идентичности полных последовательностей генов оказались значительно меньшими.

Таким образом, идентичность экзонов данных генов у всех четырех изученных видов растений оказалась достаточно высокой, что указывает на высокое сходство кодирующих областей цитоскелетных генов у разных видов растений.

Таблица 1. Анализ сходства гомологов кодирующих областей генов актина (%)

Вид растения	<i>A. thaliana</i>	<i>O. sativa</i>	<i>S. tuberosum</i>	<i>S. lycopersicum</i>
<i>A. thaliana</i>	100	71	80	80
<i>O. sativa</i>	71	100	71	71
<i>S. tuberosum</i>	80	71	100	84
<i>S. lycopersicum</i>	80	71	84	100
В среднем	77			

Таблица 2. Анализ сходства гомологов кодирующих областей генов α -тубулина (%)

Вид растения	<i>A. thaliana</i>	<i>O. sativa</i>	<i>S. tuberosum</i>	<i>S. lycopersicum</i>
<i>A. thaliana</i>	100	72	69	74
<i>O. sativa</i>	72	100	72	77
<i>S. tuberosum</i>	69	72	100	79
<i>S. lycopersicum</i>	74	77	79	100
В среднем	75			

Таблица 3. Анализ сходства гомологов кодирующих областей генов β -тубулина (%)

Вид растения	<i>A. thaliana</i>	<i>O. sativa</i>	<i>S. tuberosum</i>	<i>S. lycopersicum</i>
<i>A. thaliana</i>	100	78	79	79
<i>O. sativa</i>	78	100	76	76
<i>S. tuberosum</i>	79	76	100	82
<i>S. lycopersicum</i>	79	76	82	100
В среднем	78			

Выводы

Полученные данные свидетельствуют о том, что последовательности экзонов исследованных генов у различных видов высших растений весьма схожи, а последовательности интронов имеют

существенные различия, то есть обладают высокой степенью полиморфизма. Таким образом, интроны цитоскелетных генов могут рассматриваться в качестве потенциальных маркеров при изучении генетического разнообразия видов растений.

Литература

1. Chen R., Gyokusen M., Nakazawa Y., Gyokusen K. Selection of housekeeping genes for transgene expression analysis in *Eucommia ulmoides* Oliver using real-time RT-PCR [Электронный ресурс] // J. Bot. – 2010. – 2010. – 7 p. – Article ID 230961, – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2010/230961>
2. Braglia L., Manca A., Mastromauro F., Breviario D. cTBP: A successful intron length polymorphism (ILP)-based genotyping method targeted to well defined experimental needs // Diversity. – 2010. – 2. – P. 572–585.
3. Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress // J. Exp. Bot. – 2005. – 56. – P. 2907–2914.
4. Yamada K., Lim J., Dale J.M. et al. Empirical analysis of transcriptional activity in the *Arabidopsis* genome // Science. – 2003. – 302, N 5646. – P. 842–846.
5. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0 // Bioinformatics. – 2007. – 23. – P. 2947–2948.
6. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. – 2012. – 28. – P. 1166–1167.

RABOKON A.N., POSTOVOYTOVA A.S., PIRKO YA.V., BLUME YA.B.

Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Acad. of Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: nastya-rabokon@rambler.ru

ANALYSIS OF GENE HOMOLOGY OF SOME CYTOSKELETAL PROTEINS IN DIFFERENT SPECIES OF HIGHER PLANTS

Aims. The genes of cytoskeletal proteins are important to maintain essential life processes and functions at different stages of the ontogenesis. Intron length polymorphism (ILP) of some of them can be used as convenient and reliable tool for the study of genetic diversity and phylogenetic relationships between different plant species. ILP also can be used for genotyping different plants. In this connection, analysis of exon-intron structure of some cytoskeletal protein genes in different plant species represents considerable interest to extend the possible range of molecular markers. **Methods.** Using *Arabidopsis* actin and tubulin genes we have performed the similarity search of genes via TBLASTN predicted proteins of the *Oriza sativa*, *Solanum tuberosum* and *Solanum lycopersicum* genomes available at Phytozome v9.1. **Results.** We conducted out selection of actin, α - and β -tubulin gene homologues in the genomes of analyzed plants; studied its exon-intron structure; established the percent identity of CDS in these genes. **Conclusions.** Obtained data show that the exon sequences of these cytoskeleton genes in various species of higher plants are very similar, and intron sequences have significant differences, that reflects a high degree of polymorphism. Thus, the introns of these genes may be used as molecular markers in ILP-analysis.

Key words: gene, cytoskeletal proteins, actin, tubulin, homologue, exon, intron polymorphism.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ И ЭВОЛЮЦИИ ВИДОВ

Хромосомные механизмы видообразования и генетической адаптации видовых популяций представляют одну из актуальных проблем эволюционно-генетической теории. Многие вопросы хромосомной организации видов решены благодаря анализу многочисленных групп двукрылых насекомых, среди которых особо выделяются род *Drosophila*. Обнаружение видов, имеющих идентичный рисунок политенных хромосом (называемых гомосеквентными видами), послужило поводом к игнорированию положения Уайта [1] о необходимости хромосомной реорганизации при видообразовании. Появилась и стала доминировать точка зрения, что видообразование может быть сопряжено только с генными мутациями без каких-либо видимых изменений хромосомного аппарата [2]. По сути, гомосеквентные виды представляют собой виды – хромосомные двойники, которые могут входить в группу морфологически сходных видов-двойников (как у малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis*) или в группу близких, но морфологически различающихся видов (как у дрозофил). Детальный анализ ряда гомосеквентных видовых групп показал, что, имея идентичную структуру политенных хромосом, некоторые виды различаются по величине или локализации гетерохроматических блоков в метафазных хромосомах. Такие виды называют анизогомосеквентными. К настоящему времени появились данные относительно серьезных модификаций гетерохроматиновых блоков хромосом, по-видимому, непосредственно связанных как с видообразовательными событиями, так и с формированием адаптивного инверсионного полиморфизма. Малярийные комары *An. atroparvus* и *An. labranchiae* четко распознаются по величине гетерохроматического XR-плеча половой хромосомы [3]. Такие виды называют анизогомосеквентными. Исследование взаиморасположения политенных хромосом в трофоцитах яичников у гомосеквентных видов малярийных комаров и подгруппы *Drosophila melanogaster* также свидетельствует о наличии видовых различий. Три гомосеквентных вида *An. melanoon (subalpinus)*, *An. maculipennis* и

An. artemievi имеют видоспецифичную архитектуру хромосом, проявляющуюся в наличии-отсутствии прикрепления хромосом XL и 2R к ядерной оболочке. Гомосеквентные виды *Drosophila* подгруппы *melanogaster* также имеют характерные видоспецифичные особенности архитектоники хромосом трофоцитов. Наиболее резко *D. mauritiana* отличается от других видов тем, что хромосома 3 имеет жестко соединенные в центромерном районе плечи и яркий блок центромерного гетерохроматина. Локального хромоцентра, как уже отмечалось, нет ни у одного вида, однако *D. simulans* и *D. sechellia* имеют растянутый по ядерной оболочке «мостик», объединяющий все хромосомные плечи по центромерным участкам, которые в то же время связаны с ядерной оболочкой. Анализ межвидовых гибридов *D. mauritiana* x *D. simulans* обнаружил объединение центромерных участков гомеологов *simulans* в центромерный «мостик», характерный для данного вида. Гомеологи *mauritiana* в центромерной части не связаны. Таким образом, в гибридной конфигурации сохраняются видоспецифичные позиции хромосомных плеч [4]. Молекулярно-цитогенетические данные, полученные в последние годы, значительно углубляют представления о принципах реорганизации геномов при видообразовании. Результаты исследования пространственной организации ядра у малярийных комаров подтверждают существование в геноме специфических сайтов, обогащенных элементами, обеспечивающими взаимодействие хромосом с ядерной оболочкой. Впервые проведенный анализ района прикрепления, расположенного в середине плеча хромосомы XL *An. messeae* показал, что такие районы являются гетерохроматическими и могут локализоваться не только в прицентромерных районах хромосом, но и в середине плеч. Показана многокомпонентность молекулярно-генетического состава гетерохроматина в отношении его взаимодействия со структурными элементами ядра. Это свойство гетерохроматина проявляется в существовании двух компонентов, которые входят в его состав – консервативных элементов, характерных как

для прицентромерного, так и интеркалярного гетерохроматина всех хромосом, а также варибельного компонента – видоспецифичных и районспецифичных последовательностей ДНК. За счет реорганизации элементов варибельного компонента гетерохроматина происходит изменение взаимодействия хромосом с ядерной оболочкой. Реорганизация последовательностей гетерохроматина районов прикрепления хромосом может являться ключевым процессом, который сопровождает видообразовательные события у малярийных комаров.

Выявлено, что у восьми видов подгруппы *melanogaster* – *D. erecta*, *D. teissieri*, *D. yakuba*, *D. santomea*, *D. simulans*, *D. melanogaster*, *D. sechellia*, *D. mauritiana* – прицентромерный гетерохроматин характеризуется частичным сходством состава ДНК с составом ДНК хромоцентра *D. orena*. Общим компонентом хромоцентра трофоцитов *D. orena* и прицентромерного гетерохроматина всех хромосом у видов *D. erecta*, *D. teissieri*, *D. yakuba*, *D. santomea*, *D. simulans*, *D. melanogaster*, *D. sechellia*, *D. mauritiana* являются повторенные последовательности ДНК и последовательности, гомологичные генам. Показано, что только у *D. orena* в ядрах трофоцитов с ретикулярной структурой районспецифичная ДНК распределялась в пределах локальной территории в пространстве ядра, для остальных же видов было характерно диффузное распределение по всему ядру. Это указывает на то, что хромоцентр трофоцитов *D. orena* не подвергается деконденсации в ядрах с ретикулярной структурой.

Установлено, что ДНК из хромоцентра трофоцитов *D. orena* консервативна в плане своего распределения преимущественно в прицентромерных районах политенных хромосом трофоцитов у всех видов подгруппы *melanogaster*. Существует гипотеза, согласно которой перераспределение последовательностей ДНК гетерохроматина по геному может вызвать реорганизацию архитектуры ядер клеток генеративной системы, что, вероятно, сопровождается видообразованием. Консерватизм распределения районспецифичной ДНК (преимущественно в прицентромерных районах хромосом) и наличие гомологии последовательностей в геномах всех видов подгруппы *melanogaster* свидетельствует, вероятно, о том, что эволюционные преобразования генома, давшие начало видам данной подгруппы, не привели к кардинальному перераспределению ДНК гетерохроматина по геному. Возможно, что видоспецифичность архитектуры ядер

клеток генеративной системы у разных видов определяется тонкими различиями в структуре гетерохроматина [5].

Генетическая адаптация видов растений и животных осуществляется на основе разных механизмов, при этом наиболее распространенными и значимыми являются хромосомные перестройки. Роль хромосомного полиморфизма в генетической адаптации видов хорошо показана на примере полиморфизма по В-хромосомам [6] и особенно по инверсионному полиморфизму. В течение 40 лет генетического мониторинга малярийных комаров выявлена существенная трансформация частотных характеристик инверсионного полиморфизма *Anopheles messeae*, которая происходила поэтапно. В период 1974–1979 гг. в популяциях вида на протяжении огромного ареала, охватывающего всю бореальную подобласть Палеарктики, устойчиво сохранялась временная частотная стабильность в концентрации хромосомных инверсий при сильных частотных градиентах в пространстве ареала [7]. Данные по уровню инверсионного полиморфизма *An. messeae* в Томской популяции (центральная часть ареала) в 2013 г. показывают значительное изменение частот инверсий по сравнению с данными, полученными в 70-тых годах 20 века. Это изменение резко нарастало к концу 80-тых – началу 90-тых годов и затем стабилизировалось [8, 9]. Последние 20 лет частоты хромосом практически не изменялись [10]. Сопоставление частотной динамики инверсий с средне-сезонными температурными режимами за весь период наблюдения популяции показывает корреляцию изменений частот хромосомных инверсий с потеплением климата. В течение 40 лет мониторинга, уровень гетерозиготности хромосом так же подвергся изменению. Так в популяции Томска гетерозиготность по хромосоме XL₁₂ на протяжении 1974–1979 гг. была устойчивой на уровне ≈ 25%, в 1992–2013 гг. последовало резкое падение до ≈ 2–3%. Наоборот, поднялся уровень гетерозиготности по хромосоме XL₀₁ с ≈ 3% до ≈ 40% в те же промежутки времени. Следует отметить, что на протяжении трех лет с 1974 по 1979 гг. по всем аутосомам как и по половым хромосомам наблюдалась устойчивость гетерозиготности: по хромосомам 2R и 3R на уровне ≈ 46%, по 3L на уровне ≈ 40%. А начиная с 1992г. и по настоящее время 2013г. наблюдалось снижение гетерозиготности – более резкое по хромосоме 2R до ≈ 3%, и до ≈ 15% по хромосомам 3R и 3L до ≈ 15%. Таким образом, общая гетеро-

зиготность в популяции в 1974–1979 гг. составляла $\approx 0,95$, в 1992 г. – $\approx 0,6$ и в настоящее время – $\approx 0,3$ гетерозиготных инверсий на Повышение температуры (особенно в зимний период) привело к резкому снижению гетерозиготности изученной Томской популяции, что свидетельствует о направленной гомозиготизации в пользу хромосомных вариантов, доминирующих на юге (юго-западе) ареала. Существенная частотная реорганизация хромосомных инверсий имеет явный адаптивный характер и, как показали эксперименты [7], связана с тепловым режимом обитания. Таким образом, в ходе настоящей работы проведена оценка уровня генетической изменчивости в популяциях малярийного комара, которая позволила вскрыть характер динамических процессов, связанных с модификацией видовой экологической ниши. Подобная тенденция хорошо коррелирует с потеплением климата. Временная динамическая устойчивость кариофонда *An. messeae*, существующая на фоне сильнейших пространственных градиентов частот отдельных инверсий, очевидно, связана с относительной

стабильностью климата во времени при его высокой изменчивости в пространстве ареала. Подобная система, по-видимому, отражает саморегуляцию качественного состава кариофонда, известную как популяционно-генетический гомеостаз [11]. В целом генетическая система *An. messeae* представляется высокостационарной в пространственно-временном аспекте благодаря популяционно-генетическому, а точнее, видовому гомеостазу. Последний может реализоваться у видов с адаптивным инверсионным полиморфизмом через частотную динамичность инверсий или динамичность ассоциативных связей отдельных инверсий в генокомплексах [7]. Пространственно-временная стационарность (динамическая устойчивость) адаптивного инверсионного полиморфизма – свидетельство высокого популяционно-генетического (а точнее видового) гомеостаза и отсутствия тенденций к видообразованию [4].

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта НШ-1279.2014.4. и Программой Минобрнауки РФ.

Литература

1. White M.J.D. Animal cytology and evolution, 2nd ed. Cambridge: Cambridge Univ. Press. – 1954. – 454 p.
2. Dobzhansky Th. Genetics of evolutionary process. New-York and Lond.: Columbia Univ. Press, 1971. – 520 p.
3. Colluzzi M. Sibling species in Anopheles and their importance in malariology // Miscellaneous Publ. Entomol. Soc. Amer. 1970. – 7, N 1. – P. 62.
4. Стегний В.Н. Архитектоника генома, системные мутации и эволюция. – Новосибирск: Изд-во Новосибирского университета, 1993. – 110 с.
5. Стегний В.Н., Артемов Г.Н., Усов К.Е. Пространственная организация ядра как механизм эпигенетической регуляции. В кн. Эпигенетика. – Новосибирск: Изд. СО РАН. – 2012. – С. 143–180.
6. Борисов Ю.М. Географическая изменчивость вариантов системы добавочных хромосом у континентальных форм *Anopheles Peninsulæ* (Rodentia, Muridae) // Изв. Сиб. Отд. АН СССР. сер. Биол. Наук. – 1980. – 15, №3. – С. 61–69.
7. Стегний В.Н. Популяционная генетика и эволюция малярийных комаров. – Томск: изд-во Томского университета, 1991. – 136 с.
8. Gordeev M.I., Sibataev A.K. Cytogenetic and phenotypic variation in central and peripheral populations of the malaria mosquito, *Anopheles messeae* fall. (DIPTERA, CULICIDAE) // Генетика. – 1996. – 32, N 9. – С. 1199–1205.
9. Новиков Ю.М. Эффекты глобального потепления: направленная динамика пропорции видов *Anopheles* и цитогенетической структуры таксона *Anopheles messeae* Fall. в Западной сибире // Проблемы эволюционной цитогенетики, селекции и интродукции. Материалы Научных чтений, посвященных 100-летию профессора В.П. Чехова, 2–5 декабря 1997 г. – Томск.
10. Пищелко А.О., Стегний В.Н. Влияние климатических изменений на хромосомный инверсионный полиморфизм популяции малярийного комара *Anopheles messeae* (CULICIDAE) г. Томска. – 2014 (в печати).
11. Lerner J.M. Genetic homeostasis. – N.-Y.: Wiley, 1954. – 134 p.

STEGNIY V.N.

*Institute of biology and biophysics, Tomsk State University,
Russia, 634050, Tomsk, Lenin avenue, 36, e-mail: stegniy@res.tsu.ru*

CYTOGENETIC MECHANISMS OF ADAPTATION AND EVOLUTION OF THE SPECIES

The analysis of own and literature data meaning fully chromosomal speciation and polymorphism in genetic adaptation species and in particular on the role inversion polymorphism show the connection between the

frequency of chromosomal inversions dynamics due to thermal mode of existence populations. Long-term trend reversal frequency in the malaria mosquito population *Anopheles messeae* explains the effects of global warming.

Key words: chromosomal polymorphism, adaptation of species inversion of global warming.

УДК 631.523:575.222

ШПИЛЬЧИН В.В., МАРТИНЕНКО В.С., ТЕРНОВСЬКА Т.К.

Національний університет «Києво-Могилянська Академія» МОН України,
Україна, 04070, г. Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: vshpylchyn@bigmir.net

ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ АВРОТИКИ (ААВВТТ) ЗА ОЗНАКОЮ НАЯВНІСТЬ ВОСКОВОЇ ОСУГИ

Воскова осуга вкриває поверхню вегетативних органів всіх наземних рослин. У злаків восковий шар (осуга) може бути міцним і тоді рослина має блакитний відтінок (осуга у наявності), а може бути слабким, рослина виглядає зеленою (осуга відсутня). У м'якій пшениці (*Triticum aestivum* L.) інтенсивний шар осуги забезпечують домінантні алелі серії ортологічних генів, *W1* (2BS), *W2* (2DS). Рецесивні гомозиготи за цими генами воскової осуги не мають. Домінантні алелі іншої серії ортологічних генів, *Iw1* (2BS), *Iw2* (2DS), інгібують дію *W1* та *W2*, рецесивні алелі такої дії не мають [1]. Інший інгібітор осуги, *Iw3*(1BS) інгібує експресію промоторів воскової осуги хромосом групи 2 у колосі і не впливає на їхню експресію у листках пшениці [2]. За нашими даними, чужинно-заміщені лінії, в яких хромосома 1D сорту Аврора була заміщена гомеологом з геному *S Ae. speltoides* або *S^{sh} Ae. sharonensis*, характеризувалися яскраво-зеленим колосом та листками, вкритими восковою осугою. Отже, інгібітор воскової осуги *Iw3* властивий не лише тетраплоїдній пшениці, а й видам егілопса також.

Гексаплоїд Авротика (ААВВТТ) є амфідиплоїдом тетра-Аврори (АВ) та диплоїдного виду *Aegilops mutica* (Т). Сорт озимої м'якої пшениці Аврора, також як його тетракомпонент ААВВ, вкриті восковою осугою, *Aegilops mutica* не має воскової осуги. Щойно створений амфідиплоїд був зеленим, тобто не мав осуги. Отже, геном егілопсу несе домінантний інгібітор воскової осуги *Iw*. Серед гексаплоїдів Авротики незабаром з'явилися два нових морфотипи: Авротика 3 з більш рихлим колосом та Авротика 2, яка мала на колосі невеликі остеподібні відростки. Саме в Авротіці 2 за кілька генерацій серед зелених рослин з'явилися блакитні з міцним шаром

осуги. Пізніше, за 8–10 генерацій, серед зелених рослин Авротики 1 стали з'являтися блакитні рослини та рослини, колос яких зелений, а листя блакитне (зелено-блакитний зразок). Тобто незрозумілим чином у згаданому матеріалі відбувається зміна стану гена – інгібітора воскової осуги з домінантного до рецесивного, і, відповідно, втрачається його інгібіторна дія. Процес появи блакитних або зелено-блакитних рослин серед нащадків зелених набув перманентного характеру та спостерігається не лише в Авротіці, а й в інших геномно-заміщених амідиплоїдах, а також у чужинно-заміщених ліній, від них отриманих, геть до втрати зелених зразків.

Останнім часом в літературі надається все більше уваги процесам, які відбуваються в природних та штучно створених амфідиплоїдах під час формування їхнього геному [3–5]. Схоже, що у геномі Авротики, якій має інтрогресивне походження, відбувається якийсь процес, наслідком чого є мутування домінантного алелю до рецесивного з частотою, яка набагато перевищує відомі нам середні частоти спонтанного виникнення мутації на ген на покоління. У статті представлено результати гібридологічного аналізу різних морфотипів Авротики за ознакою наявності/відсутності воскової осуги та мікросателітним локусам, локалізованим у коротких плечах хромосом групи 2 гомеологів пшениці, виконаного з метою ідентифікації гена, який змінюється при зміні градації ознаки.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал: амфідиплоїди Авротика (ААВВТТ), контрастні за ознакою воскової осуги: зелені Авротика 1 та Авротика 2 (без воскової осуги), зелено-блакитна Авротика 1 (колос без воскової осуги, листки з восковою осугою), блакитна Авротика 2 (з

восковою осугою). Гібриди F_1 , та F_2 та F_3 від схрещування контрастних морфотипів. Воскову осугу компонентів схрещування та гібридів оцінювали візуально і рослину характеризували однією з трьох градацій: 1 – воскова осуга у наявності (блакитна), 2 – воскова осуга відсутня (зелена), 3 – колос без воскової осуги, листя вкриті осугою (зелено-блакитна).

ДНК виділяли за модифікованою із STAB-буфером. Мікросателітний аналіз з праймерами SSR-локусів, специфічних до хромосом 2B та 2D м'якої пшениці, виконано на ДНК рослин F_3 . Генотип рослин F_2 за аллелями мікросателітних локусів визначали за чотирма нащадками F_3 . Для перевірки відповідності між отриманими та очікуваними обсягами фенотипних класів використовували критерій χ^2 та точний критерій Фішера.

Результати та обговорення

Гаплотиipi різних морфотипів Авротики було запропоновано на основі інформації про їхнє походження [6] та відомостей про генетичний контроль ознаки [1]. Частина геному ААВВ Авротики має бути $W1 iw1$, генів $W2$ та $iw2$ в ньому немає, оскільки відсутній субгеном D. Ген $Iw3$ в хромосомі 1B представлений рецесивним алелем $iw3$, інакше сорт Аврора мав би зелений колос та блакитне листя, а це не так. Оскільки амфідиплоїд блакитного тетракомпонента ААВВ Аврори та зеленого диплоїда *Ae. mutica* є зеленим, геном T у хромосомі гомологічної групи 2 містить доміантний ген $Iw2(T)$, член однойменної серії ортологів *Triticinae*. Його епістатична дія пригнічує прояв гену $W1$, розташованого у хромосомі 2B. Доміантний інгібітор $Iw3(T)$ цілком може бути наявним у хромосомі 1T, хоча його прояв маскується епістатичною дією гена $Iw2(T)$: гібриди F_1 від схрещування зелених та зелено-блакитних рослин, як правило, зелені [7]. Для Авротики це припущення підтверджується вищепленням з зеленої Авротики 1 рослин зелено-блакитних. Тому вихідній амфідиплоїд Авротики мав мати гаплотип $iw3 W1 iw1 Iw2(T) Iw3(T)$, а зелено-блакитна форма – $iw3 W1 iw1 iw2(T) Iw3(T)$, розрізняючись лише за одним геном. Між зеленою Авротикою 1 та блакитною Авротикою 2 припущено різницю у два гени, гаплотип блакитної форми $iw3 W1 iw1 iw2(T) iw3(T)$.

Запропоновані гаплотиipi знайшли підтвердження у результатах гібридологічного аналізу при схрещуванні контрастних фенотипів. Раніше нами було показано [7, 8], що при схрещуванні контрастних генотипів

розщеплення за фенотипними класами у F_2 та BC_a не відповідає очікуваним співвідношенням при моно- чи дигенної моделі успадкування через суттєве збільшення проти теоретично очікуваного обсягу фенотипного класу «блакитні рослини». Більш того, в кількох випадках від схрещування зелених (доміантна ознака) з блакитними чи зелено-блакитних (доміантна ознака) з блакитними рослинами F_1 мали рецесивний блакитний фенотип. Тому надалі при підготовці матеріалу до гібридизації всі рослин з доміантним фенотипом, які були задіяні в отриманні гібридів F_1 у якості материнських чи батьківських форм, перевірялось на гомозиготність через спостереження за нащадками, отриманими від самозапилення кожної рослини, що брала участь у схрещуванні. Так було зроблено через те, що, за нашими багаторічними спостереженнями, вищеплення блакитних рослин серед нащадків доміантного фенотипу спостерігалось постійно, і виникла думка про те, що доміантні рослини, які ми беремо у якості компонента схрещування, можуть бути гетерозиготними та бути причиною спотворення співвідношення розщеплення проти очікуваного. Результати розщеплення в F_2 це припущення підтвердили. Коли у схрещування брали участь тільки гомозиготні рослини з доміантним фенотипом, співвідношення розщеплення не відрізнялось від моногібридного для комбінацій Авротики 2 зелена x Авротики 2 зелено-блакитна ($\chi^2 = 0,55$), Авротики 2 зелено-блакитна x Авротики 2 блакитна ($\chi^2 = 0,79$), Авротики 1 зелена – Авротики 1 зелено-блакитна ($\chi^2 = 0,48$). Співвідношення розщеплення 12 : 3 : 1, характерне для дигібридного розщеплення з доміантним епістазом між генами спостерігали при схрещуванні Авротики 2 зелена x Авротики 2 блакитна ($\chi^2 = 4,24$), Авротики 1 зелена x Авротики 2 блакитна ($\chi^2 = 3,23$).

Результати гібридологічного аналізу довели, що різниця між контрастними за фенотипом формами Авротики забезпечується одним геном для зеленої та зелено-блакитної Авротики 1 та двома генами для зеленої та блакитної Авротики 2. Вивчення поліморфізму контрастних форм за мікросателітними локусами та його можливого зв'язку з ознакою наявності/відсутності осуги було здійснено для коротких плечей хромосом 2B та 2D. Вибір саме цих хромосом пояснюється, що на них локалізовані інгібітори воскової осуги Iw , епістатичні як до генів $W1$ та $W2$, так і до гена $Iw3(T)$. Отже, мікросателітному аналізу було

піддано популяцію [Авротика 1(2) x Авротика 2(1)]F₂, яка розщеплюється за геном *Iw2(T)*.

Мікросателітні локуси вважаються одними з найефективніших молекулярних маркерів через високий рівень їхнього поліморфізму, чинником якого є молекулярна структура сукупності повторів. SSR-локусів, специфічних для генома T, поки не ідентифіковано, а, судячи з припущених нами гаплотипів, розщеплення відбувається за генами саме цього геному. Із 9 перевірених локусів, специфічних для хромосоми 2В, продукту не дав один, а поліморфними для контрастних батьківських форми були лише два, *Xwms429* та *Xbarc167*. Із 18 локусів, специфічних до хромосоми 2D, продуктів не було отримано з 7 парами праймерів, а поліморфними виявилися 3 локуси, *Xbarc142*, *Xwms102* та *Xwms702*. Цей останній результат узгоджується з відсутністю геному D в рослинах та підтверджує гомеологію між геномами T та D, про яку свідчить також регулярне утворення бівалентів між хромосомами цих двох геномів.

Перевірка кожного з п'яти поліморфних локусів на відповідність моногенному розщепленню серед рослин F₂ гібриду Авротика 1 зелена x Авротика 2 блакитна показала, що всі п'ять SSR-локусів є селективно нейтральними та можуть бути використані для перевірки їхнього зв'язку з ознакою інтересу (за результатами розрахунку χ^2 або точного критерію Фішера $P > 0,05$ для всіх локусів). Розподіл нащадків F₂ за сполученням алелів двох мікросателітних локусів, специфічних для хромосоми 2В, свідчить, що батьківські сполучення алелів переважають над рекомбінантними: 5 рослин із гаплотипом 208-254 та 8 рослин з гаплотипом 206-260 проти теоретично очікуваних двох рослин. Це відповідає факту розташування цих локусів на хромосомі 2В (рис. 1).

На невеликій відстані від локусів *Xwms429* та *Xbarc167* локалізовані два гени, що беруть участь у контролі воскової осуги, *W1* та *Iw1*. Проте запропоновані нами гаплотипи батьківських форм не завбачують розщеплення за цими генами, адже є однаковими за ними. Гаплотип 206-260 за мікросателітними локусами хромосоми 2 притаманний Авротичі 2 з восковою осугою. Якщо розщеплення за ознакою наявності/відсутності воскової осуги дійсно не має відношення до локусів *Xwms429* та *Xbarc167*, серед рослин F₂ з гаплотипом 206-260 теоретично очікується 6 зелених та 2 блакитні, насправді було 5 зелених та 3

блакитні, що не відрізняється від очікуваних кількостей (за точним критерієм Фішера, $P = 1,0$). Отже, за генами *W1* та *Iw1* розщеплення дійсно не відбувається, що підтверджує запропоновані нами гаплотипи батьківських рослин.

З праймерами до локусів, специфічних до хромосоми 2D, відбувається ампліфікація ДНК Авротики з геномом ААВВТТ, де геному D немає. Зважаючи на добре задокументоване явище transferability для різних геномів *Triticinae*, цілком легітимним є припущення, що локуси *Xbarc142*, *Xwms102* та *Xwms702* є специфічними не лише для хромосоми 2D, а й для хромосоми 2Т. При цьому не можна виключити також можливість ампліфікації ДНК хромосоми 2В з праймерами локусів, специфічних для хромосоми 2D. В такому випадку, зважаючи на хромосомну локалізацію п'яти мікросателітних локусів, що розглядаються (рис. 1), слід очікувати асоційованого успадкування алелів мікросателітних локусів, специфічних для хромосом 2В та 2D. Вивчення рослин F₂ за сумісним розщепленням за алелями мікросателітних локусів, специфічних для хромосом 2В та 2D, показало, що вони успадковуються незалежно один від одного. Це прямо вказує на те, що ампліфікація з праймерами до локусів хромосоми 2D відбувається з ДНК хромосоми 2Т, а не 2В.

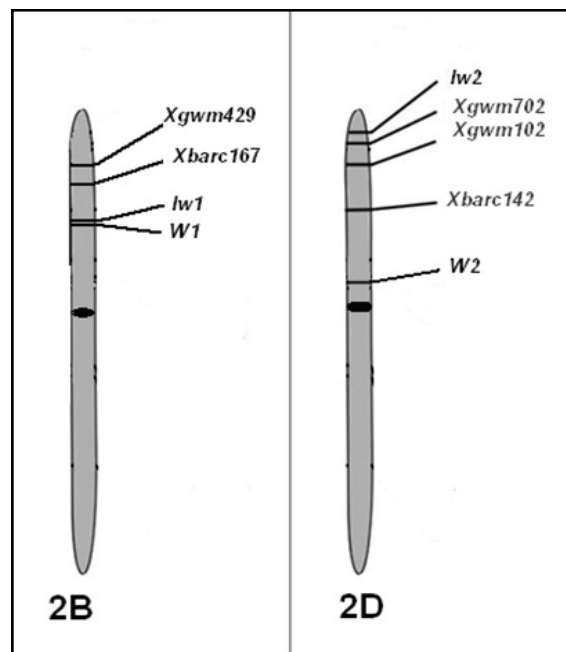


Рис. 1. Хромосомна локалізація мікросателітних локусів, що вивчалися, та генів воскової осуги (<http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/graingenes/browse.cgi?class=marker> [1, 9])

Перевірка незалежності успадкування трьох мікросателітних локусів, розташованих на хромосомі 2Т, не виявила зв'язку між локусами *Xbarc142* та *Xwms102*, *Xbarc142* та *Xwms702*, в той час як успадкування алелів локусів *Xwms102* та *Xwms702* у батьківських сполученнях переважало над незалежним їх успадкуванням. Рослин F_2 з гаплотипом 203 147, що він характеризує Авротику 1 зелену, було 5, а з гаплотипом 195 144, властивим Авротиці 2 блакитній – 4 замість теоретично очікуваних двох в обох випадках. Ці локуси розташовані поруч на карті хромосоми 2D, таке їхнє розташування зберігається на хромосомі 2Т.

З двох генів, *Iw2(T)* *Iw3(T)*, за якими, виходячи з запропонованих гаплотипів батьківських форм відбувається розщеплення, ми можемо дослідити на зв'язок з мікросателітними алелями лише ген *Iw2(T)*, оскільки ген *Iw3(T)* має бути розташований у хромосомі 1Т, яку ми не досліджували за допомогою мікросателітів. За локусом *Xwms102* блакитній Авротиці 2 властивий алель 195. Серед 8 рослин F_2 , гомозиготних за цим алелем, було 6 зелених та 2 блакитних та зелено-блакитних, які формуються генотипом *iw2(T) iw2(T)*. Саме такі кількості очікуються при незалежному успадкуванні локусів *Xwms102* та *Iw2(T)* (за точним критерієм Фішера, $P = 1,0$). Серед 10 рослин F_2 , гомозиготних за властивим тій самій формі алелем 268 локусу *Xbarc142*, було 6 зелених та 4 блакитних та зелено-блакитних, що не відрізнялось від очікуваних величин 8 та 2, відповідно (за точним критерієм Фішера, $P = 0,628$). Серед 10 рослин F_2 , гомозиготних за алелем 144 локусу *Xwms702*, властивого блакитній формі Авротики 2, було 2

зелених та 8 блакитних і зелено-блакитних рослин проти 8 та 2 очікуваних, відповідно (за точним критерієм Фішера, $P = 0,023$, різниця достовірна рівні значущості 0,05). Отже, ген *Iw2(T)* та локус *Xwms702* не характеризуються незалежним успадкуванням і можуть бути зчепленими у хромосомі 2Т.

Висновки

Беручи до уваги походження та структуру геному різних морфотипів Авротики, а також їхні гаплотипи щодо генів ортологічних серій *W* та *Iw*, слід вважати, що розщеплення відбувається за геном, розташованим у геномі Т, який замінив собою геном D м'якої пшениці. Ген позначено *Iw2(T)*. Контрастні за ознакою воскова осуга морфотипи геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротики відрізняються за одним (зелена – блакитно-зелена Авротики) та двома (зелена – блакитна Авротики) генами. В першому випадку відбувається мутація *Iw2(T) → iw2(T)* і після самозапилення утворюється зелено-блакитний морфотип. Для виникнення блакитного морфотипу потрібна ще одна мутація на додаток до першої: *Iw3(T) → iw3(T)* з наступним самозапиленням. Поява блакитних рослин серед нащадків зеленої Авротики 2 спостерігається регулярно, хоча для цього потрібно одночасне мутування в двох генах. Факт одночасного мутування в двох різних генах не може бути пояснений з позицій випадковості мутагенезу. Пояснення такому факту слід шукати у молекулярних подіях, які відбуваються під час стабілізації геному гібридного походження, а саме такими є геноми Авротики, геномно-заміщеного амфідиплоїда, в якому субгеномі А та В м'якої пшениці сполучається з геномом Т диплоїдного егілопу.

Література

1. Tsunewaki K., Ebana K. Production of near-isogenic lines of common wheat for glaucousness and genetic basis of this trait clarified by their use // *Genes and Genetic systems*. – 1999. – 74. – P. 33–41.
2. Dubcovsky J., Echaide M., Giancola S., Rousset M., Luo M.C., Joppa L.R., Dvorak J. Seed-storage-protein loci in RFLP maps of diploid, tetraploid, and hexaploid wheat // *Theor. Appl. Genet.* – 1997. – 95. – P. 1169–1180.
3. Liu B., Xu Ch., Zhao N., Qi B., Kimatu J.N., Pang J., Han F. Rapid genomic changes in polyploid wheat and related species: implications for genome evolution and genetic improvement // *J. Genet. Genomics*. – 2009. – 36. – P. 519–528.
4. Tiwari V.K., Rawat N., Neelam K., Kumar S., Randhawa G.S., Dhaliwal H.S. Random chromosome elimination in synthetic *Triticum-Aegilops* amphiploids leads to development of a stable partial amphiploid with high grain micro- and macronutrient content and powdery mildew resistance // *Genome*. – 2010. – 53, N 12. – P. 1053–1065.
5. Zhao N., Xu L., Zhu B., Li M., Zhang H., Qi B., Xu C., Han F., Liu B. Chromosomal and genome-wide molecular changes associated with initial stages of allohexaploidization in wheat can be transit and incidental // *Genome*. – 2011. – 54, N 8. – P. 692–699.
6. Жиров Е.Г. Геномы пшеницы: исследование и перестройка: Дис. ... докт. биол. наук: 03.00.15. – Краснодар. – 1989. – 366 с.

7. Шпильчин В.В., Антонюк М.З., Терновська Т.К. Фенотипний поліморфізм за ознакою воскова осуга серед представників підтриби *Triticinae* // Наукові записки НаУКМА. – 2010. – 106. Біологія та екологія. – 2011. – С. 3–8.
8. Шпильчин В.В., Терновська Т.К. Зміна прояву ознаки воскова осуга у генераціях амфідиплоїдів підтриби *Triticinae* // Наукові записки НаУКМА. – 2011. – Біологія та екологія. – 119. – С. 3–7.
9. Ganai M.W., Ruder M.S. Microsatellite and SNP markers in wheat breeding. Genomics-Assisted Crop Improvement. Genomic Applications in Crops. R.K. Varshney, R. Tuberosa Eds. – Springer, 2007. – 2. – P. 1–24.

SHPYLCHYN V.V., MARTYNENKO V.S., TERNOVSKA T.K.

National University of "Kyiv-Mohyla Academy",

Ukraine, 04070, Kyiv, Skovorody str., 2, e-mail: vshpylchyn@bigmir.net

GENETIC ANALYSIS OF AUROTICA (AABBTT) BASED ON GLAUCOUSNESS TRAIT

Aims. The aim of our work is to identify genotypes of the three morphotypes of genome-substituted Aurotica amphidiploids, which demonstrate permanent variation by the genes controlling the glaucousness trait.

Methods. Genetic analysis through crossing and assessment of segregating populations. PCR of genome DNA of alternative genotypes. **Results.** Haplotypes of contrasting morphotypes based on glaucousness trait: Aurotica green *iw3 W1 iw1 Iw2(T) Iw3(T)*, Aurotica green-blue *iw3 W1 iw1 iw2(T) Iw3(T)*, Aurotica blue *iw3 W1 iw1 iw2(T) iw3(T)*. Based on the results of SSR analysis *Iw2* is one of the segregated genes, which is located on T genome, not on B genome. **Conclusions.** Contrasting Aurotica morphotypes differ by one mutation *Iw2(T)→iw2(T)* (green – blue Aurotica) or two, the second mutation is *Iw3(T)→iw3(T)* (green – green-blue Aurotica).

Key words: glaucousness, microsatellite, amphidiploids.

УДК 575.2+575.222.73

ШТЕФІЮК Т.В., АНТОНІУК М.З.

Національний університет «Києво-Могилянська Академія» МОН України,

Україна, 04070, м. Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: m_antonyuk@yahoo.com

МІКРОСАТЕЛІТНИЙ АНАЛІЗ ХРОМОСОМ 6D ТА 7D ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ, СТІЙКИХ ДО БОРОШНИСТОЇ РОСИ

Найбільш ефективним заходом для боротьби з борошнистою росою пшениці є вирощування сортів з генетичною стійкістю до цього захворювання. На сьогодні на 18 хромосомах різних зразків м'якої пшениці локалізовано понад 40 локусів з різною кількістю алелів, що контролюють стійкість до борошнистої роси [1]. Більшість з ідентифікованих генів стійкості є компонентами системи ген-на-ген, це домінуючі гени *R*, які мають спеціальну назву *Pm* та обумовлюють вертикальну стійкість рослин. Стійкість, що цими генами забезпечується, швидко долається завдяки природній еволюції збудника. Особливо помітним цей процес є для генів стійкості, широко розповсюджених у світі, які входять до складу генома більшості сортів, стійких до борошнистої роси. Саме з цим пов'язана необхідність постійного поновлення запасу генів стійкості у генетичному пулі м'якої пшениці. Близько 30 з таких генів пов'язані

своїм походженням зі спорідненими до м'якої пшениці видами, проте лише 10 отримано від видів, які не мають спільних з м'якою пшеницею генів [1, 2]. Серед них гени *Pm12*, *Pm32* отримано від *Aegilops speltoides* [1] і вони зберігають свою ефективність тривалий час, *Pm39* – від *Ae. umbellulata*. Якщо геноми – донори та реципієнти гена стійкості є різними, це ускладнює передачу гена за рахунок рекомбінації, фрагмент з геном стійкості транслокується до реципієнтного генома, результати цього процесу не можна передбачити, а реципієнтний геном переживає певну перебудову, яка може відбиватися на його властивостях та має вивчатися. Мікросателітні локуси (SSR) можна використовувати для отримання уявлення про те, наскільки значно перебудувався геном інтрогресивних ліній, які отримали ген стійкості від генома, з яким не кон'югують хромосоми резидентного геному, стосовно інтактного реципієнтного генома [3].

Матеріали і методи

Гексаплоїдні цитологічно сталі та стійкі до борошнистої роси лінії м'якої пшениці є похідними одного з геномно-заміщених амфідиплоїдів з геномною формулою AABBXX, де AABB є тетраплоїдним компонентом м'якої пшениці сорту Аврора, а XX – геномом *Aegilops speltoides* у Авродесу (AABBSS), *Ae. sharonensis* у Аврозису (AABBS^{sh}S^{sh}) та *Ae. umbellulata* у Авролати (AABBUU) [4]. Вивчено ДНК сорту Аврора, амфідиплоїдів Авродес, Аврозис, Авролата, 18 ліній – похідних Авродесу, 3 ліній – похідних Аврозису, 12 ліній – похідних Авролати щодо спектру ампліконів з праймерами мікросателітних локусів, специфічних до хромосом 6D та 7D *Triticum aestivum* (рис. 1). Методику виділення ДНК та умови ПЛР оприлюднено [5]. Через малий обсяг вибірок статистичну обробку проводили з використанням точного критерію Фішера.

Результати та обговорення

Із всіх перевірених мікросателітних локусів, специфічних до хромосом 6D та 7D, було обрано 5, 3, 4 та 4 таких, що давали різний продукт ампліфікацій на ДНК Аврори та геномно-заміщених амфідиплоїдів та були декларовані при їхньому створенні як специфічні, відповідно, до 6DS, 6DL, 7DS, 7DL. Очікувалось, що вони не даватимуть продуктів ампліфікації на ДНК амфідиплоїдів, позбавлених геному D. Це виявилось вірним зі всіма локусами хромосоми 6D (табл. 1) та локусами *Xcfd41*, *Xbarc111*, *Xbarc53*, *Xcfd69* хромосоми 7D для ДНК Авролати та локусами хромосоми 6D *Xcfd42*, *Xcfd287*, *Xcfd60* та *Xbarc111*, *Xbarc53*, *Xcfd69* хромосоми 7D для Авродеса. ДНК Аврозиса не дала продукт майже по всім локусам, за виключенням *Xcfd42*, *Xbarc96*, *Xgwm44*, *Xcfd69*.

Статистично значущої різниці у наявності/відсутності продукту ампліфікації між трьома амфідиплоїдами встановлено не було ($P = 0,031$ та $P = 0,459$ для хромосом 6D та 7D, відповідно). Лише три локуси, *Xcfd60-6D*, *Xbarc111-7D*, *Xbarc53-D*, виявилися специфічними до відповідних хромосом, з праймерами локусу *Xgwm44* було отримано продукт з ДНК всіх амфідиплоїдів. Ампліфікацію ДНК з праймерами локусів, специфічних до геному D, якого немає у амфідиплоїдів може бути викликано будь-яким з двох чинників: локуси, задекларовані як специфічні для геному D, можуть бути у наявності в інших геномах, в тому числі

субгеномах A та B пшениці, та геномах S, S^{sh}, U; локуси є специфічними до D-геному, проте геноми амфідиплоїдів перебудовані настільки, що сегменти D-хромосом присутні як транслокації на хромосомах інших субгеномів. Друга причина здається нам мало ймовірною, оскільки перевірка кон'югації хромосом в мейозі МКП амфідиплоїдів не рееструвала наявність мультивалентів, які б мали бути за наявності транслокованих хромосом [6]. Отже, йдеться про не специфічність локусів до D геному. Тим не менш, вони можуть бути корисними для вивчення ліній щодо аналогічності їхнього генотипу рекурентному генотипу Аврора, тому що поява у спектрі амфідиплоїда продукту ампліфікації, не властивого ДНК Аврори, свідчить, що ампліфікується геном, якого у Аврори немає, тобто S, S^{sh} або U.

Характеристики стійких ліній показали, що жодна з них за набором SSR-локусів для хромосом 6D та 7D не відповідає ні Аврорі, ні відповідному амфідиплоїду (табл. 1). Це може бути доказом того, що жодна лінія не має повного чужинного заміщення 6D чи 7D або хоча б одного плеча. Судячи з набору алелів SSR-локусів (рис.), хромосоми виглядають перебудованими, такими, що включають сегменти хромосоми D-геному та чужинної хромосоми. Проте раніше нами вже було показано на групі інтрогресивних ліній, ретельно проаналізованих щодо обсягу включень. Результати скрикування чужинного хроматину з застосуванням мікросателітного та цитологічного аналізу [7] та у дослідженні хромосоми 3D, побудованому аналогічно даному дослідженню [5], що результати мікросателітного аналізу не бувають однозначними, коли досліджуються геноми гібридного походження.

Як і при вивченні ліній за хромосоною 3D [5], спостерігали велику кількість нових алелів, в тому числі утворення 0-алелів, коли такий алель не був властивий жодному з компонентів вихідного схрещування. З 16 вивчених локусів нових алелів не було лише в двох, *Xcfd60-6D* та *Xcfd41-7D*. Обидва розташовані усередині плечей. Крім того, спостерігали гетерозиготні генотипи (табл. 2). Порівняння ліній, що пішли від Авродеса та від Авролати за картиною змін проте очікуваної наявності батьківських алелів в будь-якому сполученні, показало, що статистично процес утворення нових алелів не характеризується видоспецифічністю (табл. 2, останній рядок).

Таблиця 1. Характеристика інтрогресивних ліній за мікросателітними локусами, специфічними до хромосом 6D та 7D. 0 – ампліфікація не відбулася, 1 – алель, притаманний Аврорі, 2 – алель, притаманний генотипно-заміщеному амфідиплоїду, н – новий алель, г – гетерозигота

Амфідиплоїди та лінії, що від них походять	SSR-локуси локалізовані на 6D								SSR-локуси локалізовані на 7D							
	<i>Xbarc173</i> S	<i>Xcfd42</i> S	<i>Xcfd132</i> S	<i>Xbarc196</i> S	<i>Xcfd287</i> S	<i>Xcfd95</i> L	<i>Xcfd60</i> L	<i>Xbarc96</i> L	<i>Xwmc506</i> S	<i>Xcfd41</i> S	<i>Xbarc154</i> S	<i>Xgwm44</i> S	<i>Xbarc172</i> L	<i>Xbarc111</i> L	<i>Xbarc53</i> L	<i>Xcfd69</i> L
Авродес	1	0	1	1	0	2	0	1	2	2	2	2	2	0	0	0
3	н1	1	1	1	0	2	1	1	1	1	1	2	1+н1	1	1	1
3-1	н1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	2	н1	1	0	1	1
4	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	2	2	1	0	1	1
7	1+н2	1	1	н1	0	2	1	1	н1	1	1	н3	2+н1	н1	1	1
12-1	1	1	1	1	0	2	1	1	1	1	2	н1	1	1	1	1
25	1	1	1	н1	0	2	1	1	н2	0	2	1	1+н1	н1	1	1
33-2	1	1	1	н1	0	2	1	1	н1	1	1	г1	н2	1	1	1
38	н3	1	1	1	0	1	н1	1	1	1	1	г2	н1	н2	1	1
39	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	г1	1	н1	1	н1
53	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	н4	1	1	1	н1
55	1	1	1	1	0	2	1	1	н1	0	2	г2	0	0	1	1
70	1	1	1	1	0	2	1	1	1	1	1	г2	н2	н1	1	1
83	0	1	1	1	0	2	1	0	1	1	2	н2	н1	1	1	0
1092	н3	1	1	н1	0	2	1	1	1	1	1	н5	1	1	1	1
1105-1	1	1	1	н1	0	2	1	1	1	1	1	1	н3	1	1	1
1106	1	1	1	н1	0	2	1	1	1	1	1	г1	н3	н3	0	1
1112	1	1	0	н2	0	1	0	н1	1	0	2	н5	0	0	0	1
1114	1+н2	1	1+н1	1+н2	0	1	н2	н2	н1	1	1	г1	1	0	1	1
Аврозис	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	2
113	1	0	1	1	н1	1	1	н1	1	1	н1	1	н	1	1	1
141	1+н	0	1	1	0	1	н1	1	1	1	1	1	н	1	1	1
143	1	н	н	н	н2	1	1	2	1	1	1	г	1	1	1	1
Авролата	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	2	0	0	0
166	н1	0	1	1	0	1	1	н1	1	1	1	1	1	1	1	1
190	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
206	н1	0	1	1+н	0	1	1	1	1	1	1	н1	1	1	н1	1
207	1	0	1	н1	0	1	1	н1	1	1	1	1	1	н1	н2	1
212-2	н1	0	н1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
215	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	н2	1	1	1	1
216-3	1	н1	1	н1	0	1	1	н1	1	1	1	1	1	1	0	1
217	1	н1	н1	н1	0	1	1	1	1	1	н2	1	1	1	1	1
221-1	1	0	н1	н1	0	1	1	н1	1	1	н2	1	1	0	0	1
221-2	н1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	н2	н1	1	1	1
222	1	н1	1	н1	0	1	1	н1	1	1	1	1	1	1	1	1
254	0	1	н1	0	0	1	0	н1	0	0	0	0	0	0	0	1
2599	н2	1	1	1	0	1	1	н2	1	1	1	1	н2	1	1	1

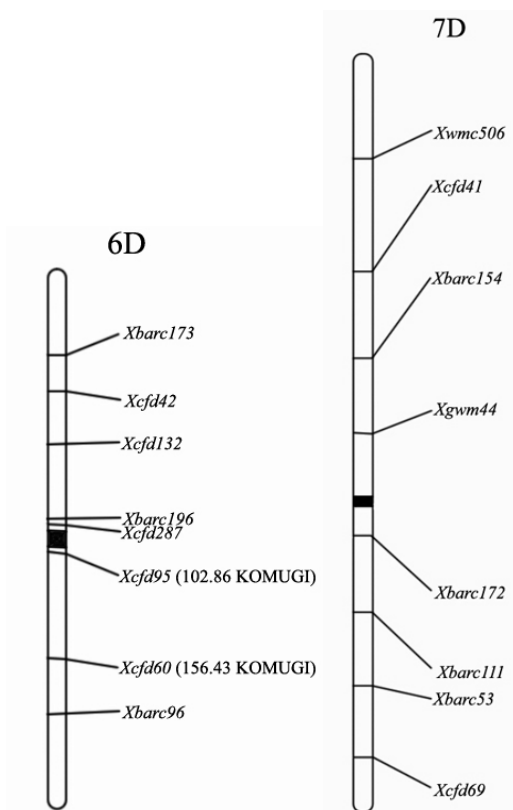


Рис. Розташування вивчених SSR-локусів на хромосомах 6D та 7D

Таблиця 2. Мінливість за мікросателітними локусами в інтрогресивних лініях та імовірність (P) розбіжностей за мінливістю між сукупністю ліній різного походження

Алель	SSR-локуси локалізовані на 6D								SSR-локуси локалізовані на 7D							
	<i>Xbarc173 S</i>	<i>Xcfd42 S</i>	<i>Xcfd132 S</i>	<i>Xbarc196 S</i>	<i>Xcfd287 S</i>	<i>Xcfd95 L</i>	<i>Xcfd60 L</i>	<i>Xbarc96 L</i>	<i>Xwmc506 S</i>	<i>Xcfd41 S</i>	<i>Xbarc154 S</i>	<i>Xgwm44 S</i>	<i>Xbarc172 L</i>	<i>Xbarc111 L</i>	<i>Xbarc53 L</i>	<i>Xcfd69 L</i>
Кількість ліній – похідних Авродесу з певними алелями																
батьківський	8	18	16	9	18	18	16	12	13	14	18	4	7	12	18	18
новий	4	0	0	7(2)	0	0	2(2)	2(2)	5(2)	4	0	7	6	6(3)	0	0
0-алель	4	0	1	1	0	0	0	4	0	0	0	0	2	0	0	0
гетерозигота	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	7	3	0	0	0
Кількість ліній – похідних Авролати з певними алелями																
батьківський	8	9	9	7	13	13	13	6	12	13	9	7	10	12	11	13
новий	5(2)	4(2)	4	5				7(2)			3(2)	3(2)	2(2)	1	2(2)	
0-алель									1		1	3	1			
гетерозигота				1												
P	0,47	0,02	0,21	1,0	1,0	1,0	0,50	0,29	0,36	0,12	0,02	0,13	0,07	0,19	0,17	1,0

Щодо розташування мікросателітного локусу на хромосомі, результати не можна трактувати однозначно. Так, при порівнянні співвідношення між батьківськими та новими алелями мікросателітів статистичну різницю на користь припущення, що прицентромерним мікросателітам притаманна стабільність, було встановлено для обох плечей хромосоми 6D для ліній – похідних Авродеса ($P = 0,003$ для короткого та $P = 0,019$ для довгого), але лише для довгого плеча ($P = 0,005$) для ліній – похідних Авролати. Для мікросателітів хромосоми 7D в жодному з чотирьох порівнянь значущої різниці не було.

Мінливість усередині мікросателітних повторів взагалі підвищена у порівнянні з іншими локусами. Сама повторювана природа таких локусів збільшує частоту мутування в їхніх межах під час реплікації та кросинговеру. Гібридна природа геномів інтрогресивних ліній, в яких відбувається інтенсивний процес молекулярної стабілізації та активується рух транспозонів, по-видимому, очевидно є ще одним чинником виникнення нових, щодо батьківських, алелів мікросателітів. Тому, результати мікросателітного аналізу не можна трактувати однозначно при вивченні геномів таких ліній. Свідчити на користь факту заміщення пшеничної хромосоми або її плеча чужинними гомологами без даних цитологічного аналізу вони не можуть, проте цілком придатні для визначення гомологічної належності чужинного хроматину. Крім того, розташування на хромосомі мікросателітного локусу, за яким лінії демонструють алель, властивий амфідиплоїду, дає можливість оцінити розмір фрагмента пшеничної

хромосоми, заміщений на чужинний, а від цього залежить цінність лінії як потенційного джерела чужинного гена стійкості.

Висновки

Інтрогресивні лінії м'якої пшениці, стійкі до борошнистої роси, мають включення чужинного хроматину замість пшеничного хроматину хромосом 6D та 7D трьох видів егілопсу. Лінії характеризуються алельним поліморфізмом за вісьмома локусами, специфічними для хромосоми 6D та такою ж кількістю – для 7D. Специфічність вивчених локусів для D геному обмежена. Для багатьох з них показана можливість ампліфікації ДНК геномів егілопсів. Алельний поліморфізм ліній виходить за межі, встановлені генотипами батьківських форм, що брали участь в їхньому створенні. Зареєстровано наявність нових у порівнянні з батьківськими генотипами алелів мікросателітних локусів. Рівень алельної мінливості за вивченими локусами хромосом 3D та 7D виявився однаковим для груп інтрогресивних ліній, що мали інтрогресії від *Ae. speltoites* та *Ae. umbellulata*. Оскільки алельний поліморфізм серед ліній виходить за межі батьківських форм ініціальних гібридів, він не може бути пояснений лише прямою інтрогресією чужинного хроматину до геному м'якої пшениці. Результати аналізу варто використовувати для встановлення хромосомної локалізації гена (генів) стійкості ліній до борошнистої роси через скринювання популяцій, що розщеплюються, від схрещування стійких ліній одна з одною та генотипом Аврора, а також для ідентифікації мікросателітного маркера гену стійкості хоча б в межах чужинного фрагменту хроматину.

Література

1. McIntosh R.A., Yamazaki Y.Y., Dubkovsky J. et al. Catalogue of gene symbols for wheat / 12th International Wheat Genetics Symposium, 8–13 September, 2013.
2. Gill B.S., Friebe B., Raupp W.J. et al. Wheat Genetics Research Center: the first 25 years // *Advances in Agronomy*. – 2006. – 89. – P. 73–136.
3. Ayala-Navarrete L., Thompson N., Ohm H., Anderson J. Molecular markers show a complex mosaic pattern of wheat-*Thinopyrum intermedium* translocations carrying resistance to YDV [Електронний ресурс] // *Theor. Appl. Genet.* – 2010. – Режим доступу: DOI 10.1007/s00122-010-1365-y.
4. Антонюк М.З., Терновська Т.К. Створення чужинно-заміщених ліній м'якої пшениці методом «змішування» хромосом у межах одного субгеному // *Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть*. – Київ: Логос, 2001. – 2. – С. 368–375.
5. Антонюк М.З., Штефюк Т.С., Терновська Т.К. Поліморфізм інтрогресивних ліній м'якої пшениці за алелями мікросателітних локусів // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. – Київ: Логос, 2013. – 12. – С. 97–101
6. Жиров Е.Г., Терновская Т.К. Геномная инженерия у пшеницы // *Вестник с.-х. науки*. – 1984. – № 10. – С. 58–66.

7. Antonyuk M.Z., Bodylyova M.V., Ternovskaya T.K. Genome structure of introgressive lines *Triticum aestivum/Aegilops sharonensis* // Cytology and Genetics. – 2009. – 43. – N 6. – C. 58–67.

SHTEFYUK T.V., ANTONYUK M.Z.

*National University of Kyiv-Mohyla Academy, MONMS Ukraine,
Ukraine, 04070, Kyiv, G. Skovorody str., 2, e-mail: m_antonyuk@yahoo.com*

THE SSR ANALYSIS OF 6D AND 7D CHROMOSOMES OF INTROGRESSIVE WHEAT LINES RESISTANT TO POWDERY MILDEW

Aims. Evaluation of polymorphism of wheat lines with introgressions from *Aegilops* species for microsatellite loci specific to 6D and 7D chromosomes. **Methods.** PCR of genome DNA with primer of specific SSR-loci. **Results.** The allelic polymorphism for SSR-loci of introgressive lines exceeds the limits, which determines by genotypes of parental genotypes. New alleles that are uncharacteristic to parental genotypes were reveal. Investigated loci have limited specificity to D genome. **Conclusions.** Polymorphism of SSR loci limits the potential of their use for investigation of introgressive lines genome structure. Microsatellites can be used for screening segregating populations taking into consideration the possibility of new allele appearance.

Key words: microsatellite analysis, SSR alleles, introgressive wheat lines, powdery mildew.

УДК 576.3; 576.523

АНАНЬИНА Т.В., СТЕГНИЙ В.Н.

Научно-исследовательский институт биологии и биофизики Томского государственного университета,

Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36, e-mail: tany_a@list.ru

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА И КОЛЬЦЕВЫХ КАНАЛОВ ПИТАЮЩИХ КЛЕТОК *CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA* В ООГЕНЕЗЕ

Изучение оогенеза вносит существенный вклад в наше понимание механизмов, лежащих в основе процессов пролиферации и дифференцировки. Половые клетки часто развиваются в составе синцитиальных кластеров [1–3]. Оогенез в политрофных овариолах двукрылых насекомых начинается с асимметричного деления стволовых клеток: формируется дочерняя стволовая клетка и цистобласт, который затем подвергается нескольким раундам неполных митозов, в результате чего формируются группы из нескольких клеток, в которой одна из клеток дифференцируется в ооцит, а остальные начинают выполнять трофическую функцию – становятся питающими клетками (трофоцитами) [4, 5]. Ранний оогенез у двукрылых насекомых является привлекательной моделью для изучения формирования паттернов синцитиальных кластеров, и дифференцировки клеток в их пределах.

Деление стволовых клеток и формирование кластеров (цист генеративной линии) происходит в переднем отделе овариолы – гермарию. На начальных стадиях образования цисты важную роль в этом процессе играет внутриклеточная цитоскелетная структура – фусома. Фусома формируется в областях цитоплазматических мостиков и объединяет клетки кластера. С фусомой ассоциирован один из полюсов веретена деления при очередном делении клетки [6]. После того, как цистообразующие митозы завершились, фусома деградирует [7] и функцию обеспечения целостности и нормального функционирования многоклеточной цисты начинает выполнять цитоскелет входящих в её состав клеток. Ключевая роль в выполнении этой функции принадлежит кольцевым каналам – цитоскелетным образованиям, которые формируются во время митозов в местах неполного цитокинеза и обеспечивают свободный отток

цитоплазмы и нарабатываемых трофоцитами веществ в ооцит [8, 9]. Изменения, происходящие в актиновом цитоскелете трофоцитов во время оогенеза, направлены на поддержание формы клеток (кортикальный слой актина), обеспечение связи между клетками (кольцевые каналы) и нормального протекания процесса демпинга – быстрого выброса цитоплазмы питающих клеток в ооцит на заключительных этапах оогенеза (цитоплазматические актиновые фибриллы).

Исследования, проведенные нами ранее, показали сходство в строении овариол *C. erythrocephala* и *D. melanogaster* [10]. Также были изучены стадии формирования 16-ти клеточных кластеров в гермарию и показаны различия в рисунке связей клеток в разных цистах, который закладывается при формировании каждой цисты во время следующих друг за другом цистообразующих митозов. Рисунок связей между клетками (положение кольцевых каналов) фиксируется при смещении кластера в область гермарию 2b и остается неизменным в процессе роста и функционирования клеток в яйцевой камере [11]. Целью настоящего исследования было изучение изменения актинового цитоскелета синцитиальных кластеров в яичниках *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae) на разных стадиях оогенеза.

Материалы и методы

C. erythrocephala из природной популяции г. Томска культивировали при 25 °С и длительности освещения 14 ч. в сут. В анализе использовали яичники самок имаго в возрасте от 1 до 7 сут. после выхода из пупария.

Овариолы были выделены в PBS и зафиксированы в 4% параформальдегиде (Sigma-Aldrich) в PBS 20 мин. Затем овариолы были инкубированы в 4% параформальдегиде в PBS с 0,1% Triton X-100 на протяжении 20 мин. при RT. Овариолы были окрашены раствором

фаллоидина, конъюгированного с FITC (Sigma) (1:100) в 4% параформальдегиде в PBS с 0,1% Triton X-100 20 мин. в темноте. После окрашивания овариолы были отмыты три раза по 5 мин. в PBS. Все процедуры проводились в микропробирках, объемом 1,5 мкл. Отдельные овариолы были помещены на предметное стекло в каплю DAPI-VECTASHIELD и накрыты покровным стеклом.

Анализ и регистрацию результатов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа AxioImager Z.1 (Zeiss, Германия), CCD-камеры AxioCam и программного обеспечения AxioVision LE Rel. 4.5. Серии оптических срезов объемных препаратов получали с использованием модуля ApoTome (Zeiss). В программном модуле In Side 4D делали графическую реконструкцию части оптических срезов и анализировали трехмерные модели отдельных яйцевых камер, клеток и ядер.

Результаты и обсуждение

Актиновый цитоскелет трофоцитов и ооцита *C. erythrocephala* состоит из слоя кортикального F-актина, выстилающего внутреннюю поверхность клеточных стенок, актиновых фибрилл, находящихся в цитоплазме и актин-содержащих структур – кольцевых каналов. В процессе оогенеза происходят изменения всех трех составляющих актинового цитоскелета.

В германии фаллоидином интенсивно окрашиваются кольцевые каналы цист. Кортикальный актин в цистоцитах выражен слабо (рис. а). В среднем оогенезе на внутренней поверхности клеточных стенок ооцита и питающих клеток выявляются скопления актиновых филаментов, которые образуют многочисленные глыбки. На этой стадии кольцевые каналы, соединяющие трофоциты с ооцитом и трофоциты между собой, и области плазматической мембраны вокруг них морфологически сходны (рис. б, в). Затем области вокруг кольцевых каналов начинают укрепляться – формируется ореол из актиновых фибрилл, который придает кольцевому каналу дополнительную прочность (рис. г). Возле кольцевых каналов трофоцитов, контактирующих с ооцитом, по направлению к ядрам трофоцитов начинает формироваться сеть из толстых актиновых фибрилл. Эти конусы удерживают ядра трофоцитов не позволяя им заблокировать кольцевые каналы во время демпинга (рис. д).

В норме кольцевые каналы имеют

круглую форму. Утолщение краев кольцевых каналов и областей мембраны вокруг них путем интеграции актина и других дополнительных белков – фосфотирозина, аддуцина, Hts, Kelch и др. [12], направлено на поддержание максимального диаметра отверстий. Это важно для обеспечения оттока цитоплазмы и перемещения синтезируемых в питающих клетках продуктов в ооцит.

В овариолах старых мух встречаются яйцевые камеры с измененным количеством клеток в кластере и неправильно сформировавшимися кольцевыми каналами (рис. е). Такие каналы встречались чаще в яйцевых камерах с числом клеток меньше или больше 16-ти, т.е. в цистах, сформировавшихся в результате одного, двух, трех или пяти митотических делений. Нарушения в формировании актинового валика выражаются в изменении формы канала, в различной степени незамкнутости актинового валика, частичном расслоении или дополнительной полимеризации F-актина во внутренней области канала, которая может привести к практически полному закрыванию просвету канала (рис. е').

Дополнительная полимеризация актина вокруг кольцевых каналов и формирование актиновых филаментов в цитоплазме трофоцитов на поздних стадиях оогенеза характерны и для *D. melanogaster*: во время стадии оогенеза 10В от плазмалеммы в сторону ядер начинают полимеризоваться актиновые филаменты, образующие толстые пучки, фиксирующие ядра трофоцитов в центральной области клетки и не позволяющие им приблизиться к кольцевым каналам во время демпинга [13].

У *C. erythrocephala* на поздних стадиях оогенеза цитоплазматические пучки актина выражены в меньшей степени – они образуются только в непосредственной близости к кольцевым каналам между ооцитом и трофоцитами.

В исследованиях на дрозофиле показано, что белок Kelch играет роль в интеграции актина и белка HTS в формирующемся кольцевом канале. У Kelch-мутантов наблюдается образование диффузного массива актина в просвете канала [12]. Похожие нарушения мы наблюдали и у *C. erythrocephala*. Процесс формирования кольцевых каналов и их белковый состав консервативны [14], и дефекты кольцевых каналов у *C. erythrocephala*, вероятно, являются следствием тех же нарушений, которые происходят в оогенезе дрозофилы [12, 13, 15].

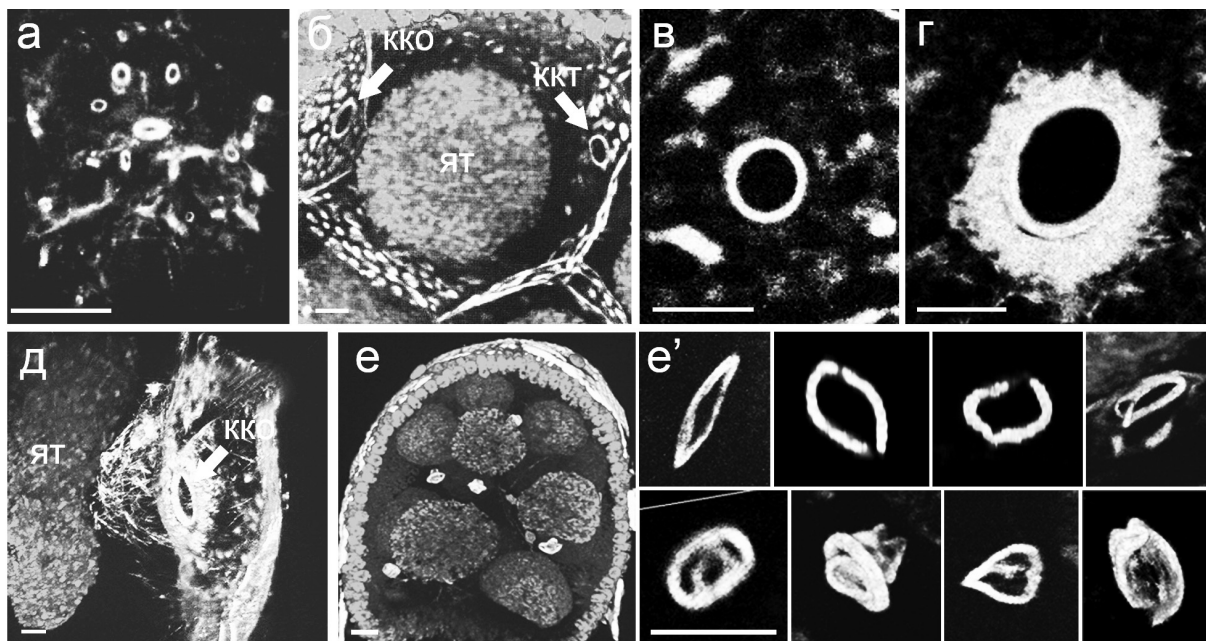


Рис. Актиновый цитоскелет синцитиальных кластеров ооцит-трофобласта в овариолах *C. erythrocephala*. а – кольцевые каналы цисты из региона гермария 2а; б – трофобласт, контактирующий с ооцитом; в – морфология кольцевого канала между двумя трофобластами; г – дополнительная полимеризация актина вокруг кольцевого канала; актиновые фибриллы вокруг кольцевого канала, соединяющего ооцит и трофобласт; е – фолликул с аномальными кольцевыми каналами; е' – примеры нарушений в формировании актинового валика кольцевых каналов. ККО – кольцевой канал между ооцитом и трофобластом; ККТ – кольцевой канал между двумя трофобластами; ЯТ – ядро трофобласта. Шкала – 20 мкм

Выводы

Изменения актинового цитоскелета в цистах из овариол яичников *C. erythrocephala* являются частью целого комплекса изменений, происходящих во время оогенеза. Увеличение количества F-актина в областях вокруг кольцевых каналов связано с ростом синтетической активности трофобластов и

направлено на обеспечение беспрепятственного оттока цитоплазмы из трофобластов в ооцит. Изменение формы и пропускной способности кольцевых каналов может являться следствием нарушения процесса формирования цист генеративной линии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта НШ-1279.2014.4.

Литература

1. Matova N., Cooley L. Comparative aspects of animal oogenesis // *Developmental Biology*. – 2001. – 231. – P. 291–320.
2. ЂwiNetek P., Kubrakiewicz Ja., Klag J. Formation of germ-line cysts with a central cytoplasmic core is accompanied by specific orientation of mitotic spindles and partitioning of existing intercellular bridges // *Cell Tissue Res*. – 2009. – 337, N 1. – P. 137–148.
3. Haglund K., Nezis I.P., Stenmark H. Structure and functions of stable intercellular bridges formed by incomplete cytokinesis during development // *Communicative & Integrative Biology*. – 2011. – 4, N 1. – P. 1–9.
4. Koch E.A., King R.C. The origin and early differentiation of the egg chamber of *Drosophila melanogaster* // *J. Morphol.* – 1966. – 119. – P. 283–304.
5. King R.C. *Ovarian Development in Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York, 1970. – 227 p.
6. de Cuevas M., Spradling A.C. Morphogenesis of the *Drosophila* fusome and its implications for oocyte specification // *Development*. – 1998. – 125. – P. 2781–2789.
7. Snapp E.L., Iida T., Frescas D., Lippincott-Schwartz J., Lilly M.A. The Fusome mediates intercellular ER connectivity in *Drosophila* ovarian cysts // *Mol Biol Cell*. – 2004. – 15, N 10. – P. 4512–4521.
8. Robinson D.N., Cooley L. Stable intercellular bridges in development: the cytoskeleton lining the tunnel // *Trends Cell Biol*. – 1996. – 6, N 12. – P. 474–479.
9. Greenbaum M.P., Iwamori T., Buchold G.M., Matzuk M.M. Germ cell intercellular bridges [Электронный ресурс] // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2011. DOI 10.1101/cshperspect.a005850.

10. Anan'ina T.V., Vedernikov A.E., Khodzhanov A.E., and Stegnii V.N. Development of ovarioles and nurse cell cytoskeleton in *Calliphora erythrocephala* Mg (Diptera: Calliphoridae) // Cell and Tissue Biology. – 2010. – 4, N 2. – P. 192–198.
11. Anan'ina T.V., Kokhanenko A.A., Stegnyy V.N. Cyst geometry in the egg chambers of *Calliphora erythrocephala* Mg. (Diptera: Calliphoridae) ovaries [Электронный ресурс] // Protoplasma. – 2013. DOI 10.1007/s00709-013-0593-9.
12. Robinson D.N., Cant K., Coole L. Morphogenesis of *Drosophila* ovarian ring canals // Development. – 1994. – 120. – P. 2015–2025.
13. Guild G.M., Connelly P.S., Shaw M.K., Tilney L.G. Actin filament cables in *Drosophila* nurse cells are composed of modules that slide passively past one another during dumping // J Cell Biol. – 1997. – 25, N 138 (4). – P. 783–797.
14. Cell-cell channels. Edited by: Baluska F., Volkmann D., Barlow P. – Landes Bioscience & Shpringer Science, 2006. – 319 p.
15. Li M., Serr M., Edwards K., Ludmann S., Yamamoto D., Tilney L.G., Field Ch.M., Hays T.S. Filamin is required for ring canal assembly and actin organization during *Drosophila* oogenesis // The Journal of Cell Biology. – 1999. – 146, N 5. – P. 1061–1073.

ANAN'INA T.V., STEGNIY V.N.

*Research Institute of Biology and Biophysics, Tomsk State University,
Russia, 634050, Tomsk, Lenin str., 36, e-mail: tany_a@list.ru*

CHANGE OF THE ACTIN CYTOSKELETON AND RING CHANNELS IN THE NURSE CELLS CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA IN OOGENESIS

Aims. The purpose of this study was to investigate changes of the actin cytoskeleton syncytial clusters in ovaries *C. erythrocephala* at different stages of oogenesis. **Methods.** Ovarioles were stained phalloidin-FITC and DAPI. Series of optical sections were obtained using fluorescent microscope Axiomager Z.1 and module ApoTome (Zeiss). In a software module In Side 4D doing graphic reconstruction of the optical sections and analyzed by three-dimensional models of individual egg chambers, cells and nuclei. **Results.** We studied the changes that occur in the actin cytoskeleton cysts in different stages of oogenesis. The changes in the morphology of the ring channels which occur during normal oogenesis and violations in the formation of ring canals in the wrong formation of cysts. **Conclusions.** Increasing amounts of F-actin in the areas around the ring channels associated with an increase in synthetic activity of nurse cells and is aimed at ensuring the smooth movement of the cytoplasm of the nurse cells into the oocyte. Changing the shape and bandwidth ring channels may be a consequence of a breach of the formation of cysts in germarium.

Key words: *Calliphora erythrocephala*, oogenesis, ring channels, actin cytoskeleton.

УДК 575.1:581.163:577.151.64:633.413:577.213

ВИНИЧЕНКО Н.А., КИРИКОВИЧ С.С., ЛЕВИТЕС Е.В.

Институт цитологии и генетики СО РАН,

Россия, 630090, г. Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 10, e-mail: levites@bionet.nsc.ru

ВЛИЯНИЕ ВОЗРАСТА ЛИСТЬЕВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ НА ПЦР-ПРОФИЛИ ФЕРМЕНТНЫХ ГЕНОВ

В настоящее время большое внимание уделяется изучению молекулярных механизмов, лежащих в основе наблюдаемых у растений изменений экспрессии генов под действием различных внутренних и внешних условий. Удобными маркерными локусами для таких исследований являются гены, контролирующие ферменты. Для изучения полиморфизма ДНК районов хромосом, содержащих маркерные ферментные гены, нами был предложен

модифицированный метод ISSR-амплификации (inter-simple sequence repeat, «между повторяющихся простых последовательностей»). В отличие от исходного оригинального метода, мы использовали в паре с микросателлитным праймером праймер, специфичный к локусу ферментного гена. Это упростило выявляемый на электрофореграмме профиль ПЦР-продуктов и позволило нам выявлять различия между ПЦР-профилями,

полученными от растений, гомозиготных по одному и тому же аллелю ферментного локуса [1–3]. Этот факт указывает на высокую чувствительность примененной методики и на возможность её использования для изучения организации ферментного локуса при различных внешних и внутренних условиях. При помощи такой модификации ISSR-амплификации нам удалось выявить тканевые различия ПЦР-профилей ферментных локусов [4]. Этот факт указывает на то, что в процессе дифференцировки происходит некий процесс изменения организации ДНК. Характерно, что процесс этот различен в разных тканях. Эти представления хорошо согласуются с известными данными о влиянии типа ткани и её возраста на содержание ДНК в соматических клетках [5, 6]. В последующих исследованиях мы рассмотрели динамику изменения ПЦР-профилей ферментных генов в процессе прорастания семян [7]. Было обнаружено, что по мере того, как из зародыша развивается растение, происходит изменение структуры ДНК (дифференцировка) по совершенно четкой программе. Эти изменения не затрагивают первичную структуру гена, поскольку изменений в электрофоретической подвижности ферментов замечено не было. Сбой в программе «дифференцировки» ДНК приводит к гибели зародыша. Это можно было видеть на ДНК непроросших семян, у которых ПЦР-профили либо соответствовали профилям живых зародышей самых первых суток проращивания, либо качественно отличались от профилей нормально развивающихся зародышей [5]. Это говорит о том, что программа развития либо останавливается на ранней стадии, либо онтогенетическое изменение структуры ДНК проходит неправильно и приводит к гибели зародыша. Возникает вопрос: ограничивается ли процесс «дифференцировки» ДНК только начальными стадиями развития растения, или подобные процессы происходят и во взрослом растении? Для ответа на этот вопрос представляет интерес исследование ПЦР профилей листьев разного возраста одного и того же взрослого растения.

Материалы и методы

Растительный материал. В исследование были взяты растения двух разных агамоспермных потомств сахарной свеклы, обозначенных рабочими номерами как 11-2 и 12-2. Данные потомства были получены на пыльцестерильных растениях под бязевыми изоляторами в 2004 году. Для выделения ДНК с

индивидуального растения брали по три образца из разных листьев: 1) самый молодой, еще не раскрывшийся лист, обозначаемый нами как лист первой пары, 2) третий по возрасту лист из третьей пары, 3) самый старший на момент взятия пробы лист. Были взяты растения с разными фенотипами по ферментам.

Выделение ДНК, ПЦР-амплификация. Суммарную ДНК растений выделяли из 200 мг свежих листьев стандартным СТАВ-методом [8].

Для проведения ПЦР-амплификации были использованы следующие специфические праймеры:

adh1r (5'-act(ct)a-cagca-ag(ct)cc-(ct)ac(ct)g-ctcc-3'), специфичный к локусу *Adh1*, кодирующему алкогольдегидрогеназу-1,

malic1 (5'-tgtac-ggtga-agata-ctgcc-ac-3'), специфичный к локусу *Mel1*, кодирующему цитозольный малик-фермент-1,

gpi1 (5'-cttcg-acagt-aatcc-t-3'), специфичный к локусу *Gpi1*, кодирующему глюкозофосфатизомеразу-1 (GPI1) свеклы,

got1 (5'-cagat-ggtgg-tgaat-g-3'), специфичный к локусу *Got1*, контролирующему глутаматоксалоацетаттрансаминазу-1.

В паре с каждым специфическим праймером использовался микросателлитный *Mic2* (5'-gacag-acaga-cagac-a-3').

ПЦР-реакцию проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10–200 нг суммарной ДНК, 65 mM трис-HCl (pH 8,0), 16 mM (NH₄)₂SO₄, 0,05% твин-20, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM каждого из dNTP, 1мкМ каждого праймера, 2,5 ед. акт. *Taq*-полимеразы. Был использован следующий температурный режим:

Предварительная денатурация – 94 °C (4 мин.). Далее 30 циклов – 94 °C (1 мин.), 52 °C (42 сек.), 72 °C (4 мин.). Последний цикл – 72 °C (7 мин.)

Продукты амплификации разделяли в 5% полиакриламидном геле (0,5 x TBE буфер) и окрашивали бромистым этидием.

Результаты и обсуждение

Получены ПЦР-профили регуляторной части локуса *Adh1* у растений потомств 11-2 и 12-2. На рисунке 1 показаны профили двух индивидуальных растений из потомства 12-2, и трех индивидуальных растений из потомства 11-2. Растения потомства 11-2, полученные агамоспермным путем от одного растения и гомозиготные по аллелю *Adh1-F*, имели фенотип FF по алкогольдегидрогеназе. ПЦР-профили локуса *Adh1* у этих растений значительно различались. Поскольку эти растения представляют собой потомство от одного

растения, то выявленные различия, следовательно, не связаны с различиями в последовательности нуклеотидов в локусе *Adh1*. Не исключено, что эти различия могут быть обусловлены разной степенью политени аллеля в том или ином растении. Характерно, что наблюдаемые различия могут проявляться на любой стадии: как в самом молодом, так и в самом старшем по возрасту листе. Изменение структуры ДНК по мере развития листа у гомозигот *FF* происходит по-разному (рис. 1). Это указывает на динамичность структурной организации ферментного локуса, а также на то, что эта динамика подвержена влиянию различных внутренних и внешних факторов, определяющих экспрессию данного гена у конкретного растения.

Это подтверждает полученные ранее данные, свидетельствующие о различии ПЦР-профилей, полученных от растений, имеющих один и тот же фенотип по алкогольдегидрогеназе [1–3]. Отмечалось также, что гомозиготы *FF* по локусу *Adh1* в агамоспермных потомствах демонстрируют большее разнообразие ПЦР-профилей по сравнению с гомозиготами *SS*. Эти различия ПЦР-профилей у различающихся гомозигот указывают на объективность получаемых данных, а также на существование специфических различий в организации *F* и *S* аллелей локуса *Adh1* у сахарной свеклы. Полученные результаты хорошо согласуются с известными данными, полученными при

изучении АДГ у кукурузы. Генетическими методами было показано, что у кукурузы существует 14 вариантов аллеля *Adh1-F* и 6 вариантов аллеля *Adh1-S* [9]. В потомстве 12-2 у растений с разными фенотипами также происходит изменение структуры ДНК по мере взросления листа. Выявленные различия профилей у двух представленных на рисунке 1 растений из потомства 12-2 могут быть обусловлены различиями их генотипов: *FF* и *FS*.

Исследованные ПЦР-профили структурной части локуса *Me1* не давали большого разнообразия (рис. 2), но продемонстрировали характерную особенность. В профиле самого младшего листа у гомозиготы *FF* из потомства 11-2 имеется высокомолекулярный банд, в среднем листе появляется низкомолекулярная фракция, и в самом старом листе высокомолекулярный банд исчезает, зато усиливается низкомолекулярный. Таким образом, в наблюдаемом постепенном изменении профиля средний лист представляет собой переходный этап. Постепенное изменение ПЦР-профиля локуса *Me1* с возрастом листа хорошо согласуется с полученными нами ранее данными о постепенной активации в растущем листе фермента ME1 у гомозиготного по аллелю *Me1-F* растения сахарной свеклы [10]. В гомозиготах *SS* потомства 12-2 мы просто наблюдаем появление низкомолекулярной фракции у среднего и самого старшего листа, а у самого молодого листа профиль пуст.

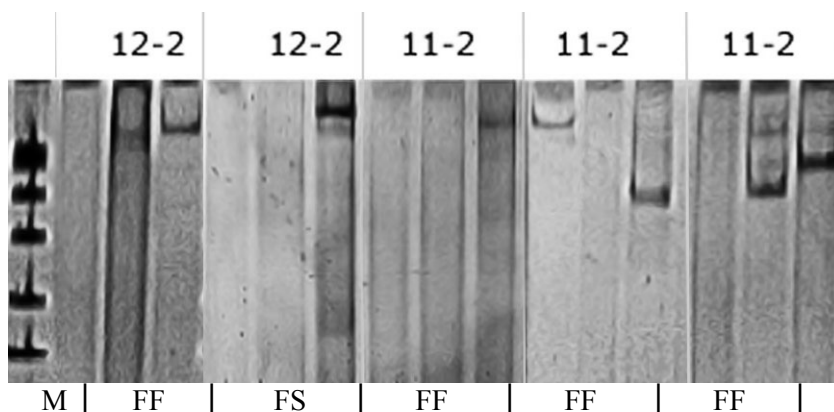


Рис 1. ПЦР-профили локуса *Adh1*, полученные на матрице ДНК растений из агамоспермных потомств 11-2 и 12-2. Каждое растение представлено тремя дорожками: слева самый молодой лист, условно обозначаемый как первый, в середине – третий лист, справа – самый старший лист. М – маркер pBluescript/MspI

ПЦР-профили структурной части локусов *Gpi1* и *Got1* в растущих листьях сахарной свеклы характеризуются постепенным усложнением, связанным с появлением дополнительных бандов и увеличением их интенсивности (рис. 3, 4). Фенотипы исследуемых растений по локусам *Gpi1* и *Got1* не идентифицировали.

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют

о том, что у взрослого растения сахарной свеклы в процессе развития листа происходят не затрагивающие нуклеотидные последовательности изменения структуры ДНК ферментных локусов *Adh1*, *Mel*, *Gpi1*, *Got1*. На примере одного ферментного аллеля локуса *Adh1*, контролирующего алкогольдегидрогеназу, показано, что эти изменения могут происходить у разных растений по-разному и приводить к различным результатам.

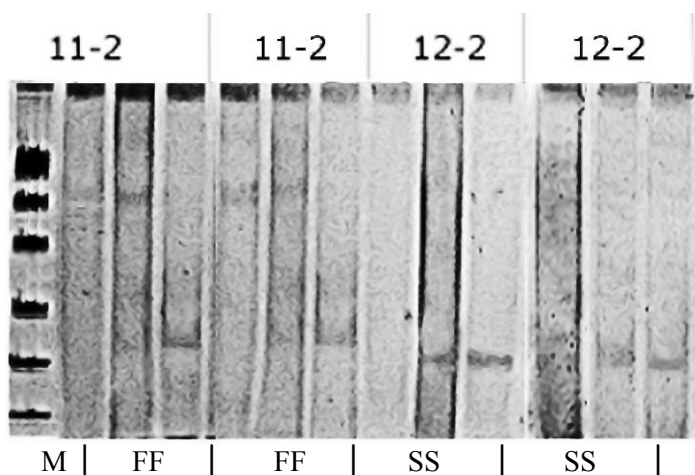


Рис 2. ПЦР-профили локуса *Mel*, полученные на матрице ДНК растений из агамоспермных потомств 11-2 и 12-2. Каждое растение представлено тремя дорожками: слева самый молодой лист, условно обозначаемый как первый, в середине – третий лист, справа – самый старший лист. М – маркер pBluescript/MspI

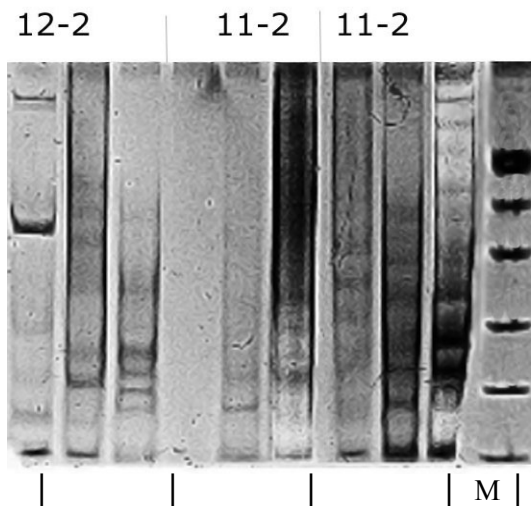


Рис 3. ПЦР-профили локуса *Gpi1*, полученные на матрице ДНК растений из агамоспермных потомств 11-2 и 12-2. Каждое растение представлено тремя дорожками: слева самый молодой лист, условно обозначаемый как первый, в середине – третий лист, справа – самый старший лист. М – маркер pBluescript/MspI

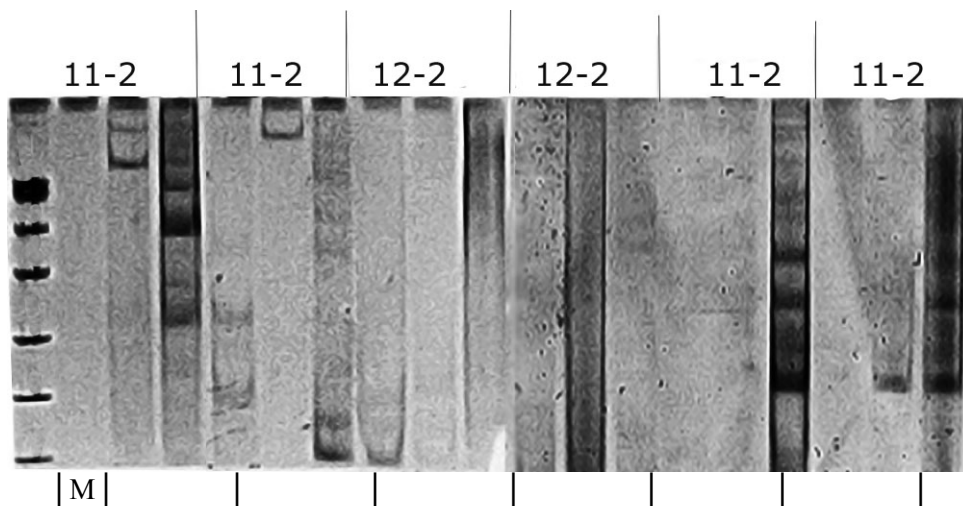


Рис 4. ПЦР-профили локуса *Got1*, полученные на матрице ДНК растений из агамоспермных потомств 11-2 и 12-2. Каждое растение представлено тремя дорожками: слева самый молодой лист, условно обозначаемый как первый, в середине – третий лист, справа – самый старший лист. М – маркер pBluescript/MspI

Литература

1. Виниченко Н.А., Кирикович С.С., Левитес Е.В. Модификация метода ISSR-амплификации для изучения изменчивости аллелей локуса *Adh1* в агамоспермном потомстве сахарной свеклы // Фактори експериментальної еволюції організмів. – Київ: «Логос». – 2006. – 3. – С. 80–84.
2. Vinichenko N.A., Kirikovich S.S., Levites E.V. The genetic instability of the *Adh1* locus alleles in sugar beet agamosperous progeny // Sugar Tech. – 2006. – 8, N 4. – P. 288–291.
3. Виниченко Н.А., Кирикович С.С., Левитес Е.В. Полиморфизм ПЦР-профилей и экспрессии аллелей локуса *Adh1* в агамоспермных потомствах сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. – 2008. – 44, № 9. – С. 1252–1256.
4. Виниченко Н.А., Кирикович С.С., Левитес Е.В. Тканевые различия в организации локуса *Adh1* сахарной свеклы // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології (Збірник наукових праць). – Київ: Логос, 2007. – 2. – С. 247–251.
5. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 1. Изменчивость в онтогенезе // Биополимеры и клетка. – 1994. – 10, № 6. – С. 5–35.
6. Кунах В.А. Онтогенетическая пластичность генома как основа адаптивности растений // Жебраковские чтения. III. – Минск, 2011. – 56 с.
7. Виниченко Н.А. Влияние температурной обработки прорастающих семян пшеницы и сахарной свеклы на ПЦР-профили ферментных локусов // Фактори експериментальної еволюції організмів. – Київ: Логос, 2011. – 11. – С. 131–136.
8. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. – 1987. – 19. – P. 11–15.
9. Woodman J.G., Freeling M. Identification of a genetic element that controls the organ-specific expression of *Adh1* in maize // Genetics. – 1981. – 98, N 2. – P. 357–378.
10. Левитес Е.В. Генетика изоферментов у сахарной свеклы // Генетика сахарной свеклы. – Новосибирск: Наука, Сибирское отделение, 1984. – С. 45–60.

VINICHENKO N.A., KIRIKOVICH S.S., LEVITES E.V.

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Russia, 630090, Novosibirsk, ave. Lavrent'eva, 10, e-mail: levites@bionet.nsc.ru

INFLUENCE AGE SUGAR BEET LEAVES ON PCR PROFILES OF ENZYME GENES

Aims. In the previous researches we showed that during a sprout growth process and a tissue differentiation there is a change of DNA structure of enzyme loci. These changes, however, do not concern primary structure of coding genes part. We were interested by a question, whether there is a change of DNA in adult plants. For this purpose we decided to use PCR-profiles of leaves of different age from one plant. **Methods.** For researches were taken two sugar beet agamosperous progenies. For receiving PCR-profiles we used the

modified method of the ISSR analysis. The main peculiarity of this modification is those: together with a microsatellite primer for PCR we used the primer which was specific to the enzyme locus. DNA was extracted from the youngest, average and senior leaves. **Results.** PCR-profiles for *Adh1*, *Me1*, *Gpi1*, *Got1* loci were received. A wide variety of PCR-profiles of *Adh1* locus was revealed even in homozygous plants at all studied stages of growth. PCR-profiles of a *Me1* locus did not show a wide variety, but showed gradual transition of one PCR-profile to another one during leaf growth. It was revealed complication of PCR-profiles of *Gpi1* and *Got1* loci during leaf development and growth. **Conclusions.** Obtained results point out that there are changes of DNA structure of enzyme loci the adult plant of sugar beet during development and growth of a leaf. At present there are no data which point that these changes connected with changes of the nucleotide sequences of studied genes.

Key words: PCR-profiles, sugar beet, enzyme loci, ISSR analysis.

УДК 575.113. + 581.162

ГЕРАЩЕНКОВ Г.А., РОЖНОВА Н.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Россия, 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71, e-mail: apomixis@anrb.ru

ДЕТЕКЦИЯ ГЕМИЗИГОТНОГО ГЕНОМНОГО ФРАГМЕНТА У ФОРМ *BOECHERA HOLBOELLII* (СЕМЕЙСТВО BRASSICACEAE) С БЕСПОЛОСЕМЕННЫМ РАЗМНОЖЕНИЕМ

Апомиксис – это бесполое размножение цветковых растений, при котором зародыши в семенах возникают из клеток материнского генотипа без мейоза и фертилизации [1, 2]. Ключевыми событиями при апомиксисе являются (1) замена мейоза апомейозом, (2) партеногенетическое развитие яйцеклетки и (3) существование механизмов развития эндосперма, без которых невозможно формирование семени. Такая специфическая трансформация полового размножения (амфимиксиса) в бесполое (в связи с полным или частичным отсутствием мейоза и оплодотворения) дает их обладателям несомненные преимущества: апомикты имеют превосходную семенную продуктивность вне зависимости от нарушений мейоза, слабую зависимость от опыления, позволяют фиксировать эффект гетерозиса в ряду поколений.

С теоретической точки апомиксис интересен эволюционистам, так как не согласуется с принципами синтетической теории эволюции в связи с отсутствием комбинативной изменчивости. Генотипы видов с бесполое размножением не только не выявляют инбредного вырождения, но и удерживают самые экстремальные ареалы в конкуренции с формами, размножающимися половым способом. Понимание молекулярных механизмов наследования апомиксиса является

важной предпосылкой для успешного использования его потенциала у сельскохозяйственных растений. Прикладное использование апомиксиса обещает экономические и социальные выгоды, превышающие выигрыш от «зеленой революции» Нормана Борлауга, решившей проблему голода во многих развивающихся странах. Так, только прибыль от мирового производства апомиктического риса оценивается более чем в 2,5 млрд. \$ в год [2, 3].

В настоящее время ведется активный поиск биохимических и молекулярно-генетических маркеров апомиксиса у различных видов цветковых растений, и в том числе у *Boecheera* [3, 4]. Исследования в области генетики апомиксиса у цветковых растений обоснованно относят к числу прорывных исследований [2, 3]. Тем не менее, успехи в понимании молекулярной природы апомиксиса и его практическом использовании не так впечатляющи. Многолетние попытки многие лабораторий выделить гены апомиксиса пока не привели к успеху. Цель работы – детектировать геномных локусов, ассоциированных с апомиксисом.

Материалы и методы

При исследовании систем размножения цветковых растений вообще и апомиксиса в частности принципиально важным является подбор модельных объектов [1, 4]. В работе был

использован уникальный коллекционный материал, а именно североамериканские эндемичные формы рода *Boechema* с различными репродуктивными модами и уровнями плоидности из ведущих лабораторий Нидерландов, Германии и США (таблица). Диплоспорический вид *Boechema holboellii* характеризуется рядом особенностей, позволяющих рассматривать его в качестве перспективного модельного объекта при исследованиях морфо-физиологической и молекулярной регуляции апомиксиса. *Boechema holboellii* – это близкий родственник *Arabidopsis thaliana*, для которого доступны обширные молекулярно-генетические ресурсы (полностью секвенированный геном, мутанты), что облегчает поиск участвующих в контроле апомиксиса генов.

В работе были использованы стандартные методы молекулярной биологии [5]. Тотальную ДНК экстрагировали из проростков и листьев растений фенольно-детергентным методом. В связи с малым количеством растительного материала некоторых образцов все выделенные варианты ДНК далее были наработаны с помощью ϕ 29 полимеразы методом полногеномной амплификации, позволяющим осуществлять эквивалентное накопление всех ДНК последовательностей генома в количествах, достаточных для молекулярно-генетического анализа. Препараты ДНК гидролизовали рестриктазами BamHI, EcoRI, Eco130I, HindIII, MvaI, PstI (Fermentas). Электрофорез и перенос фрагментов ДНК с геля

на мембрану осуществляли по методу Саузерна с некоторыми модификациями. Мечение и детекцию ДНК набором от фирмы Роше выполняли на полиамидных фильтрах, следуя прописи производителя.

Результаты и обсуждение

Несмотря на активное использование растений рода *Boechema* в качестве модельного объекта при изучении генетики полового размножения и апомиксиса, к настоящему моменту не известно ни одного гена кандидата апомиктического размножения. В 2011–2012 годах было завершено множественное независимое секвенирование полученных SCAR_Cin_380 и SCAR_Isaak_230, а также дополнительно SCAR_Cin_220 и SCAR_Cin_240, маркеров апомиксиса у растений рода *Boechema*. Полученные молекулярные маркеры были использованы в качестве гибридизационных проб. В 2013 году методом Саузерн гибридизации ДНК апомиктических и амфимиктических растений рода *Boechema* из голландской и немецкой коллекций с пробой № 4 (SCAR_Isaak_230) детектирован геномный фрагмент Apo_Isaak_1.2 размером около 1.2 kb, общий для европейских апомиктических растений *Boechema holboellii*. Этот геномный фрагмент, близкий по размеру к среднестатистическим растительным генам (2–4 kb) характеризуются гемизиготностью, как и исходный SCAR_Isaak_230 маркер. Однако для австралийской выборки растений описанный Apo_Isaak_1.2 геномный фрагмент обнаружить не удалось.

Таблица. Коллекция форм растений с бесполосеменным и половым способами размножения

№	Виды и формы	Особенности размножения	Источник происхождения
I	Выборка = Представители рода <i>Boechema</i> семейства <i>Brassicaceae</i>		
	Голландская коллекция		
1	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 3x #36-1	Apo*	Dr. Kim Boutilier, Plant Research International, Netherlands
2	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 3x #6-3	Apo	
3	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 3x #5-10	Apo	
4	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 2x #4-2	Apo	
5	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 2x #8-7	Apo	
6	<i>Arabis drummondii</i> 2x #10	Sex*	
	Немецкая коллекция		
7	<i>Arabis holboellii</i> Rc#1	Apo	Dr. Thomas Mitchell-Olds, Max Planck Institute of Chemical Ecology, Germany
8	<i>Arabis holboellii</i> cg#25	Apo	
9	<i>Arabis drummondii</i> 4	Sex	
10	<i>Arabis drummondii</i> 11	Sex	

Примечание: * Apo – апомиктическое размножение; Sex – половое размножение.

Пробы № 1, 2 и 3 (на основе SCAR_Cin маркеров апомиксиса) были не эффективны при Саузерн анализе. Методом полногеномной амплификации получены препараты ДНК, пригодные для клонирования обнаруженных фрагментов, ассоциированных с апомиксисом у европейских форм *Boechea*. В настоящее время идет работа по созданию геномных библиотек для выделения геномного фрагмента Apo_Isaak_1200, близкого по размеру среднестатистическим растительным генам.

Напомним, что вплоть до настоящего времени молекулярные механизмы, контролирующе апомиксис, остаются слабо понятными [1, 2, 6, 7]. К настоящему времени все

попытки выделить гены кандидаты из различных модельных систем апомиксиса у цветковых растений заканчивались неудачей [2, 3]. Полученные нами результаты могут быть применены в генетическом конструировании апомиксиса для создания гетерозисных форм и сложных полиплоидов сельскохозяйственных растений. Таким образом, результаты апомиксисных исследований, полученные в 2011–2013 годах, являются совершенно новыми. Теоретический уровень ожидаемых результатов сопоставим с мировым, а по ряду позиций опережает аналогичные зарубежные разработки в данной области науки.

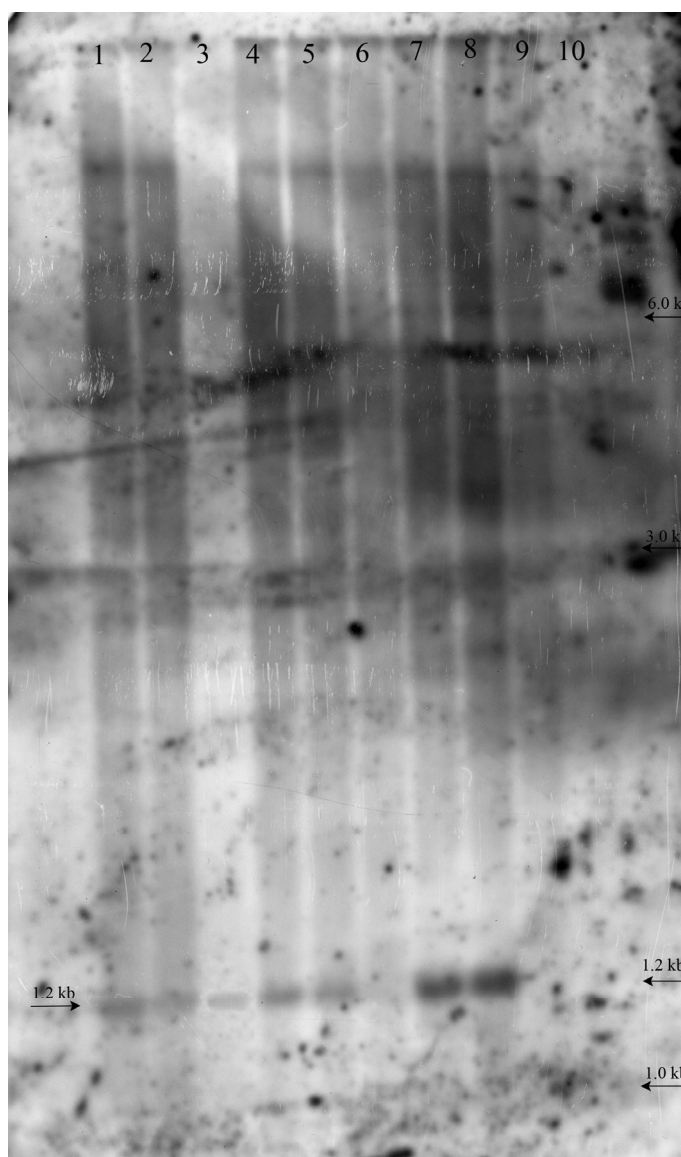


Рис. 1. Саузерн блот гибридизация ДНК 10 форм *Boechea* из голландской и немецкой коллекций с маркером SCAR_Isaak_230

Примечание: Apo_Isaak_1.2 kb фрагменты указаны на блот паттерне; молекулярный размер дан в тысячах пар оснований (kb).

Выводы

1. Методом Саузерн гибридизации ДНК апомиктичных и амфимиктичных растений рода *Boecheera* из голландской и немецкой коллекций с пробой № 4 (SCAR_Isaak_230) детектирован геномный фрагмент Apo_Isaak_1.2 размером около 1.2 kb, общий для европейских апомиктичных растений *Boecheera holboellii*.

2. Apo_Isaak_1.2 фрагмент близок по размеру к среднестатистическим растительным генам (2–4 kb), а также характеризуется гемизиготностью, как и исходный SCAR_Isaak_230 маркер.

3. Пробы № 1, 2 и 3 (на основе SCAR_Cin маркеров апомиксиса) были не эффективны при Саузерн анализе.

4. Полученные результаты могут быть применены в генетическом конструировании апомиксиса для создания гетерозисных форм и сложных полиплоидов сельскохозяйственных растений.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (гранты № 11-04-97039 р_поволжье_а, № 13-04-01404-а и 14-04-97089 р_поволжье_а).

Литература

1. Gerashchenkov G., Rozhnova N. Genetic Control of Gametophytic Apomixis: Current Status of Knowledge // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. – 2004. – Section B. – 58. – P. 167–174.
2. Ozias-Akins P., van Dijk P.J. Mendelian Genetics of Apomixis in Plants // Annu. Rev. Genet. – 2007. – 41. – P. 509–537.
3. Barcaccia G, Albertini E. Apomixis in plant reproduction: a novel perspective on an old dilemma // Plant Reprod. – 2013. DOI 10.1007/s0497-013-0222-y
4. Gerashchenkov G., Rozhnova N., Gorbunova V., Timirkaeva A. The analysis of hormonal levels in top leaves and flower buds of the *Boecheera* accessions with asexual (apomictic) and sexual (amphimictic) reproduction // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. – 2007. – Section B. – 61, N 6. – P. 1–7.
5. Green M.R., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition): Three-volume set // Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2012. – P. 2028.
6. Геращенко Г.А., Рожнова Н.А. Мобильные генетические элементы в эволюции пола у растений // Генетика. – 2010. – 46. – С. 1445–1457.
7. Геращенко Г.А., Рожнова Н.А. Участие фитогормонов в регуляции пола у растений // Физиология растений. – 2013. – 60. – С. 634–648.

GERASHCHENKOV G.A., ROZHNOVA N.A.

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences, Russia, 45005, Ufa, prospekt Oktyabrya, 71, e-mail: apomixis@anrb.ru

DETECTION OF HEMIZYGIOUS GENOME FRAGMENT AT FORMS OF *BOECHERA HOLBOELLII* (BRASSICACEAE FAMILY) WITH SEEDS-WITHOUT-SEX REPRODUCTION

Aims. Apomixis is the clonal reproduction of floral plants by seeds without both meiosis and fertilization. Apomixis has great biotechnological benefits in excess of the gain from the “green revolution” Norman Borlaug. Nevertheless the genetic control of apomixis is not clear and speculative till now. The goal of the work was to detect genome loci associated with apomixis. **Methods.** Whole genome amplification and Southern hybridization were used to detect hemizygous genome fragment associated with apomictic reproduction of *Boecheera holboellii*. **Results.** The generated molecular markers were used as the hybridization probes. Apo_Isaak_1.2 genomic fragment about 1.2 kb, common to European apomictic plants *Boecheera holboellii* was detected by means of Southern hybridization of apomictic and amphimictic plants DNAs from Dutch and German collections with the probe 4 (SCAR_Isaak_230). **Conclusions.** Apo_Isaak_1.2 fragment has the molecular size close to is similar in size to the mean plant genes (2–4 kb) and is the hemizygous fragment as the original SCAR_Isaak_230 marker. Our results can be used in genetic engineering of apomixis to create complex forms and heterosis polyploid crops.

Key words: amphimixis, apomixis, *Boecheera* sp., Southern hybridization, hemizygous.

ТИПЫ СООТНОШЕНИЙ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ КЛАССОВ ПРИ АГАМОСПЕРМИИ

Полученные к настоящему времени факты свидетельствуют о том, что полиморфизм в агамоспермных потомствах диплоидных растений обусловлен комбинаторными процессами. К этим комбинаторным процессам, прежде всего, относится мейоз, происходящий в тетраплоидных материнских клетках мегаспор, присутствующих в качестве примеси среди основной массы диплоидных клеток материнского растения [1]. Другой комбинаторный процесс происходит в апозиготической клетке перед её вступлением в эмбриогенез и представляет собой случайный равновероятный выбор из множества эндоредуплицированных в результате политенизации копий исследуемого участка хроматид по одной копии от каждой из пары гомологичных хромосом [2–4].

Начало выбора представляет собой случайное равновероятное прикрепление одной из копий к ядерной мембране или к ядерному матриксу. Неприкрепившиеся копии аллелей в ходе первых делений эмбриогенеза теряются из ядра и клетки [2, 3]. Этот процесс сходен с диминуцией у циклопов [5, 6]. Возможно также совместное проявление этих двух комбинаторных процессов [4]. Диминуция возможна при вступлении в эмбриогенез клетки зародышевого мешка, или клетки нуцеллуса и интегументов [2–4, 7]. Различные типы комбинаторных процессов и их сочетание приводят к разным соотношениям фенотипических классов в агамоспермных потомствах [8].

Удобным инструментом для изучения агамоспермии явились изоферменты. Замечательной особенностью изоферментов является их кодоминантное наследование, благодаря которому изоферментный спектр гибридного растения отличается от изоферментного спектра каждого из родителей. Это позволяет в потомстве гетерозиготного по ферментному локусу растения выявлять все три фенотипические классы: два гомозиготных и один гетерозиготный [9, 10]. Использование изоферментов в качестве генетических маркеров позволяет по соотношениям фенотипов предполагать ход событий, обеспечивших

появление данного потомства, и таким образом классифицировать типы агамоспермного размножения растений [8].

С появлением данных, свидетельствующих о существовании комбинаторных процессов, обусловленных дифференциальной политенизацией хромосом и диминуцией избыточных участков хроматид, появилась возможность понимания и классификации агамоспермной природы гораздо большего числа потомств. В связи с этим, целью данной работы было дать новую интерпретацию ранее полученных и новых экспериментальных данных.

Материалы и методы

В качестве материала для исследования были взяты агамоспермные потомства, полученные от пыльцестерильных растений сахарной свеклы в беспыльцевом режиме. Для создания беспыльцевого режима в период цветения на поле оставляли только растения фенотипа ms0 и ms1 по классификации Оуэна [11], а также использовали индивидуальные изоляторы.

В полученных семенных потомствах анализировали соотношение фенотипических классов ферментов алкогольдегидрогеназы (ADH1, К.Ф. 1.1.1.1), малик-фермента (ME1, К.Ф. 1.1.1.40), изоцитратдегидрогеназы (IDH3, К.Ф. 1.1.1.42) методом электрофореза в крахмальном геле с последующим гистохимическим выявлением изоферментов на электрофореграммах [12, 13]. Выявленные экспериментальные соотношения сопоставляли с теоретически ожидаемыми (3:8:3 and 1:2:1) с помощью критерия χ^2 .

Результаты и обсуждение

В таблицах 1 и 2 представлены результаты исследований агамоспермных потомств, проведенных в разные годы. Соотношения фенотипических классов сравнивали с соотношением 3:8:3, характерным для гаметического соотношения у тетраплоида. Это делалось на том основании, что полиморфизм, выявляемый в диплоидном агамоспермном потомстве, полученном от диплоидного растения, обусловлен мейозом в тетраплоидных клетках, присутствующих в качестве примеси

среди основной массы диплоидных клеток [1]. Также проводили сопоставление с классическим менделевским соотношением 1:2:1.

Соотношение фенотипических классов по ADH1 67FF:94FS:68SS в потомстве 1–4 достоверно отличается от 3:8:3 и 1:2:1 (табл. 1). Это соотношение уже приводилось нами в предыдущей статье [4] и объяснялось следующим образом.

После формирования яйцеклеток в соотношении 3:8:3, а также при отсутствии пыльцы и задержке опыления в яйцеклетках может происходить политенизация отдельных участков хромосом. Но перед переходом к эмбриогенезу яйцеклетка освобождается от избыточных копий участков хроматид случайным равновероятным образом.

В результате этого в некоторых изначально гетероаллельных яйцеклетках в ядре остается по два одинаковых аллеля. Это приводит к тому, что доля гетероаллельных яйцеклеток уменьшается, а гомоаллельных – увеличивается. Расчеты этого процесса подробно описаны в ранее опубликованной статье [4], причем в этом приводимом случае уменьшение доли гетероаллельного класса произошло настолько сильно, что его частота стала достоверно ниже 0.5, и нарушилось соотношение 1:2:1 (табл. 1).

В других случаях это уменьшение менее сильное, и в таком потомстве наблюдается соотношение фенотипов, соответствующее соотношению 1:2:1 (табл. 1, 2). Рассмотрение данных в таблицах 1 и 2 показывает, что у значительной части представленных здесь потомств соотношения фенотипов симметричны, либо имеющиеся в них отклонения от симметрии незначительны, и они не приводят к достоверным отличиям от соотношения 1:2:1. Опираясь на наши предыдущие исследования можно сказать, что такие потомства получены путем мейотической агамоспермии. Этот путь включает в себя такие процессы как: мейоз в тетраплоидных материнских клетках мегаспор, политенизацию в яйцеклетках участков хромосом, несущих маркерные ферментные локусы, и случайную равновероятную диминуцию избыточных копий аллельных генов яйцеклеткой перед её вступлением в эмбриогенез. Источником симметрии в соотношении фенотипических классов является равная доза аллелей у гетерозиготных тетраплоидных материнских

клеток мегаспор, возникающих в результате удвоения числа хромосом в некоторых диплоидных клетках диплоидного материнского растения. Например, при полиплоидизации клетки генотипа FS образуется клетка генотипа FFSS с равной дозой аллелей. Это равенство сохраняется и при последующей политенизации участка гомологичных хромосом, несущего данный маркерный ген. Следует отметить, что по нашим оценкам степень политенизации участков хромосом в яйцеклетках невелика и равна 2 [4].

Другой тип соотношений фенотипических классов характеризуется резкими отличиями от соотношения 1:2:1, что можно видеть на примере потомства растения 7-7 (табл. 2). Эти соотношения могут также достоверно отличаться и от соотношения 3:8:3 (потомства растений 17-2 и 17-6, табл. 2).

Потомство растения 7-7 характеризуется высокой долей гетероаллельного класса. Это позволяет предположить, что геномы клеток, вступающих в эмбриогенез, прошли лишь один этап преобразований. Таким этапом мог быть процесс либо процесс диминуции избыточных копий аллелей маркерного локуса *Mel*, либо только мейоз. В таком случае данное потомство можно рассматривать либо как потомство, полученное путем митотической агамоспермии из соматических клеток, или как потомство, возникшее из диплоидных яйцеклеток.

Процесс образования потомств растений 17-2 и 17-6 в силу их ярко выраженной асимметрии соотношений фенотипических классов с большой вероятностью можно отнести к митотической агамоспермии (табл. 2). Такая асимметрия может являться следствием известной независимости степени политенизации аллелей в соматических клетках растений, приводящей к разной дозе аллелей [14].

Развиваемый нами генетический способ классификации типов агамоспермного размножения отличается от цитологических методов возможностью анализа большого числа растений. Это придает, по нашему мнению, объективность полученным результатам. Кроме того, наш подход не подменяет собой цитозембриологические методы, а дополняет их.

Данная статья посвящена развитию метода генетической классификации типов агамоспермного размножения у растений на примере сахарной свеклы.

Таблица 1. Соотношения фенотипических классов по алкогольдегидрогеназе (ADH1) и малик ферменту (ME1) в агамоспермных потомствах сахарной свеклы

№ растения (год репродукции)	ADH1		ME1		Тип агамоспермии
	FF : FS : SS	1) $\chi^2(3:8:3)$ 2) $\chi^2(1:2:1)$	FF:FS:SS	1) $\chi^2(3:8:3)$ 2) $\chi^2(1:2:1)$	
1-1 (2003)	33:52:9	1) 14.4255*** 2) 13.3.3191**	25:32:17	1) 7.856* 2)3.081	Мейотическая
11-1 (2003)	73:0:0		24:47:22	1)1.757 2)0.097	Мейотическая
11-1 (2004)	59:0:0		19:55:26	1)1.331 2)1.980	Мейотическая
2-6 (2003)	14:33:16	1)0.731 2)0.270	25:0:0		Мейотическая
2-6 (2004)	61:134:62	1)2,636 2)0,48	172:0:0		Мейотическая
2-8 (2004)	26:29:15	1) 11.092** 2)5.514	20:29:21	1) 7.092* 2)2.086	Мейотическая
12-2 (2003)	30:46:22	1)5.690 2)1.673	27:49:22	1)2.637 2)0.510	Мейотическая
12-2 (2004)	23:32:23	1) 8.274* 2)2.512	25:31:22	1) 9.911** 2)3.513	Мейотическая
7-12 (2003)	35:0:0		34:55:28	1)5.625 2)1.034	Мейотическая
5-7 (2007)	41:83:41	1)3,152 2)0,006	50:75:45	1) 12,120** 2)2,447	Мейотическая
1-4 (2007)	67:94:68	1) 24,233*** 2) 7,349*			Мейотическая

Примечание: Вероятность сходства с теоретически ожидаемыми соотношениями: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$.

Таблица 2. Соотношения фенотипических классов по изоцитратдегидрогеназе (IDH3) и малик-ферменту (ME1) в агамоспермных потомствах сахарной свеклы

№ растения (год репродукции)	IDH3		ME1		Тип агамоспермии
	FF : FS : SS	1) $\chi^2(3:8:3)$ 2) $\chi^2(1:2:1)$	FF : FS : SS	1) $\chi^2(3:8:3)$ 2) $\chi^2(1:2:1)$	
11-2 (2004)	31:69:47	1) 10,313** 2)4,034	45:60:44	1) 17,34*** 2)5,658	Мейотическая
12-5 (2003, 2004)	21:26:20	1) 9,2338** 2)3,3881	18:40:15	1)0,452 2)0,918	Мейотическая
КА-8 (2003)	31:62:21	1)2.401 2)2.632	22:59:45	1) 15.273*** 2) 8.905*	Митотическая
7-7 (2003, 2004)	37:0:0		23:96:28	1)4.397 2) 14.116***	Митотическая- Мейотическая
17-2(2003)	34:30:11	1) 25.458*** 2) 17.107***	40:0:0		Митотическая
17-6 (2003, 2004)	52:51:17	1) 34.326*** 2) 23.117***	36:0:0		Митотическая

Примечание: Вероятность сходства с теоретически ожидаемыми соотношениями: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$.

Возможность классификации обеспечивается использованием в качестве генетических маркеров изоферментов, позволяющих выявлять в анализируемом потомстве индивидуального диплоидного гетерозиготного растения все три генотипических класса. Классификация основана на том, что соотношения фенотипических классов в потомствах, полученных путем мейотической и митотической агамоспермии различаются.

Литература

1. Малецкий С.И., Малецкая Е.И. Самофертильность и агамоспермия у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. – 1996. – 32, № 12. – С. 1643–1650.
2. Levites E.V. Sugarbeet plants produced by agamospermy as a model for studying genome structure and function in higher plants // Sugar Tech. – 2005. – N 7. – P. 67–70.
3. Levites E.V. Marker enzyme phenotype ratios in agamospermous sugarbeet progenies as a demonstration of multidimensional encoding of inherited information in plants. 2007. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://arxiv.org/abs/q-bio/0701027>.
4. Levites E.V., Kirikovich S.S. Post-meiotic apozygotic combinatory process in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Advances in Bioscience and Biotechnology. – 2012. – N 3. – P. 75–79.
5. Ammermann D. Morphology and development of the macronuclei of the ciliates *Stylonychia mytilus* and *Euplotes aediculatus* // Chromosoma. – 1971. – 33. – P. 209–238.
6. Гришанин А.К., Акифьев А.П. Межпопуляционная дифференциация внутри *C. kolensis* and *C. strenuus strenuus* (Crustacea: Soropoda): доказательство на основе цитогенетических методов // Гидробиология. – 1999. – 417. – С. 37–42.
7. Левитес Е.В., Кирикович С.С. Автосегрегация ферментных локусов в агамоспермных потомствах триплоидных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. – 2011. – 47, № 7. – С. 945–951.
8. Levites E.V. New classification of the reproduction modes in sugar beet // Sugar Tech. – 2002. – N 4. – P. 45–51.
9. Schwartz D. The genetic control of alcohol dehydrogenase in maize: gene duplication and repression // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1966. – 56. – P. 1431–1436.
10. Scandalios J.G. Genetic control of multiple forms of enzymes in plants: a review // Biochemical Genetics. – 1969. – 3. – P. 37–79.
11. Owen F.V. Cytoplasmically inherited male sterility in sugar beet // Journal of Agricultural Research. – 1945. – 71. – P. 423–440.
12. Meizel S., Markert C.L. Malate dehydrogenase isozymes of the marine snail *Ilyanassa obsoleta* // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1967. – 122. – P. 753–765.
13. Vallejos C.E. Enzyme activity staining. In: Isozymes in plant genetics and breeding. – Part A. – Elsevier, Amsterdam, 1983. – P. 469–515.
14. Cionini P.G., Cavallini A., Corsi R., Fogli M. Comparison of homologous polytene chromosome in *Phaseolus coccineus* embryo suspensor cells: Morphological, autoradiographic and cytophotometric analyses // Chromosoma. – 1982. – 86. – P. 383–396.

KIRIKOVICH S.S., LEVITES E.V.

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences Russia, Russia, 630090, Novosibirsk, ave. Lavrent'eva, 10, e-mail: svetak@bionet.nsc.ru

THE TYPES OF PHENOTYPIC CLASS RATIOS UNDER AGAMOSPERMY

Aims. With the appearance of evidence of the existence of combinatorial processes due to differential polyteny of chromosomes and diminution of redundant chromatid segments, it became possible to understand and classify the nature of agamospermy for a much larger number of progenies. In this connection, this work aims to give an interpretation of the previously obtained and new experimental data.

Methods. The ratios of enzyme phenotypic classes for alcohol dehydrogenase (ADH1), malic enzyme (ME1), isocitrate dehydrogenase (IDH3) were analyzed using electrophoresis in starch gel with further

Выводы

1. Проанализировано 15 потомств сахарной свеклы, полученных агамоспермным путем в разные годы выращивания.

2. Показано, что по типу соотношения фенотипических классов в потомстве можно определить, какой тип семенной репродукции лежит в основе образования данного потомства: мейотическая или митотическая агамоспермия.

3. Существенным признаком мейотической агамоспермии является симметричное соотношение фенотипических классов, а митотической агамоспермии – асимметричное.

isozymes histochemical staining in electrophoregrams. **Results.** Phenotypic ratio types of agamosperous progenies obtained from 15 maternal plants were analyzed. It was shown that with the help of phenotypic classes ratios in the progenies it is possible to classify the type of agamospermy. **Conclusions.** This article focuses on the development of the method for the genetic classification of agamosperous reproduction types in plants using sugar beet as an example. The classification feasibility is ensured by the use of isozymes as genetic markers allowing the identification of all three phenotypic classes in the progeny of individual heterozygous diploid plant and is based on different phenotypic class ratios in the progenies obtained by meiotic and mitotic agamospermy.

Key words: Agamospermy, isozymes, polyteny, sugar beet.

УДК 631.522:581.163:633.413:577.151.64:575.113.2

ЛЕВИТЕС Е.В.

Институт цитологии и генетики СО РАН,

Россия, 630090, г. Новосибирск, проспект Лаврентьева, 10, e-mail: levites@bionet.nsc.ru

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ В СЕМЕННОМ ПОТОМСТВЕ ПРИ МИТОТИЧЕСКОЙ АГАМОСПЕРМИИ

В настоящее время получено достаточно большое количество данных, свидетельствующих о полиморфизме в агамоспермных потомствах диплоидных растений. Одно из объяснений этого полиморфизма основано на признании большой роли миксоплоидии у растений. Миксоплоидия проявляется как примесь тетраплоидных клеток среди основной массы диплоидных клеток археспория материнского растения [1, 2].

Вступление такой клетки в мейоз приводит к образованию диплоидных зародышевых мешков и, соответственно, к образованию диплоидных яйцеклеток, способных вступать в эмбриогенез без оплодотворения [1]. Этот механизм характерен для мейотической диплоспории, которую можно обозначить также как мейотическая агамоспермия [3]. Полиморфизм в таком случае является закономерным следствием мейоза и обозначен хорошо известным термином «автосегрегация» [4, 5]. Генетические и цитологические данные подтверждают эту гипотезу [6].

Наряду с этим, был предложен механизм, предполагающий, что большую роль в возникновении полиморфизма играет политенизация участков хромосом, несущих маркерные локусы. Предполагается, что дифференциальная политенизация приводит в дальнейшем к случайной, равновероятной потере избытка хроматина клеткой перед её вступлением в эмбриогенез [7, 8].

Проведенные на основании генетических данных расчеты показывают, что дифферен-

циальная политенизация хромосом и последующая диминуция избытка хроматина возможны как при мейотической агамоспермии [9], так и в том случае, когда потомство образуется из соматических клеток, не претерпевших мейотических преобразований генома (адвентивная эмбриония или митотическая агамоспермия) [7, 8]. Кроме того, получены генетические доказательства того, что политенизация участков хромосом возможна и при половом размножении растений [10]. В настоящее время показана зависимость этого процесса от внешних условий [11].

Накопленные результаты исследований агамоспермных потомств, рассматриваемые с учетом гипотезы о дифференциальной политении хромосом, позволяют по-новому взглянуть на многие генетические процессы и причины многих отклонений в соотношении гено- и фенотипов в образующемся потомстве. Характерной особенностью полиморфизма при агамоспермии является несовпадение выявляемых соотношений с известными менделевскими пропорциями.

Учет влияния политенизации участков хромосом, несущих маркерные гены, на сегрегацию соответствующих маркерных признаков расширяет границы генетики. В настоящее время можно говорить о различных типах сегрегации признаков: как связанной с изменением числа хромосом в клетке (мейоз и встреча гамет), так и не связанной с изменением числа хромосом (сегрегация эндоредуплицированных участков хроматид).

Время, прошедшее с начала проводимых

нами исследований, и обнаруживаемые нами факты постепенно меняли представления о механизмах, лежащих в основе наблюдаемой изменчивости в агамоспермных потомствах. В связи с этим возникает необходимость повторного рассмотрения полученных ранее данных. Это и явилось целью данной статьи.

Повторно будут рассмотрены данные, приведенные в статье, озаглавленной «Псевдосегрегация в агамоспермных потомствах пыльцестерильных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.)» [12]. В качестве генетических маркеров в этой работе использовались изоферменты, множественные молекулярные формы ферментов [13, 14], позволяющие выявлять в потомстве гетерозиготного по ферментному локусу растения три гено- и фенотипических класса. В этой работе генетическим методом было показано, что проанализированные агамоспермные потомства сахарной свеклы образовались из соматических клеток. Основанием к такому заключению был мономорфизм одного потомства (KWS1-5A) по гетерозиготному изоферментному спектру алкогольдегидрогеназы (АДГ). Еще одно интересное явление, выявленное в данном исследовании, это диморфизм анализируемых потомств, в том числе и KWS1-5A, по другим маркерным ферментам. Диморфизм представлял собой наличие в потомстве только двух фенотипических классов: одного гомозиготного и одного гетерозиготного. Из опубликованных в этой статье данных приведем только два потомства: KWS1-5A и КНВС2-78А (табл.).

Первоначально предполагалось, что выявляемый диморфизм является результатом инактивации у части потомков одного из аллелей гетерозиготного локуса. Такая инактивация может приводить к тому, что фенотип, сходный с гомозиготным, несет один активный аллель, определяющий электрофоретическую подвижность фермента, и инактивированный аллель. Однако, в даль-

нейшем было установлено, что фенотип, сходный с гомозиготой, действительно является гомозиготой [15].

Это послужило поводом для выдвижения гипотезы о том, что диморфизм был обусловлен гетерозиготностью маркерного ферментного локуса, в котором один из аллелей был представлен одной копией, а второй аллель в результате политенизации был представлен тремя копиями. Политенизация хромосом у растений представляет собой хорошо известный факт [16]. Предполагается, что соматическая клетка генотипа *FFFS* перед вступлением в эмбриогенез освобождалась от избытка копий аллелей случайным равновероятным образом согласно вероятностным законам; и процесс этот описывается формулами гипергеометрического распределения [17]. Проведенный по формулам гипергеометрического распределения расчет показывает, что в данном случае теоретически возможны только два генотипа *FF* и *FS* в соотношении 1:1.

Расчет этот таков:

для *FF* – число сочетаний из трех по два C_3^2 , равно 3;

для *FS* – число сочетаний из трех по одному, умноженное на число сочетаний из одного по одному ($C_3^1 \times C_1^1$), т.е. $3 \times 1 = 3$.

Генотип *SS* не образуется, поскольку для него нужны две копии аллеля, а в геноме присутствует всего лишь одна.

Для равновероятного процесса диминуции необходим свободный обмен хроматидами между хромосомами. Существование такого обмена было обнаружено позднее по соотношению фенотипов в агамоспермном потомстве растения, обработанного колхицином [9].

В связи с выше изложенным, представляет интерес рассмотрение соотношений фенотипов по ферментам изоцитратдегидрогеназа (IDH3) и малатдегидрогеназа (MDH1) в потомстве КНВС2-78А (табл.).

Таблица. Фенотипические классы маркерных ферментов в агамоспермных потомствах, полученных от пыльцестерильных растений сахарной свеклы [12]

Потомство	Фенотипы маркерных ферментов в потомстве		
	ADH1	IDH3	MDH1
	FF : FS : SS	FF : FS : SS	FF : FS : SS
KWS1-5A	0:78:0	23:41:0*	9:0:0
КНВС2-78А	-	9:47:10**	45:57:0*

Примечание: вероятность сходства с теоретически ожидаемым соотношением 3:8:3 – * – $P < 0,001$; ** – $P > 0,05$.

Это потомство представляет собой особый интерес, поскольку в нем проявились сразу два характерных для агамоспермных потомств признака: наличие соотношения фенотипов, соответствующее 3:8:3 по IDH3, и диморфизм по MDH1. Диморфизм по MDH1 указывает на то, что данное потомство возникло из соматических клеток с разной дозой аллелей в локусе *Mdh1*, а соматическая природа этих клеток указывает на то, что в их ядрах не прошли мейотические преобразования генома.

Известно, что соотношение 3:8:3 получается, когда случайным образом из совокупности, содержащей 4 элемента одного типа и 4 элемента другого типа, выбирается 2 элемента. Такая ситуация, происходит, например, когда тетраплоидная гетерозигота генотипа *FFSS* вступает в мейоз. Поскольку каждая хромосома в этот момент представлена двумя хроматидами, в ядре присутствуют 8 аллельных копий, по 4 копии каждого из 2-х аллелей. На примере расчета частот гамет у такого тетраплоида можно рассмотреть и процесс формирования частот фенотипических классов в агамоспермном потомстве при митотической агамоспермии.

Если частота перекреста между маркерным локусом и центромерой 50%, то все копии аллелей при мейозе независимы, и поэтому случайное сочетание двух копий аллелей, попадающих в одну гамету, подчиняется закону вероятности. Частоты образующихся гамет можно рассчитать по формулам гипергеометрического распределения. Для рассматриваемого здесь примера частоты генотипов гамет в долях от единицы будут определяться следующим образом.

Для $FF - C^2_4 C^0_4 / C^2_8$; число сочетаний из 4 по 2, умноженное на число сочетаний из 4 по 0 и деленное на число сочетаний из 8 по 2, т.е. $6 \times 1 / 28$.

Для $FS - C^1_4 C^1_4 / C^2_8$; число сочетаний из 4 по 1, умноженное на число сочетаний из 4 по 1 и деленное на число сочетаний из 8 по 2, т.е. $4 \times 4 / 28$.

Для $SS - C^0_4 C^2_4 / C^2_8$; число сочетаний из 4 по 0, умноженное на число сочетаний из 4 по 2 и деленное на число сочетаний из 8 по 2, т.е. $6 \times 1 / 28$.

Сократив эту пропорцию и выразив её в целых числах, получаем 3:8:3.

Именно в таких же пропорциях могут

формироваться фенотипы и при митотической агамоспермии. На этом основании можно сказать, что наблюдаемое в потомстве КНВС2-78А соотношение 3:8:3 по ферменту IDH3 указывает на два факта: 1) это потомство возникло из клеток, у которых изначально в локусе присутствовало увеличенное число копий каждого аллеля, 2) число копий аллелей уменьшилось к моменту вступления клеток в эмбриогенез.

Но с другой стороны, наличие в этом же самом потомстве двух фенотипических классов по MDH1 указывает на то, что это потомство произошло из клеток, не претерпевших мейотических преобразований генома. Следовательно, уменьшение числа копий аллелей в локусе *ldh3* произошло не мейотическим путем. Отсюда следует, что единственный путь для уменьшения числа аллельных копий – это диминуция. Именно диминуцией можно объяснить соотношения фенотипов в обоих представленных здесь потомствах.

В заключение следует добавить, что согласно предложенной ранее гипотезе равновероятный процесс диминуции избыточных копий аллелей представляет собой следствие равновероятного характера прикрепления копий аллелей к ядерной мембране, т.е. процесс диминуции начинается с прикрепления к ядерной мембране. Предполагается, что к ядерной мембране прикрепляется только по одной копии от каждой хромосомы, а неприкрепившиеся копии теряются [7, 8].

Выводы

Повторное обращение к опубликованным ранее данным с учетом накопленных фактов позволило акцентировать внимание на наличие в одном из исследованных потомств генетических характеристик, которые в совокупности подтверждают модель, объясняющую специфический механизм формирования полиморфизма в агамоспермных потомствах. Наличие в этом потомстве сразу двух взаимодополняющих признаков (вступление в эмбриогенез соматических клеток и увеличенная доза аллелей в клетках перед их вступлением в эмбриогенез) подтверждает и агамоспермное происхождение потомства и наличие процесса диминуции перед вступлением клеток в эмбриогенез.

Литература

1. Maletskii S.I., Maletskaya E.I. Self-fertility and agamospermy in sugar beet *Beta vulgaris* L. // Russian Journal of Genetics. – 1996. – 32. – P. 1643–1650.
2. Maletskaya E.I., Maletskaya S.S. The nuclear DNA mass variability in embryo root cells of sugarbeet // Sugar Tech. – 1999. – 1. – P. 30–36.
3. Levites E.V. New classification of the reproduction modes in sugar beet [Электронный ресурс] // Sugar Tech. – 2002. – 4. – P. 45–51. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02956879>
4. Gustafsson A. Apomixis in higher plants // I-III. Lunds Univ. Arsskr. N.F. Avd. – 1946–1947. – 43 (42–43). – P. 1–370.
5. Maletskii S.I., Levites E.V., Maletskaya E.I., Ovechkina O.N. Autosegregation and linked inheritance in agamospermic pedigrees of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Russ. Jour. Genetics. – 1999. – 34, N 4. – P. 520–527.
6. Szkutnik T. Apomixis in the Sugar Beet Reproduction System // Acta Biol. Cracoviensia, Ser. Bot. – 2010. – 52, N 1. – P. 87–96.
7. Levites E.V. Sugarbeet plants produced by agamospermy as a model for studying genome structure and function in higher plants [Электронный ресурс] // Sugar Tech. – 2005. – 7. – P. 67–70. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02942532>
8. Levites E.V. Marker enzyme phenotype ratios in agamospermous sugarbeet progenies as a demonstration of multidimensional encoding of inherited information in plants [Электронный ресурс] // Arxiv.org. – Режим доступа: <http://arxiv.org/abs/q-bio/0701027>
9. Levites E.V., Kirikovich S.S. Post-meiotic apozygotic combinatory process in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) [Электронный ресурс] // Advances in Bioscience and Biotechnology. – 2012. – 3. – P. 75–79. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2012.31011>
10. Levites E.V., Kirikovich S.S. Zygotic combinatorial process in plants [Электронный ресурс] // Advances in Bioscience and Biotechnology. – 2013. – 4. – P. 798–803. – Режим доступа: [doi:10.4236/abb.2013.47104](http://dx.doi.org/10.4236/abb.2013.47104)
11. Levites E.V., Kirikovich S.S. Influence of external conditions on the combinatorial processes at agamospermy [Электронный ресурс] // Advances in Bioscience and Biotechnology. – 2013. – 4. – P. 89–94. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2013.410A3010>
12. Levites E.V., Shkutnik T., Ovechkina O.N., Maletskii S.I. Pseudosegregation in the agamospermic progeny of male sterile plants of the sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Doklady Biological Sciences. – 1999. – 365. – P. 182–184.
13. Schwartz D. The genetic control of alcohol dehydrogenase in maize: Gene duplication and repression [Электронный ресурс] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1966. – 56. – P. 1431–1436. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.56.5.1431>
14. Scandalios J.G. Genetic control of multiple forms of enzymes in plants: A review [Электронный ресурс] // Biochemical Genetics. – 1969. – 3. – P. 37–79. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00485973>
15. Levites E.V., Kirikovich S.S. Epigenetic variability of unlinked enzyme genes in agamospermous progeny of sugar beet [Электронный ресурс] // Sugar Tech. – 2003. – 5, N 1&2. – P. 57–59. – Режим доступа: [doi:10.1007/BF02943765](http://dx.doi.org/10.1007/BF02943765)
16. Carvalheira G. Plant polytene chromosomes [Электронный ресурс] // Genetics and Molecular Biology. – 2000. – 23. – P. 1043–1050. – Режим доступа: [doi:10.1590/S1415-47572000000400050](http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572000000400050)
17. Feller W. An introduction to probability theory and its applications. – New York: John Wiley and Sons, INC., 1950.

LEVITES E.V.

*Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
Russia, 630090, Novosibirsk, Lavrentieva ave., 10, e-mail: levites@bionet.nsc.ru*

GENETIC SEGREGATION IN SEED PROGENY UNDER MITOTIC AGAMOSPERMY

Aims. The previously published data are examined on the base of the hypothesis about the existence of chromosomes differential polyteny and excessive chromatin diminution during the first stages of sugar beet plant embryogenesis. **Conclusions.** It has been concluded that available data provide the genetic proof of that chromatin diminution is one of the mechanisms underlying the origin of polymorphism in sugar beet progenies under mitotic agamospermy.

Key words: isozymes, polyteny, diminution, agamospermy, non-Mendelian inheritance, sugar beet.

ИЗМЕНЧИВОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ У САХАРНОЙ СВЕКЛЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ РЕПРОДУКЦИИ

Многоуровневая организация живого представляет собой иерархическую лестницу от биоты к субклеточным структурам, формируя вокруг себя различные биологические дисциплины. «В контексте каждой из них именно данный уровень считается ... основным в организации живого и в понимании его сущности». Геноцентрическая парадигма находится на одном краю этой иерархии, сводя биологическое разнообразие к различиям между генами, а классическая организмоцентрическая – относится к более высокому уровню, где организм является ключевым элементом [1]. В рамках геноцентрической парадигмы признаки делят на дискретные и континуальные. Дискретные признаки, в свою очередь, подразделяют на альтернативные, связанные с мутационными изменениями, и счетные (число цветков, семян ...), изменчивость которых напрямую не связана с активностью генов, и определяется сигналами, получаемыми растением в ходе вегетации (условия произрастания и пр.). Обе группы признаков в рамках выборочных измерений образуют ряды цифр, являясь элементами «морфопространства». Альтернативной моделью можно считать эпигенетическую парадигму наследования¹, которая не связывает индивидуальную изменчивость исключительно с изменениями в нуклеотидных последовательностях ДНК. Согласно иерархии живого этот уровень ближе к органоцентрической парадигме. В ее рамках можно выделить фрактальные (геометрические) признаки, присущие объекту как целому: структура сосудистых систем, структура корневой системы [1], а также эмбриональные и тканевые признаки. Дискретные, континуальные и фрактальные признаки четко различимы друг от друга геометрической размерностью (D). Если размерность дискретных и континуальных признаков выражается целыми числами – одно-

двух-, трехмерные признаки [1, 2], то фрактальным присуща дробная размерность [2]. В частности морфо- и гистологические структуры у растений в ряде случаев соответствуют древовидным фракталам [3].

Вариабельность структуры эпидермы листа определяется как вариацией числа хромосом, хроматид, содержания ДНК (эпигеномная изменчивость), так и вариацией числа органелл в цитоплазме (эпипластомная изменчивость). У растений непостоянство содержания ДНК может проявляться различным образом. Одной из форм проявления является миксоплоидия (полисоматия), когда в одной ткани присутствуют клетки не только с основным числом хромосом (доминирующая фракция), но и клетки иного уровня ploidy; другой – изменение содержания ДНК в определенных тканях или в процессе онтогенеза. Непостоянство содержания ДНК, не связанное с изменением числа хромосом, наблюдается у ряда видов из-за политерии – наличия дупло- и квадруплохромосом [1, 2]. Известно, что у растений наибольшая полиплоидизация имеет место в эндосперме, что, вероятно, связано с запасующей функцией. Различные вариации эндополиплоидии (полиплоидия, политерии) встречаются и в клетках генеративной сферы у различных растений. Примечательно, что содержание ДНК у растений может повышаться в процессе созревания яйцеклетки или в зиготе сразу после оплодотворения, в процессе формирования зародыша, или же во время прорастания семян [1].

Миксоплоидия – распространенное явление у растений, поэтому уже через 20 лет после первого обнаружения [2] наличие миксоплоидии было показано еще в 20 ботанических родах [1]. Сахарная свекла не являлась исключением [10, 2]. Именно в семействе маревых (*Chenopodiaceae*) была отмечена высокая частота встречаемости миксоплоидии [1]. Показано также, что у растений она может проявляться как за счет эуплоидии, так и анеуплоидии [1, 2]. Причины могут быть различными: это может являться свидетельством пластичности генома или нести регуляторную

¹ Эпигенетика (греч. ἐπί – над, выше, внешний) – изучает закономерности наследования различных изменений, не затрагивающих последовательности ДНК.

функцию [6]. При проведении цитометрических исследований у сахарной свеклы непостоянство содержания ДНК отмечено в ядрах клеток как вегетативных, так и генеративных органов [5, 6].

Существует прямая зависимость между содержанием ДНК, уровнем пloidности, объемом цитоплазмы и линейными размерами клеток, что в свою очередь влияет на число органелл в цитоплазме. Связь числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц с уровнем пloidности и размерами клеток давно известна [1, 2]. Однако в различных по происхождению материалах сахарной свёклы этот показатель может изменяться по-разному. Так в свободно размножаемых диплоидных популяциях среднее число хлоропластов варьирует в пределах 12–16 шт. на клетку [18], а при углублении инбридинга этот показатель повышается до 16–19 шт. [1]. Хлоропласты – внутриклеточные органеллы с собственным генетическим материалом. Если бы в ряду клеточных делений органеллы всегда распределялись бы поровну, то в каждой клетке растения содержалось бы столько же органелл, сколько их имела инициальная клетка. При неслучайном характере распределения органелл в момент цитокинеза возникает изменчивость их числа в популяциях соматических клеток (эпипластомная изменчивость). Но она обязана как случайной изменчивости, так и варьированию содержания ДНК в ядре (эпигеномная изменчивость).

Ткань растения представлена множеством клеток с различным числом органелл, начало которым положила одна инициальная клетка с определённым числом пластид. При делении пластиды могут распределиться между двумя дочерними клетками равномерно или неравномерно. Дочерние клетки в свою очередь делятся также либо равномерно, либо неравномерно и т.д. Таким образом, формируется своего рода «генеалогическое древо», геометрическая структура, которую можно определить термином «пластидный фрактал» [1]. Используя фрактальный подход к изучению клеточных популяций, мы получаем характеристику более высокого уровня согласно иерархии живого [1].

Целью данной работы было сравнение показателей изменчивости клеточных популяций в различных по происхождению и способу размножения материалах: у инбредной линии, коммерческого гибрида, поколения однопородительского размножения и их гибрида с линейным материалом.

Материалы и методы

В исследовании использовали однопородительскую инбредную линию СОАН 22, коммерческий гибрид «Ленора» (поколение A_0), ее потомство после однопородительского размножения (поколение A_1) и гибрид (ручная гибридизация) ♀Ленора A_1 x ♂СОАН 22.

Для осуществления однопородительского размножения на изолированном участке² до распускания первого цветка удаляют все фертильные и полуфертильные растения³ (ms 2), оставляя только мс-растения (ms 0 и ms 1). Идентификация по фенотипу пыльцы проводится ежедневно в течение всего срока цветения, так как некоторые растения могут проявлять мозаичный фенотип. Таким способом получают поколение A_1 . В беспыльцевом режиме репродукции становится возможным развитие эмбрионов без оплодотворения (апозиготия). Успех апозиготического развития выше у яйцеклеток с диплоидным набором хромосом, чем у гаплоидных яйцеклеток. Семенные потомства, получаемые при беспыльцевом режиме семенной репродукции, преимущественно являются дигаплоидами. Они формируются из диплоидных мегаспор, возникших, в свою очередь, из тетраплоидных мейоцитов. Ранее было показано, что у стерильных форм сахарной свеклы способность к формированию яйцеклеток с соматическим числом хромосом выше, чем у фертильных форм. Попадание полиплоидной клетки в зародышевый путь способствует проявлению дисомической сегрегации по многим маркерным локусам [2, 3].

Проводили ручную гибридизацию отдельных мс-растений, полученных после однопородительского размножения коммерческого гибрида «Ленора» (поколение A_1) фертильной пыльцой линии СОАН 22. Для этого пергаментными изоляторами изолировали отдельные веточки стерильных растений (за 3–5 дней до начала раскрытия цветков); остальные побеги удаляли; с фертильных растений собирали пыльцу (перевозится на изолированный участок) и точно наносили ее на изолированные цветки.

Для исследования клеточной популяции *эпидермальной ткани* проводили подсчет числа

² Изолированный участок располагается в зоне, где отсутствуют как семеноводческие посадки свеклы.

³ фенотипы стерильных растений определяли по классификации Оуэна [25]

хлоропластов на листьях первого года жизни. С нижней стороны листа снимали эпидермис, на который наносили раствор азотнокислого серебра (AgNO_3) для окрашивания хлоропластов. Подсчет числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц проводили в 50 клетках каждого, включенного в эксперимент растения. Подсчитывали среднее число хлоропластов (M), ошибку среднего значения (m), дисперсию распределения (σ^2). Сравнение между образцами проводили с помощью критерия t Стьюдента.

Совокупное число пластид в отдельной клетке обозначается термином «пластотип» (Pt). В ткани встречается несколько пластотипов, отличающихся друг от друга по числу хлоропластов в цитоплазме клеток. Величина Pt соответствует числу пластотипов в исследуемой ткани⁴. Замыкающие клетки устьиц связаны между собой генеалогически, и описываются двумя параметрами: числом пластотипов в ткани листа (Pt) и средним числом органелл на клетку (M). Эти два параметра листовой ткани образуют пропорцию ($M : Pt$), которая динамически меняется в ходе онтогенеза, характеризуя цитогенетический фрактал данной ткани. В клеточной популяции они связаны между собой формулой: $M = Pt^D$. Логарифмирование обеих сторон равенства позволяет найти интегральный параметр D , фрактальную размерность: $D = \ln M / \ln Pt$ [3].

Данный показатель свидетельствует о стабильности или наоборот нестабильности клеточной популяции исследуемого растения. Значения этих соотношений у разных растений соответствуют обобщенному принципу формирования гармонических пропорций, «на основе и посредством которых в процессе самоорганизации естественные системы обретают гармоничное строение ... структурно-функциональную ... устойчивость» [26].

С биологической точки зрения, фрактальная размерность (D) эпидермальной ткани соответствует эпигеномной и эпипластомной пластичности (нестабильности) клеток в ткани листа. Геометрическая пропорция двух величин ($M:Pt$) позволяет связать признаки двух уровней: тканевого (среднее значение числа хлоропластов на

клетку) и индивидуального (среднее число пластотипов на ткань). Таким образом, эта пропорция представляет собой новый признак, присущий эпидермальной ткани листа (растения) как целому.

Результаты и обсуждение

В таблице приведены результаты исследований клеточных популяций: среднее значение числа хлоропластов (M) изменялось от 12,71 до 14,73, диапазон изменчивости (Pt) клеточной популяции – от 6,8 до 9,3. Сравнение средних значений (M) у родительских растений полученного от ручной гибридизации «♀ мсЛеноры, поколение A_1 » и «линии ♂ СОАН 22» свидетельствуют о статистически достоверных различиях ($t = 2,3$, $P > 0,95$). Также достоверны различия и по диапазону изменчивости клеточной популяции Pt ($t = 5,14$, $P > 0,999$). Сравнение гибрида (♀ Ленора A_1 x ♂ СОАН 22) по средним значениям с родительскими компонентами свидетельствует об отсутствии различий по числу хлоропластов как при сравнении с материнскими ($t = 1,23$), так и с отцовскими ($t = 0,97$) растениями. Однако сравнение по числу пластотипов (Pt) у полученного гибрида различается только с отцовскими растениями ($t = 3,51$, $P > 0,999$). Таким образом «паттерн изменчивости» гибрида и материнского растения ($t = 0,13$) полностью идентичны. При однопородительском размножении гибрида «Ленора» так же отсутствуют достоверные различия ($t = 0,18$) по диапазону изменчивости (Pt) между исходными материнскими растениями (поколение A_0) и их потомством после однократного однопородительского размножения (поколение A_1), тогда как средние значения числа хлоропластов (M) у них различаются ($t = 3,61$, $P > 0,999$). Результаты свидетельствуют, что в потомствах, полученных как путем гибридизации, так и при однопородительском размножении, сохраняются изменчивость, соответствующая материнским растениям.

В настоящем исследовании изучение клеточной популяции проводилось на основе двух показателей – число хлоропластов в замыкающих устьиц и числом пластотипов в исследуемой ткани. Число хлоропластов – это признак, характеризующий отдельную клетку, тогда как число пластотипов – интегральный признак, присущий отдельному листу (или отдельному растению).

⁴ Например, если в исследуемом материале в десяти клетках содержится 11 хлоропластов, еще в десяти – 12 хл., в других десяти – 13 хлоропластов, то значение Pt для популяции клеток будет равно трём.

Таблица. Изменчивость и статистические параметры клеток эпидермальной ткани листа

Материал	число растений*	M	Pt	D
Ленора A ₁ x СОАН 22	15	14,04 ± 0,39	6,8 ± 0,67	1,4
СОАН 22	43	13,55 ± 0,32	9,3 ± 0,24	1,18
Ленора, A ₀	15	12,71 ± 0,39	6,8 ± 0,36	1,29
Ленора A ₁ ,	15	14,73 ± 0,40	6,9 ± 0,40	1,50

Примечание: * от каждого растения (с каждого препарата) в исследование брали по 50 клеток.

Соотношение этих параметров ($D = \ln M : \ln Pt$) характеризуют цитогенетический фрактал данной ткани и свидетельствует о стабильности или относительной нестабильности клеточной популяции у изученных растений. В исследуемом материале значение D варьировало от 1,1 до 1,5. С самым низким показателем оказалась инбредная линия СОАН 22, что свидетельствует о нестабильности у нее клеточных популяций. В гибридных материалах (поколения A₀ и A₁) показатель существенно выше (табл.), что свидетельствует о стабильности этих популяций. Геометрическая пропорция двух величин (D) связывает признаки двух уровней: тканевого (число хлоропластов) и индивидуального (диапазон варьирования), представляя собой новый признак, присущий эпидермальной ткани листа (растения) как целому.

Выводы

1. Эпигеномная и эпипластомная вариабельность, оцениваемая через геометрические пропорции (D), характеризует общее физиологическое состояние клеточных популяций растений в ходе онтогенеза: диплоидные гетерозисные мс-гибриды имеют высокие значения эпигеномной стабильности D; инбредные линии депрессированы, что приводит к низким значениям этого показателя.
2. Число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у потомства может зависеть от способа размножения и особенностей родительских форм, но «паттерно» изменчивости как при гибридизации, так и при однородительском размножении соответствует только материнским формам.

Работа проведена при поддержке интеграционного гранта президиумов СО РАН и НАН Беларуси № 3.

Литература

1. Павлинов И.Я. Морфологическое разнообразие: общие представления и основные характеристики // Сборник трудов Зоологического музея МГУ, – 2008. – 49. – С. 343–388.
2. Мандельброт Б. Фрактальная геометрия природы. – М: Институт компьютерных исследований, 2010. – 656 с.
3. Малецкий С.И. Классификация признаков растений // Эпигенетика растений: сб. науч. тр. – Новосибирск: Институт цитологии и генетики СО РАН, 2005. – С. 35–38.
4. Филипченко Ю.А. Индивидуальная изменчивость // Изменчивость и методы ее изучения. Основы биологической вариационной статистики. – Ленинград, 1926. – С. 5–32.
5. Уфимцев Р. Хвост ящерики. Метафизика метафоры // Калининград: «Оттокар», 2010. – 293 с.
6. D'Amato F. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerantes // CRC Crit. Rev. Plant Sci. – 1985. – 3, N 1. – P. 73–112.
7. Sesek P., Kump B., Bohanes B. Interphase structure of endoreduplicated nuclei in diploid and tetraploid *Brassica oleraceae* L. // Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica. – 2005. – 47/1. – P. 93–99.
8. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 1. Изменчивость в онтогенезе // Биополимеры и клетка, – 1994. – 10, № 6. – С. 5–35.
9. Nemes B. Das Problem der Befruchtungsvorgänge und andere zytologische Fragen. – Berlin: Gebrüder Bornträger, 1910. – P. 532.
10. Лусс А.И. Вегетативные мутации. В кн: Теоретические основы селекции растений. – М,Л: «Сельхозгиз», 1935. – 1. – С. 215–292
11. Харченко-Савицкая Е.И. Цитология и эмбриология сахарной свеклы. В кн.: Свекловодство. – Киев: «Госсельхозиздат», 1940. – 2. – С. 453–550.
12. Wulff H.D. Die polysomatie der Chenopodiaceen // Planta. – 1936. – 26, N 2. – P. 275–290.
13. Кунах В.А., Адонин В.И., Ожередов, Блюм Я.Б. Миксоплоидия у диких и культивируемых видов крестоцветных, способных к гибридизации с рапсом *Brassica Napus*. // Цитология и генетика. – 2008. – 42. – С. 81–86.

14. Малецкая Е.И., Юданова С.С. Цитологический анализ миксоплоидии клеточных популяций в апозиготических потомствах гаплоидных растений сахарной свеклы. // Сб. науч. тр.: Факторы экспериментальной эволюции организмов. – Киев: Логос, 2013. – 13. – С. 210–214.
15. Sheid O.M., Jakovleva L., Afsar K., Maluszynska J. Paszkowski J. A change of ploidy can modify epigenetic silencing // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1996. – 93 – P. 7114–7119.
16. Maletskaya E.I., Maletskaya S.S. The nuclear DNA mass variability in embryo root cells of sugarbeet // Sugar Tech. – 1999. – 1, N 1/2. – P. 30–36.
17. Lukaszewska E., Sliwinska E. Most organs of sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) plants at the vegetative and reproductive stages of development are polysomatic // Sex Plant Reprod. – 2007. – 20. – P. 99–107.
18. Savitsky N.I. Effectiveness of selection for tetraploids plants in C₀ generation on the basis of the number of chloroplasts in stomata // Amer. Soc. of Sugar Beet Technologists. – 1966. – 13, N 8. – P. 655–661.
19. Раджабли Е.П., Рудь В.Д. Получение и использование полиплоидных форм растений. – Новосибирск: «Наука», 1972. – 132 с.
20. Юданова С.С., Малецкая Е.И., Малецкий С.И. Изменчивость числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. – 2002. – 38, № 1. – С. 72–78.
21. Малецкий С.И., Юданова С.С., Малецкая Е.И. Гармонические пропорции числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц сахарной свёклы (*Beta vulgaris* L.) // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – 17, №1. – С. 72–80.
22. Малецкий С.И., Левитес Е.В., Малецкая Е.И., Шаворская О.А. Автосегрегация в партеногенетических потомствах сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) Докл. РАН. – 1997. – 354, № 5. – С. 705–706.
23. Левитес Е.В., Шкутник Т., Овечкина О.Н., Малецкий С.И. Псевдосегрегация в агамоспермных потомствах пыльцестерильных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). Докл. РАН. – 1998. – 362, № 3. – P. 430–443.
24. Owen F.V. Cytoplasmically inherited male sterility in sugar beets // J. Agric. Res. – 1945. – 71, N 10. – P. 423–440.
25. Сороко Э.М. Структурная гармония систем. – Минск: Наука и техника, 1984. – 284 с.

YUDANOVA S.S.

*Institute of Cytology of Genetics Siberian Branch of Russian academy of Science,
Russia, 630090, Novosibirsk, Lavretea, 10, e-mail: sonia_y@ngs.ru*

A VARIABILITY OF CELL POPULATION IN SUGAR BEET BY DIFFERENT MODE OF SEED REPRODUCTION

A **goal** of the presented paper was to analyze the variability of cell populations in different by origin and breeding methods materials. **Methods.** The following parameters of stomata guard cell populations were evaluated: average mean of chloroplasts number and plastotype, variance of the distribution, the integral index D (lnM / lnPt), characterizing cytogenetic tissue fractal and stability of the cell population. Evaluation of significance was carried out Student's T-test. **Results.** It was shown that regardless of the method of the reproduction (hybridization or uniparental reproduction) maintains 'pattern' variability corresponding mother plants. **Conclusions.** Geometric proportion (D), linking the characters of tissue and individual levels indicates instability of cell populations in inbred plants. Besides, both hybridization and uniparental reproduction cell populations were quite stable.

Key words: variability, fractal characters, sugar beet, mode of seed reproduction.

СТРУКТУРА І ФУНКЦІЇ ХРОМОСОМ

УДК 599. 323. 4

АЗИЗОВ И.В.¹, КУЛИЕВ Г.Н.², МАМЕДРЗАЕВА Э.Т.², ШАМИЛОВ Э.Н.³,
АБДУЛЛАЕВ А.С.³, ШАМИЛЛИ В.Э.³, КУЛИЕВ А.Г.³

¹ Институт Ботаники НАН Азербайджана,

Азербайджан, AZ1073, г. Баку, Бадамдарское шоссе, 40, e-mail: ibrahim.azizov47@gmail.com

² Институт Зоологии НАН Азербайджана,

Азербайджан, AZ1073, г. Баку, ул. А. Аббасов, переул. 1128, пр. 50, e-mail: qiyaq@mail.ru

³ Институт Радиационных Проблем НАН Азербайджана,

Азербайджан, AZ114, г. Баку, ул. Б. Вагабзаде, 9, e-mail: elshanshamil@gmail.com

КАРИОТИПЫ *MICROTUS OBSCURUS* НА ТЕРРИТОРИИ АЗЕРБАЙДЖАНСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

Серые полевки в роде *Microtus* представлены многочисленными видами и являются одной из наиболее интересных групп для изучения кариологии. В этой группе с помощью комплексных методов, в том числе кариологических, обнаружены несколько криптических видов [1, 2]. Таксономия некоторых видов определена только путем кариологических данных. Определены также некоторые кариоморфы в обыкновенных полевках, отличающиеся между собой числом хромосомных плеч [3, 4]. Обнаружена гибридная зона между двумя 46-хромосомными формами *Microtus arvalis*. Последние годы активно ведутся исследования кариологии *M. arvalis* Поволжья М.И. Баскевичем и сотрудниками [5-8].

Целью нашей работы являлось изучение кариотипов *M. obscurus* на территории Азербайджана.

Материалы и методы

Материал обыкновенной полевки собран в восьми различных местах территории Азербайджана. Исследованиями охвачены изолированные друг от друга территории Большого и Малого Кавказа, Нахичеванской Республики и Ленкоранской природной области. Всего изучено 103 экземпляра.

Для выполнения работы использованы методы Форда и Хамертона [9]. Окрашивание полученных метафазных пластинок проводили методом дифференциального окрашивания, предложенным С.И. Раджабли и Е.П. Крюковой [10]. Окраска на гетерохроматин получена по методу Самнера [11]. AgNOR (ядрышкообразующие регионы (ЯОР)) получены по методу Howell W.M., Black D.A. [12].

Результаты и обсуждение

Кариотип обыкновенной полевки из Кедабекского района (Малый Кавказ). Диплоидное число хромосом равно 46. Аутосомы этого вида по величине можно распределить на две группы: в первую входят 4 пары крупных мета- и субметацентриков и одна пара крупных субтелоцентриков; во вторую – 7 пар мелких мета- и субметацентрических и 10 пар мелких акроцентрических хромосом. X-хромосома является средним метацентриком, Y-хромосома – одним из мелких акроцентриков. На некоторых препаратах на слабоспирализованных метафазных пластинках выявлена мелкая субтелоцентрическая хромосома, которая при сильной спирализации обнаруживается как акроцентрик. На этих пластинках увеличиваются основные числа хромосомных плеч [13].

Дифференциальная окраска показала, что особи из Кедабекской популяции обыкновенных полевек имеют 11-12 пар хромосом с центромерными блоками структурного гетерохроматина (в 5–6 мелких парах метацентрических и 6 парах акроцентрических хромосом). Ядрышкообразующие районы располагаются в 4 парах: в 2 крупных метацентриках и 2 средних акроцентриках. В крупных пар, включая X-хромосомы, не выявляются C-окрашенные блоки.

Особи из Пиркулинкой популяции (Большой Кавказ) имели центромерные блоки гетерохроматина в 6 парах мелких метацентриков и в 5 парах акроцентриков. Y-хромосома в обеих популяциях имела акроцентрическую форму и интенсивно окрашивалась на гетерохроматин. У крупных

пар, включая X-хромосомы, С-окрашенные блоки не выявлены. У-хромосома является одним из мелких акроцентриков в особи как Кедабекской, так и Пиркулинский популяций. ЯОР в особи Пиркулинский популяции располагаются только в 2 средних акроцентриках; в крупных парах они не обнаружены.

Структурный гетерохроматин в обыкновенных полевках из Чайкендской популяции выявлен в 5 метацентрических и 7 акроцентрических хромосомах. У-хромосома, представленная мелким метацентриком, полностью гетерохроматизирована. У крупных пар, включая X-хромосомы, не выявляются С-окрашенные блоки.

Структурный гетерохроматин у обыкновенных полевек Ленкоранской природной области обнаружен четко в 9-ти и нечетко – в двух парах мелких хромосом. Кариотип обыкновенный полевки из Нахичеванской Республики совпадает по кариотипу этого же вида из Кедабекской популяции.

У обыкновенной полевки при тотальном окрашивании отмечен как внутривидовой полиморфизм, так и межвидовые различия, а также по гетерохроматину и ЯОР. У некоторых особей Кедабекской популяции наблюдается полиморфизм 5-й пары хромосом: одна хромосома акроцентрическая, другая – метацентрическая. Следует отметить, что у большинства полевек эти пары метацентрические. G-окраска хромосом показала, что эта мутация является следствием достаточно редкой у млекопитающих перичентрической инверсии. Размеры 5-й пары хромосом неодинаковы. Размер акроцентрической хромосомы превосходит размер субтелоцентрической. Применение С-метода окраски хромосом показало, что у акроцентрика имеется крупный гетерохроматиновый блок, тогда как у субтелоцентрика он не обнаружен. Увеличение размеров акроцентрика, по видимому, связано с дополнительным гетерохроматиновым материалом.

Хромосомный полиморфизм, связанный с перичентрической инверсией гомологов 5-й пары крупных аутосом, описан также в работах [2, 10]. В результате G-окраски также подтверждено, что акроцентрической хромосома становится в результате перичентрической инверсии. Для инвертированной хромосомы характерно появление крупного блока С-гетерохроматина, охватывающего практически весь район инверсии [2]. Необходимо отметить, что в мутантном кариотипе в

У-хромосоме не обнаружен гетерохроматиновый блок, тогда как в особи нормального кариотипа она является гетерохроматиновой. Возможно, увеличение гетерохроматина в мутантном акроцентрике связано с гетерохроматином У-хромосомы.

Гетероморфность пятой пары хромосом была отмечена в 1978–1983 годах у 5 особей Кедабекской популяции из 103 исследованных (4,87 %). Однако, в различных исследованных за последние годы популяциях обыкновенной полевки, в том числе и из Кедабекской популяции, гетероморфность пятой пары хромосом не отмечалась. Вероятнее всего, возникшая новая мутация не закрепилась в популяции. Последние исследования показали, что в этих местностях радиоактивное излучение превышает нормы, и имеет локальный характер. В связи с этим, кариологические исследования грызунов, в том числе обыкновенных полевек, в этих местностях продолжаются.

М.И. Баскевич и др. [8] на территории Нижегородья провели хромосомный анализ собранного в 2013 году материала и среди 12-ти кариотипированных экземпляров *Microtus arvalis obscurus* выявили лишь одну особь, гетерозиготную по 5-ой паре хромосомной мутации. По мнению авторов, возможными причинами наблюдаемого явления можно рассматривать отдаленные последствия химического и радиационного загрязнения, эффект краевого положения популяции и ее формирование в историческом контексте из общего для Приволжской возвышенности рефугиума. Мы полностью согласны с мнением М.И. Баскевич и др., 2014 [8] и предполагаем, что в кариотипе *M. obscurus* среди хромосомных пар самыми неустойчивый к загрязнению и радиации являются крупные субтелоцентрические пары. Возможно, этих животных можно считать индикаторами загрязнения местности в горных районах, учитывая то, что этот вид в Азербайджане распространен предпочтительно в горных территориях.

Как отмечалось выше, в кариотипе особи Кедабекской популяции обыкновенных полевек, центромерная часть 11–12-ти пар хромосом (5–6 пар метацентрические и 6 пар акроцентрические) обладает гетерохроматиновым блоком. ЯОР находятся в четырех парах хромосом (2 пары – крупные метацентрические, и 2 пары – акроцентрические, среднего размера). В кариотипе особи Пиркулинской популяции центромерные гетерохроматиновые блоки отмечены в 11-ти парах хромосом (6 пар –

метацентрические, и 5 пар – акроцентрические). ЯОР обнаруживаются только в двух парах акроцентрических хромосом среднего размера. Y-хромосома у обеих популяций имеет акроцентрическую форму и интенсивно окрашивается.

Проведено 4 вариантов скрещиваний обыкновенных полевков: 1. Кедабек ♀ x Пиркули ♂; 2. Пиркули ♀ x Кедабек ♂; 3. Кедабек ♀ x Кедабек ♂; 4. Пиркули ♀ x Пиркули ♂.

В вариантах скрещиваний полевков с различных географически изолированных популяций Малого и Большого Кавказа число особей в выводках оказалось крайне низким и составило 2,1–2,5. При этом отмечено уменьшение интенсивности размножения (на 25 и 33 %). Смертность среди рожденных полевков была высокой, в среднем 65 %. Большая часть полевков доживала только до 10–15 дневного срока. Особи поколения F₁ популяций Пиркули x Кедабек оказались стерильными.

В кариотипе гибридных особей гетерохроматин был обнаружен в 12 парах хромосом (рис. 1). В одной из акроцентрических пар среднего размера, гетероморфизм, связанный с гетерохроматином, встречается только у одного гомолога. Акроцентрическая Y-хромосома полностью гетерохроматинизирована. ЯОР отмечены в 4-х парах хромосом: в двух парах крупных хромосом, у одного из гомологов, и в двух акроцентрических парах хромосом среднего размера (рис. 2).

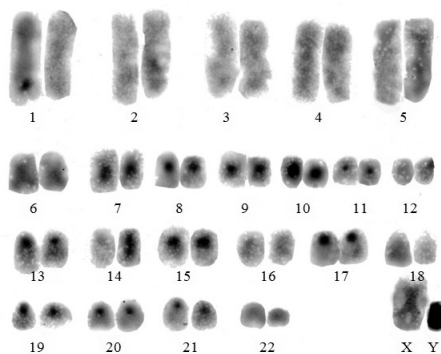


Рис. 1. Структурный гетерохроматин в гибридного самца *M. obscurus* (Пиркули ♀ x Кедабек ♂)

Список литературы

1. Орлов В.Н., Булатова Н.Ш. Сравнительная цитогенетика и кариосистематика млекопитающих. – М.: Наука, 1983. – 405 с.
2. Мейер М.Н., Голинищев, Ф.Н., Раджабли С.И., Саблина О.Л. Серые полевки Фауны России и сопредельных территорий. – С-Пб, 1996. – 320 с.

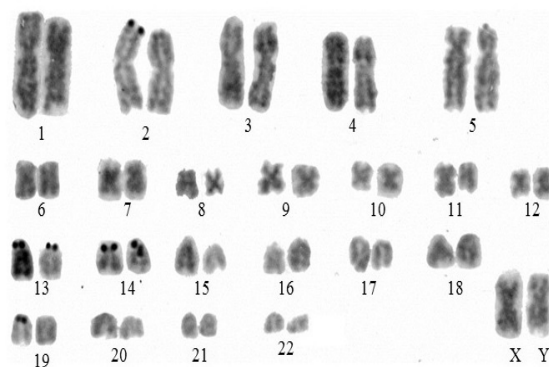


Рис. 2. ЯОР у гибрида самки *M. arvalis* (Пиркули ♀ x Кедабек ♂)

Кроме того, хорошо окрашенные ЯОР заметны у одного гомолога среди мелких акроцентрических аутосом. В мейозе F₁ гибридных самцов не обнаружено нарушений в конъюгации хромосом на стадиях диакинез–метафаза–I и метафаза–II. Число сперматозоидов и устойчивость мейотической конфигурации показывают, что гибридные самцы должны быть фертильными. Характер распределения гетерохроматина, а также мелкие и устойчивые отличия в локализации и числе ЯОР, могут рассматриваться как индикаторы генетических различий, имеющих отношение к генетической изоляции [14].

Выводы

1. Установлены кариотипы обыкновенной полевки на территории Азербайджана. Кариотип этого вида включает: 5 пар крупных мета-, субметацентрических, субтелоцентрических хромосом, а также мелкие аутосомные хромосомы – 10 пар двуплечих и 7 акроцентрических.

2. Гетероморфность пятой пары хромосом была отмечена у 5 особей (4,87 % от общего числа исследованных) Кедабекской популяции из 103 исследованных в 1978–1983 годах с разных районов Азербайджана.

3. Проведена гибридизация между отличающимися по гетерохроматину и ядрышкообразующим районам двух популяций – обыкновенной полевки Большого Кавказа (популяции Пиркули) и Малого (Кедабекской популяции). Полученные гибриды были стерильными.

3. Golenischev F.N., Meyer M.N., Bulatova N.Sh. The hybride zone between two karyomorphs of *Microtus arvalis* (Rodentia, Arvicolidae) // Proc. Zool. Inst. RAS. – 2001. – 289. – P. 89–94.
4. Булатова Н.Ш., Голенищев Ф.Н., Ковальская Ю.М., Емельянова Л.Г., Быстракова Н.В., Павлова С.В., Наджафова Р.С., Лавренченко Л.А. Цитогенетическое изучение парапатрической зоны контакта двух 46-хромосомных форм обыкновенной полевки в Европейской России // Генетика. – 2010. – 46, № 4. – С. 502–508.
5. Баскевич М.И., Окулова Н.М., Миронова Т.А., Кривоногов Д.М., Маслов В.Ю., Трушкова М.А. Хромосомные и некоторые морфологические особенности у фоновых видов грызунов (Mammalia: Rodentia) из Арзамасского района Нижегородской области // Видовые популяции и сообщества в антропогенно трансформированных ландшафтах: состояние и методы его диагностики: материалы XI международной научно-практической конференции. – Белгород: «Политерра», 2010. – С. 198–199.
6. Баскевич М.И., Окулова Н.М., Миронова Т.А., Кривоногов Д.М., Маслов В.Ю., Трушкова М.А. Серые полёвки Нижегородской области в свете кариологических данных // Териофауна России и сопредельных территорий (IX съезд Териологического общества): материалы Международного совещания. – М.: КМК, 2011. – С. 42.
7. Баскевич М.И., Окулова Н.М., Миронова Т.А., Кривоногов Д.М., Маслов В.Ю., Трушкова М.А. Динамика популяционно-генетической структуры *Microtus arvalis* формы *obscurus* (Rodentia, Arvicolinae) во времени: по материалам трёхлетнего цитогенетического контроля популяции из Арзамасского района Нижегородской области // Структурно-функциональные изменения в популяциях и сообществах на территориях с разным уровнем антропогенной нагрузки: материалы XII международной конференции. – Белгород: ИД «Белгород», 2012. – С. 18–19.
8. Баскевич М.И., Миронова Т.А., Окулова Н.М., Кривоногов Д.М., Маслов В.Ю., Трушкова М.А. Хромосомные исследование серых полевок (Rodentia Arvicolinae, *Microtus*) из Нижегородской области // Зоологические исследования регионов Росси и сопредельных территорий. Материалы III Международной научной конференции. Нижний Новгород, 2014. – С. 253–258.
9. Ford C.E., Hamerton J.L. A colchicines hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes // Stain Technol. – 1956. – 31. – P. 247–251.
10. Раджабли С.И., Крюкова Е.П. Сравнительный анализ дифференциальной окраски хромосом двух видов хомячков: даурского и китайского // Цитология. – 1973. – 15. – С. 1527–1531.
11. Sumner A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin // Exp. Cell. Res. – 1972. – 75. – P. 304–306.
12. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a step method // Experientia. – 1980. – 36. – P. 1014–1015.
13. Кулиев Г.Н. Изучение кариотипов обыкновенных полевок из разных географических точек Азербайджанской ССР // Известия АН Азербайджанской ССР. Серия биологических наук. – 1978. – № 5. – С. 84–88.
14. Кулиев Г.Н. Попытка гибридизации трех видов лесных мышей (*Sylvaemus uralensis*, *S. fulvipectus*, *S. ponticus*) различных географических популяций обыкновенной полевки (*Microtus arvalis*) Азербайджана // Вестник Харьковского Университета имени Каразина, серия «Биология». – 2012. – Вып. 15, № 1008. – С. 129–135.

AZIZOV I.V.¹, **QULIYEV G.N.**², **MEMMEDRZAYEVA E.T.**², **SHAMILOV E.N.**³, **ABDULLAYEV A.S.**³, **SHAMILI V.E.**³, **QULIYEV A.Q.**³

¹ *Institute of Radiation Problems of Azerbaijan National Academy of Sciences, Azerbaijan, AZ114, Baku, B. Vahabzada str., 9, e-mail: elshanshamil@gmail.com*

² *Institute of Zoology of the National Academy of Sciences of Azerbaijan, Azerbaijan, Baku, AZ1073, A. Abasov str., 1128 lane, 504 block, e-mail: qiyas_q@mail.ru*

³ *Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Azerbaijan, Azerbaijan, AZ1073, Baku, Badamdar road, 40, e-mail: ibrahim.azizov47@gmail.com*

KARYOTYPES OF MICROTUS OBSCURUS IN THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF AZERBAIJAN

Aims. Karyotypes of common vole (*Microtus obscurus*) distributed in mutations have been registered. **Methods.** The structure of this chromosome was analyzed by G and C-banding methods. In the fifth pair of chromosomes in some specimens of common vole caught in the Azerbaijan territory (Kedabek district). Due to the fact that in one of the chromosome at which the mutation was detected occurs pericentric inversions, it is converted into the acrocentric form. **Conclusions.** A hybridization between different of heterochromatine

and constituent parts of the nucleolus two populations of common voles Big (population of Pirguli) and Lesser Caucasus (population of Kedabek) was carried out. **Results.** The resulting hybrids were sterile.
Key words: heterochromatine, chromosome, C-banding, population.

УДК 575.8 + 599.323

ЛЕВЕНКОВА Е.С.

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук,
Россия, 119071, г. Москва, Ленинский пр., 33, e-mail: e-leven@mail.ru

СТРУКТУРНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ ХРОМОСОМ В МИКРОЭВОЛЮЦИИ

Связь хромосомного полиморфизма и экологических условий обитания видов продемонстрирована многократно, начиная с работ Добржанского [1, 2 и др.] Вероятно, микроволуционные преобразования, которые приводят к образованию комплекса близких видов, адаптационны и направлены на максимальное использование экологических ниш. Вопрос о том, каким образом эти события связаны с возрастанием сложности организации генома в ходе макроэволюционных изменений, обсуждается, но пока не имеет однозначного ответа [3–5].

Видоспецифичные хромосомные различия у млекопитающих связаны с наличием дополнительных гетерохроматиновых районов, инверсиями, транслокациями, центрическими слияниями акроцентриков и др. Роль структурных изменений хромосом оценивают по-разному – как причину, или как побочное следствие видообразования. Наше исследование гибридного мейоза в разных таксонах грызунов показало, что хромосомные перестройки сами по себе, без дополнительных условий, не создают репродуктивных барьеров. Повидимому, становление видовых особенностей происходит одновременно при условии генной, хромосомной дивергенции и изменений в архитектонике ядра, причем значимость этих изменений для каждого таксона различна. Вероятно, в ходе макроэволюционных преобразований происходит еще более значительная реорганизация генома, при которой увеличивается сложность взаимодействия всех его компонентов.

Материал и методы

Многолетние исследования мейоза у видов и гибридов выполнены на разных таксонах грызунов: хомячков *Phodopus*, мышей *Mus*, крыс *Rattus*, полевок *Alexandromys*, землероек *Sorex*. Комплексный цитогенетический анализ проводили методами светового

анализа митотических и мейотических хромосом, и электронной микроскопии синаптонемных комплексов (СК) в пахитене мейоза.

Результаты и обсуждение

Первым объектом исследования гибридного мейоза стали джунгарские хомячки *Phodopus sungorus* ($2n = 28$, $NF = 56$), *Ph. campbelli* ($2n = 28$, $NF = 52$) и гибриды от их скрещивания [6]. Исходные виды хорошо различимы морфологически и по занимаемым ареалам, гибридные самцы оказались стерильны, у самок была выявлена пониженная плодовитость.

Кариотипические различия джунгарских хомячков связаны с наличием добавочных гетерохроматиновых плеч на двух самых мелких аутосомах у *Ph. sungorus*, у обоих видов выявлен полиморфизм по наличию добавочного гетерохроматина на X-хромосоме. По G-окраске оказались гомологичны почти все элементы кариотипа, за исключением ширины полос в прицентромерном районе первой пары, при C-окраске выявили различия в локализации блоков гетерохроматина на трех первых, шестой парах аутосом, и внутривидовой полиморфизм по этому признаку. При электронно-микроскопическом анализе синаптонемные комплексы самцов обоих видов оказались сходны и представлены 13 аутосомными и половым бивалентами. Гетерохроматин коротких плеч самых мелких аутосом и половых хромосом оказался практически не представлен на СК.

При исследовании мейоза гибридных самцов в сперматоцитах на стадии пахитены обнаружили множественные нарушения синапсиса хромосом. При световом анализе только в единичных мейоцитах обнаружили полностью сформированные СК, однако и они оказались аномальны. С помощью электронной микроскопии в таких клетках выявили

нарушения: аморфное состояние хроматина на участках боковых элементов синаптонемных комплексов, их выпетливание и неравномерное перекручивание. Асинаптирующие фрагменты СК вступали в незаконные ассоциации с другими бивалентами, один из крупных бивалентов контактировал с осью X-хромосомы (рис.) Наиболее часто были асинаптированы биваленты, соответствующие по величине 4–6 аутосомам. Осевые элементы половых хромосом были диссоциированы в большинстве сперматоцитов, тогда как у исходных видов они имеют участок синапсиса.

В остальных исследованных под электронным микроскопом клетках на стадии средней-поздней пахитены эти аномалии были более выражены; длинные асинаптированные фрагменты, их переплетение, деструктурированные участки, унивалентные, незаконные ассоциации и интенсивное окрашивание аномальных структур приводили к трудности идентификации СК.

Итак, у стерильных гибридных самцов F1 от обоих сочетаний скрещиваний джунгарских хомячков выявили блокаду сперматоцитов в профазе из-за нарушений синапсиса хромосом, только единичные клетки завершали стадию пахитены и формировали аномальные сперматозоиды. У гибридных самок мейоз также затруднен, о чем свидетельствует нарушение их фертильности. Различие в степени нарушения плодовитости потомства первого поколения от скрещивания джунгарских хомячков по-видимому, связано с нестабильностью X-Y - бивалента: наличие асинаптирующих районов создает дополнительное препятствие для синапсиса в условиях гетерозиготности. По-видимому, во всех случаях, когда от скрещивания близких видов млекопитающих получены плодовитые самки и стерильные самцы, непосредственная причина стерильности последних – блокада мейоза в профазе на стадии пахитены.

Объяснить нарушения синапсиса хромосом у гибридных особей особенностями кариотипов исходных видов хомячков *Phodopus* оказалось невозможно. Мы предположили, что множественность аномалий синапсиса хромосом в пахитене мейоза гибридных самцов, вероятно, связана с дивергенцией генетических механизмов, ответственных за синапсис хромосом.

Это предположение подтверждают исследования мейоза при гибридизации мышей *Mus* ($2n = 40$) со сходными кариотипами. Мы обнаружили увеличение спонтанных

мейотических нарушений у самцов от скрещивания *M. musculus domesticus* из лабораторной линии и дикой популяции [7]. В потомстве от скрещивания *M. spretus* и линейных *Mus domesticus* самцы оказались стерильны, а самки со сниженной плодовитостью, в мужском и женском мейозе выявили аномалии синапсиса и выбраковку мейоцитов [8]. Авторы отметили, что механизмы контроля синапсиса и рекомбинации могут изменяться в процессе видообразования.

Анализ мейоза у самцов от разных вариантов скрещивания кавказских кустарниковых полевок рода *Terricola* показал, что обычный в популяциях полиморфизм по хромосомным перестройкам, в том числе Робертсоновским транслокациям (Rb), не препятствует прохождению мейоза. У гибридного самца от скрещивания кариоморф *T. daghestanicus* ($2n = 38$ x $2n = 42$) гетероморфные хромосомы формировали на стадии пахитены два тривалента с полным синапсисом боковых элементов метацентрика и соответствующих ему акроцентриков [9].

Наши дальнейшие исследования мейоза у самцов, полученных от скрещивания черной *Rattus rattus* ($2n = 38$) и желтогрудой *R. flavipectus* ($2n = 42$) крыс, выявили, что две Робертсоновские перестройки и две перичентрические инверсии, различающие кариотипы исходных видов, не влияют на синапсис хромосом у гибридов. В сперматоцитах на стадии пахитены сформированы Робертсоновские триваленты, а гетерозиготные по инверсии хромосомы формируют выровненные биваленты. Обнаружили асинапсис половых хромосом в трети от исследованных сперматоцитов, что может снижать плодовитость гибридных самцов [7].

В кариотипе бурозубок *Sorex araneus*, распространенных по всей Евразии и ставших модельным объектом для изучения микроэволюционных процессов, 10 акроцентриков составляют мобильную часть кариотипа и сливаются в метацентрики в любом сочетании, образуя расы с разным числом и набором хромосом. При световом исследовании мейоза у самцов с разным набором метацентриков мы не выявили нарушений. П.М. Бородин с соавт. [10] при электронно-микроскопическом исследовании межрасовых гибридов *S. araneus* наблюдали регулярное спаривание в тривалентах и квадрилентах даже при гетерозиготности по Rb с монобрахиальной гомологией.

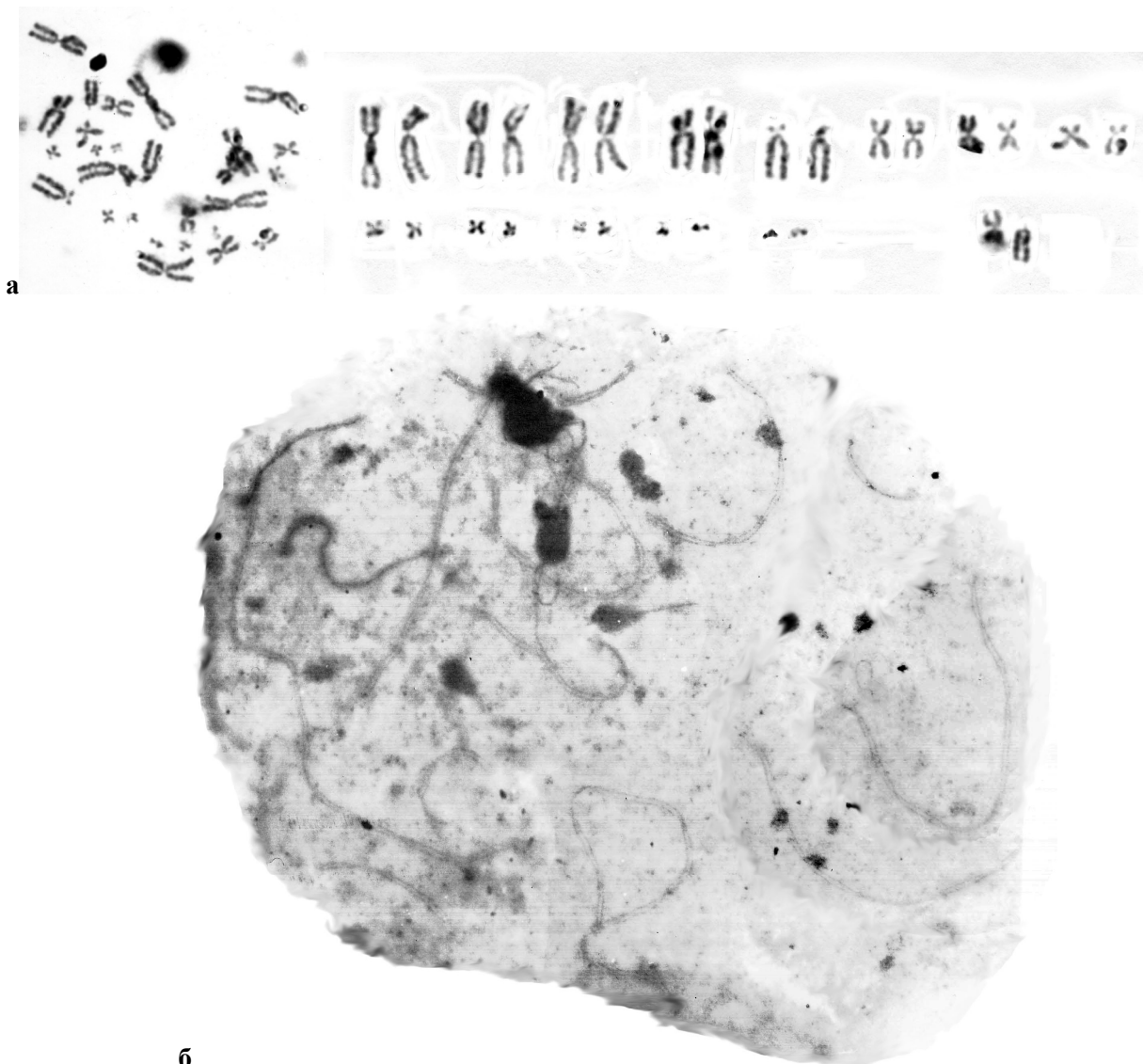


Рис. а – Метафазная пластинка и кариотип (световая микроскопия); б – распластанный сперматоцит (электронная микроскопия) самца-гибрида от скрещивания самки *Ph. sungorus* и самца *Ph. campbelli*; слева – несинаптирующие осевые элементы половых хромосом контактируют с бивалентом, соответствующим, по-видимому, первой по величине паре ауто сом

У мышей *Mus domesticus* из западно-европейских популяций с робертсоновской кариотипической изменчивостью, монобрахиальная гомология в метацентриках определяет стерильность у особей, гетерозиготных по таким Rb [11]. В сперматоцитах мышей формируется тетравалент, что свидетельствует о работе синаптической подгонки, тем не менее мейоз не завершен. У слепушонок *Ellobius* с робертсоновским полиморфизмом трудности для синапсиса в мужском мейозе, помимо брахиальной гомологии, создает гетерозиготность по множественным робертсоновским транслокациям. В большинстве клеток на стадии поздней пахитены гетерологичный синапсис

элементов разных метацентриков не полностью скорректирован, что влияет на выбраковку сперматоцитов и фертильность самцов [12].

Полный синапсис необходим для нормального завершения мейоза и созревания гамет. Факты о его затруднениях при гетерозиготности по Rb, свидетельствующие о наличии латентных репродуктивных барьеров в популяциях, вызвали дискуссии об определении вида и о хромосомном видообразовании [11 и др.] Однако наши исследования показали, что при обычном в популяциях полиморфизме по добавочному гетерохроматину коротких плеч хромосом, инверсиям, Rb, хромосомные различия в мейозе у гетерозигот ликвидирует

синаптическая подгонка. Таким образом, он не создает репродуктивных барьеров и напрямую не участвует в видообразовании.

Выводы

Анализ наших и литературных данных показал, что наряду с универсальностью синаптической подгонки в мейозе, есть видоспецифичные особенности её действия. Нужно с осторожностью обобщать и экстраполировать выводы, сделанные при анализе перестроек у одного таксона, на другие, тем более эволюционно отдаленные виды. Слияние акроцентрических хромосом в робертсоновские метацентрики обычно при становлении видовых различий в разных таксонах. Однако заключение о том, насколько именно эти и другие структурные перестройки хромосом участвуют в возникновении репродуктивных барьеров, невозможно

сделать без анализа мейоза в каждом конкретном случае. Кроме того, необходимо учитывать генетический фон – затруднения синапсиса хромосом могут быть вызваны дивергенцией систем контроля мейотических процессов. По-видимому, в становлении различий каждого таксона и группы близких видов участвует хромосомная и генетическая изменчивость, в комплексе с архитектурой ядра.

Тем более недопустима прямая экстраполяция микроэволюционных событий, направленных, по-видимому, на увеличение биоразнообразия внутри таксона и адаптацию к максимальному использованию экологических ниш, на события макроэволюции, в ходе которых возрастает сложность организации генома и происходит становление таксономической иерархии.

Литература

1. Dobzhansky Th. Genetics of natural populations. XZVI. Altitudinal and seasonal changes produced by natural selection in certain populations of *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila persimilis* // Genetics. – 1948. – 33. – P. 158–176.
2. Баскевич М.И. Проверка модели канализованной хромосомной эволюции на новом териологическом материале // 36. науч. пр.: Факторы экспериментальной эволюции организмов. // К.: Логос, 2013. – 12. – С. 13–17.
3. Проворов Н.А., Мыльников С.В. Генетические механизмы индивидуальных и кооперативных адаптаций // Экологическая генетика. – 2007. – 5. № 1. – С. 25–30.
4. Стегний В.Н. Принципы эволюционной и адаптационной значимости организации видовых геномов и их использование в селекции // 36. науч. пр.: Факторы экспериментальной эволюции организмов. // К.: Логос, 2013. – 12. – С. 161–164.
5. Стегний В.Н. Архитектура генома, системные мутации и эволюция. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та, 1993. – 111 с.
6. Сафронова Л.Д., Малыгин В.М., Левенкова Е.С., Орлов В.Н. Цитогенетические последствия гибридизации хомячков *Phodopus sungorus* и *Phodopus campbelli* // ДАН. – 1992. – 327, № 2. – С. 266–271.
7. Левенкова Е.С. Гибридные нарушения мейоза у некоторых видов грызунов. – Автореф. дисс. канд. биол. наук. – Москва: ИПЭЭ РАН. – 2001. – 21 с.
8. Hale D.W., Washburn L.L., Eicher E.M. Meiotic abnormalities in hybride mice of the C57B/6J x *Mus spretus* cross suggest a cytogenetic basis for Haldene's rule of hybride sterility // Cytogenet. Cell Genet. – 1993. – 63. – P. 224–234.
9. Малыгин В.М., Левенкова Е.С., Ахвердян М.Р., Сафронова Л.Д. Сравнение синаптонемных комплексов самцов-гибридов кавказских кустарниковых полевков (*Rodentia, Microtinae, Terricola*) в контексте изучения гибридной стерильности // Зоол. ж. – 2000. – 79, № 3. – С. 348–356.
10. Borodin P.M., Ladygina T.Yu., Polyakov A.V., Rogacheva M.B. Chromosome Pairing in Robertsonian Heterozygotes of Common *Sorex araneus* and Musk *Sorex murinus* Shrew // Dokl. Ross. Akad. Nauk. – 1997. – 356, N 1. – P. 132–134.
11. Капанна Э. Изменчивость кариотипа и хромосомное видообразование у *Mus domesticus* // Зоол. ж. – 1988. – 67, Вып. 11. – С. 1699–1713.
12. Коломиец О.Л., Ляпунова Е.А., Мазурова Т.Ф., Янина И.Ю., Богданов Ю.Ф. Участие гетерохроматина в формировании цепочек синаптонемных комплексов у животных, гетерозиготных по множественным робертсоновским транслокациям // Генетика. – 1986. – 22, № 2. – С. 273–280.

LEVENKOVA E.S.

AN Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences,
Russia, 119071, Moscow, Leninsky Prospekt, 33, e-mail: e-leven@mail.ru

STRUCTURAL CHROMOSOME REARRANGEMENTS IN THE MICROEVOLUTION

Aims. The study aims at clarifying the evolutionary role of chromosomal rearrangements. **Methods.** The results of long-term cytogenetic studies of rodents *Phodopus*, *Mus*, *Ruttus*, *Alexandromys*, *Sorex*, including

the electron microscopic analysis of synaptonemal complexes (SC), are presented. **Results.** We have analyzed causes of male sterility of hamsters, mice, voles interspecific hybrids. Non-homologous synapsis permits forming stable SC structure and provides further proceeding of meiosis. Probably, this process is under gene control. **Conclusions.** We caution against the direct transfer of the conclusions drawn in the study of species-specific chromosomal rearrangements, on the model of macroevolution.

Key words: speciation, polymorphism, interspecific hybrids, synaptonemal complex.

УДК 573.354:635.64

ЛІСОВСЬКА Т.П., КУЗЬМІШИНА І.І., КОЦУН Л.О., ВОЙТЮК В.П., АНДРЕЄВА В.В.

Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки,

Україна, 43025, м. Луцьк, пр. Воли, 13, e-mail: tlisovska@ukr.net

МЕЙОТИЧНА МУТАЦІЯ ТОМАТУ, ЩО ПОРУШУЄ КОНДЕНСАЦІЮ ХРОМАТИНУ

Мейотичний поділ клітин супроводжується складною реорганізацією хромосом, зокрема конденсацією і когезією сестринських хромосом, синапсисом гомологічних хромосом, регулярним розходженням до полюсів гомологів у першому і сестринських хроматид у другому поділі мейозу, що, зрештою, призводить до редукції числа хромосом вдвічі [15].

У профазі мітозу і мейозу хромосоми додатково конденсуються, хоча конденсація хромосом в мейозі відрізняється від мітотичної, що дозволяє здійснитися синапсису гомологічних хромосом і кросинговеру. В мітозі і мейозі суттєву роль у підтриманні структури хромосом і когезії сестринських хроматид відіграють білкові комплекси – конденсини і когезини. Когезія сестринських хроматид виникає в S-фазі і зберігається в ділянці центромери до анафази під час мітозу та до анафази II під час мейозу [7]. Когезія плеч сестринських хроматид в мейозі зникає до анафази I, що полегшує роз'єднання гомологів у місцях хіазм, але в ділянці центромери, де когезини захищені білком – шугошином, зберігається до анафази II. З'єднання сестринських хроматид у ділянці центромери забезпечує регулярне розходження гомологічних хромосом в анафазі I і регулярне розходження сестринських хроматид в анафазі II.

Останні генетичні та біохімічні дослідження почали проливати світло на молекулярні механізми, що лежать в основі когезії, конденсації і поділу хромосом під час мітотичного циклу клітин. Один з висновків полягає в тому, що конденсацію хромосом і когезію сестринських хроматид регулюють різні, але структурно схожі, мультисубодиничні

білкові комплекси, які називають конденсином і когезином, відповідно. В основі цих двох білкових комплексів лежать члени родини хромосомних АТФаз, так звані SMC (the structural maintenance of chromosomes) і нового класу білків – клейзинів. Конденсин складається з гетеродимерів білків АТФаз класу SMC2 і SMC4, і трьох субодиниць, які називають асоційованими з хромосомами поліпептидами (CAP у *Xenopus leavis* і *Homo sapiens*) [11, 13]. Когезини складаються із гетеродимерів SMC1 і SMC3 і клейзинів sc1 (клейзин α), Scc3 та деяких видоспецифічних. Хоча конденсини і когезини виконують аналогічні функції в обох поділах, в мейозі функціонують мейоз-специфічні ортологи мітотичних когезинів і конденсинів. Наприклад, в мейозі функціонує α -клейзин REC8, ортолог мітотичного Scc1 (Mcd1, Rad21) [16]. В мейозі, крім забезпечення когезії сестринських хроматид, когезини і конденсини задіяні у створенні поздовжніх осей гомологічних хромосом, які згодом формують латеральні елементи синаптонемного комплексу, тобто забезпечують синапсис гомологів в мейозі [17].

На сьогодні відомо про широке коло фенотипових ефектів порушень мейоза, які пов'язують з відсутністю або дефектом окремих конденсинів або когезинів. Показано, що значну гомологію до мейотичного когезина REC8 виявляють гени, мутації яких призводить до «злипання», фрагментації хромосом, порушення конденсації і довжини хромосом, ефектам десинапсису і асинапсису [4, 6, 18]. Заміну першого мейотичного поділу на мітотичний, який викликає мутація *afd* кукурудзи, також пояснюють дефектом гена з високою гомологією до REC8 [9].

До мутацій, які контролюють конденсацію

хромосом в мейозі, належить досліджуваний нами мутант томату (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *sti* (stickiness).

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження слугував мейотичний мутант томату *sti*, який входить до складу колекції мейотичних мутантів, зібраної в лабораторії генетики і селекції біологічного факультету СНУ імені Лесі Українки.

Мутація *sti* була відібрана за стерильністю в польових посівах томату сорту Глорія. Через повну чоловічу і знижену жіночу стерильність мутація підтримується у вигляді популяції ВС від схрещування гомозиготних за мутацією *sti* рослин в якості материнської форми із фертильними гетерозиготами в якості батьківської форми.

Бутони довжиною 2...3 мм фіксували в суміші етанол : крижана оцтова кислота у співвідношенні 3:1, зберігали у 70 % етанолі, фарбували ацетокарміном згідно загальноприйнятої методики. Перебіг мейозу аналізували у мікроспорогенезі. Для цитологічних досліджень готували давлені препарати пиляків на різних стадіях мейозу. Фертильність пилку визначали ацетокарміновим методом. Статистичну обробку даних генетичного аналізу здійснювали за методом χ^2 .

Результати та обговорення

У рослин, гомозиготних за мутацією *sti*, початок профазі I мейозу проходить без видимих відхилень. Так, у пізній лептотені можна побачити специфічне скупчення хромосом у ядрах мейоцитів у вигляді «букета» (рис. а). У пахітені спостерігаються нерівномірно потовщені синапсовані гомологічні хромосоми. Починаючи зі стадії диплотени і діакінезу, хромосоми характеризується нечіткими контурами, нерівномірною конденсацією хромосом, переплетінням хроматину між бівалентами, негомологічними хромосомами і унівалентами, які важко відокремити (рис. б). На стадії метафазі I (рис. в) спостерігається розташування хромосом поза межами екваторіальної площини, у анафазі I виявляються чисельні тяжі хроматину між полюсами та фрагментація хромосом (рис. г).

Оскільки під час першого мейотичного поділу виявляється значна кількість порушень, то до другого поділу переходить незначна кількість клітин. Мейоз II також проходить з

порушеннями типу переплетіння хроматину, містків і фрагментації хромосом.

Унаслідок зазначених порушень протягом мейозу, на стадії спорад утворюються переважно діади, діади з мікроядрами і тріади (рис. д). Частка цитологічно нормальних тетрад становить менше 12 %, подальший мікрогаметогенез зупиняється або порушується.

Мутантні рослини виявляють значну стерильність пилку, так, у гомозигот *sti/sti* фертильність пилку істотно нижча ($1,1 \pm 0,59$ %) у порівнянні з гетерозиготами *Sti/sti* ($81,78 \pm 2,21$ %). У зв'язку з тим, що переважна більшість спорад представлена діадами, стерильний пилкок (рис. е) має більший розмір, ніж пилкок досліджених раніше синаптичних мутантів томату (середня площа пилкових зерен у *sti/sti* $335,70 \pm 17,60$ мкм² порівняно з *Sti/sti* $491,08 \pm 7,21$ мкм² у гетерозигот *Sti/sti*).

У зв'язку із труднощами дослідження мейозу у мегаспорогенезі томату, ми вивчили вплив мутації *sti* на фертильність продуктів жіночого мейозу за зав'язуванням насінин на плід за штучного запилення квіток гомозиготних за мутацією *sti* рослин фертильним пилком гетерозиготних рослин. Середня кількість насінин на плід у гомозиготи *sti/sti* дорівнює $17,5 \pm 2,2$, у порівнянні з гетерозиготою *Sti/sti* $143,0 \pm 11,3$ насінин на плід. Отже мутація *sti* має вияв як у мікроспорогенезі, так і у мегаспорогенезі.

Генетичний аналіз встановив, що мутація *sti* має рецесивний характер успадкування і контролюється одним геном (χ^2 1:1 = 3,15). Треба відзначити, що в популяціях, отриманих від аналізуючого схрещування, спостерігали певну нестачу гомозиготних за мутацією рослин. За допомогою функціонального тесту на алелізм було встановлено, що мутація *sti* не алельна виявленим раніше мейотичним мутаціям томату *dsm1*, *dsm2*, *amd* і *as₄*.

Необхідно відмітити значну подібність за цитологічним виявом мейотичної мутації томату *as₄*, яка була досліджена П. Моенсом [14] і *sti*. За повідомленням П. Моенса, мутант *as₄* підвищує частоту одинарних кросоверних обмінів між маркерними генами 2-ої хромосоми [14] і, найбільш значно, в 7 разів, подвійних [1]. Мутація *as₄* має рецесивний моногенний характер успадкування. За нашими даними, ці мутації є неалельними.

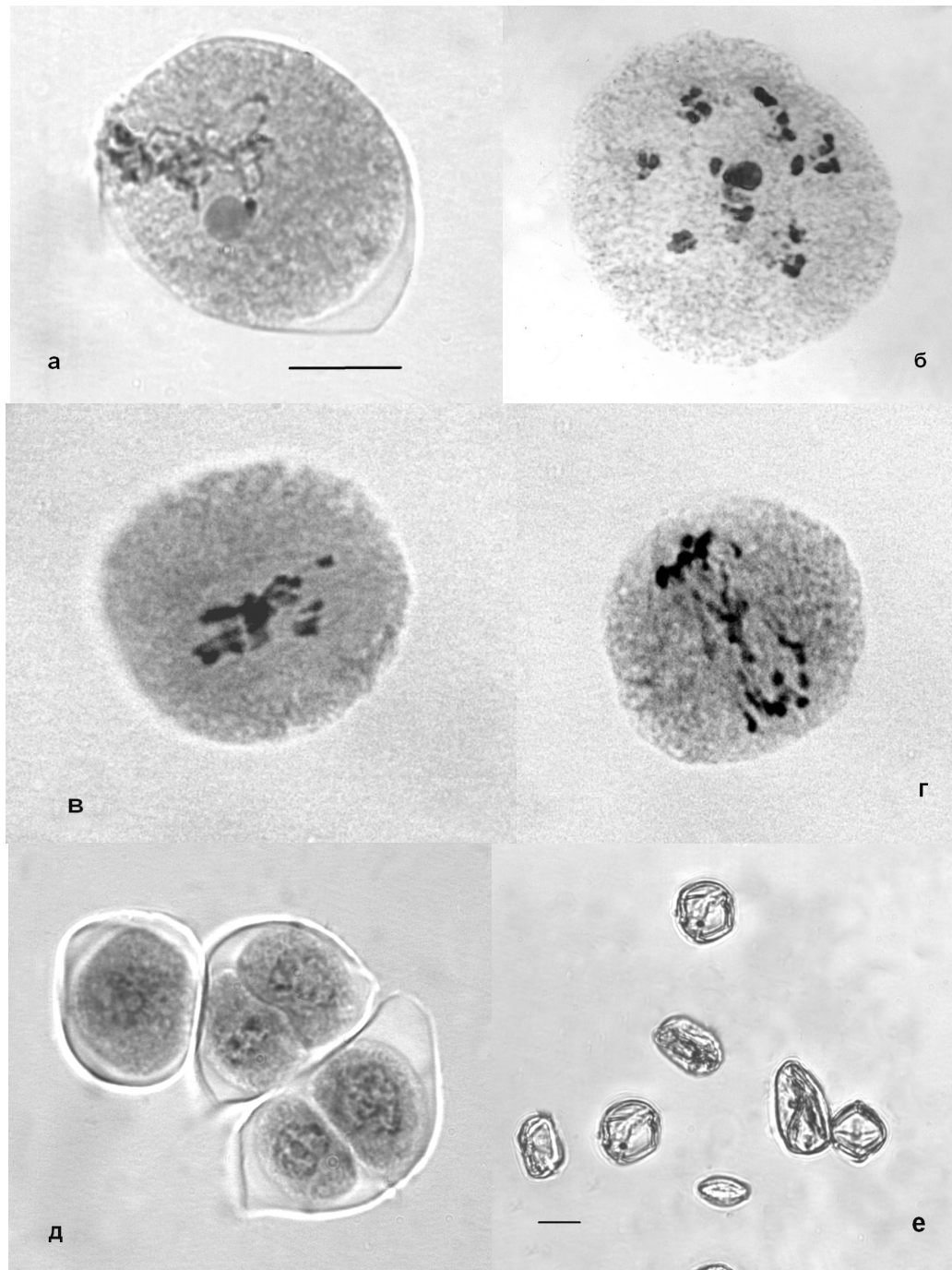


Рис. Мейоз у гомозигот *sti/sti*: **а** – пізня лептотена, **б** – діакінез, **в** – метафаза I, **г** – анафаза I, **д** – споради, **е** – пилки. Масштабна лінійка – 10 мкм

Раніше нами було встановлено, що мутант *sti* виявив істотно вищий від контролю рівень спонтанних та індукованих рентгенівським опроміненням хромосомних аберацій в мітозі та істотно вищу частоту кросинговеру у гетерозигот і, більш значно, у гомозигот за цим геном [2].

Вперше мутація, яка викликала порушення конденсації і злипання хроматину, була описана у кукурудзи [5]. Фенотипові подіб-

ні мутації описані для різних видів рослин – лисохвоста [12], жита [3] та деяких інших. Залучення до дослідження мейозу молекулярно-біологічних методів дозволило встановити, що деякі дефектні гени, які фенотипово виявляються у порушенні конденсації хроматину, переплетінні хроматину негомологічних хромосом і їх фрагментації, належать до родини RAD21/REC8 клейзинів – складових когезинів. Зокрема, гомологію до REC8 виявив мутантний

ген SYN1/DIF1 *Arabidopsis thaliana* [4, 6] та ген OsRad21-4 *Oryza sativa* [18], цитологічний вияв яких дуже подібний до досліджуваного нами мутанту sti томату.

За конденсацію хроматину в профазі мейозу відповідають комплекси конденсинів і когезинів. До складу когезинів в мітозі входять щонайменше два представники клейзинів α – Scc1 (мейотичний ортолог Rec8) і Scc3. Клейзин Scc3 приєднується до центру молекули Scc1 і таким чином з'єднує кільце, складене із гетеродимерів SMC1 і SMC3. Такі кільця охоплюють сестринські хроматиди, утримуючи їх разом до анафази [7, 10].

Ми передбачаємо, що дуже подібні за фенотиповим виявом в мейозі неалельні мутації томату as₄ і sti можуть бути мутаціями мейотичних ортологів клейзинів α : Scc1 (Rec8) і Scc3 (мейотичний ортолог на сьогодні невідомий). Можливо, це мутації генів – паралогів Rec8. Так, у геномі арабідопсису знайдено три гена RAD21 (мейотичний ортолог

Rec8) [8], а в геномі рису – чотири гена RAD21 [18], які розрізняються за подібністю до родини клейзинів Rec8. Сподіваємося, що подальші дослідження мутантів томату дозволять детально дослідити механізми структурного підтримання хромосом в мейозі рослин.

Висновки

Мейотична мутація томату sti характеризується очевидно нормальним перебігом початку мейозу, порушення конденсації хроматину спостерігаються, починаючи з диплотени профазі I. Починаючи зі стадії диплотени і діакінезу, хромосоми характеризується нечіткими контурами, нерівномірною конденсацією хромосом, переплетінням хроматину між бівалентами, негомологічними хромосомами і унівалентами, які важко відокремити. Мутація виявляє рецесивний моногенний характер успадкування. Вона виявляє повну чоловічу і знижену жіночу стерильність.

Література

1. Жученко А.А., Король А.Б. Рекомбинация в эволюции и селекции. – М.: Наука, 1985. – С. 71–72.
2. Лісовська Т.П., Войтюк В.П., Кузьмичина І.І., Страту Л.С. Рекомбінаційні і репараційні властивості двох мейотичних мутантів томату // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: зб. наук. пр. – К.: Логос, 2012. – 4. – С. 139–144.
3. Соснихина С.П., Кириллова Г.А., Михайлова Е.И. Нарушение конденсации мейотических хромосом, вызываемое мутацией mei8 у ржи *Secale cereal* L. // Генетика. – 2003. – 39, № 3. – С. 362–369.
4. Bai X., Peirson B.N., Dong F., Xue C., Makaroff C.A. Isolation and Characterization of SYN1, a RAD21-like Gene Essential for Meiosis in Arabidopsis // The Plant Cell. – 1999. – 11. – P. 417–430.
5. Beadle G.W. A gene for sticky chromosomes in *Zea mays* // Z. Indukt. Abstamm. Vererbungsl. – 1932. – 63. – P. 195–217.
6. Cai X., Dong F.G., Edelmann R.E., and Makaroff C.A. The Arabidopsis SYN1 cohesin protein is required for sister chromatid arm cohesion and homologous chromosome pairing // J. Cell Sci. – 2003. – 116. – P. 2999–3007.
7. Calvente A., Barbero J.L. Cohesins and Cohesin-Regulators in Meiosis [Електронний ресурс] // Meiosis – Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity /Edited by Andrew Swan. – InTech. – 2012. – P. 35–66. – Режим доступу: <http://www.intechopen.com>.
8. Dong F., Cai X., Makaroff C.A. Cloning and characterization of two Arabidopsis genes that belong to the RAD21/REC8 family of chromosome cohesin proteins // Gene. – 2001. – 271. – P. 99–108.
9. Golubovskaya I.N., Hamant O., Timofejeva L., Wang C.R., Braun D., Meeley R., Cande Z. Alleles of afd1 dissect REC8 functions during meiotic prophase I // Journal of Cell Science, 2006. – 119. – P. 3306–3315.
10. Haering C.H., Kim N. Building and breaking bridges between sister chromatids // BioEssays. – 2003. – 25. – P. 1178–1191.
11. Hirano T. The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair // Genes & Development. – 2002. – 16. – P. 399–414.
12. Johansson H. Meiotic aberrations and sterility in *Alopecurus myosuroides* Huds // Hereditas. – 1944. – 30. – P. 469–566.
13. Losada A., Hirano T. Shaping the metaphase chromosome: coordination of cohesion and condensation // Bioessays. – 2001. – 23. – P. 924–935.
14. Moens P.B. Genetic and cytological effects of three desynaptic genes in the tomato // Canad. J. Genet. and Cytol. – 1969. – 11, N 4. – P. 857–859.
15. Pawlowski W.P., Cande W.Z. Coordinating the events of the meiotic prophase // Trends in Cell Biology. – 2005. – 15, N 12. – P. 674–681.
16. Schleiffer A., Kaitna S., Maurer-Stroh S., Glotzer M., Nasmyth K., Eisenhaber F. Kleisins: a superfamily of proteins associated with the heads of both bacterial and eukaryotic SMC proteins // Mol. Cell. – 2003. – 11. – P. 571–575.

17. Yu H.G., Koshland D. Chromosome Morphogenesis: Condensin-Dependent Cohesin Removal during Meiosis // Cell. – 2005. – 123. – P. 397–407.
18. Zhang L., Tao J., Wang Sh., Chong K., Wang T. The rice OsRad21-4, an orthologue of yeast Rec8 protein, is required for efficient meiosis // Plant Molecular Biology. – 2006. – 60. – P. 533–554.

LISOVSKA T.P., KUZMISHYNA I.I., KOTSUN L.O., VOITIUK V.P., ANDREEVA V.V.

*Lesia Ukrainka Estern European National University,
Ukraine, 43025, Lutsk, Voli prosp., 13, e-mail: tlisovska@ukr.net*

TOMATO MEIOTIC MUTATION THAT DISORDERS CHROMATIN CONDENSATION

Aims. This paper presents the results of cytological and genetic analysis of new meiotic mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sti. **Methods.** Studies on meiosis in microsporogenesis were made in iron-acetocarmine smears of anther fixed in acetic alcohol (3:1). **Results.** Cytological analysis revealed that starting from the stage dyplotene and diakinesis chromosomes showed defects in condensation by fuzzy contours, irregular chromosomes condensation, intertwined chromatin, non-homologous chromosomes and univalents that are difficult to identification. Meiotic mutation tomato sti (stickyness) is monogenic recessive nature of inheritance. Mutant plants exhibit a high male and female sterility. **Conclusions.** Meiotic mutant of tomato sti is defected in chromosome condensation.

Key words: meiosis, meiotic mutants, chromosome condensation, *Lycopersicon esculentum* Mill.

УДК 579.873.71:577.214.2:004.9

ПОЛИЩУК Л.В., МАЦЕЛЮХ Б.П.

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
Украина, 03680, г. Киев, ул. Заболотного, 154, e-mail: LVPolishchuk@ukr.net*

рРНК-ГЕНЫ АКТИНОМИЦЕТОВ, ГОМОЛОГИЧНЫЕ ГЕНАМ рРНК-КЛАСТЕРА *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-2

Установлено, что рибосомальная РНК составляет до 75 % всей РНК клеток как эукариот, так и прокариот [1]. Определено наличие 3 видов рРНК в клетках прокариот: 16S рРНК, 23S рРНК и 5S рРНК [1–5]. По одному рРНК-гену трех видов образуют в хромосомах микроорганизмов кластер и транскрибируются в виде одной молекулы прерибосомальной РНК с последующим сплайсингом [1]. Выявлена множественность рРНК-оперонов генов в клетках организмов эукариот и прокариот [1–3]. Например, у *Streptomyces ambofaciens* обнаружено 4 копии рРНК-оперонов, 7 копий у *S. venezuela*, по 6 копий у *S. lividans*, *S. coelicolor*, *S. griseus* и многих других видов (*Rhodobacter sphaeroides* – 3 копии) [2–4]. По одному оперону найдено в хромосоме других родов актиномицетов – *Mycobacterium bovis*, *M. leprae* [5].

У ряда штаммов актиномицетов выявлены отличия в строении рРНК-оперонов. Так, у *S. niveus* NCIMB 11891 (NZ_CM002285) в хромосоме выявлены 6 рРНК-оперонов, но только в двух из них есть 5S рРНК-гены, а 23S рРНК-гены представлены в виде 2 фрагментов

(996 пн и 1396 пн). Только 2 рРНК-оперона из трех содержат 5S рРНК-гены у штамма *Rothia dentocaris* ATCC 17831 (NC_014643).

Как известно, ДНК стрептомицетов характеризуется ГС-богатым составом (69–73 %), однако, рРНК-кластеры имеют уменьшенное содержание данных нуклеотидов. Так, рРНК гены *S. ambofaciens* содержат 59 %, 57 % и 60 % (соответственно, 16S рРНК-гены, 23S рРНК-гены и 5S рРНК-гены) [1].

В настоящее время большое внимание исследователей уделяется изучению нуклеотидного строения рРНК-генов микроорганизмов [1–7, 10]. Например, сравнительный анализ первичного строения 16S рРНК-гена используется для определения таксономической принадлежности. Одними из основных положений генотипирования бактерии служат нуклеотидный состав (соотношение Г/С и А/Т пар) хромосомной ДНК и степень гомологии нуклеотидных последовательностей 16S рРНК. Кроме того, установлено, что устойчивость к аминогликозидным антибиотикам может быть вызвана модификациями 16S рРНК: метилированием рРНК или ее gts-мутацией [6, 7].

Изучение гомологии нуклеотидного строения рРНК-генов у микроорганизмов различных таксонов, с одной стороны, позволит выявить их эволюционное сродство, а, с другой, может быть полезной, например, для увеличения биосинтеза антибиотиков штаммами продуцентами.

Цель данной работы – изучить распространение рРНК-генов, гомологичных генам рРНК-оперона *S. globisporus* 1912-2 в геномах актиномицетов.

Материалы и методы

Проводился *in silico* анализ доступных Интернет ресурсов (базы данных сервера NCBI Microbial Genome [8]). В качестве реперной последовательности использовался фрагмент хромосомной ДНК *Streptomyces globisporus* 1912-2 (5184 пн).

In silico исследования Интернет базы данных с целью выявления степени их идентичности с выбранной последовательностью рРНК-генов *S. globisporus* 1912-2 осуществлялся с помощью программы BLASTN 2.2.29 (megablast) с установками по умолчанию [9].

Результаты и обсуждение

В доступных Интернет ресурсах (база данных Microbial Genomes) представлено информация о полном первичном строении хромосом 4435 представителей царства *Bacteria*, из них 68 видов рода *Streptomyces* [15].

In silico анализом библиотеки 1438 контигов, содержащей информацию о первичном строении 1438 последовательностей тотальной ДНК штамма *Streptomyces globisporus* 1912-2 было определено нуклеотидное строение трех рРНК-генов (в публикации).

Определение первичного строения хромосомной ДНК штамма *S. globisporus* 1912-2 было проведено аккредитованной компанией «BaseClear» (Лейден, Голландия) в 2013 г. Использование в качестве реперной последовательности известную частичную нуклеотидную последовательность 16S рРНК wild-type штамма *S. globisporus* 1912-2 (AJ132630, GenBank – 464 пн) и данных доступных Интернет ресурсов о первичном строении генов рРНК-оперона *S. griseus* NBRC 13350 (AP009493, GenBank) позволило определить локализацию рРНК-генов *S. globisporus* на Contig 207 (10000 пн – 15184 пн).

У множества актиномицетов определен молекулярный размер рРНК-генов и их расположение в рРНК-кластере. Для генов рРНК-кластера характерна синтения – гены прокариот в кластере располагаются, как правило, в одинаковой последовательности 16S

рРНК – 23S рРНК – 5S рРНК [1–7], молекулярные размеры рРНК-генов в среднем составляют, соответственно, 1500 пн, 3000 пн и 120 пн. Установлено молекулярные размеры генов рРНК-кластера *S. globisporus* 1912-2: последовательности 16S рРНК – 1535 пн, 23S рРНК – 3149 пн, 5S рРНК – 134 пн. Общий размер его рРНК-кластера 5142 пн, включая 2 спейсера (290 пн, 80 пн). Количество Г+Ц пар в первичном строении генов рРНК-кластера *S. globisporus* составлял для 16S рРНК-гена – 58,3 %, 23S рРНК-гена – 56,5 % и для 5S рРНК-гена – 59,1 %. В то время, как в целом Г+Ц состав всех 1438 контигов тотальной ДНК штамма – 75 %.

При проведении *in silico* анализа базы данных Microbial Genome последовательности, идентичные на 82–99 % последовательностям рРНК-кластера *S. globisporus* 1912-2, были обнаружены у 100 штаммов актиномицетов, принадлежащим к 28 различным семействам. Наибольшее количество штаммов принадлежали к семействам *Streptomycetaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Micrococcaceae* и ряда других, в то время как к большинству семейств принадлежат только по одному штамму. В Интернет базе данных Microbial Genome представлены данные о нуклеотидном строении 631 штамма порядка *Actinobacteria*, из них, например, 68 штаммов представителей семейства *Streptomycetaceae*, 49 штаммов – *Mycobacteriaceae* (табл.).

Таким образом, *in silico* анализ выявил, что последовательности, гомологичные последовательностям рРНК-кластера *S. globisporus* 1912-2, преимущественное распространение у представителей отдельных семейств: например, у представителей семейств *Streptomycetaceae* и *Micrococcaceae*, в то время как среди представителей семейства *Corynebacteriaceae* в 9 раза реже.

Показатели статистической значимости попарного выравнивания первичного строения рРНК-кластеров (Score) составляли от 8983 до 1954. Из них 16 штаммов, имеющих наибольшую идентичность (99–95 %) с рРНК-генами *S. globisporus* 1912-2 и значение Score (8983–5156) относились семейству *Streptomyces*. В то же время, штамм *S. niveus* NCIMB 11891 (NZ_CM002285) характеризовался низким показателем Score (2324).

У всех 100 штаммов актиномицетов были выявлены последовательности, гомологичные последовательностям 23S рРНК- и 16S рРНК-генов *S. globisporus* 1912-2. Однако, последовательности, гомологичные 5S рРНК-гену

S. globisporus 1912-2 не были выявлены у 73 культур. Из них, 1 штамм – представитель семейства Streptomyces (*S. roseochromogenes* DS 12.976 – CM002285). Только у 10 культур, принадлежащих к другим семействам актиномицетов, были выявлены 5S рРНК-гены с первичным строением, идентичным аналогичному гену *S. globisporus* (например, *Microbacterium testaceum* StLB037 – NC_015125, *Frankia sp.* Eulle – NC_014666, *Actinoplanes missouriensis* 431 – NC_017093).

Как установлено, первичное строение рибосомальных РНК – наиболее консервативно (по сравнению с тРНК и иРНК) у прокариот и эукариот [1, 10]. Наряду с консервативными фрагментами, в последовательности кластера присутствуют и фрагменты со значительной изменчивостью – спейсеры [1–3]. Доказано, что первичное строение 5S рРНК-генов (из трех видов рРНК-генов) как прокариот, так и эукариот – наиболее консервативное [1, 10].

Таблица. Таксономическое распределение видов актиномицетов в выборках

Семейства порядка <i>Actinomycetales</i>	Интернет база данных Microbial Genomes		Наша выборка микроорганизмов*	
	Количество видов	Вклад в базу данных, %	Количество видов	Вклад в выборку, %
Streptomycetaceae	68	10,78	17	17
Mycobacteriaceae	49	13,57	10	10
Micrococcaceae	32	5,07	10	10
Pseudonocardiaceae	46	7,29	9	9
Nocardiaceae	100	15,85	8	8
Micromonosporaceae	14	2,22	8	8
Frankineae	6	0,95	5	5
Nocardioideae	12	1,9	4	4
Gordoniaceae	26	4,12	3	3
Geodermatophilaceae	4	0,64	2	2
Cellulomonadaceae	6	0,95	3	3
Nocardiopsaceae	20	3,16	2	2
Promicromonosporaceae	6	0,95	2	2
Microbacteriaceae	46	7,29	2	2
Catenulisporaceae	1	0,16	1	1
Acidothermaceae	1	0,16	1	1
Nakamurellaceae	2	0,32	1	1
Streptosporangiaceae	4	0,64	1	1
Thermosporaceae	12	1,9	1	1
Tsukamurellaceae	2	0,32	1	1
Corynebacteriaceae	59	9,35	1	1
Segnilipaceae	2	0,32	1	1
Intrasporangiaceae	14	2,22	1	1
Sanguibacteraceae	2	0,32	1	1
Dermatococcaceae	3	0,48	1	1
Dermabacteriaceae	10	1,58	1	1
Kineosporiaceae	1	0,16	1	1
Propionibacteriaceae	18	2,85	1	1

Примечание: * – культуры актиномицетов, в хромосомах которых присутствуют гены, гомологичные рРНК-генам *S. globisporus* 1912-2.

Нашим *in silico* анализом первичного строения генов рРНК-кластеров в геномах 100 актиномицетов выявлено существование наибольшего различия в строении 5S рРНК-генов. Например, у штаммов *Beutenbergia cavernae* DSM 12333 (NC_012669) и *Catenulispora acidiphila* DSM 44928 (NC_0131310) нуклеотидное строение 5S рРНК-генов не гомологично аналогичному гену *S. globisporus* 1912-2. К первичному строению 5S рРНК-гена Bcav_R0020 *Beutenbergia cavernae* DSM 12333 были гомологичны (на 84–95%) последовательности 5S рРНК-генов пяти актиномицетов (*Sanguibacter keddieii* DSM 10542 – NC_013521, *Rhodococcus jostii* RHA1 – NC_008268, *Gordonia gronchialis* DSM 43247 – NC_013441, *Gordonia polyisoprenivorans* VH2 – NC_016906, *Saccharomonospora glauca* K62 – CM0011484). Идентичными на 80–91% последовательности 5S рРНК-гена Caci_R0032 *Catenulispora acidiphila* DSM 4492829 были 5S рРНК-гены 29 штаммов актиномицетов (например, *Nocardia brasiliensis* ATCC 700358 NC_018681, *Mycobacterium bovis* AF2122/98). В то же время, у 4 штаммов, при отсутствии гомологии с 5S рРНК геном *S. globisporus* 1912-2, выявлено 5S рРНК-гены, идентичные 5S рРНК-генам как *Beutenbergia cavernae* DSM 12333, так и *Catenulispora acidiphila* DSM 44928 (*Sanguibacter keddieii* DSM 10542 – NC_01351, *Gordonia gronchialis* DSM 43247 – NC_013441, *Saccharomonospora glauca* K62 – CM0011484, *Gordonia polyisoprenivorans* VH2 – NC_016906). Первичное строение 5S рРНК-генов штамма *Frankia sp. Eulle* было гомологично 5S рРНК-генам штаммов *S. globisporus* 1912-2 и *Catenulispora acidiphila* DSM 4492829 (соответственно на 86 % и 85 %).

Литература

1. Барков А.Н., Трубникова Е.В., Стабровская Н.В. Молекулярные особенности организации и транскрипции рибосомных генов [Электронный ресурс] // Ученые записки : электрон. науч. журн. Курского государственного университета. – 2007. – № 1 (3) – Режим доступа: <http://www.scientific-notes.ru/pdf/sa11.pdf>.
2. van Wezel G.P., Vijgenboom E., Bosch L. A comparative study of the ribosomal RNA operons of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and sequence analysis of *rrnA* // *Nucleic Acids Research*. – 19, N 16. – P. 4399–4403.
3. Pujic P., Durajija-Zinic S., Pandza S., Mikoc A., Plohl M., Gamulin V. Ribosomal RNA operons in *Streptomyces rimosus*: sequence of the *rrnF* and comparative analysis of *rrn* promoter regions // *Food. technol. biotech.* – 2001. – 39, N 2. – P. 77–81.
4. Pernodet J.-L., Bocard F., Alegre M.-T., Gagnat J., Guirineau M. Organization and nucleotide sequence analysis of a ribosomal RNA gene cluster from *Streptomyces ambofaciens* // *Gene*. – 1989. – 79, N 1. – P. 33–46.
5. La Farina M., Stira S., Mancuso R., Grisanti C. Characterization of *Streptomyces venezuelae* ATCC 10595 rRNA gene clusters and cloning of *rrnA* // *J Bacteriol.* – 1996. – 178, N 5. – P. 1480–1483.
6. Kim Eunjoona R., Hongika K., Hong Seung-Pyoa, Kook Hee Kangb, Yung Hee Khoa, Park Yong-Ha Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA gene cluster from *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* // *Gene*. – 1993. – 132, N 1. – P. 21–31.

In silico анализом первичного строения библиотеки контигов штаммов *S. globisporus* 1912-2 не было выявлено последовательностей ДНК, гомологичных 5S рРНК-генам как *Beutenbergia cavernae* DSM 12333 и *Catenulispora acidiphila* DSM 44928, так и ряда других штаммов – например, *Frankia alni* ACN14a (NC_008278) *Streptosporangium roseus* DSM 43021 (NC_013595) и *Catenulispora acidiphila* DSM 44928 (NC_13131).

Выводы

Последовательности, идентичные на 82–99 % последовательностям всех 3 генов рРНК-кластера *S. globisporus* 1912-2, обнаружены у 100 штаммов актиномицетов, принадлежащим к 28 различным семействам при проведении *in silico* анализа базы данных Microbial Genome. Наибольшее количество штаммов принадлежали к семействам *Streptomycetaceae* (17 видов), *Mycobacteriaceae* (10 видов), *Micrococcaceae* (10 видов), *Pseudonocardiaceae* (9 видов), *Nocardiaceae* (8 видов), *Micromonosporaceae* (8 видов). К большинству (12 культур) семейств принадлежат только по одному штамму актиномицета.

Последовательности, гомологичные 5S рРНК-гену *S. globisporus* 1912-2, не были выявлены у 73 культур. Из них, 1 штамм – представитель семейства *Streptomyces* (*S. roseochromogenes* DS 12.976 – CM002285). Только у 10 культур, принадлежащих к другим семействам актиномицетов, были выявлены 5S рРНК-гены с первичным строением, идентичным аналогичному гену *S. globisporus* 1912-2.

In silico анализ первичного строения генов рРНК-кластеров в геномах 100 актиномицетов выявлено существование наибольшего различия в строении 5S рРНК-генов у исследуемых актиномицетов.

7. Ochi K., Zhang D., Kawamoto S., Hesketh A. Molecular and functional analysis of the ribosomal L11 and S12 protein genes (rplK and rpsL) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) // *Mol Gen Genet.* – 1997. – 5, N 256. – P. 488–498.
8. Чернов В.М., Гоголев Ю.В., Мухаметшина Н.Е., Нестерова Т.Н., Чернова О.А. Особенности амплификации нуклеотидных последовательностей оперонов *rrnA* и *rrnB* *Acholeplasma laidlawii* PG8 // *Вестник биотехнологии и физ.-хим. биологии.* – 2006. – 2, N 3. – С. 5–13.
9. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/Microbial Genomes/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/Microbial%20Genomes/)
10. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTN 2.2.29 \(megablast, bl2seq\)/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTN%202.2.29%20(megablast,%20bl2seq)/)
11. Смирнов А.В., Энтелис Н.С., Крашенинников И.А., Мартэнс Р., Тарасов И.А. Особенности структуры 5S рРНК, ее взаимодействие с макромолекулами и возможные функции // *Успехи современной биохимической науки.* – 2008. – 48. – С. 133–180.

POLISHCHUK L.V., MATSELUKH B.P.

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnoho str., 154, e-mail: LVPolishchk@ukr.net

rRNA-GENES OF ACTINOMYCETES, WHICH ARE GOMOLOGOUS TO *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-2 rRNA-CLUSTER

Aims. To study the spread of the rRNA-genes homologous fo analogous genes of *S. globisporus* 1912-2 in the genomes of actinomycetes. **Methods.** The program BLASTN 2.2.29 was used for in silico analysis of Internet base of dates NCBI (Microbial genomes). **Results.** Sequence gomologous on 82–99 % to sequences of rRNA-genes of *S. globisporus* 1912-2, were detected in 100 actinomycetes strains from 28 different families. The greatest number of strains belonging to some families: *Streptomycetaceae* (17 species), *Mycobacteriaceae* (10 species), *Micrococcaceae* (10 species), *Pseudonocardiaceae* (9 species), *Nocardiaceae* (8 species), *Micromonosporaceae* (8 species). The majority of families (14 spesies) included only one such strain actinomycetes. Sequences homologous to the 5S rRNA-gene of *S. globisporus* 1912-2 were detected in chromosomes of 25 actinomycetes cultures. **Conclusions.** In silico analysis of the primary structures of rRNA-gene clusters in the genomes of 100 actinomycetes revealed the existence of the largest differences in structures and spreading of 5S rRNA-genes in the studied cultures.

Key words: rRNA, identity, *Actinomycetes*, chromosome, *Streptomyces globisporus* 1912-2.

УДК [575.22 : 582.542.11] (292.3)

ТВАРДОВСЬКА М.О.¹, АНДРЕЄВ І.О.¹, АМОСОВА А.В.², СПІРІДОНОВА К.В.¹, НАВРОЦЬКА Д.О.¹, САМАТАДЗЕ Т.Е.², ЗОЩУК С.А.², МУРАВЕНКО О.В.², КУНАХ В.А.¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, e-mail: twardovska06@mail.ru

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,

Россия, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, 32, e-mail: atomar@mail.ru

ВИВЧЕННЯ ГЕНОМІВ РОСЛИН *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* DESV. З РІЗНИХ ЛОКАЛІТЕТІВ ПРИБЕРЕЖНОЇ АНТАРКТИКИ ЗА ДОПОМОГОЮ ХРОМОСОМНИХ ТА МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ

Судинні рослини регіону Прибережної Антарктики представлені лише двома видами: щучником антарктичним (*Deschampsia antarctica* Desv.) та колобантусом Кіто (*Colobanthus quitensis* Kunth. Bartl.). Питання виключного поширення в Антарктиці тільки двох видів судинних рослин і досі залишається невирішеним. *D. antarctica* викликає науковий інтерес завдяки ряду фізіологічних ознак, що забезпечують її виживання у суворих умовах

Антарктики, серед яких короткий вегетаційний період та здатність до вегетації і цвітіння за низьких температур, що, зокрема, пов'язано із високим рівнем фотосинтезу за цих умов; можливість існування в умовах високого рівня ультрафіолетового опромінення; стійкість до світлового стресу; пристосування до екстремально-сухих та надмірно зволжених ґрунтів та інше [1].

Відомо, що стресові фактори середовища

здатні підвищувати мінливість геному, що проявляється на цитогенетичному та молекулярно-генетичному рівнях у появі В-хромосом, анеу- та поліплоїдії, структурних перебудовах хромосом, а також у змінах послідовності ДНК. Поряд із цим, у літературі обмежена кількість даних, які стосуються дослідження числа хромосом та формули каріотипу *D. antarctica* [2, 3]. Хромосомний поліморфізм у каріотипах *D. antarctica* з території Прибережної Антарктики до цих пір не вивчений. Тому метою даної роботи є проведення молекулярно-цитогенетичного аналізу рослин *D. antarctica* з різних локалітетів Прибережної Антарктики.

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом для досліджень слугувало насіння *D. antarctica*, зібране в 2005–2008 рр. під час експедицій на Аргентинських островах (о-ви Дарбо та Галіндез). Отримання асептичних проростків та вирощування рослин описано в роботі [4]. Отримані рослини культивували на агаризованому живильному середовищі Гамборга, Евелейга (B5) [5], доповненому 0,1 мг/л 1-нафтилоцтової кислоти (НОК). Розмноження рослин проводили клонуванням шляхом поділу одержаних дернин на фрагменти.

Для цитогенетичного аналізу використали корінці проростків довжиною 0,8–1,5 см, які з метою накопичення та синхронізації мітозів перед фіксацією витримували у воді з льодом протягом 24 годин при температурі 3–4 °С або в 0,2%-му розчині колхіцину протягом 2 год при температурі 37 °С. Зразки фіксували в суміші етанол: льодяна оцтова кислота у співвідношенні 3:1 протягом 1 доби. Через добу фіксатор змінювали на свіжий. Зафіксований матеріал зберігали при -20 °С.

Для встановлення хромосомного числа виду зразки фарбували 1%-им ацетоорсеїном і виготовляли давлені препарати. У роботі використовували мікроскоп “NU-2E Carl Zeiss”. Мікрофотографування проводили фотоапаратом Canon 1000D. Отримані дані опрацьовували статистично [6].

Молекулярно-цитогенетичні дослідження проводили за допомогою С- та DAPI-диференційного забарвлення, флуорисцентної гібридизації *in situ* (FISH) з використанням в якості зондів 5S та 26S рДНК. Активність районів ядерцевих організаторів хромосом вивчали за методикою Ag-NOR-забарвлення. Аналіз метафазних пластинок проводили за

допомогою флуорисцентного мікроскопа Olympus BX61 з чорно-білою ПЗС камерою CoolSnap («Roper Scientific Inc», США). Хромосоми в каріотипах розміщували за розміром та центромерним індексом відповідно до цитологічних принципів [7].

ДНК виділяли цетавлоновим методом [8] з листових пластинок рослин, вирощуваних *in vitro*. Якість і концентрацію отриманої ДНК оцінювали за допомогою гель-електрофорезу, порівнянням інтенсивності флуорисценції рослинної ДНК із ДНК фага λ відомої концентрації в УФ-променях після забарвлення бромистим етидієм [9]. Молекулярно-генетичний аналіз проводили із застосуванням методу полімеразної ланцюгової реакції з вісьмома ISSR- та двома IRAP-праймерами.

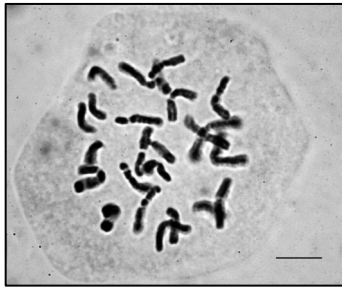
Результати та обговорення

Відомо, що види роду *Deschampsia* мають диплоїдний набір $2n = 26$, тобто основне хромосомне число $x = 13$. Однак, є види з основним хромосомним числом $x = 7$ (*D. artropurpurea* ($2n = 14$), *D. flexuosa* (зазвичай $2n=28$), яке іноді використовують як один із критеріїв для їх виділення в окремі роди [3, 10, 11]. Окрім цього, відомі поліплоїдні та триплоїдні генотипи, які мають 52 та 39 хромосом відповідно [12].

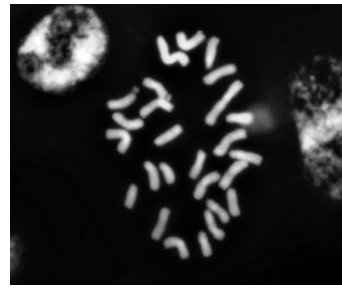
Каріологічний аналіз рослин *D. antarctica* з двох локалітетів Прибережної Антарктики (о-ви Дарбо та Галіндез) виявив у каріотипах 13 пар ($2n = 26$) хромосом, розміром близько 3–10 мкм (рис.). Отримані результати узгоджуються з даними інших дослідників, які встановили для рослин цього виду такий самий диплоїдний набір ($2n = 26$) [2, 3].

Окрім цього, у каріотипах рослин з о. Дарбо, поряд із 26 хромосомами основного набору (А-хромосомами), вперше виявлено від 1 до 3 мікрохромосом (В-хромосом). При цьому не виявлено варіабельності за числом хромосом основного набору.

Результати каріологічного аналізу рослин *D. antarctica*, отриманих із насіння, зібраного на аргентинській антарктичній станції «Джубані» (о. Кінг Джордж), показали, що усі вони мали диплоїдний набір $2n = 26$ [3]. Поряд із цим, у деяких проростках знайдено клітини з $2n = 28$. Таке число хромосом дослідники пояснюють присутністю у каріотипі двох додаткових хромосом, які відповідають 1-й та 11-й хромосомам, що вказує на подвійну трисомію. Мікспоїдію виявлено у п'яти із 14 рослин *D. antarctica*.



a



б

Рис. Метафазні пластинки у клітинах апікальної меристеми корінців проростків *D. antarctica*, які містять 26 хромосом: а – забарвлення ацетоорсеїном, б – забарвлення DAPI. Довжина відрізка становить 10 мкм

Автори припускають, що це може бути пов'язано з вирощуванням виду в умовах (зокрема, температурних), які сильно відрізняються від природних у місцях зростання, а також не виключають той факт, що хромосомна нестабільність є невід'ємною характеристикою роду [3]. Загалом, гаплоїдний набір каріотипу *D. antarctica* складається із 5 метацентричних, 3 субметацентричних, 4 субтелоцентричних та 1 телоцентричної хромосоми. Ядерцевий організатор міститься на кінці 1-ої пари субметацентричних хромосом, яка була гетероморфною у кількох вивчених клітинах за рахунок невеликого перегрупування гетерохроматинових блоків [3].

Згідно гіпотези Кавано і Альбертса поліплоїдні види роду *Deschampsia* виникли внаслідок дуплікацій ($x = 7-14$), водночас види з хромосомним числом $2n=26$ виникли внаслідок дисплоїдії (28–26) від поліплоїдних видів [13, 14]. Деякі автори вважають, що *D. antarctica* – один із видів, еволюція якого йшла в напрямку дисплоїдії [3].

Цитогенетичний аналіз вторинних корінців *D. antarctica* з островів Галіндез, Пітерман, Берселот виявив широкий розмах мінливості за числом хромосом від 10 до 68. Також було знайдено полісоматію (міксоплоїдію) [15].

Рисунок С-диференційного забарвлення хромосом *D. antarctica* відноситься до «прицентромерно-теломерного» типу з невеликими інтеркалярними бендами. Хромосоми у каріотипах рослин з різних локалітетів несуттєво відрізнялися за числом та розміром інтеркалярних і теломерних С-бендів, але у рослин з о. Дарбо прицентромерні бенди на хромосомах були більшого розміру. Також виявлено поліморфізм за розмірами С-бендів, що прилягають до ядерце-утворювальних ділянок хромосом, які мають супутники.

Додаткові хромосоми інтенсивно

фарбувалися при С-диференційному забарвленні хромосом і зберігали конденсовану темнозабарвлену структуру в інтерфазних ядрах, що характерно для В-хромосом. Очевидно, виявлені мікрохромосоми можна віднести до В-хромосом, які являють собою додаткові до основного хромосомного набору генетичні елементи з автономним способом успадкування. Зазвичай В-хромосоми сильно конденсовані, гетерохроматинізовані, менші за розміром, порівняно з А-хромосомами, та їх число в каріотипі може значно варіювати (від 1 до кількох десятків) [16, 17]. В-хромосоми виявлені в каріотипах багатьох рослин, в тому числі і у близькоспоріднених видів *D. caespitosa* $2n = 26(0-2B)$ та *D. wibeliana* $2n = 26(0-5B)$ [1].

Рисунок DAPI-забарвлення метафазних хромосом був подібним до С-бендінгу. Ідентифікацію хромосом в каріотипах проводили за рисунками С- та DAPI-бендінгу з урахуванням морфології, а також розташування молекулярних маркерів – сайтів рибосомних генів.

FISH-аналіз виявив 10 сайтів 5S рДНК на п'яти парах хромосом А-набору. Окрім того, послідовності 5S рДНК було виявлено також на деяких В-хромосомах. У каріотипах вивчених зразків сигнали 5S рДНК розташовані в проксимальних районах довгих плечей хромосом, у субтеломерних районах коротких плечей хромосом, а також у центральній частині деяких В-хромосом. Такі результати показують, що у каріотипах рослин з о. Дарбо є, щонайменше, два типи В-хромосом. В термінальних районах коротких плечей двох пар субметацентричних хромосом знайдено великі сайти локалізації 26S рДНК. На одній парі хромосом розташована чітко виражена вторинна перетяжка, і виявлений у цій ділянці сайт локалізації 26S рДНК має більший розмір порівняно із другою парою хромосом, на якій вторинна перетяжка практично не виражена.

В інтерфазних ядрах виявлено чотири (два великих і два середнього розміру) Ag-забарвлених ядерця, що вказує на наявність двох транскрипційно активних ядерце-утворювальних ділянок.

Дослідження хромосом *D. antarctica* з Прибережної Антарктики (о-ви Дарбо та Галіндез) з використанням молекулярно-цитогенетичних маркерів, дозволило встановити, що в каріотипах цих рослин є 2 хромосоми із супутниками, а не одна, як вважалося раніше [3]. При цьому, обидві ядерце-утворювальні хромосоми несуть транскрипційно активні рибосомні гени.

Вважається, що наявність у каріотипі В-хромосом, а також збільшення у хромосомах кількості гетерохроматину та числа активних ядерце-утворювальних ділянок пов'язані із адаптивними особливостями виду. Очевидно, рослини *D. antarctica* з о. Дарбо більшою мірою зазнають дії екстремальних умов середовища.

Було проведено також молекулярно-генетичний аналіз охарактеризованих вище на цитологічному рівні рослин *D. antarctica* з островів Дарбо та Галіндез. Для цього використали 8 ISSR- та 2 IRAP-праймерів, для яких раніше було встановлено, що вони виявляють поліморфізм у популяціях цього виду з Прибережної Антарктики. Загалом було враховано 134 ПЛР-продукти в діапазоні від 0,3 до 2,5 т.п.н., з яких 14 виявилися поліморфними. Генетична відстань за Жаккардом між зразками, розрахована на основі даних ПЛР-аналізу, становить 0,116. Це значення знаходиться в

межах діапазону генетичних дистанцій (0,017–0,234), які було визначено для вибірки з 23 рослин *D. antarctica*, зібраних з островів Аргентинського архіпелагу та навколишніх островів (дані не наведено).

Висновки

Встановлено хромосомне число $2n = 26$ для рослин *D. antarctica* з двох локалітетів Прибережної Антарктики (о-ви Дарбо та Галіндез). Вперше виявлено у каріотипах рослин з о. Дарбо, поряд із 26 хромосомами основного набору, від 1 до 3 додаткових хромосом. Використання хромосомних та молекулярних маркерів для аналізу каріотипів рослин *D. antarctica* дозволило виявити поліморфізм за рисунками С- та DAPI-диференційного забарвлення хромосом і наявність двох транскрипційно активних ядерце-утворювальних ділянок хромосом. Молекулярно-генетичний аналіз із застосуванням поліморфних ISSR-маркерів показав, що відмінності між дослідженими зразками не виходять за межі внутрішньопопуляційного поліморфізму, властивого рослинам із досліджуваного регіону.

Роботу виконано за часткової фінансової підтримки Національного антарктичного наукового центру Держкомінформнауки в рамках проекту № Н/13-2013 «Дослідження взаємозалежностей показників адаптивності антарктичних рослин в природі та модельних умовах як елемент оцінки впливу кліматичних змін на структуру і функції суходільних екосистем Антарктики».

Література

1. Parnikoza I., Kozeretska I., Kunakh V. Vascular plants of the Maritime Antarctic: origin and adaptation // American Journal of Plant Sciences – 2011. – 2, N 3 – P. 381–395.
2. Moore D.M. Chromosome numbers of Falkland Islands angiosperms // British Antarctic Survey Bulletin – 1967. – № 14. – P. 69–82.
3. Cardone S., Sawatani P., Rush P., Gargna A.M., Poggio L., Schrauf G. Karyological studies in *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) // Polar Biol. – 2008. – 32, N 3. – P. 427–433.
4. Загричук О.М., Дробик Н.М., Козерецька І.А., Парнікоза І.Ю., Кунах В.А. Введення в культуру *in vitro* *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) з двох районів Прибережної Антарктики // Український антарктичний журнал. – 2011/2012. – № 10–11. – С. 289–295.
5. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. – 1968. – 46, N 5. – P. 417–421.
6. Плохинский Н.А. Биометрия. Издание 2-е. – М.: Изд-во МГУ, 1970. – 367 с.
7. Levan A, Fredga K, Sandberg A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes // Hereditas. – 1964. – 52. – P. 201–222.
8. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues // Plant Mol. Biol. – 1985. – 5. – P. 69–76.
9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
10. Крогулевич Р.Е., Ростовцева Т.С. Хромосомные числа цветковых растений Сибири и Дальнего Востока. – Новосибирск: Наука, 1984. – 286 с.

11. Chiapella J. A molecular phylogenetic study of *Deschampsia* (Poaceae: Avenae) inferred from nuclear ITS and plastid trnL sequence data: support for recognition of *Avenella* and *Vahlodea* // *Taxon*. – 2007. – 56, N 1. – P. 55–64.
12. Alberts F. Vergleichende Karyologie der Gräser-Subtriben *Aristaveninae* und *Airinae* (Poaceae–Aveneae) // *Plant Syst. Evol.* – 1980. – 136. – P. 137–167.
13. Kawano S. Cytogeography and evolution of the *Deschampsia caespitosa* complex // *Can. J. Bot.* – 1963. – 41. – P. 719–742.
14. Alberts F. Kariologische und genomatische Veränderungen innerhalb der Gräser Subtriben *Aristaveninae* und *Airinae* // *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* – 1978. – 91. – P. 693–697.
15. Adonin V.I., Parnikova I.Yu., Kyrychenko S.S., Kozeretka I.A., Kunakh V.A. Mixoploidy in *Deschampsia antarctica* of the Maritime Antarctic // *Матеріали читань присвячених 300-річчю з дня народження К. Ліннея*. – Луганськ: Елтон-2, 2007. – С. 74.
16. Samacho J.P.M., Sharbel T.F., Beukeboom L.W. B chromosome evolution // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* – 2000. – 355. – P. 163–178.
17. Кунах В.А. Додаткові або В-хромосоми рослин. Походження і біологічне значення // *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. – 2010. – 8, № 1. – С. 99–139.

TWARDOVSKA M.O.¹, **ANDREEV I.O.**¹, **AMOSOVA A.V.**², **SPIRIDONOVA K.V.**¹,
NAVROTSKA D.O.¹, **SAMATADZE T.E.**², **ZOSCHUK S.A.**², **MURAVENKO O.V.**²,
KUNAKH V.A.¹

¹ *Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine,*

Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: twardovska06@mail.ru

² *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,*

Russia, 119991, Moscow, Vavilov str., 32, e-mail: amomar@mail.ru

STUDY OF GENOMES IN *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* DESV. FROM DIFFERENT LOCALITIES OF MARITIME ANTARCTIC USING CHROMOSOMAL AND MOLECULAR MARKERS

Aims. To perform molecular cytogenetic analysis of *D. antarctica* plants from different localities of maritime Antarctic. **Methods.** Cytogenetic analysis, C-banding, DAPI-banding, fluorescent *in situ* hybridization, silver-staining technique for nucleolar organizer regions, PCR-analysis. **Results.** Chromosome number 2n = 26 was determined in *D. antarctica* plants from two localities of Maritime Antarctic (Darboux and Galindez Islands). Karyotypes of plants from Darboux Island were found to contain from 1 to 3 supernumerary chromosomes. FISH-analysis revealed 10 5S rDNA loci found on five A-chromosome pairs, as well as additional loci were localized on some of the B-chromosomes. Large 26S rDNA loci were located in the terminal positions on short arms of two submetacentric chromosome pairs. Genetic analysis of the plants was performed using polymorphic ISSR- and IRAP-markers. Jaccard genetic distance between the *D. antarctica* accessions under study was calculated from the data of PCR-analysis and compared to the data of assessment of *D. antarctica* genetic variability in the region. **Conclusions.** Using chromosomal and molecular markers in analysis of *D. antarctica* karyotype we succeeded in revealing C-banding and DAPI-banding polymorphism. Furthermore, two transcriptionally active nucleolar organizer regions were identified. Molecular genetic analysis using polymorphic ISSR-markers demonstrated that genetic differences between the accessions under study fell in a range of within population variation that was found for the plants from investigated region.

Key words: *D. antarctica*, karyotype, chromosome markers, genetic variation.

АНАЛІЗ ТА ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНИХ РЕСУРСІВ

УДК 581.1

АДАМОВСКАЯ В.Г., МОЛОДЧЕНКОВА О.О., СИЧКАРЬ В.И., КАРТУЗОВА Т.В., БЕЗКРОВНАЯ Л.Я., ЛАВРОВА Г.Д.

Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и сортоизучения НААНУ, Украина, 65036, г. Одесса, Овидиопольская дорога, 3, e-mail: olgamolod@ukr.net

ХАРАКТЕР ИЗМЕНЧИВОСТИ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА 7S И 11S ГЛОБУЛИНОВЫХ БЕЛКОВ У ГИБРИДОВ F₄ СОИ

Зернобобовые культуры являются основным источником растительного белка в питании человека и животных. Особое место среди этих культур отводится сое. На мировом рынке она считается стратегической культурой XXI века и передовые страны Европы, Азии и Америки, используя совершенные технологии выделения и очистки ее белков, производят из них продукты питания. Установлено, что наиболее перспективными белками для производства соепродуктов являются глобулины, а именно 7S (β -конглицинин) и 11S (глицинин) глобулиновые фракции [1].

Внимание исследователей всего мира сконцентрировано на улучшении качества употребляемых в пищу бобовых культур, в том числе сои. 11S и 7S глобулины – это высокомолекулярные белки с четвертичной структурой и неодинаково сбалансированы по аминокислотному составу. 7S глобулины являются гликопротеинами с молекулярной массой 150 кД и содержат 3 субъединицы: α' (76 кД), α (72 кД) и β (52 кД). 7S глобулины оказывают как положительное, так и отрицательное влияние на здоровье человека [2]. 11S фракция глобулинов содержит 3 основных белка, вызывающих аллергическую реакцию: 28 кД, α и β субъединицы [3]. Поэтому при создании сортов сои продовольственного направления необходимо контролировать как содержание, так и компонентный состав этих фракций. По литературным данным, самое высокое соотношение 11S/7S имеет гибрид Tohoku 124 [4]. Одновременно этими авторами создан гибрид, у которого полностью отсутствует 11S фракция. Как правило, соотношение 11S/7S фракций в семенах сои составляет 0,7–1,8. Основной целью наших исследований было изучение полиморфизма компонентного состава 7S и 11S глобулинов у гибридов F₄ сои и их родительских форм, идентификация различий в компонентном

составе этих белков с тем, чтобы в дальнейшем, установив наличие-отсутствие определенных компонентов, связать их с функциональными свойствами этих белков и содержанием белка в семенах сои.

Материалы и методы

Исследования проводились на гибридной комбинации растений F₄ (семена F₅) сои (*Glycine max* L.) (Вилана х [Юрьевка х Изумрудная]), содержащей 23 семьи и их родительских формах. Материал был предоставлен отделом селекции, генетики и семеноводства зернобобовых культур СГИ-НЦНС.

В лабораторных исследованиях использовались стандартные для Украины и модифицированные в нашей лаборатории методы биохимического анализа. Выделение 7S и 11S глобулинов сои проводили методом, разработанным в лаборатории [5], а идентификацию этих белков – методом SDS электрофореза в 15% ПААГ с 1% SDS, используя прибор фирмы Нем-Hoff. В качестве маркеров молекулярной массы использовали следующую белковую смесь: 97 кДа – фосфорилаза В, 67 кДа – бычий сывороточный альбумин, 43 кДа – альбумин яичный, 30 кДа – карбоангидраза, 20 кДа – ингибитор трипсина, 14,4 кДа – лактальбумин.

Анализ результатов и статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ «Анализ данных электронных таблиц «Microsoft Excel» программы обработки изображений «Imagel»».

Результаты и обсуждение

Как показали наши исследования, на электрофореграммах и денситограммах 7S и 11S глобулинов прослеживаются различия как по интенсивности окрашивания белков, молекулярной массе, так и по наличию-отсутствию белковых компонентов, характерных для данной комбинации. У изучаемой гибридной комбинации и родительских форм количество белковых

компонентов в электрофоретическом спектре 7S лобулинов находится в интервале 27–32, в электрофоретическом спектре 11S глобулинов в интервале 25–28 компонентов. Электрофоретический спектр суммарных глобулинов включает от 22 до 26 полипептидных компонентов.

Фракции 7S и 11S глобулинов, по данным электрофореза, были условно разделены по молекулярной массе белков на 3 группы: высокомолекулярные (с молекулярной массой 97–65 кД), средномолекулярные (с молекулярной массой 45–30 кД) и низкомолекулярные

(с молекулярной массой 20,1–14,4 кД), а также на группы по количеству семей с одинаковым компонентным составом (табл. 1–3).

Анализ электрофоретических спектров суммарной фракции, 7S и 11S фракций глобулинов семян изученной гибридной комбинации показал, что часть семей имеют отцовский или материнский компонентный состав глобулинов. Наряду с этим у некоторых семей гибридов F₄ специфический, свойственный только им, компонентный состав глобулинов.

Таблица 1. Изменчивость компонентного состава 7S глобулинов у гибридов F₄ сои

Образец	Количество компонентов 7S глобулинов			Суммарное количество компонентов	Количество семей	
	ВМ	СМ	НМ		Число	%
Вилана ♀	10	14	5	29		
Юрьевка х Изумрудная ♂	11	12	5	28		
Виллана х (Юрьевка х Изумрудная) F ₄						
номер группы						
1	10	12	5	27	6	26,1
2	10	14	5	29	5	21,7
3	11	12	5	28	2	8,7
4	11	13	5	29	2	8,7
5	11	14	6	31	1	4,3
6	12	14	6	32	2	8,7
7	12	13	6	31	5	21,7

Примечание: ВМ – высокомолекулярные белки, СМ – средномолекулярные белки, НМ – низкомолекулярные белки.

Таблица 2. Изменчивость компонентного состава 11S глобулинов у гибридов F₄ сои

Образец	Количество компонентов 11S глобулинов			Суммарное количество компонентов	Количество семей	
	ВМ	СМ	НМ		Число	%
Вилана ♀	11	11	5	27		
Юрьевка х Изумрудная ♂	12	11	5	28		
Виллана х (Юрьевка х Изумрудная) F ₄						
номер группы						
1	11	11	5	27	7	30,4
2	11	10	4	25	1	4,3
3	12	5	6	28	6	26,1
4	12	10	4	26	5	21,7
5	12	10	5	27	5	21,7

Примечание: ВМ – высокомолекулярные белки, СМ – средномолекулярные белки, НМ – низкомолекулярные белки.

Таблица 3. Изменчивость компонентного состава суммарных глобулинов у гибридов F₄ сои

Образец	Количество компонентов суммарных глобулинов			Суммарное количество компонентов	Количество семей	
	ВМ	СМ	НМ		Число	%
Виллана ♀	10	10	5	25		
Юрьевка х Изумрудная ♂	9	11	5	25		
Виллана х (Юрьевка х Изумрудная) F ₄						
номер группы						
1	10	10	5	25	7	8,69
2	9	9	5	23	2	8,69
3	9	8	5	22	8	34,8
4	10	8	5	23	4	17,4
5	9	11	5	25	5	21,7

Примечание: ВМ – высокомолекулярные белки, СМ – среднемoleкулярные белки, НМ – низкомолекулярные белки.

Выводы

Компонентный состав 11S и 7S глобулинов у 23 семей гибридной комбинации F₄ (Вилана × [Юрьевка × Изумрудная]) полиморфен. Дальнейшие исследования, проведенные на линиях этой гибридной комбинации, позволят подтвердить полученные результаты и изучить характер наследования 7S и 11S глобулиновых фракций белков. Учитывая дискретный характер наследования отдельных компонентов электро-

форетических спектров, полученные результаты могут иметь большое значение для селекции сои, которая ведется не только на белок, но и на наиболее ценные белковые компоненты, определяющие функциональные свойства 7S и 11S глобулинов. Установлено, что между содержанием белка и соотношением 11S и 7S глобулинов существует функциональная взаимосвязь.

Литература

1. Клименко В.Г. Белки семян бобовых растений. – Кишинев: Штиица, 1978.
2. Moraes R.M.A. Genetic variation and environmental effects on the beta-conglycinin and glycinin content in Brazilian soybean cultures // Pesquisa Agropecuaria Brasileira. – 2006. – 41. – P. 725–729.
3. Yaklich R.W. в-Conglicinin and glicinin in high-protein soybean // G. Agric. Food.Chem. – 2000. – 49. – P. 729–735.
4. Takahashi M., Hajika M., Matsunaga R. et al. Breeding soybean variety lacking в-conglycinin by introduction of Scg gene from wild soybean / In International soybean processing and utilization conference 3. – Tsukuba proceedings. Tsukuba. – The Japanese Society for food and science and technology. – 2000. – P. 45–46.
5. Адамовська В.Г., Молодченкова О.О., Січкач В.І., Цісельська Л.Й., Сагайдак Т.В. Спосіб добору сої. Патент на корисну модель № 42181 від 25.06.2009. Бюл.

ADAMOVSKAYA V.G., MOLODCHENKOVA O.O., SICHKAR V.I., KARTUZOVA T.V., BEZKROVNAYA L.Y., LAVROVA G.D

Plant Breeding & Genetic Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation, Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopol'skaya doroga, 3, e-mail: olgamolod@ukr.net

CHARACTER OF COMPONENT COMPOSITION VARIATION OF 7S AND 11S GLOBULINS AT THE F₄ HYBRIDS OF SOYBEEN SEED

Aims. Glycinin (11S globulin) and β-conglycinin (7S globulin) are important seed storage proteins in soybean. The objective of this work was to analysis of variation in the electrophoretic patterns of 11S and 7S globulins of F₄ hybrids of soybean seed. **Methods.** 7S and 11S globulins were separated by method, which was developed in the Laboratory of Plant Biochemistry (Patent # 42181). The pictures of the 11S and 7S globulins were got with SDS-PAGE electrophoresis. **Results.** It was established, that part of 23 families of hybrid combination (Vilana × [Yurievka × Izumrudnaya]) have the paternal or maternal component composition of glycinin, β-conglycinin and summary globulins. Some families of studied hybrid combination of soybean have the specific, peculiar only by him, component composition of globulins.

Conclusions. The got results testify that component composition of 7S and 11S globulins in the soybean F₄ hybrids is polymorphic. Further researches of these indexes on the soybean F₅ hybrids will allow study the character of inheritance of component composition of 11S and 7S globulins, which responsible for quality of products from soybean. The results provide a basis to improve soybean protein quality and breed high quality variety.

Key words: *Glicine max* L., 11S globulin, 7S globulin.

УДК 575.17: 582.923.1

АНДРЕЄВ І.О.¹, МОСУЛА М.З.², МЕЛЬНИК В.М.¹, БУБЛИК О.М.¹, КОНВАЛЮК І.І.¹, ДРОБИК Н.М.²

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: i.o.andreev@imbg.org.ua

² Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Україна, 46027, м. Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2, e-mail: maryanamosula@gmail.com

ПОРІВНЯННЯ ПОКАЗНИКІВ ІНФОРМАТИВНОСТІ ПЛР-МАРКЕРІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ ГЕНЕТИЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ НА ПРИКЛАДІ *GENTIANA LUTEA* L.

Одними з найефективніших інструментів дослідження генетичного різноманіття рослин є методи молекулярно-генетичного аналізу на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), які дозволяють отримати інформацію про генетичну структуру виду, унікальність генофонду окремих популяцій. Необхідною передумовою використання таких методів є пошук оптимальних молекулярно-генетичних маркерів та оцінка їхньої інформативності.

Для оцінки інформативності маркерів запропоновано кілька показників. Зокрема, це показник інформативності РІС (*polymorphism information content*), який було спершу використано для оцінки інформативності маркерних локусів під час побудови карт генетичного зчеплення у людини [1], а пізніше разом із індексом інформативності маркерів (*marker index*, MI), що дорівнює добутку РІС на кількість поліморфних локусів, застосовано для оцінки різних типів ПЛР-маркерів [2]. Роздільну здатність (*resolving power*, Rp) було запропоновано як показник здатності праймерів або систем ПЛР-маркерів розрізняти зразки між собою [3]. Розпізнавальна здатність (*discrimination power*, D) та її границя за умови прямування кількості аналізованих зразків до нескінченності (*discriminating power*, D₁) відображають ймовірність того, що два довільно обрані індивіди мають різні набори ПЛР-продуктів, і таким чином відрізняються один від одного [4].

Метою нашого дослідження було порівняння та вибір найбільш ефективних для оцінки генетичного різноманіття показників

інформативності ПЛР-маркерів. Як модельний об'єкт було використано тирлич жовтий (*Gentiana lutea* L.) – рідкісну реліктову рослину, яка на території України зростає лише в Карпатах. У зв'язку зі скороченням ареалу, зменшенням чисельності та порушенням структури популяцій внаслідок дії біотичних та антропогенних чинників, вид занесений до Червоної книги України (2009 р.) [5]. Цінність цієї лікарської рослини та потенційна потреба в сировині зумовлює необхідність оцінки її ресурсів в Україні та визначення можливих засобів їх збереження та відновлення. Для розширення спектру ділянок геному, що відрізняються за функціональним значенням, в генетичному аналізі було використано ПЛР-маркери кількох типів, а саме: ISSR-маркери, які виявляють міжмікросателітні ділянки, IRAP-, асоційовані з кінцевими послідовностями LTR-ретротранспозонів, а також CDDP- та RGAP-маркери, що можуть бути безпосередньо пов'язані із кодувальними ділянками функціонально важливих генів стійкості до хвороб та відповіді на стрес.

Матеріали і методи

Для дослідження використали по 15 рослин *G. lutea* з двох популяцій, які знаходяться на хребті Свидовець в Українських Карпатах (полонина Крачунеска, г. Трояска-Татарука). Використання в аналізі рослин з двох популяцій дозволило певною мірою врахувати міжпопуляційні відмінності, оскільки *G. lutea* належить до видів з фрагментованим ареалом, для яких існує висока ймовірність значної диференціації популяцій.

ДНК виділяли зі свіжих молодих листків за стандартним протоколом [6]. Для ПЛР-аналізу використали 10 RAPD-, 9 ISSR- [7, 8], 9 CDDP- та 7 пар RGAP-праймерів [9, 10], а також 5 IRAP-праймерів, люб'язно наданих Р.М. Календарем (МТТ/ВІ Plant Genomics, Institute of Biotechnology, University of Helsinki). Назви та послідовності праймерів наведені в табл. 1. Умови проведення ПЛР та фракціонування продуктів ампліфікації за допомогою гель-електрофорезу наведено у роботах [11].

Для оцінки інформативності праймерів розраховували наступні показники:

- загальну кількість ампліконів (ЗКА) та частку поліморфних ампліконів (P);

- показник інформативності (PIC) [1]:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^I p_i^2, \text{ де } p_i - \text{ частота } i\text{-ї алелі}$$

маркера; I – число алелей маркера;

- індекс інформативності маркерів (MI) [2]: $MI = PIC \times \text{кількість поліморфних локусів}$;

- роздільну здатність (Rp) [3]: $Rp = \sum Ib$, де Ib – інформативність амплікона, яку визначають, виходячи із частки генотипів, що його містять (p): $Ib = 1 - (2 \times |0,5 - p|)$;

- розпізнавальну здатність (D) [4]: $D = 1 - C$, де C – ймовірність невизначеності під час диференціації зразків, а саме того, що два довільно обрані генотипи з вибірки n будуть мати однакові набори фрагментів ДНК:

$$C = \sum_{i=1}^I p_i \frac{n \cdot p_i - 1}{n - 1};$$

- границя D за прямування числа зразків до нескінченості (D_L) [4] дає оцінку розпізнавальної здатності праймера, яку можна розглядати як варіант PIC, розрахований на основі частот наборів фрагментів, продукованих праймером:

$$\lim(D_j) = \lim(1 - \sum_{i=1}^I p_i \frac{n \cdot p_i - 1}{n - 1}) = D_L = 1 - \sum_{i=1}^I p_i^2$$

Таблиця 1. Показники інформативності праймерів, використаних для ПЛР-аналізу *G. lutea*

Тип маркера	№	Праймер/ пара праймерів	ЗКА	P	PIC	MI	Rp	D	D _L	ND ₃₀ розрах.	ND ₃₀ експер
RAPD	1	A01	10	0,900	0,499	2,495	7,400	0,830	0,802	74	74
	2	A03	10	0,700	0,453	1,812	6,933	0,579	0,560	183	196
	3	A05	7	0,857	0,491	1,473	4,067	0,697	0,673	132	132
	4	A07	13	0,923	0,42	4,62	5,400	0,986	0,953	6	6
	5	A13	10	1,000	0,493	3,451	6,267	0,894	0,864	46	46
	6	A18	16	0,938	0,48	6,72	7,733	0,989	0,956	5	5
	7	A19	15	0,933	0,456	5,928	7,333	0,975	0,942	11	11
	8	B01	12	0,917	0,464	5,104	5,467	0,977	0,944	10	10

За частотами наборів ПЛР-продуктів p_i , отриманих з використанням окремих праймерів, визначали розрахункове число пар зразків, які не може розрізнити праймер (ND) у вибірці з n

$$\text{зразків: } ND = (n \times (n-1)/2) \times \sum_{i=1}^I p_i \frac{n \cdot p_i - 1}{n - 1} \quad [4].$$

Для певної комбінації з кількох (k) праймерів за умови виконання гіпотези про незалежність утворення наборів ПЛР-продуктів цей показник

$$\text{дорівнює: } ND_k = (n \times (n-1)/2) \times \prod_{j=1}^k \sum_{i=1}^I p_i \frac{n \cdot p_i - 1}{n - 1}.$$

Зв'язок між показниками інформативності праймерів розраховували за допомогою коефіцієнта кореляції Спірмена (r_s).

Результати та обговорення

У результаті ПЛР з використанням 40 праймерів різного типу для 30 зразків *G. lutea* із двох популяцій отримано 495 продуктів ампліфікації. Кількість продуктів на праймер становила від 4 до 26, в середньому – 12,4. З цих фрагментів 395 (79,8%) були поліморфними, їх частка для окремих праймерів варіювала від 0 до 1, і в середньому становила 0,743. На основі частот ампліконів та наборів фрагментів, продукованих окремими праймерами, для кожного з них було розраховано показники інформативності. Отримані значення наведено в табл. 1.

Значення показника інформативності PIC використаних праймерів варіювали у діапазоні від 0 до 0,5, і в середньому становили 0,45; індексу інформативності маркерів MI – від 0 до 9,5, в середньому – 3,4; роздільної здатності Rp – від 0 до 12,3, в середньому – 5,5; і розпізнавальної здатності D_L – від 0 до 0,967, в середньому – 0,821. Найбільш інформативними за усіма показниками, крім PIC, виявилися праймери UBC#811 та UBC#807, а найменш інформативними – KNOX-F, KNOX-R, NLRR for/NLRR rev (табл. 1).

	9	B07	15	0,933	0,496	5,952	8,667	0,970	0,938	13	14
	10	B08	14	0,857	0,469	5,628	4,667	0,910	0,880	39	39
ISSR	1	UBC#807	18	1,000	0,484	8,712	11,93 3	1,000	0,967	0	0
	2	UBC#809	14	0,929	0,461	5,993	7,667	0,972	0,940	12	12
	3	UBC#810	10	0,700	0,493	2,958	2,800	0,802	0,776	86	86
	4	UBC#811	26	1,000	0,380	9,5	12,33 3	0,998	0,964	1	1
	5	UBC#827	8	0,750	0,439	2,195	3,867	0,931	0,900	30	30
	6	UBC#835	19	0,947	0,480	7,68	4,667	0,984	0,951	7	7
	7	UBC#840	15	0,933	0,491	6,874	7,200	0,986	0,953	6	5
	8	UBC#857	15	0,800	0,470	4,7	4,933	0,851	0,842	56	56
	9	UBC#889	17	0,824	0,443	6,202	8,733	0,986	0,953	6	7
CDDP	1	WRKY-A-F	15	0,667	0,446	3,568	5,000	0,878	0,849	53	53
	2	WRKY-A-R	13	0,692	0,46	3,68	7,333	0,906	0,876	41	41
	3	WRKY-B	10	0,700	0,468	3,276	4,400	0,855	0,827	63	63
	4	MYB	16	0,938	0,5	5,5	7,667	0,982	0,949	8	8
	5	ERF-F	16	0,813	0,487	5,357	9,133	0,982	0,949	8	8
	6	KNOX-F	5	0	0	0	0	0	0	435	465
	7	KNOX-R	4	0,750	0,267	0,267	1,127	0,578	0,558	184	184
	8	MADS-A	14	0,714	0,422	2,954	4,333	0,972	0,940	12	12
	9	ABP1-2	11	0,727	0,42	1,68	6,467	0,694	0,671	133	133
RGAP	1	RLRR for RLRR rev	9	0	0,472	2,360	6,733	0,756	0,731	106	106
	2	XLRR-INV1 XLRR-INV2	11	0,545	0,442	0,884	3,133	0,883	0,853	51	51
	3	Pto kin3 Pto kin4	5	0	0,485	2,425	3,200	0,811	0,784	82	82
	4	XLRR for XLRR rev	11	0,636	0,410	2,050	2,733	0,857	0,829	62	62
	5	NLRR for NLRR rev	5	0,400	0,358	2,506	1,667	0,692	0,669	134	138
	6	Cre3Ploop Cre3-k3	11	0,727	0,478	1,912	5,067	0,869	0,840	57	57
	7	NLRR-INV1 NLRR-INV2	8	0,625	0,467	2,335	0,733	0,561	0,542	191	195
IRAP	1	653	15	0,733	0,481	3,367	5,000	0,894	0,864	46	46
	2	1962	15	0,933	0,495	6,435	6,133	0,982	0,949	8	8
	3	866	15	0,800	0,5	5	7,533	0,956	0,924	19	19
	4	696	8	0,625	0,444	1,776	1,333	0,710	0,687	126	126
	5	675	14	0,857	0,484	3,872	3,133	0,823	0,796	77	77

Примітка: ND₃₀ розрах. та ND₃₀ експер. – розрахункова та реальна кількість нерозпізнаних пар у вибірці з 30 зразків відповідно.

Для кількісної оцінки зв'язку між використаними показниками інформативності праймерів було розраховано коефіцієнти рангової кореляції Спірмена (табл. 2). Виявлено дуже високу силу зв'язку між D_L і кількістю нерозпізнаних пар, а також між MI та часткою поліморфних ампліконів. Це зумовлено тим, що D_L розраховується на основі величини невизначеності, яка власне відображає кількість нерозпізнаних пар, а MI є добутком PIC та

кількості поліморфних ампліконів. Між іншими показниками, за виключенням PIC, сила зв'язку була високою або середньою. Достовірно значимий слабкий зв'язок виявлено лише між PIC та часткою поліморфних ампліконів.

Отримані результати означають, що всі використані показники, за винятком PIC, певною мірою характеризують ефективність ПЛР-маркерів.

Таблиця 2. Коефіцієнт кореляції Спірмена (r_s) між параметрами інформативності праймерів, використаних для оцінки генетичного поліморфізму *G. lutea*

Показники	Rp	PIС	MI	D _L	ЗКА	P	ND ₃₀ експер.
Rp							
PIС	0,361 ^{NS}						
MI	0,688*	0,365 ^{NS}					
D _L	0,687*	0,210 ^{NS}	0,855*				
ЗКА	0,678*	0,286 ^{NS}	0,834*	0,805*			
P	0,627*	0,419**	0,752*	0,723*	0,932*		
ND ₃₀ експер.	-0,657*	-0,217 ^{NS}	-0,834*	-0,997*	-0,830*	-0,727*	

Примітка: * – $p < 0,001$; ** – $p = 0,05$; ^{NS} – $p > 0,05$.

Загальна кількість ампліконів та частка поліморфних ампліконів – важливі показники придатності окремих праймерів для оцінки генетичного поліморфізму, котрі можуть бути використані на етапі первинного скринінгу. Кількість утворюваних праймером ампліконів визначає теоретично можливу кількість унікальних наборів фрагментів, які здатен утворити праймер. З іншого боку, частка поліморфних ампліконів характеризує реальну наявність у особин дослідженої вибірки відмінностей між послідовностями геному, які визначають утворення ПЛР-продуктів. Водночас, ці показники ніяк не враховують особливостей розподілу поліморфних ампліконів серед досліджених генотипів, зокрема їхні частоти у вибірці зразків. Частота поліморфного амплікону має важливе значення, оскільки найбільш інформативним для генетичного аналізу він є саме за умови рівномірного представлення алелей поліморфного локуса. Спробу врахування частот поліморфних локусів було зроблено в показниках PIС та похідному від нього MI, а також Rp. Ми не знайшли кореляції PIС з рештою показників, тоді як MI та Rp, виявляють зв'язок середньої або високої сили між собою та з іншими показниками.

Коли справа стосується мультилокусних маркерів, стає очевидною необхідність врахування й іншої особливості поліморфних ампліконів – незалежності їхнього розподілу в наборах фрагментів різних генотипів. Цю особливість враховує лише один із використаних показників, а саме розпізнавальна здатність, яка розраховується з частот не окремих ампліконів, а їх наборів. Показник D_L також безпосередньо пов'язаний із кількістю пар зразків, які нездатний розпізнати праймер у дослідженій вибірці. Порівняння кількості нерозпізнаних пар зразків, встановленої експериментально, та теоретично розрахованої за частотами наборів фрагментів, показало значну подібність цих

показників для всіх праймерів (табл. 1). Ці результати свідчать, що розпізнавальну здатність можна успішно застосовувати як показник інформативності при відборі праймерів для оцінки генетичного різноманіття виду. Поряд із цим, ймовірність невизначеності С, на основі якої розраховується розпізнавальна здатність D (див. Матеріали і методи), може бути використана для визначення мінімального необхідного набору праймерів, потрібного для диференціації аналізованої вибірки з N зразків. Результати таких розрахунків наведено нижче.

Розрахунок числа нерозпізнаних пар на основі частот утворюваних наборів ПЛР-продуктів (табл. 3) показав, що використання комбінації з двох праймерів з найвищим значенням D_L недостатньо для диференціації окремих генотипів у вибірці 500 особин, водночас комбінація з будь-яких трьох таких праймерів теоретично здатна успішно розпізнати до 1000 зразків.

Висновки

Проведене дослідження показало, що всі використані показники, за винятком показника інформативності PIС, мають зв'язок середньої та високої сили між собою, а отже певною мірою характеризують інформативність ПЛР-маркерів, призначених для генетичного аналізу. Водночас, найефективнішим є показник розпізнавальна здатність, який найбільш повно враховує особливості розподілу поліморфних ампліконів серед досліджених зразків, а також дозволяє розрахувати кількість пар зразків, що не можуть бути розпізнані праймером або комбінацією праймерів у вибірці певного розміру.

Роботу виконано за фінансової підтримки Цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» в рамках проекту «Порівняльна геноміка у діагностиці генофонду деяких рідкісних видів рослин України».

Таблиця 3. Число нерозпізнаних пар (ND) для різних комбінацій праймерів з найбільшим значенням D_L , розраховане за умови незалежності утворення наборів ПЛР-продуктів для 500 та 1000 зразків

Комбінація праймерів	ND ₅₀₀ розрах.	ND ₁₀₀₀ розрах.
UBC#811 + A18	3,296	13,20
UBC#811 + UBC#889	3,940	15,84
UBC#811 + A18 + A07	0,046	0,182
UBC#811 + A18 + UBC#889	0,046	0,182
UBC#811 + A18 + UBC#840	0,046	0,182
UBC#811 + A18 + UBC#835	0,050	0,212
UBC#811 + UBC#840 + A07	0,055	0,218

Література

1. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // *Am. J. Hum. Genet.* – 1980. – 32. – P. 314–331.
2. Powell W., Morgante M., Andre C., Hanfey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis // *Mol. Breeding.* – 1996. – 2. – P. 225–228.
3. Prevost A., Wilkinson M.J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars // *Theor. Appl. Genet.* – 1999. – 98. – P. 107–112.
4. Tessier C., David J., This P., Boursiquot J.M., Charrier A. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. // *Theor. Appl. Genet.* – 1999. – 98. – P. 171–177.
5. Червона книга України. Рослинний світ / За ред. Я.П. Дідуха. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.
6. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues // *Plant Mol. Biol.* – 1985. – 5. – P. 69–76.
7. Твардовська М.О., Страшнюк Н.М., Мельник В.М., Конвалюк І.І., Кунах В.А. RAPD-аналіз геномного поліморфізму деяких видів роду *Gentiana* L. флори України // *Доповіді НАН України.* – 2009. – 5. – С. 200–204.
8. Конвалюк І.І., Мельник В.М., Дробик Н.М., Кравець Н.Б., Твардовська М.О., Кунах В.А. RAPD- і ISSR-аналіз генетичної мінливості у культурі тканин та органів тирличу звичайного (*Gentiana pneumonanthe* L.) // *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* – 2009. – 9. – С. 22–31.
9. Collard B.C.Y., Mackill D.J. Conserved DNA-Derived Polymorphism (CDDP): a simple and novel method for generating DNA markers in plants // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 2009. – 27. – P. 558–562.
10. Dong P., Wei Y.-M., Chen G.-Y., Li W., Nevo E., Zheng Y.-L. Resistance gene analog polymorphisms (RGAPs) in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) and their ecological associations // *Genetic Resources and Crop Evolution.* – 2009. – 56. – P. 121–136.
11. Мосула М.З., Конвалюк І.І., Мельник В.М., Бублик О.М., Андреев І.О., Дробик Н.М., Кунах В.А. Аналіз генетичної різноманітності популяцій *Gentiana lutea* L. методом маркування міжретротранспозонних послідовностей (IRAP-ПЛР) // *Фізіологія рослин і генетика.* – 2014. – 46, № 1. – С. 45–55.
12. Мосула М.З., Конвалюк І.І., Мельник В.М., Андреев І.О., Бублик О.М., Дробик Н.М., Кунах В.А. Генетичне різноманіття популяцій *Gentiana lutea* L. з хребта Свидівець Українських Карпат // *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* – 2013. – 11, № 2. – С. 250–259.

ANDREEV I.O.¹, MOSULA M.Z.², MEL'NYK V.M.¹, BUBLYK O.M.¹, KONVALYUK I.I.¹, DROBYK N.M.²

¹ *Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: i.o.andreev@imbg.org.ua*

² *Ternopil National Volodymyr Hnatiuk Pedagogical University, Ukraine, 46027, Ternopil, M. Kryvonis str., 2, e-mail: maryanamosula@gmail.com*

COMPARISON OF INFORMATIVENESS INDICES OF PCR-BASED MARKERS FOR GENETIC DIVERSITY ANALYSIS AS EXEMPLIFIED BY *GENTIANA LUTEA* L.

The *aim* of the work was to compare informativeness indices of PCR-based markers for genetic diversity assessment and select the most efficient from them. *Methods.* The study involved 30 plants from two *G. lutea* populations (Svydivets ridge, Ukrainian Carpathians) which were subjected to RAPD, ISSR, CDDP, RGAP, and IRAP analyses. To evaluate the efficiency of the primers, the total number of generated bands,

the proportion of polymorphic bands, the resolving power (Rp), the discrimination power (D), the discriminating power (D_L), the polymorphism information content (PIC), the marker index (MI) and the number of non-differentiated pairs (ND) were calculated. **Results.** The informativeness indices were calculated for each primer based on the frequency of individual bands and banding patterns. This was followed by correlation analysis of the indices. A very strong relationship was found between D_L and ND, and between MI and proportion of polymorphic amplicons ($p < 0.001$). There were also high or moderate significant correlations between other parameters, with the exception of PIC. The estimated number of non-differentiated pairs and that determined experimentally were very close for all primers. **Conclusions.** All of the informativeness indices, except PIC, describe the efficiency of PCR-based markers in some way. The comparison of different markers showed that the most informative was the discriminating power. It can be used successfully to select the primers for genetic diversity assessment, while the confusion probability (C) can be used to determine the minimal set of primers necessary to discriminate between the genotypes in a sample of N accessions.

Key words: discriminating power (D_L), informativeness indices of markers, PCR-based markers.

УДК 577.21:633.852

БАЄР Г.Я.², БОЙЧУК Ю.М.², ПРКО Я.В.², КОРХОВИЙ В.І.², РАХМЕТОВ Д.Б.¹, ЄМЕЦЬ А.І.², БЛЮМ Я.Б.²

¹ Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України, Україна, 01014, м. Київ, вул. Тимірязєвська, 1

² Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А, e-mail: galinabayer@mail.ru

ДОСЛІДЖЕННЯ СЕЛЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ РИЖІЮ ПОСІВНОГО (*CAMELINA SATIVA* (L.) CRANTZ) ЗА ДОПОМОГОЮ ISSR-АНАЛІЗУ

Інтерес до біопалива спонукав дослідників критично оцінити альтернативні джерела сировини для виробництва біодизелю. Один із способів подолати попит на олії – використання нетрадиційних олійних рослин. До таких рослин, що не використовуються широко в харчовій промисловості, належить *Camelina sativa* (L.) CRANTZ (рижій посівний) родини Brassicaceae, який є найбільш перспективною в цьому відношенні культурою. Ще на початку ХХ століття рижій вирощувався на невеликих площах в Україні, Росії, Європі, головним чином з метою отримання олії для освітлення та фарбування. Однак протягом тривалого часу ця культура вважалася бур'яном, що засмічує посіви льону. Поновлення інтересу до *C. sativa* в якості сировини для отримання біопалива пов'язане з його посухостійкістю і невибагливістю до родючості ґрунтів. Рижій, як скоростигла культура, вирізняється коротким вегетаційним періодом, високою адаптаційною здатністю до абіотичних стресових факторів, стійкістю до хвороб та шкідників [1, 2]. У відділі нових культур НБС ім. М.М. Гришка НАН України створено цінний генофонд рижію [3]. До того ж важливість *C. sativa* для виробництва біодизеля вже добре доведено [4]. Олія та

біодизель з рижію були використані в якості палива у випробуваннях двигуна з багатобіаючими результатами [4, 5]. Незважаючи на свій потенціал щодо отримання олії, на цей час інформація про стан генофонду цього виду, особливо новостворених сортозразків, залишається досить обмеженою.

Зі збільшенням кількості нових подібних або тісно пов'язаних сортів рижію все актуальнішим стає процес реєстрації створеного сорту, його сертифікації та захисту авторських прав селекціонерів. Молекулярні маркери відрізняються високим рівнем поліморфізму між сортами і можуть ефективно використовуватися для оцінки загальних генетичних характеристик рослин [6]. Тому метою нашої роботи було за допомогою ISSR-аналізу вивчити генетичну мінливість і диференціацію деяких форм та сортів *C. sativa*, зробити їх генетичне профілювання.

Матеріали і методи

Для ISSR-аналізу використовували 8 форм та 4 сорти рижію посівного (*Camelina sativa*) з колекції Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка, насіння яких висівали в ґрунт в умовах культуральної кімнати. ДНК екстрагували з 10-денних проростків за допомо-

гою ЦТАБ [7]. Для аналізу використовували 7 олігонуклеотидних праймерів до мікросателітних послідовностей (табл. 1). Праймери було синтезовано на приладі АВ 3400 DNA Synthesizer у ЦККП «Гентест» (Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України).

Реакційна суміш для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) об'ємом 25 мкл містила: 50 нг геномної ДНК, 0,2 мкМ праймера, 200 мкМ суміші dNTP, 2,5 одиниці Таq-полімерази (Хелікон, Росія). Ампліфікацію проводили на ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США) за наступною схемою: початкова денатурація при 95°C, 5 хв; ампліфікація – 45 циклів (95°C – 1 хв, 40°C – 1 хв, 72°C – 2 хв); кінцева елонгація – 72°C, 7 хв.

Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 1,5%-ному агарозному гелі. Для визначення довжини фрагментів використовували ДНК-маркери (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, ready-to-use, «Fermentas» (Литва), та 1Kb Plus DNA Ladder,

«Invitrogen» (США). Рівень поліморфізму оцінювали для кожного праймера у відсотках як відношення кількості поліморфних ПЛР-локусів до загальної кількості детектованих ПЛР-локусів за формулою:

$$P = n_p / (n_p + n_{np}) \times 100\%$$

де n_p – кількість поліморфних ПЛР-локусів, а n_{np} – кількість неполіморфних ПЛР-локусів.

Для визначення генетичних взаємовідносин між досліджуваними зразками розраховували генетичні дистанції за Неєм [8], матрицю яких в подальшому було використано для побудови дендрограми за незваженим парногруповим методом з арифметичним усередненням (UPGMA) за допомогою комп'ютерної програми «TREE 4.5».

Результати та обговорення

У результаті проведеного ISSR-аналізу 8 форм та 4 сортів рижю посівного було виявлено 68 локусів (ампліконів), 52 (76%) з яких виявились поліморфними (рис. 1).

Таблиця 1. Праймери, що були використані в роботі для дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму серед генотипів рижю посівного

Праймер	5'→3' послідовність	Розмір фрагментів, пн.
ISSR-3	(CT) ₈ TG	350–2000
ISSR-4	(CA) ₅ GT	300–900
ISSR-16	(AG) ₇ GT	150–700
ISSR-18	(ACTG) ₅	350–2000
Cv05	(AC) ₈ TG	250–1400
Cv25	(AC) ₈ CA	450–3000
Cv62	(AG) ₈ CA	250–1000

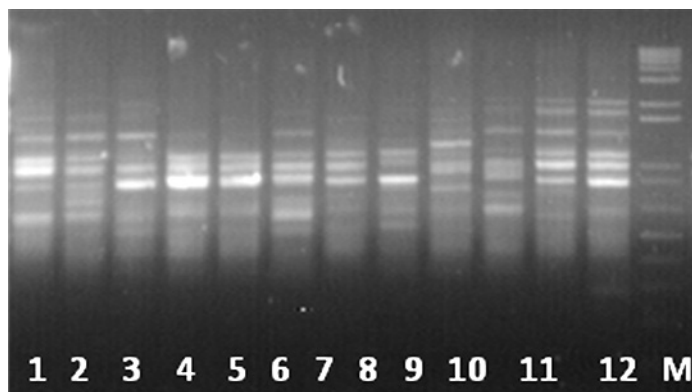


Рис. 1. Результати ампліфікації ДНК сортозразків рижю з праймером Cv25 (1– сорт Перемога; форми: 2 – ФЕОРЖЯФ-5; 3 – ФЕОРЖЯФД; 4 – ФЕОРЖЯФЧП; 5 – ФЕОРЖЯФ-4; 6 – ФЕОРЖЯФ-2; 7 – ФЕОРЖЯФЕ-1; 8 – ФЕОРЖЯФ-3; 9 – ФЕОРЖЯФЧ; сорти: 10 – Колондаjk; 11 – Міраж; 12 – Свро-12; М – ДНК-маркер)

Більшість фрагментів мали довжину в межах 400–2000 п. о. Найбільшу кількість ампліфікованих фрагментів після проведення ПЛР спостерігали при використанні праймерів Cv05 і Cv25, що раніше були запропоновані для мікроводоростей *Chlorella vulgaris* та *C. pyrenoidosa* [9]. Дані праймери виявилися досить ефективними і для вивчення генетичної різноманітності *C. sativa* (табл. 2).

Середня кількість ПЛР-фрагментів на праймер склала – 9,7. У результаті ампліфікації з праймером ISSR-4 виявили найбільшу кількість поліморфних локусів – 100%. Для досліджуваних генотипів виявлено 9 унікальних локусів, а саме: у сорту Клондайк – 4 локуси; у форм: ФЕОРЖЯФД, ФЕОРЖЯФЧП; ФЕОРЖЯФ-4; ФЕОРЖЯФЧ; Міраж – по одному унікальному локусу. За сумарними даними ПЛР-аналізу

проведено розрахунок генетичних дистанцій та кластеризацію зразків, що досліджувались. Значення генетичних дистанцій варіювали від 0,100 до 0,450. Виявилось, що найбільш генетично гетерогенними були форма ФЕОРЖЯФ-2 та сорт Перемога, які до того ж мали найбільші значення генетичної відстані. В той же час найменша генетична відстань була зафіксована між формою ФЕОРЖЯФ-3 та сортом Євро-12. В цілому досліджувані зразки доволі чітко різняться між собою, що засвідчує непогані диференціюючі властивості використаних праймерів під час проведення ISSR-аналізу, а отримані результати підтверджують можливість використання цього виду аналізу як ефективного експрес-методу для вивчення генетичного поліморфізму та генотипування сортозразків.

Таблиця 2. Ефективність праймерів при аналізі рослин *Camelina sativa*

Праймер	Загальна кількість локусів, шт	Поліморфні локуси, шт	Поліморфізм, %
ISSR-3	7	4	57,14
ISSR-4	7	0	100,0
ISSR-16	8	4	50,0
ISSR-18	7	5	71,0
Cv05	14	11	76,8
Cv25	14	13	92,8
Cv62	11	8	72,7
Всього:	68	52	76,5

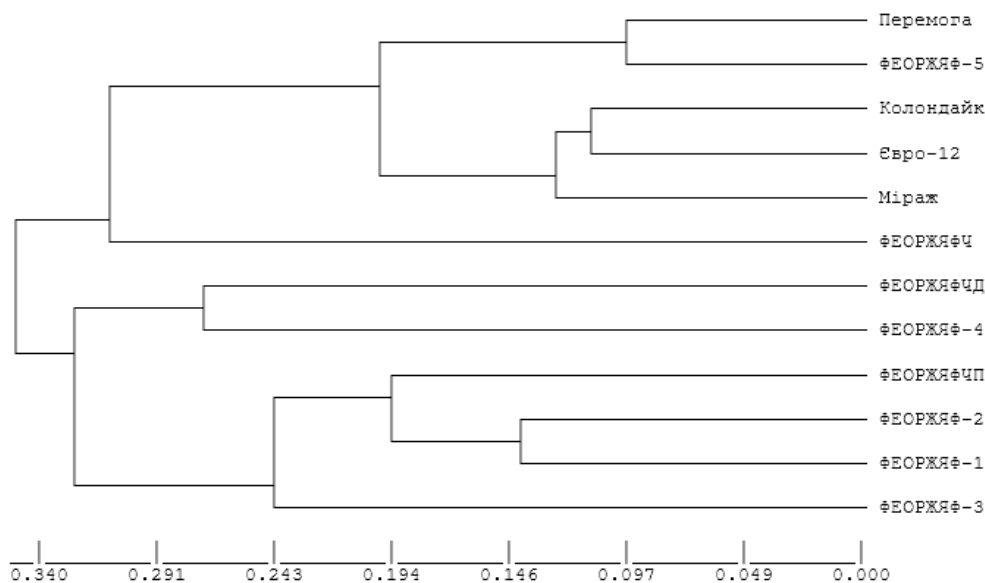


Рис. 2. Дендрограма, що демонструє взаємовідносини між дослідженими зразками *Camelina sativa* за даними ISSR-аналізу

Проведений кластерний аналіз дозволив наочно продемонструвати характер генетичної диференціації зразків рижію посівного (рис. 2). Побудована дендрограма містить два великі кластери, перший – складається з двох субкластерів, в які об'єдналися зразки селекції Національного ботанічного саду: ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФ-4 та ФЕОРЖЯФЧП, за винятком форми ФЕОРЖЯФЧД, що має походження з Данії. Другий великий кластер об'єднав сорти: Перемога, ФЕОРЖЯФ-5, Клондайк, Євро-12 та Міраж.

Висновки

За допомогою ISSR-аналізу проаналізовано 12 генотипів *C. sativa*, досліджено генетичну мінливість та їх диференціацію. В цілому рівень генетичного поліморфізму рижію посівного становив 76,5%. Досліджувані зразки

доволі чітко різняться між собою, що засвідчує непогані диференціюючі властивості використаних під час проведення ISSR-аналізу праймерів, а отримані результати підтверджують можливість використання цього виду аналізу як ефективного експрес-методу оцінки генетичного поліморфізму у *C. sativa*. На основі варіабельності міжмікросателітних послідовностей у досліджених зразків рижію визначено ступінь генетичних відмінностей і побудована дендрограма, що наочно демонструє взаємовідносини між ними. Унікальні ПЛР-фрагменти були виявлені у 6 генотипів. Отримані результати можуть бути використані в селекційних програмах для генетичної ідентифікації сортів, захисту авторських прав і для контролю за поширенням перспективного селекційного матеріалу.

Література

1. Putnam D., Budin J., Field L., Breene W. Camelina: a promising low-input oilseed. In New crops. Edited by: Janick J., Simon J.E. – New York: Wiley, 1993. – P. 314–322.
2. Gehringer A., Friedt W., Luhs W., Snowdon R.J Genetic mapping of agronomic traits in false flax (*Camelina sativa* subsp. *sativa*) // Genome. – 2006. – 49. – P. 1555–1563.
3. Рахметов Д., Самойленко И. Рыжей – альтернативная масличная культура // Зерно, «Новый друк». – 2012. – № 2 (70). – С. 50–56
4. Frohlich A., Rice B. Evaluation of *Camelina sativa* oil as a feedstock for biodiesel production // Ind. Crop. Prod. – 2005. – 21. – P. 25–31.
5. Bernardo A., Howard-Hildige R., O'Connell A., Nichol R., Ryan J., Rice B., Roche E., Leahy J.J: Camelina oil as a fuel for diesel transport engines // I nd. Crop. Prod. – 2003. – 17. – P. 191–197.
6. Sofalianye O., Chaparzadeh N., Dolati M. Genetic diversity in spring wheat landraces from northwest of Iran assessed by ISSR markers // Not. Bot. Hort. Agrobot. – 2009. – N 37 (2). – P. 252–256.
7. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moor D.D., Seidman J.G. Current protocols in molecular biology // John Wiley & Sons. – New York, 1987. – P. 4.3.1.–4.3.3.
8. Nei M., Li W.H. Mathematical model for studing genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1979. – 76. – P. 5269–5273.
9. Songdong S. Genetic diversity analysis with ISSR PCR on green algae *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa* // Chin. J Ocean. Limn. – 2008. – 26, N 4. – P. 380–384.

BAYER G.YA.², **BOICHUK YU.M.**², **PIRKO YA.V.**², **KORKHOVOY V.I.**², **RAKHMETOV D.B.**¹, **YEMETS A.I.**², **BLUME YA.B.**²

¹ M.M. Grishko National Botanical Garden, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 01014, Kyiv, Timiryazevska str., 1

² Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: galinabayer@mail.ru

ANALYSIS OF BREEDING FALSE FLAX (*CAMELINA SATIVA* (L.) CRANTZ) MATERIAL WITH ISSR MARKERS

Aims. The aim of investigation is the applicability of ISSR markers for uncovering polymorphism to study the relationships between *C. sativa* genotypes. **Methods.** Twelve genotypes were analyzed using seven primers. Extracted DNA was successfully used for study by ISSR-PCR method. The genetic distances were used to construct the UPGMA dendrogram which characterized relationships between studied genotypes.

Results. The level of genetic polymorphism of *C. sativa* is 76.5%. The unique fragments have been revealed in 6 genotypes. The studied genotypes were divided in two clusters. **Conclusions.** It was shown that ISSR

analysis is the useful method for fingerprinting and determination of relationships between the different *C. sativa* genotypes. The results can be used in breeding programs for the genetic identification of cultivars for copyright protection and to control the spread of promising breeding material.

Key words: *Camelina sativa*, ISSR-PCR, polymorphism, genetic distances.

УДК 633.11:575

ЗАЙЦЕВА Г.П., АКИНИНА Г.Е., ТВЕРДОХЛЕБ Е.В., ДУГАРЬ Ю.Н., ПОПОВ В.Н.

Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН,

Украина, 61060, г. Харьков, пр. Московский 142, e-mail: yuriev1908@gmail.com

ОПРЕДЕЛЕНИЕ *Lr* ГЕНОВ В СОРТАХ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ ОЗИМОЙ УКРАИНСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

Бурая, или листовая, ржавчина, одна из основных болезней пшеницы (*Triticum aestivum* L.), возбудителем которой является гриб *Puccinia triticina* Erikss., может приводить к потерям урожая, а также к снижению качества зерна. Устойчивость к бурой ржавчине мягкой пшеницы является предпосылкой для получения стабильно высоких урожаев.

В настоящее время идентифицировано более 70 *Lr*-генов, 67 из них картированы относительно разных ДНК-маркеров [1]. В частности, *Lr10* локализован на коротком плече хромосомы 1А и не является широко эффективным, однако может играть позитивную роль в сочетании с другими генами устойчивости [2]. *Lr34* картирован на хромосоме 7D, относится к числу наиболее высокоэффективных генов устойчивости к бурой ржавчине. *Lr20* расположен на длинном плече хромосомы 7А. Источником гена *Lr26* является рожь (*Secale cereale* L.), он находится на коротком плече хромосомы 1RS. Гены *Lr24* и *Lr19* привнесены в мягкую пшеницу от *Agropyron elongatum* (Host) Beauv.

К настоящему времени осуществлено множество переносов полезных генов от дикорастущих сородичей пшеницы в геном мягкой пшеницы, однако, лишь небольшое число генов можно использовать в селекционных целях. Создавать сорта пшеницы, сочетающие несколько олигогенов, или специфическую и неспецифическую устойчивость, легче при использовании молекулярных маркеров генов. Они являются мощным инструментом, позволяющим пирамидировать гены (marker assisted selection – MAS breeding programs). Кроме того, несколько генов устойчивости можно идентифицировать совместно посредством тестирования на присутствие молекулярных маркеров. Определить гены

устойчивости с помощью молекулярных маркеров возможно на ранних стадиях развития растения (семена и проростки). К настоящему времени известны ДНК-маркеры, сцепленные с генами устойчивости *Lr9* [7], *Lr24* [3], *Lr29*, *Lr25* [5], *Lr35* [4] и *Lr39* [6].

Целью наших исследований являлась идентификация *Lr*-генов в сортах озимой мягкой пшеницы украинской селекции с использованием ДНК-маркеров.

Материалы и методы

Сорта и линии пшеницы мягкой озимой (*Triticum aestivum* L.), были предоставлены Национальным центром генетических ресурсов растений Украины. Нами были проанализированы сорта и линии, созданные в Институте растениеводства им В.Я. Юрьева НААН (далее ИП), сорта Селекционно-генетического института НААН, г. Одесса (СГИ) и Мироновского института пшеницы им. В.М. Ремесло НААН, г. Киев (МИП). Из каждого учреждения было отобрано по 19 сортов (перечень сортов представлен в таблице). В качестве контроля использовали образцы с известными *Lr* генами. Для изучения генетического разнообразия сортов были выбраны 4 микросателлитных локуса сцепленных с *Lr10*, *Lr19*, *Lr20*, *Lr34* [8]. ДНК выделяли из смеси пяти семян набором реагентов для выделения ДНК из биологического материала DiatomDNAPrep100 (Неоген). Наличие *Lr* генов изучали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Амплификацию ДНК проводили в пробирках с лиофилизированным набором реактивов для ПЦР (GenePak PCR core) в амплификаторе Терцик (Россия). Конечный объем реакционной смеси составил 20 мкл и содержал 5 мкл ДНК и 1 мкМ каждого праймера. Для амплификации использовали следующую программу: 94 °С –

10 мин., 1 цикл, с последующими 40 циклами: 94 °С – 30 сек., Tm (62 °С – *Lr10*, 55 °С – *Lr19*, 60 °С – *Lr20*) 30 сек., 72 °С – 30 сек., 72 °С – 10 мин., 1 цикл. Амплификацию маркера к гену *Lr34* проводили в соответствии с рекомендациями <http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/index.htm>.

Продукты амплификации визуализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле в боратном буфере с низкой ионной силой, для мониторинга ДНК в ультрафиолете использовали бромистый этидий (на 300 мл 2% агарозного геля – 20 мкл). Электрофорез проводили в горизонтальном приборе Hoefer SuperSub100 [9].

В качестве маркеров молекулярной массы использовали DNA ladders 50. Полученные гели документировали с использованием фотосистемы Nikon. Для определения количества и размеров продуктов амплификации применяли

демоверсию программы TotalLab 120 (<http://www.totallab.com>).

Результаты и обсуждение

При идентификации гена *Lr10* с использованием праймеров Lrk 10 D1 (F) и Lrk 10 D2 (R) идентифицирован фрагмент размером 282 п.н. в шести сортах озимой мягкой пшеницы, созданных в двух селекционных центрах – ИР и СГИ (табл. 2). Ген *Lr10* в настоящее время не относится к группе эффективных генов, но его комбинирование с другими *Lr*-генами может способствовать повышению уровня устойчивости [10].

По литературным данным ДНК-маркеры к *Lr19* и *Lr20* имеют фрагменты 130 п.н. и 542 п.н., соответственно [8]. В наших опытах указанные фрагменты не наблюдались, следовательно, представленные гены, отсутствуют в изученных сортах пшеницы.

Таблица. Образцы озимой мягкой пшеницы

Номер Нац. каталога	Название образца	Номер Нац. каталога	Название образца	Номер Нац. каталога	Название образца
Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН		Селекционно-генетический институт НААН		Мироновский институт пшеницы им. В.М. Ремесло НААН	
UA0100002	Харьковская 11	UA0106584	Годувальниця одеська	UA0106265	Снігурка
UA0100005	Харьковская 90	UA0106587	Єдність	UA0104204	Подольянка
UA0100813	Харківська 105	UA0104207	Дальницька	UA0102692	Крижинка
UA0100833	Харьковская 81	UA0103681	Куяльник	UA0105975	Фаворитка
UA0103003	Полукарлик 3	UA0105607	Оксана	UA0106226	Богдана
UA0106376	Досконала	UA0106022	Зміна	UA0106227	Золотоколоса
UA0106573	Дорідна	UA0106017	Вдала	UA0105600	Смуглянка
UA0103677	Харус	UA0106254	Господиня	UA0104205	Колумбія
UA0104972	Василина	UA0106257	Запорука	UA0106578	Солоха
UA0104973	Астет	UA0106523	Заможність	UA0107097	Сонечко
UA0106375	Альянс	UA0106580	Бунчук	UA0107438	Нива Київщини
UA0106572	Розкішна	UA0106583	Благодарка одеська	UA0107643	Славна
UA0106961	Гордовита	UA0107430	Жайвір	UA0107655	Лимарівна
UA0108061	Линия 831/10	UA0107433	Борвій	UA0107656	Спасівка
UA0107997	Статна	UA0107661	Ластівка одеська	UA0107657	Чигиринка
UA0108058	Дбайлива	UA0107662	Голубка одеська	UA0110806	Лея
UA0108107	Фермерка	UA0107663	Ватажок	UA0100020	Полесская 90
UA0108116	Запашна	UA0110807	Ніконія	UA0100065	Мироновская 808
UA0108131	Линия 808/10	UA0101767	Прокофьевка	UA0100007	Украинка

Молекулярный скрининг сортов озимой пшеницы на наличие гена *Lr34* с использованием праймеров csLV34 (F) и csLV34 (R) показал наличие фрагментов размером 150 п.н и 229 п.н. Амплификация фрагментов размером 150 п.н свидетельствует о наличии гена *Lr34*, а наличие фрагмента размером 229 п.н. может свидетельствовать об отсутствии этого гена. Так, у 13 сортов пшеницы ИП были выявлены фрагменты размером 150 п.н., а у 8 сортов – фрагмент размером 229 п.н., у 16 сортов СГИ также идентифицирован маркер, сцепленный с геном *Lr34*. Среди сортов селекции МИП – у 3-х идентифицировали фрагмент размером 150 п.н., а у 16 сортов он отсутствовал. Ген *Lr34* получил широкое распространение в селекции пшеницы от сорта Безостая 1, который использовался во многих селекционных центрах по созданию сортов

пшеницы. Несмотря на то, что эффективность гена *Lr34* снижается, показано, что комбинация его с другими расоспецифическими генами, например *Lr13*, значительно повышает уровень полевой устойчивости [11].

Выводы

С помощью ДНК-маркеров были выявлены сорта и линии пшеницы мягкой озимой, в которых выявлены маркеры, сцепленные с генами устойчивости к бурой ржавчине. Из 19 сортов селекции ИП выявлено 13 образцов с генами *Lr10* и *Lr34*, причём у сорта Фермерка присутствуют два гена - *Lr10* и *Lr34*. У изученных сортов селекции СГИ выделено 17 образцов, 4 из которых имеют два гена *Lr 10* и *Lr34* – Куяльник, Зміна, Жайвір, Ластівка одеська. Всего лишь три образца с геном *Lr34* мы выявили в сортах селекции МИП: Богдана, Колумбія, Леся.

Литература

1. McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat: 2009 Supplement [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2009.pdf
2. McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes. CSIRO, Melbourne. – 1995.
3. Dedryver F., Jubier M. F., Thouvenin J., Goueau H. Molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr 24* in different wheat cultivars // Genome. – 1995. – 38, N 1. – P. 75–83.
4. Gold J., Harder D., Townley-Smith F., Aung T., Procnier J. Development of a molecular marker for rust resistance genes *Sr39* and *Lr 35* in wheat breeding lines // Elektronik Journ. of Biotechnol. – 1999. – 2, N 1.
5. Procnier J.D., Townley-Smith T.F., Fox S., Prashar S., Gray M., Kim W.K., Czarnecki E., Dyck P.L. PCR-based RAPD/DGGE-markers linked to leaf rust resistance genes *Lr 29* and *Lr 25* in wheat (*Triticum aestivum* L.) // J. Gen. and Breed. – 1995. – 49. – P. 87–92.
6. Raupp W.J., Sukhwinder-Singh, Brown-Guedira G.L., Gill B.S. Cytogenetic and molecular mapping of the leaf rust resistance gene *Lr 39* in wheat // TAG Theor. Appl. Gen. – 2001. – 102. – P. 347–352.
7. Schachermayr G., Siedler H., Gale M.D., Winzeler H., Winzeler M., Keller B. Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr 9* leaf rust resistance gene of wheat // Theor. Appl. Gen. – 1994. – 88. – P. 110–115.
8. Урбанович О.Ю., Малышев С.В., Долматович Т.В., Картель Н.А. Определение генов устойчивости к бурой ржавчине в сортах пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с использованием молекулярных маркеров // Генетика. – 2006. – 42, № 5. – С. 675–683.
9. Brody J.R., Calhoun E.S., Gallmeier E. et al. Ultra-fast high-resolution agarose electrophoresis of DNA and RNA using low-molarity conductive media // Bio-techniques. – 2004. – 37, N 4. – P. 598–602.
10. McIntosh R.A. et al. Wheat rusts: an atlas of resistance genes. CSIRO, Australia, and Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995.
11. Kolmer J.A. Virulence phenotypes of *Puccinia triticina* in South Atlantic States in 1999 // Plant Diseases. – 2002. – 86. – P. 288–291.

ZAITSEVA G.P., AKININA G.YE., TVERDOKHLEB E.V., DUGAR YU.M., POPOV V.N.

The Plant Production Institute nd. a. V.Ya. Yuryev of NAAS, Ukraine, 61060, Kharkov, Moskovskiy prospekt, 142, e-mail: yuriev1908@gmail.com

DETERMINATION OF *Lr* GENES IN SOFT WINTER WHEAT VARIETIES OF UKRAINIAN SELECTION

Aims. The aim of our research was to identify *Lr*-genes in winter wheat Ukrainian varieties using DNA markers. **Methods.** DNA was isolated from a mixture of five seeds. Presence of *Lr* genes was studied by polymerase chain reaction (PCR). The amplification products were visualized by electrophoresis on a 2% agarose gel. For determination the numbers and sizes of the amplification products demo version of program

TotalLab 120 was used. **Results.** *Lr10* gene was detected in six varieties of winter wheat from two breeding centers – The Plant Production Institute (PPI) and The Plant Breeding and Genetics Institute (PBGI). In the studied varieties *Lr19* and *Lr20* genes were not identified. *Lr34* gene was identified in 13 varieties of PPI, 17 varieties of PBGI and three varieties of the Mironivskiy institute of wheat (MIW). **Conclusions.** Using the DNA-markers varieties and lines of soft winter wheat with the *Lr* genes were identified. The two *Lr* genes, *Lr10* and *Lr34*, are present in some studied samples. And two genes, *Lr19* and *Lr20*, were not identified in studied Ukrainian winter wheat varieties and lines.

Key words: *Lr*- genes, DNA markers, leaf rust, *T. aestivum* L.

УДК 577.21:632.4

ІВАЩУК Б.В., ПІРКО Я.В., БЛЮМ Я.Б.

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail: yavp@mail.ru

ІДЕНТИФІКАЦІЯ АЛЕЛЬНИХ СТАНІВ ГЕНА Rpg1 У СОРТІВ ЯЧМЕНЮ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

Ячмінь (*Hordeum vulgare*) є однією з найбільш поширених зернових культур у світі. Разом з пшеницею ячмінь складає більш ніж 25% світового харчового постачання. Оцінено, що через різноманітні захворювання цих злаків щороку втрачається близько 5 млрд. доларів США [1]. До найбільш шкідливих патогенів ячменю та пшениці відносять *Puccinia recondite*, *Puccinia graminis* і *Puccinia striiformis*, які викликають такі захворювання, як листова іржа, стеблова іржа і смугаста іржа відповідно. Особливою небезпечністю серед них виділяється *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, що вражає як ячмінь, так і пшеницю і періодично викликає масові епіфітотії, які призводять до значного зниження врожаю та якості зерна цих культур.

У 1940-х роках ХХ століття втрати урожаю ячменю, спричинені стебловою іржею, стали мінімальними, що було викликано появою нових сортів з геном Rpg1. До недавнього часу цей єдиний ген надійно забезпечував стійкість ячменю до різних патотипів *P. graminis* f. sp. *tritici* [2]. З появою у 1999 р. в Уганді нової раси стеблової іржі, названої Ug99, більшість сортів пшениці та ячменю виявились чутливими до цього патотипу, тому і досі використання у селекції ячменю таких генів, як Rpg1, та пошук нових генів стійкості до цього патотипу іржі є актуальною проблемою. Особливо важливо відзначити, що у зв'язку з швидким поширенням Ug99 з центральної Африки в Південну Африку, Аравійській півострів, Іран, і далі на схід Євразії виникає ризик розповсюдження цього захворювання і в країнах Європи. Rpg1 – домінуючий ген, оригінальним джерелом якого є сорт ячменю Kindred [2]. Оскільки він забезпе-

чував широку стійкість до різних патотипів *Puccinia graminis* протягом останніх 70-ти років, майже кожен сорт ячменю в середніх і західних штатах США є носієм цього гена. Завдяки визначенню нуклеотидної послідовності гена Rpg1 було виявлено, що білковий продукт Rpg1 схожий на рецептор кінази з унікальним поєднанням двох тандемних кіназних доменів [6]. В епідермісі листка експресується в 30 разів більше цього білка, ніж в інших тканинах. Він головним чином представлений в цитозолі, плазматичній мембрані та внутрішньоклітинних мембранах. Аналіз мутантів по гену Rpg1 показав, що для стійкості необхідна наявність обох кіназних доменів, але лише один із них має кіназну активність [3]. Результати деяких досліджень свідчать про те, що Rpg1 фосфорилується вже через 5 хв. після інокуляції авірулентними урединоспорами, що нашоухує на думку про його роль у ранній відповіді на інфекцію стебловою іржею. Також було з'ясовано, що для перенесеної геном Rpg1 стійкості немає прямої відповідності між стійкістю до стеблової іржі, числом копій гена чи транскрипційним рівнем [3], але при великій кількості перенесених копій гена може відбуватись посттрансляційний генний сайленсинг [4].

У зв'язку з цим, важливо мати розгорнуті дані щодо наявності та алельного стану гена Rpg1 у різних сортів ячменю вітчизняного селекційного фонду, оскільки він визначає стійкість ячменю до багатьох вірулентних патотипів стеблової іржі. Тому метою даної роботи було виявлення можливої присутності «стійкого» алеля гена Rpg1 в українських сортах ячменю.

Матеріали і методи

У роботі було використано зразки 60 сортів ярого ячменю вітчизняної селекції, отриманих в Селекційно-генетичному інституті – Національному центрі насіннєзнавства та сортовивчення НААН України. Як контроль використовували канадські сорти ячменю: для виявлення «стійкого» алеля – Oxbow і Bonanza; для аналізу наявності «чутливого» алеля – Harrington і Hiproly.

ДНК виділяли з насіння за допомогою набору NeoPrep⁵⁰DNA (NEOGENE[®]) за інструкцією виробника. Для ідентифікації «стійкого» алеля за допомогою ПЛР використовували праймери з наступними нуклеотидними послідовностями: форвардний праймер RPG1RF – (GGCTAATCASCATCAAGTAA), реверсний праймер RPG1RR – (TTCTCCATTGTCCAACCTC). Довжина продукту ампліфікації – 610 п.н. Для ідентифікації «чутливого» алеля були задіяні наступні праймери: форвардний – RPG1SF (GGCTAATCASCATCAAGGTT) та реверсний – RPG1SR (CCACGACCAATTATGTTCTG). Довжина продукту ампліфікації – 487 п.н. [5]

Реакційна суміш об'ємом 25 мкл для визначення наявності «стійкого» алеля містила 0,1% БСА, 10 мМ Тріс-НСL, рН 8,8, 50 мМ КСL, 1,125 мМ MgCl₂, 250 мкМ дНТФ, 1 пМ кожного праймера, 1 од. *Taq* ДНК полімерази (Fermentas) і 60–100 нг ДНК, а для встановлення наявності «чутливого» алеля: 10 мМ Тріс-НСL, рН 8,8, 50 мМ КСL, 2 мМ MgCl₂, 250 мкМ дНТФ, 10 пМ кожного праймера, 1 од. *Taq* ДНК полімерази

(Fermentas), і 60–100 нг ДНК. Параметри режиму для проведення ампліфікації (Thermal cycler 2720 Applied Biosystems) були наступними: 94 °С – 4 хв; 35 циклів: 94 °С – 30 с., 56 °С – 45 с., 72 °С – 60 с.; 72 °С – 10 хв.

Продукти ампліфікації візуалізували за допомогою бромистого етидію в 1,5%-ному агарозному гелі.

Результати та обговорення

Згідно проведеного аналізу 60-ти сортів ярого ячменю вітчизняної селекції було встановлено, що жоден сорт не є носієм «стійкого» алеля гена *Rpg1*. Отриманий результат є доволі очікуваним, оскільки в Україні відсутнє широке розповсюдження вірулентних рас стеблової іржі, що складають епідеміологічну загрозу, і тому направлена селекція на отримання стійких сортів ячменю в минулому не здійснювалась. Лише у 16 сортах був виявлений чутливий алель гена *Rpg1*. Більшість з них походять від сортів ячменю одеської селекції. На рисунку наведена електрофореграма продуктів ПЛР для детекції «чутливого» алеля гена *Rpg1* частини сортів, для яких проводився відповідний аналіз.

Узагальнені дані щодо аналізу алельного стану українських сортів ячменю наведено нижче в таблиці. Варто зазначити, що «чутливий» алель, знайдений нами в українських сортах, не обов'язково є ідентичним за походженням до «чутливого» алеля, який був виявлений в канадських чи американських сортах [5].

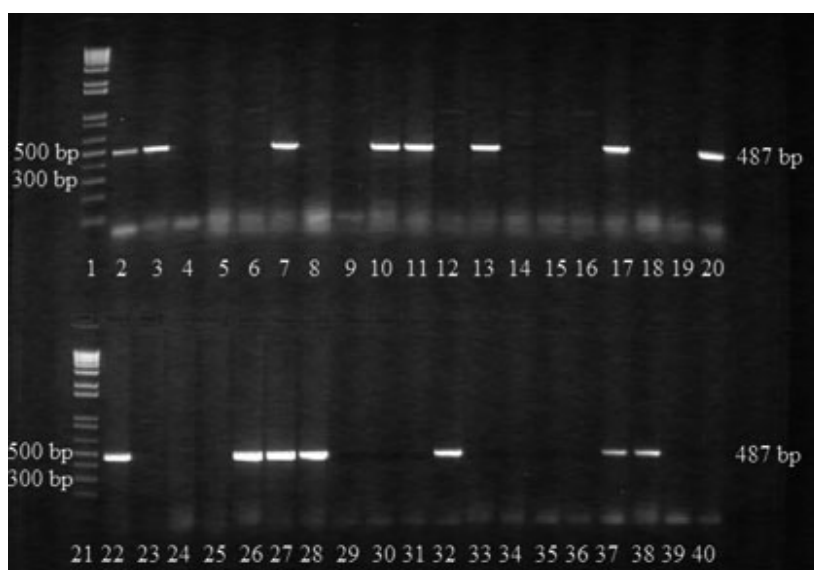


Рис. Продукт ампліфікації фрагмента гена *Rpg1* («чутливий» алель): 1, 21 – маркери молекулярної маси, 2 – сорт Harrington, 3 – сорт Hiproly, 4 – негативний контроль, 7 – Одеський 9, 10 – Южний, 11 – Степовий, 13 – Одеський 36, 17 – Одеський 69, 20 – Нутанс 518, 22 – Дружба, 26 – Романтик, 27 – Тайфун, 28 – Одеський 115, 32 – Паллідум 107, 37 – Переможний, 38 – Гамбринус

Таблиця. Алельний стан гена Rpg1 у досліджених сортів ячменю

Сорт	Алельний стан гена Rpg1	Сорт	Алельний стан гена Rpg1	Сорт	Алельний стан гена Rpg1
Паллідум 32	відсутні алелі	Романтик	-	Зоряний	відсутні алелі
Медікум 46	відсутні алелі	Тайфун	-	Південний	-
Одеський 9	_*	Одеський 115	-	Гетьман	відсутні алелі
Одеський 14	відсутні алелі	Итиль	відсутні алелі	Оболонь	відсутні алелі
Одеський 18	відсутні алелі	Прерія	відсутні алелі	Чудовий	відсутні алелі
Южний	-	Рось	відсутні алелі	Вакула	відсутні алелі
Степовий	-	Паллідум 107	-	Селеніт	відсутні алелі
Нутанс 106	відсутні алелі	Одеський 131	відсутні алелі	Чарівний	відсутні алелі
Одеський 36	-	Одеський 151	відсутні алелі	Казковий	-
Чорноморець	відсутні алелі	Гермес	відсутні алелі	Водограй	відсутні алелі
Нутанс 244	відсутні алелі	Престиж	відсутні алелі	Геліос	відсутні алелі
Славутич	відсутні алелі	Дерибас	відсутні алелі	Командор	відсутні алелі
Одеський 69	-	Переможний	-	Еней	відсутні алелі
Одеський 70	відсутні алелі	Гамбринус	-	Всесвіт	відсутні алелі
Одеський 82	відсутні алелі	Едем	відсутні алелі	Святогор	відсутні алелі
Нутанс 518	-	Сталкер	відсутні алелі	Воєвода	відсутні алелі
Дружба	-	Незалежний	відсутні алелі	Лука	відсутні алелі
Одеський 100	відсутні алелі	Адапт	відсутні алелі	Аватар	відсутні алелі
Вестник	відсутні алелі	Галатея	відсутні алелі	Галичанин	-
Одеський 111	відсутні алелі	Галактик	відсутні алелі	Мерлін	відсутні алелі

Примітка: * – позначено «чутливий» алель.

Тут мається на увазі, що тринуклеотидна інсерція, що відрізняє «чутливий» алель гена Rpg1 від «стійкого», може бути притаманна всім варіантам гена Rpg1, які не надають стійкості до високовірulentних рас стеблової іржі чи інших хвороб, але білковий продукт цього гена конститутивно використовується так чи інакше в сигнальних шляхах активації імунітету рослин. Більшість з наведених в таблиці сортів, для яких доведена наявність «чутливого» алеля, мають у своїх родоводах сорт Одеський 9 та сорт Одеський 115. Хоч джерело знайденого «чутливого» алеля в цих двох сортах невідоме, можна припустити, що батьківські форми ячменю, використані при виведенні цих двох сортів, могли взагалі не мати «стійкого» алеля гена Rpg1. Так поява стійкості в культурі, яка дала початок сорту Kindred, як наслідок випадкової мутації, є швидше виключенням, ніж правилом для культурних рослин. Адже мало ймовірно, що в природних популяціях злакових за умов постійного тиску патогену існує лише один варіант захисту від нього. Нині зрозуміло, що виявлення нових генів на зразок

Rpg1, який навряд чи є високо поліморфним за своєю природою, і який з певною мірою впевненості можна віднести до генів «горизонтальної» стійкості, поглибить розуміння механізмів імунного захисту рослин, і надасть можливість створювати сорти з довготривалою стійкістю до широкого кола хвороб.

Висновки

У результаті проведеного аналізу сортів ячменю української селекції на наявність та встановлення алельного стану гена Rpg1, який забезпечує стійкість до одного з найнебезпечніших для врожаю зернових збудників стеблової іржі – *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* – визначено, що жоден досліджений сорт не містить «стійкого» алеля цього гена, натомість 16 сортів містять «чутливий» алель. Аналіз їх родоводів вказує на спорідненість цих сортів за ідентифікованим «чутливим» алелем. Найбільш вірогідними сортами, від яких вони могли успадкувати «чутливий» алель гена Rpg1, є Одеський 9 та Одеський 115. Отримана інформація вказує на потребу залучення нових джерел стійкості до стеблової іржі при прове-

денні селекційної роботи з вітчизняними сортами ячменю, оскільки в разі загрози епіфітотій (у зв'язку з поступовою зміною клімату), може

постраждати значна частина врожаїв цієї широко культивованої в Україні рослини.

Література

1. Schumann G.L., Leonard K.J.. Stem rust of wheat (black rust) [Електронний ресурс] // The Plant Health Instructor. – 2000. – Режим доступу: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/StemRust.aspx>
2. Steffenson B.J. Analysis of durable resistance to stem rust in barley // *Euphytica*. – 1992. – 63. – P. 153–167.
3. Nirmala J., Brueggeman R., Maier C., Clay C., Rostoks N., Kannangara C.G., von Wettstein D., Steffenson B.J., Kleinhofs A. Subcellular localization and functions of the barley stem rust resistance receptor-like serine/threonine-specific protein kinase Rpg1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2006. – 103. – P. 7518–7523.
4. Stam M., Mol J.N.M., Kooter J.M. Review article: The silence of genes in transgenic plants. // *Ann. Bot.* – 1997. – 79. – P. 3–12.
5. Eckstein P., Rosnagel B., Scoles G. Allele-specific markers within the barley stem rust resistance gene (Rpg1) [Електронний ресурс] // *Barley Genetics Newsletter*. – 2003. – 33. – Режим доступу: <http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/bgn/33/PE1TXT.htm>
6. Brueggeman R., Rostoks N., Kudrna D., Kilian A., Han F., Chen J., Druka A., Steffenson B., Kleinhofs A. The barley stem rust-resistance gene Rpg1 is a novel disease-resistance gene with homology to receptor kinases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. – 99. – P. 9328–9333.

IVASCHUK B.V., PIRKO YA. V., BLUME YA.B.

Institute of Food Biotechnology and Genomics, Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskogo str., 2a, e-mail: yavp@mail.ru

IDENTIFICATION OF RPG1 GENE ALLELIC VARIATIONS IN THE UKRAINIAN BARLEY CULTIVARS

Aim. Because of providing a valuable resistance to the different pathotypes of stem rust just gene Rpg1 was selected for the molecular analysis. Determination of Rpg1 gene presence and its allelic condition in the Ukrainian barley cultivars were the objectives of this work. **Method.** Sixty spring *Hordeum vulgare* variety were chosen for the analysis. The PCR with specific primer were used to distinguish different allele of resistance. **Results.** Analysis of sixty Ukrainian barley cultivars defined that no one had the Rpg1 gene «resistant» allele. Also, «susceptible» allele was presented only in sixteen cultivars. The pedigree analysis indicates the kinship between the barley samples with the «susceptible» allele. Odesskaya 9 and Odesskaya 115 are the most reliable cultivars of all that could be the origins of «susceptible» allele. But there is no data that these cultivars were crossed with the foreign resistance sources. So it could be another variant of Rpg1 «susceptible» allele that is somehow involved in the signaling plant immunity pathway. **Conclusion.** Spring barley is a wide grown plant in Ukraine and the gradual global climate changes might be a cause of stem rust epidemic emergence in this country. It is necessary that new resistance cultivars of barley are produced in order to avoid future barley harvest loss.

Key words: barley, stem rust, Rpg1 gene, susceptible and resistant alleles.

УДК 575.17 + 575.174.015.3

КОЗУБ Н.О.^{1,2}, СОЗІНОВ І.О.¹, БІДНИК Г.Я.^{1,2}, ДЕМ'ЯНОВА Н.О.^{1,2}, СОЗІНОВ О.О.^{1,2}

¹ Інститут захисту рослин НААН,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 33, e-mail: sia1@i.com.ua

² ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України»,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а

РІЗНОМАНІТНІСТЬ ЗА ЛОКУСАМИ ЗАПАСНИХ БЛІКІВ ПОПУЛЯЦІЙ *AEGILOPS BIUNCIALIS* VIS. ЗАХІДНОГО УЗБЕРЕЖЖЯ КРИМУ

Дикі види є важливим джерелом для збагачення генофонду культурної пшениці за

генами стійкості до абіотичних та біотичних факторів та генами інших господарчо-важливих

ознак [1]. Тому актуальною є проблема збереження їх генетичного різноманіття *in situ* та *ex situ* [2]. Ці два підходи до збереження генетичних ресурсів взаємодоповнюють один одного, проте основою для розробки стратегії збереження генетичного ресурсу виду є оцінка генетичної різноманітності популяцій, дослідження їх генетичної структури. Одним з небагатьох диких родичів культурної пшениці, які ростуть на території України (в Криму) є тетраплоїдний вид *Aegilops biuncialis* Vis. Він має геномну формулу UUM^bM^b ($2n = 28$), геном *U* походить від виду *Ae. umbellulata*, модифікований геном M^b – споріднений з геномом *M* *Ae. comosa* [3]. *Ae. biuncialis* відноситься до найбільш поширених видів егілопсів, проте в Криму він зустрічається лише в південній частині [3, 4]

У наших попередніх дослідженнях [5–7] виявлено високий рівень поліморфізму за локусами запасних білків *Ae. biuncialis* – гліадинів та високомолекулярних субодиниць глютенінів та оцінено генетичне різноманіття деяких кримських популяцій за цими локусами. Ідентифікація множинних алелів дозволяє використовувати локуси запасних білків як зручні молекулярно-генетичні маркери для дослідження різноманіття та стану генетичних ресурсів природних популяцій цього виду. Відомо, що гліадини м'якої пшениці (*T. aestivum*) і її родичів контролюються основними локусами *Gli-1* і *Gli-2*, розмішеними на кінцях коротких плеч хромосом 1 і 6 гомеологічних груп; локуси, що кодують високомолекулярні (НМВ) субодиниці глютенінів (*Glu-1*), знаходяться на довгих плечах хромосом 1 гомеологічної групи [8].

Задачею даної роботи було вивчення генетичної різноманітності популяцій *Ae. biuncialis* Західного узбережжя Криму.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження слугували вибірки з природних популяцій *Ae. biuncialis* – між Берегове-Піщане Бахчисарайського р-ну (від 44°88,70' 33°61,13' до 44°90,21' 33°61,40') (далі Берегове), м. Севастополь (околиці заповідника Херсонес Таврійський, 44°61,22' 33°48,83'). З окремого колоса *Ae. biuncialis* для аналізу брали одну зернівку. Розмір проаналізованої вибірки з кожної популяції – 88 зернівок (колосів). Електрофорез високомолекулярних субодиниць глютенінів проводили за методикою Laemmli в 10 % розділюючому гелі [9], електрофорез гліадинів – за методикою [10]. Для кожної зернівки *Ae. biuncialis*

визначали генотип за локусами високомолекулярних субодиниць глютенінів *Glu-U1*, *Glu-M^b1*, та гліадинів *Gli-U1*, *Gli-M^b1*. Для позначення алелів цих локусів використовували складені нами каталоги [5, 6]. Зірочкою відмічено алелі, які не було виявлено раніше (тимчасові позначення алелів). Для оцінки популяційно-генетичних параметрів використовували програму POPGENE v. 1.31 [11].

Результати і обговорення

Частоти алелів за локусами *Gli-U1*, *Gli-M^b1*, *Glu-U1*, *Glu-M^b1* у популяціях *Ae. biuncialis* з Берегового та Севастополя наведено в табл. 1, а показники генної різноманітності – в табл. 2.

Обидві досліджені популяції характеризуються подібними показниками генного різноманіття за дослідженими маркерними локусами. У популяції Берегового середнє число алелів на локус дорівнює 8, у популяції Севастополя – 7 (табл. 2). В обох популяціях найбільше число алелів виявлено за локусом *Gli-U1* (10 і 11, відповідно), середнє ефективне число алелів дорівнює 3, а середній показник генного різноманіття за *He* є достатньо високим – 0,66 (табл. 2). Найбільше генне різноманіття спостерігається за локусом *Gli-U1* в популяції Берегового (0,823) та за локусом *Glu-U1* у популяції Севастополя (0,75). Слід відмітити, що подібні високі показники різноманіття спостерігаються як у вибірці з популяції, що займає відносно велику площу (вздовж узбережжя Берегове-Піщане), так і у вибірці, зібраної зі значно меншої площі ізольованої популяції на околицях заповідника Херсонес Таврійський. Різноманітність алелів за локусом *Glu-U1*, виявлена в невеликій популяції *Ae. biuncialis* Севастополя (6 алелів), близька до різноманітності алелів за локусом *Glu-U1*, визначеної у колекції 39 зразків *Ae. umbellulata* різного походження (8 алелів серед зразків з Турції, Ірану, Іраку, Азербайджану) [12].

При подібності за показниками різноманіття популяції значно відрізняються за складом та частотами алелів досліджених локусів запасних білків (табл. 1). За локусом *Gli-U1* обидві популяції мають 7 спільних алелів, проте в популяції Берегового переважаючими є алелі *f*, *i*, *e*, тоді як у популяції Севастополя найбільшу частоту має алель *a*. За локусом *Gli-M^b1* в обох популяціях однаковими є лише два алелі, з них один (*g*) є переважаючим алелем (0,40 і 0,52, відповідно, у двох популяціях), крім нього високі частоти мають алель *c* у популяції в Берегового (0,51) та алель *a* (0,24) у популяції Севастополя. За локусом *Glu-U1* спільними для

обох популяцій є 5 алелів, проте популяції відрізняються за складом домінуючих алелів. У популяції Севастополя найбільшу частоту має алель *b*, якого не виявлено в популяції Берегового, де переважаючими є три алелі: *c* (0,49), *d* (0,20), *e* (0,27). За локусом *Glu-M^b1*

спільними є 4 алелі. Популяції відрізняються за переважаючими алелями цього локусу: у вибірці Берегове-Піщане переважає алель *m* (63%), тоді як у популяції з Севастополя найбільші частоти мають алелі *a* і *g*.

Таблиця 1. Частоти алелів за локусами запасних білків у вибірках з популяцій *Ae. biuncialis* з Берегового і Севастополя (розмір кожної вибірки N = 88)

Локус, алель	Частота		Локус, алель	Частота	
	Берегове	Севастополь		Берегове	Севастополь
<i>Gli-UI</i>			<i>Glu-UI</i>		
<i>a</i>	0,057	0,636	<i>a</i>	0,034	0,068
<i>c</i>	0,068		<i>b</i>		0,420
<i>d</i>	0,011	0,011	<i>c</i>	0,443	0,159
<i>e</i>	0,193	0,011	<i>d</i>	0,205	0,091
<i>f</i>	0,261	0,023	<i>e</i>	0,273	0,114
<i>h</i>	0,023	0,091	<i>g</i>	0,034	0,148
<i>i</i>	0,205	0,091	<i>j</i> *	0,011	
<i>j</i>	0,148	0,091	<i>Glu-MI</i>		
<i>l</i>		0,011	<i>a</i>	0,034	0,489
<i>n</i>		0,011	<i>b</i>	0,125	0,193
<i>o</i>		0,011	<i>c</i>		0,034
<i>bc</i> *		0,011	<i>e</i>	0,011	
<i>p</i> *	0,023		<i>f</i>		0,011
<i>t</i> *	0,011		<i>g</i>	0,011	0,216
<i>Gli-MI</i>			<i>m</i>	0,636	0,057
<i>a</i>		0,239	<i>n</i>	0,023	
<i>c</i>	0,511	0,08	<i>o</i> *	0,125	
<i>d</i>	0,023		<i>p</i> *	0,023	
<i>e</i>	0,023		<i>null</i> *	0,011	
<i>f</i>	0,011				
<i>g</i>	0,398	0,523			
<i>i</i>		0,011			
<i>k</i>		0,148			
<i>l</i>	0,023				
<i>a-null</i> *	0,011				

Таблиця 2. Показники генної різноманітності у популяціях *Ae. biuncialis* з Берегового (Б) і Севастополя (С) (розмір вибірки N = 88)

Локус	<i>n_a</i> *		<i>n_e</i> *		<i>H</i> *	
	Б	С	Б	С	Б	С
<i>Gli-UI</i>	10	11	5,604	2,320	0,823	0,569
<i>Gli-M^b1</i>	7	5	2,373	2,790	0,578	0,642
<i>Glu-UI</i>	6	6	3,174	4,004	0,684	0,750
<i>Glu-M^b1</i>	9	6	2,279	3,056	0,561	0,672
Середнє	8	7	3,357	3,042	0,662	0,658

Примітка: **n_a* – фактичне число алелів, *n_e* – ефективне число алелів, *H* – генне різноманіття за Nei.

У даних популяціях виявлено ряд рідкісних алелів, що не зустрічались раніше при аналізі кримських зразків. Це p^* , t^* за *Gli-UI*, a - $null^*$ (у якого відсутній мажорний гама-компонент) за *Gli-M^b1*, j^* ($u3+u8$) за *Glu-UI*, o^* , p^* ($m9+m8$), $null^*$ (нуль-алель) за локусом *Glu-M^b1* у популяції з Берегового і *Gli-UIbc^{*}* в популяції з Севастополя. Білкові компоненти, кодовані деякими з цих нових алелів, показано на рисунку.

Генетична ідентичність даних популяцій за N_e дорівнює (0,40), генетична відстань – 0,924, що свідчить про значні відмінності між даними популяціями за проаналізованими маркерними локусами.

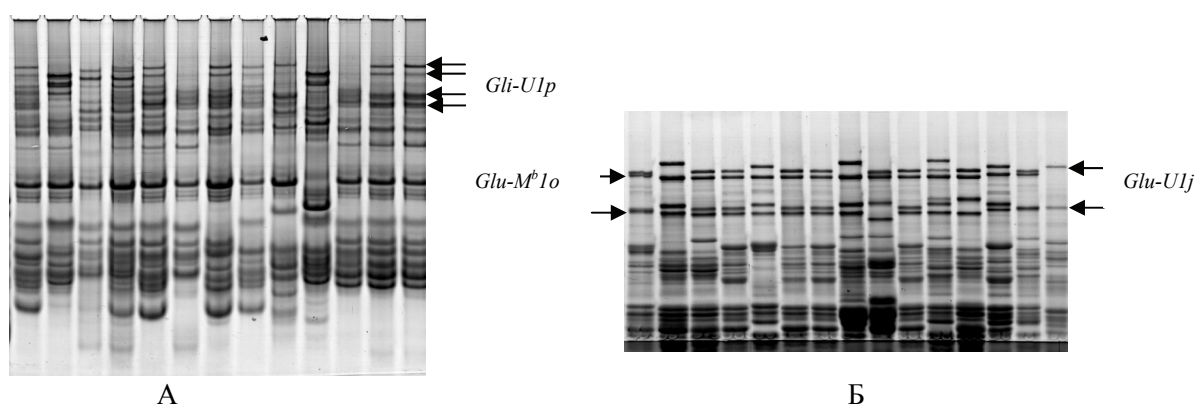


Рис. Фрагмент електрофореграми гліадинів (А) і SDS-електрофореграми (Б) окремих зернівок зразків з популяції *Ae. biuncialis* з Берегового. Стрілками позначені компоненти, кодовані певними алелями

Література

- Schneider A., Molnar I., Molnar-Lang M. Utilisation of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat // *Euphytica*. – 2008. – 163. – P. 1–19.
- Nevo E. Genetic diversity in wild cereals: regional and local studies and their bearing on conservation *ex situ* and *in situ* // *Genet. Resources Crop Evol.* – 1998. – 45. – P. 355–370.
- Богуславский Р.Л., Голик О.В. Род *Aegilops* L. как генетический ресурс селекции. – Харьков, 2004. – 236 с.
- Van Slageren M.W. Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. et Spach.) Eig (*Poaceae*) // Wageningen Agricultural University Papers.– Wageningen, The Netherlands, 1994. – N 94–7. – 512 p.
- Козуб Н.А., Созинов И.А., Ксиниас И.Н., Созинов А.А. Разнообразие аллелей локусов высокомолекулярных субъединиц глютеинов *Aegilops biuncialis* Vis. // *Генетика*. – 2011. – 47, № 9. – С. 1216–1222.
- Козуб Н.А., Созинов И.А., Созинов А.А. Идентификация аллелей гліадинових локусов *Gli-UI* и *Gli-M^b1* *Aegilops biuncialis* Vis. // *Генетика*. – 2012. – 48, № 4. – С. 473–479.
- Козуб Н.А., Созинов И.А., Созинов А.А. Разнообразие крымских популяций дикого сородича пшеницы *Aegilops biuncialis* Vis. по локусам запасных белков // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. – К.: Логос, 2012. – 3. – С. 455–459.
- Payne P.I. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality // *Ann. Rev. Plant Physiol.* – 1987. – 38. – P. 141–153.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – 227, N 5259. – P. 680–685.
- Kozub N.A., Sozinov I.A., Sobko T.A., Kolyuchii V.T., Kuptsov S.V., Sozinov A.A. Variation at storage protein loci in winter common wheat cultivars of the Central Forest-Steppe of Ukraine // *Цитология и генетика*. – 2009. – 43, № 1. – С. 69–77.

Висновки

Отже, в результаті даного дослідження охарактеризовано генетичну різноманітність двох популяцій західного узбережжя Криму – Берегове-Піщане та ізолювана популяція на околицях заповідника Херсонес Таврійський (Севастополь). Дані популяції характеризуються високим генним різноманіттям за локусами запасних білків та значно відрізняються за частотами алелів за дослідженими маркерними локусами. Отримані результати можуть бути використані для моніторингу стану різноманіття популяцій *Ae. biuncialis* Південно-Західного Криму.

11. Yeh F.C., Boyle T.J.B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits // *Belgian J. of Botany*. – 1997. – 129. – P. 157.
12. Rodriguez-Quijano M., Nieto-Taladriz M.T., Carrillo J.M. Polymorphism of high molecular weight glutenin subunits in three species of *Aegilops* // *Genet. Resources Crop Evol.* – 2001. – 48. – P. 599–607.

KOZUB N.A.^{1,2}, **SOZINOV I.A.**¹, **BIDNYK H.Ya.**^{1,2}, **DEMIANOVA N.A.**^{1,2}, **SOZINOV A.A.**^{1,2}

¹ *Institute of Plant Protection, NAAS,*

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 33, e-mail: sial@i.com.ua

² *State Institution "Institute of Food Biotechnology and Genomics, NAS of Ukraine",*

Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskogo str., 2a

GENETIC DIVERSITY AT STORAGE PROTEIN LOCI IN *AEGILOPS BIUNCIALIS* VIS. IN POPULATIONS FROM THE WESTERN COAST CRIMEA

Aims. The objective of the investigation was analysis of genetic diversity of *Ae. biuncialis* populations from the Western coast Crimea. **Methods.** Samples from natural populations of Beregove (Bakhchisarai region) and Sevastopol were analyzed. SDS electrophoresis of high-molecular-weight glutenin subunits and APAG electrophoresis of gliadins were used to identify alleles at the *Gli-U1*, *Gli-M^b1*, *Glu-U1*, *Glu-M^b1* loci.

Results. Frequencies of alleles at the storage protein loci in two populations of *Ae. biuncialis* and genic variation statistics were determined. The populations were characterized with respect to predominant alleles.

Conclusions. The *Ae. biuncialis* populations from the Western coast Crimea show similarly high values of genic diversity at the storage protein loci but significantly differ in the predominant alleles and their frequency. These data can be used for the monitoring of the state of diversity of *Ae. biuncialis* populations of the Western coast Crimea.

Key words: *Aegilops biuncialis*, diversity, storage proteins, alleles.

УДК 633.179(477.4):631.529.003.13

КУЛИК М.І., ЮРЧЕНКО С.О.

Полтавська державна аграрна академія Міністерства аграрної політики та продовольства України,

Україна, 36003, м. Полтава, вул. Сковороди, 1/3, e-mail: maksimkylik@mail.ru

ФОРМУВАННЯ ПРОДУКТИВНОСТІ ІНТРОДУКОВАНОГО В ЦЕНТРАЛЬНІЙ ЧАСТИНІ УКРАЇНИ *PANICUM VIRGATUM* L. (ПРОСА ЛОЗОПОДІБНОГО)

Інтродукція була і залишається дієвим способом виявлення найбільш адаптованих та продуктивних рослин, які у процесі акліматизації мають різні пристосувальні реакції, адаптація яких пов'язана з певною перебудовою фенотипу завдяки тому, що генотип містить деякий надлишок спадкової інформації [1].

Не винятком є і енергетичні рослини, фітомасу яких використовують для виготовлення біопалива – одного із альтернативних видів поновлюваної енергії.

В якості сировини для біопалива передбачається використовувати багаторічні культури, які б були добре адаптовані до певних умов культивування та спрощену технологію вирощування. І це має забезпечити в тих чи інших умовах найбільшу продуктивність та вихід корисної продукції (сухої фітомаси

рослин). Для вирішення цієї проблеми практичний інтерес представляють такі культури: сорго багаторічне, міскантус (слонова трава), верба, світчграс (просо лозоподібне). Із вище перерахованих фітоенергетичних культур, просо лозоподібне є однією з культур у якої низька собівартість вирощування та висока продуктивність [2, 3].

Panicum virgatum L. (просо лозоподібне) цінується в першу чергу як сировина для виробництва альтернативних видів енергії – твердого біопалива [4], а також має технічні якості стебел, та використовується як декоративний злак [5].

На даний час просо лозоподібне вже інтродукується в Україні: вивчаються його ботаніко-біологічні особливості [6], розробляються елементи технології вирощування цієї культури [8–10] та етапи виготовлення

біопалива із фітомаси рослин [11].

Провівши багаторічні дослідження, зарубіжні вчені встановили, що врожайність фітомаси світчграсу змінюється в межах від 6 т сухої речовини на ґрунтах з низькою родючістю до 25 т на ґрунтах з високою родючістю. За умови відповідного догляду урожай можна збирати протягом 15 років [12].

У той же час, в центральній частині Лісостепу України встановлено, що світчграс другого року вегетації формує наступну врожайність: сорт Форесбург – 6,22 т/га, сорт Кейв-ін-рок – 5,60 т/га, а Картадж – 5,23 т/га [13]. Інші вчені [14] визначили: сорти Кейв-ін-рок та Санбурст на другий рік вегетації формують врожайність, відповідно, 11,5 та 8,7 т/га сухої біомаси.

На основі комплексної оцінки визначено, що за інтродукції сорти світчграсу: Кейв-ін-рок, Форестбург, Санбурст, Шелтер, Аламо, Канлоу є придатні для поширення в природно-кліматичних умовах Лісостепу України. Продуктивність біомаси залежить від сортового складу. Найбільша врожайність 17,9 т/га була у сорту Кейв-ін-рок [15].

Отже, неоднозначні дані та невивчені аспекти особливостей формування продуктивності світчграсу в умовах України викликають необхідність дослідити це питання й встановити рівень врожайності фітомаси та насінневої продуктивності даної культури залежно від елементів структури врожаю, та у зв'язку з інтродукцією.

Матеріали і методи

Робота по даній тематиці виконана згідно міжнародного наукового проекту «Pellets for power» на базі Полтавської державної аграрної академії. Протягом трьох років (2010–2013 рр.) було проведено експеримент, що включав дослідження п'яти сортів світчграсу: Аламо, Канлоу, Кейв-ін-рок, Картадж та Форесбург. В даному повідомленні вміщені результати досліджень по трьох сортах: Cave-in-roch (надалі: Кейв-ін-рок, скорочено – КІР), Carthage (Картадж), та Forestburg (Форесбург) – у зв'язку з низькою стійкістю до біотичних факторів та тривали періодом вегетації сортів Аламо і Канлоу, які загинули після першого вегетаційного року.

Досліди закладено на малопродуктивних ґрунтах, що мали наступні агрохімічні показники: вміст гумусу – 2,07%; азоту – 44,8; фосфору – 65,0 і калію 113,0 мг на 1 кг ґрунту.

Методика закладання і проведення експерименту – загальноприйнята [16] та згідно

рекомендацій зарубіжних вчених [17]. Розміщення варіантів у дослідах рендомізоване; повторність – чотириразова. Площа облікової ділянки – 10 м².

Агротехніка в дослідах поєднувала: в перший рік вегетації – дискування поля де росло різнотрав'я та проведення двох культиваций (осінню та весняну), сівбу й коткування ґрунту, прополювання міжрядь у міру забур'яненості; на другий рік – два міжрядних обробітки та скошування рослин на час закінчення вегетації.

Фенологічні спостереження під час росту й розвитку рослин та облік кількісних показників здійснювали за «Методикою державного сорто випробування сільськогосподарських культур» [18]. Облік елементів структури врожаю світчграсу: висоту рослин і кількість стебел на 1 м², визначення врожайності фітомаси та насінневої продуктивності культури проводили на час закінчення вегетації рослин.

Результати та обговорення

За погодними умовами в період вегетації проса лозоподібного (травень-жовтень, листопад) виокремилися останні два роки, що характеризувалися підвищеним температурним режимом за одночасного зниження кількості опадів, що вказує на посушливі умови другого та третього року вегетації культури, відповідно у 2012 і 2013 роках.

Досліджувані сорти світчграсу мають різну плоідність, походження та поділяються на два екотипи: низинні та височинні [19, 20]. Низинні види характеризувалися високими, товстими та грубими стеблами із низьким коефіцієнтом кушіння та мають подовжений період вегетації. Височинний тип рослин має тонші стебла, ніж низовинні, але значно більшу їх кількість на одиницю площі, за тривалістю вегетаційного періоду відносимо їх до ранніх, середніх та пізньостиглих форм (табл. 1).

Результати вирощування проса лозоподібного в Європі [21] засвідчують, що його можна культивувати і в умовах України так як географічна широта збігається з ареалом походження рослин. Згідно з дослідженнями L.E. Moser і K.P. Vogel [22], сорти, що походять із Південної Америки, найкраще пристосовані до умов південних територій Європи, проте вони також продуктивні і в північній Європі, але холодостійкість їх менша, в порівнянні з сортами північного походження. Це знайшло підтвердження і в наших дослідженнях коли сорти Аламо і Канлоу не перезимували після першого року вегетації.

За визначення елементів структури врожаю (біометричних показників) встановлено їх значне варіювання залежно від сортових властивостей та умов року вегетації (табл. 2).

У перший рік, на час закінчення вегетації рослин, зафіксовано значні відмінності за біометричними показниками досліджуваних сортів: відмічено незначне варіювання висоти – від 42,0 до 56,8 см та суттєві відхилення за густотою стеблостою – від 9,1 до 14,0 шт./м². На другий рік найбільша висота рослин була у сорту Картадж, а кількість стебел – у сортів Форесбург та КІР. Густота та висота стеблостою рослин третього вегетаційного періоду була найбільшою у сорту КІР, суттєво меншими ці показники були у сорту Картадж і найнижчі – у сорту Форесбург.

Елементи структури врожаю певним чином мали вплив на загальну врожайність фітомаси рослин проса лозоподібного (табл. 3).

З-поміж досліджуваних сортів світчграсу другого року вегетації найбільшу врожайність

формував сорт Картадж – 14,3 т/га, суттєво менше – КІР (13,0 т/га), а найнижча врожайність зафіксована у сорту Форесбург (11,0 т/га).

Статистично доказова врожайність сортів світчграсу була в умовах 2013 року і варіювала від 13,5 до 18,0 т/га. Сорт Картадж третього року вегетації формував найбільшу врожайність фітомаси – прибавка до попереднього року становила 3,7 т/га, сорт Кейв-ін-рок забезпечив суттєво нижчу продуктивність, але прибавка врожаю була значною – 3,6 т/га. Найнижча врожайність і прибавка врожаю була у сорту Форесбург, відповідно 13,5 та 2,5 т/га. Що передусім пов'язано із тривалістю вегетаційного періоду, за якого рослини закладають стеблостій та відповідну врожайність фітомаси.

Формування насінневої продуктивності рослин свідчить про здатність до подальшого генеративного розмноження, акліматизацію генотипу до певних умов вирощування, що відрізняються від ареалу походження проса лозоподібного (табл. 4).

Таблиця 1. Характеристика екотипів сортів проса лозоподібного

Сорт (українська і англійська назва)	Екотип	Плоідність	Походження	Веgetаційний період, діб	Строк дозрівання
Форесбург (Forestburg)	**	тетраплоїд	Південна Дакота	162-173	ранній
Кейв-ін-рок (Cave-in-rock)	**	октаплоїд	Південний Іллінойс	174-180	середньо-пізній
Картадж (Carthage)	**	октаплоїд	Північна Кароліна	181-190	пізній
Аламо (Alamo)	*	тетраплоїд	Південний Техас	понад 190	дуже пізній
Канлоу (Kanlow)	*	тетраплоїд	Оклахома	понад 190	дуже пізній

Примітка: ** – височинний, * – низинний екотип.

Таблиця 2. Біометричні показники рослин проса лозоподібного, 2012–2013 рр.

Рік (фактор А)	Фактор		Висота рослин, см	Кількість стебел, шт./м ²
	Сорт (фактор В)			
2011	Кейв-ін-рок		56,8	14,0
	Картадж		42,0	9,1
	Форесбург		43,1	12,5
2012	Кейв-ін-рок		90,2	426,2
	Картадж		115,0	359,8
	Форесбург		110,1	430,0
2013	Кейв-ін-рок		174,9	705,0
	Картадж		170,3	570,4
	Форесбург		160,0	560,2
HP ₀₅ фактор А			15,4	45,4
HP ₀₅ фактор В			1,7	3,5

Таблиця 3. Урожайність сухої фітомаси проса лозоподібного, 2012–2013 рр.

Фактор		Продуктивність, кг/м ²	Урожайність сухої фітомаси, т/га	Прибавка врожаю до попереднього року, т/га
Рік (фактор А)	Сорт (фактор В)			
2012	Кейв-ін-рок	1,3	13,0	-
	Картадж	1,4	14,3	-
	Форесбург	1,1	11,0	-
2013	Кейв-ін-рок	1,7	16,6	3,6
	Картадж	1,8	18,0	3,7
	Форесбург	1,4	13,5	2,5
НІР ₀₅ фактор А		0,03	0,32	-
НІР ₀₅ фактор В		0,02	1,7	-

Таблиця 4. Насіннева продуктивність проса лозоподібного (кг/м²), 2012–2013 рр.

Сорт	Роки		В середньому за роки
	2012	2013	
Кейв-ін-рок	0,036	0,038	0,037
Картадж	0,045	0,083	0,064
Форесбург	0,013	0,031	0,022
НІР ₀₅	0,008	0,005	0,012

У сортів, поставлених на вивчення, насіннева продуктивність за роками вегетації збільшувалась і на третій рік виявилась найвищою у пізньостиглого сорту Картадж, а найнижча – у ранньостиглого сорту Форесбург, середнє значення за даним показником мав сорт КІР. Що свідчить про те, що поряд із сортовими властивостями і погодними умовами тривалість вегетаційного періоду також має вплив на урожай насіння.

Висновки

1. За терміном дозрівання досліджувані сорти проса лозоподібного відносимо до ранніх, середньостиглих та пізньостиглих. Це певним чином відображається на біометричних показниках рослин (висота та кількість стебел на одиницю площі): найвищими вони виявились у сортів середньо- та пізньостиглих сортів (Кейв-ін-рок та Картадж), що характеризувалися подовженим періодом вегетації, порівняно із

ранньостиглим сортом Форесбург.

2. На другий і третій вегетаційний рік найбільшу продуктивність рослин та урожайність сухої фітомаси формували сорти Картадж, суттєво менше, але на високому рівні – Кейв-ін-рок і найнижчим цей показник був у сорту Форесбург.

3. З-поміж досліджуваних сортів проса лозоподібного насіннева продуктивність за роки досліджень виявилась найвищою у сорту Картадж, найнижча – у сорту Форесбург, проміжне значення мав сорт Кейв-ін-рок.

Отже, просо лозоподібне є перспективною фітоенергетичною культурою, яка під час інтродукування в умовах центральної частини України на малопродуктивних ґрунтах забезпечила потужний стеблостій на другий-третій рік вегетації, формувала стабільну врожайність фітомаси (сировини для виробництва біопалива) та насінневу продуктивність.

Література

1. Гродзінський А.М. До системи уявлень про інтродукцію та акліматизацію рослин // Інтродукція та акліматизація рослин на Україні. – К., 1978. – Вип. 12. – С. 3–7.
2. Гументик М.Я. Перспективи вирощування багаторічних злакових культур для виробництва біопалива // Цукрові буряки. – 2010. – № 4. – С. 21–22.
3. Роїк М.В., Курило В.Л., Гументик М.Я. Енергетичні культури для виробництва біопалива // Наукові праці Полтавської державної аграрної академії. «Енергозбереження та альтернативні джерела енергії: проблеми і шляхи їх вирішення». – Полтава: РВВ ПДАА, 2010. – 7 (26). – С. 12–17.
4. Sanderson M.A., Reed R.L., McLaughlin S.B., et al. Switchgrass as a sustainable bioenergy crop // Bioresource Technology, 1994. – N 56. – P. 83–93.
5. Porter C.L. An analysis of variation between upland and lowland switchgrass, *Panicum virgatum* L., in central Oklahoma // Ecology, 1996. – N 47. – P. 980–992.
6. Кулик М.І. Ботанічні особливості та характеристика екотипів проса лозовидного // Матеріали восьмої

міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Простір і час сучасної науки», 18–19 квітня 2012 р. – Київ, 2012. – С. 6–7.

7. Гументик М.Я., Каськів М.Я., Мандровська С.М. Вдосконалення елементів технології вирощування проса лозоподібного в умовах західного Лісотепу України // Матеріали міжнародної науково-практичної конференція «Біоенергетика: вирощування енергетичних культур, виробництво та використання біопалива», 25–26 жовтня 2011 р. – Київ: Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків, 2011 – С. 139–140.
8. Кулик М.І. Вплив умов вирощування на врожайність фітомаси світчграсу (*Panicum virgatum* L.) другого року вегетації // Вісник Полтавської державної аграрної академії. – № 2, 2013. – С. 30–35.
9. Курило В.Л., Гументик М.Я., Гончарук Г.С. Смірних В.М., Горобець А.М., Каськів В.В., Максименко О.В., Мандровська С.М. Методичні рекомендації з проведення основного та передпосівного обробітку ґрунту і сівби проса лозовидного. – К.: Інститут біоенергетичних культур і біопалива НААН, 2012. – 26 с.
10. Писаренко П.В., Кулик М.І., Elbersen W. та ін. Методичні рекомендації по технології вирощування енергетичних культур (світчграсу) в умовах України. – Полтава: Полтавська ДАА, 2011. – 40 с.
11. Крайсвітній П.А., Рій О.В., Кулик М.І. Світчграс як енергоємна сировина для виробництва біопалива // Збірник наукових праць Вінницького національного аграрного університету. Серія: Сільськогосподарські науки. – Вінниця, 2012. – Вип. 1 (57). – С. 41–47.
12. Lee D.K., Voe A. Biomass Production of Switchgrass in Central South Dakota // Crop Sci. – 2005. – N 45. – P. 2583–2590.
13. Кулик М.І. Вплив умов вирощування на врожайність фітомаси світчграсу (*Panicum virgatum* L.) другого року вегетації // Вісник Полтавської державної аграрної академії. – 2013. – № 2. – С. 30–35.
14. Мороз О.В., Смірних В.М., Курило В.М. та ін. Світчграс як нова фітоенергетична культура // Цукрові буряки. – Київ, 2011. – № 3 (81). – С. 12–14.
15. Мандровська С.М. Світчграс (*Panicum virgatum* L.) – перспективний інтродуцент для виробництва біопалива в Лісотепу України // Наукові праці Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків: зб. наук. праць. – К.: ФОП Корзун Д.Ю., 2013. – Вип. 19. – С. 82–84.
16. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта / Борис Александрович Доспехов. – М.: Колос, 1985. – 336 с.
17. Elbersen Wolter. Draft Protocols for Ukraine Switchgrass experiments // Food and Biobased. Wageningen. UR. – 5 p.
18. Методика Государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур: Фенологические наблюдения за растениями зерновых, крупяных и зернобобовых культур / под ред. М.А. Федина. – М.: Агропромиздат, 1988. – 121 с.
19. Wullschlegel S.D., Sanderson M.A., McLaughlin S.B., Biradar D.P., Rayburn A.L. Photosynthetic rates and ploidy levels among populations of switchgrass // Crop Sci, 1996. – N 36. – P. 306–312.
20. Richards Mary S., Landers R.Q. Responses of species in Kalsow Prairie, Iowa, to an April fire // Proceedings Iowa Academy of Science. – 1973. – N 80. – P. 159–161.
21. Wolter Elbersen Switchgrass for biomass: Bibliography and management practices Draft document FAIR 5-CT97-3701: Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) as an alternative energy crop in Europe. Initiation of a productivity network. ATO-DLO, Wageningen. – 1998. – 22 p.
22. Moser L.E., Vogel K.P. Switchgrass, Big Bluestem, and Indiangrass. In: An introduction to grassland agriculture // Iowa University Press, 1995. – P. 409–420.

KULYK M.I., YURCHENKO S.O.

Poltava State Agrarian Academy of the Ministry Agrarian Policy and Food of Ukraine, Ukraine, 36003, Poltava, Skovorody str., 1/3, e-mail: maksimkylik@mail.ru

FORMATION OF PRODUCTIVITY INTRODUCED IN CENTRAL UKRAINE *PANICUM VIRGATUM* L. (SWITCHGRASS)

Aims. To use plant phytomass for biofuels production peculiarities formation phytomass yield and productivity of seeds a new, exotic culture – switchgrass. **Methods.** Research Methods in the field experiments – conventional and special: quantitative indicators of plant. **Results.** The results of the three-year research: the duration of the growing season, forming the elements of the vegetative and generative performance culture *Panicum virgatum* L. when grown sorts of American origin introduced in the central steppes of Ukraine. **Conclusions.** Is established elements of the structure part (height and number of plants per unit area), dry phytomass yield and seed production the switchgrass. Stated that switchgrass well acclimatized to growing conditions in central Ukraine and can be used as feedstock for biofuel production plant origin.

Key words: introduction, phytomass structure, raw materials, productivity, switchgrass *Panicum virgatum* L.

ОТБОР И ОЦЕНКА НЕКОТОРЫХ ГИБРИДНЫХ ФОРМ ХЛОПЧАТНИКА НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ВИЛТУ

Из возделываемых технических культур к группе прядильных придается очень важное значение. Они являются источником получения натурального растительного волокна, которые используются для выработки различных текстильных тканей и многих других изделий.

Генетически виды хлопчатника делятся на две группы, различающиеся числом хромосом в клетке: диплоидную и тетраплоидную. Диплоидны ($2n = 26$) два культурных вида – хлопчатник индокитайский, или древовидный (*Gossypium arboreum* L.) и хлопчатник травянистый, или гуза (*Gossypium herbaceum* L.). Еще два вида, имеющие гораздо большее экономическое значение – хлопчатник перуанский, или барбадосский (*G. barbadense* L.) и хлопчатник мексиканский, обыкновенный, или упланд (*G. hirsutum* L.) – тетраплоидны, то есть у них четыре набора хромосом ($4n = 52$) [1].

Повышение урожайности и увеличение валовых сборов прядильных культур основывается на внедрении в производство новых, более урожайных сортов. Но для получения высоких и устойчивых урожаев хлопчатника немало трудностей. Одна из них поражение растений вредителями и болезнями. Наиболее распространенными болезнями хлопчатника являются корневая гниль, гоммоз, вилт, антракноз и другие. Самой вредоносной болезнью хлопчатника является вилт или увядание *V. dahliae*. В зависимости от характера проявления болезни и ее возбудителя увядание хлопчатника делят на вертициллезное и фузариозное [2].

Вертициллезное увядание распространено почти во всех хлопкосеющих районах, но чаще обнаруживается на посевах средневолкнистого хлопчатника. Вертициллезное увядание вызывается грибом *Verticillium dahliae* Klebahn, который относится к несовершенным грибам. Это почвенный организм – полифаг с несложным циклом развития, который поражает около 700 видов растений, относящихся к различным семействам. В почве грибок развивается на мертвых остатках растений. На его бесцветной, многократно разветвленной грибнице образуется конидиальное спороноше-

ние и микросклероции. В полевых условиях болезнь обычно проявляется в фазе бутонизации или в начале цветения сначала на нижних, а позже на верхних листьях в виде округлых или угловатых, светло-зеленых, а затем желтых пятен. Располагаются они по краям листа и между жилками, а нередко сливаются и охватывают всю листовую пластинку. Нормальная зеленая окраска листа сохраняется только в виде небольших узких полосок вдоль жилок. Пораженная ткань буреет, листья засыхают и постепенно опадают. Нередко при длительном течении болезни наблюдается полное оголение растений. Коробочек на таких растениях формируется немного, к тому же они преждевременно подсыхают и раскрываются. Иногда на растении вместо опавших листьев из спящих почек появляются новые, очень мелкие листья, что приводит к еще большему истощению растений и ослаблению плодообразования.

В некоторых случаях растениям удается оправиться от заболевания, и тогда куст хлопчатника внешне выглядит нормальным. Однако при тщательном осмотре его можно заметить укороченные междоузлия, что свидетельствует об угнетающем действии болезни на растение. При заболевании хлопчатника вилтом на поперечных или косых срезах стебля в центре или на периферии обнаруживаются побуревшие участки [3, 4].

Материалы и методы

В данной работе на искусственно-зараженном инфекционном фоне Абшеронской научно-экспериментальной базы Института Генетических Ресурсов НАН Азербайджана, проводилась, сравнительная фитопатологическая оценка устойчивости внутри- (*G. hirsutum* x *G. hirsutum*) и межвидовых (*G. hirsutum* x *G. barbadense*) гибридов хлопчатника к вертициллезному вилту. Фитопатологическая оценка устойчивости к болезни проводилась по установленной Ф.М. Войтеноком методике, то есть пятибальной шкале [5].

Иммунные – 0

1. Высокоустойчивые – (1–5%)

2. Устойчивые – (6–10%)

3. Толерантные – (11–25%)
4. Восприимчивые – (26–50%)
5. Сильновосприимчивые – (51–100%)

Результаты и обсуждение

В таблице представлены данные сравнительной фитопатологической оценки поражаемости вилтом внутри- и межвидовых гибридов хлопчатника вида *G. hirsutum* и *G. barbadense*. Как видно, из представленной таблицы, процент больных растений у внутривидовой гибридной формы 153-F x AP-200 составил соответственно по каждой повторности 66,7 и 42,9 %. У гибридной формы AP-200 x S-5497 процент больных растений был равен соответственно 40,0 и 50,0 %. У внутривидового гибрида S-2607 x KK-1543 эти цифры составили по каждой повторности 50,0 и 57,1 %. И наконец, гибрид Antep x 159-F процент больных растений равнялся 50,0 и 85,7 % соответственно.

Процент пораженных вертициллезным вилтом растений был определен и по межвидовым гибридам. Как видно из таблицы у гибридной формы S-5497 x 6465 эти данные по каждой повторности были одинаковы и составили 33,3 %. У гибрида Todlo-16 x Acala-1517 процент пораженных растений по каждой повторности равнялся соответственно 25,0 и 33,3 %. У гибридной формы Pima-S-4 x 18819 процент больных растений был 12,5 и 16,7 %. И наконец, у межвидового гибрида Senare x Indiya-295 процент пораженных вилтом растений составил соответственно 50,0 и 37,5 %.

Поражаемость вертициллезным вилтом стандартного сорта хлопчатника AP-317,

относящегося к виду *G. hirsutum* составил 57,1 %, а стандартного сорта Ashgabad-25, относящегося к виду *G. barbadense* был равен 33,3 %. Сравнивая эти показатели можно сделать вывод, что межвидовые гибриды более устойчивы к вертициллезному вилту, чем внутривидовые.

Это объясняется тем, что вид хлопчатника *G. barbadense*, который участвует в межвидовой гибридизации, в отличие от вида *G. hirsutum*, является более устойчивым к вертициллезному вилту. И поэтому, гибриды, полученные от межвидовой гибридизации имеют более высокие показатели устойчивости к вилту, чем гибриды полученные от внутривидовой. Сорта средневолокнистого хлопчатника (*G. hirsutum*) поражаются преимущественно вертициллезным вилтом, а тонковолокнистого (*G. barbadense*) – фузариозным. Процент поражаемости средневолокнистого хлопчатника вертициллезным вилтом может превышать 50 %, а тонковолокнистый хлопчатник хотя и поражается вертициллезным вилтом, но проявляет известную толерантность к *V. dahliae* Klebahn, поэтому потери его урожая от болезни значительно меньше [6, 7].

К числу важнейших способов борьбы с вредителями и болезнями относятся выведение и возделывание непоражаемых болезнями сортов культурных растений и поэтому, использование в гибридизации тонковолокнистых сортов хлопчатника вида *G. barbadense*, даст возможность получению устойчивых к вертициллезному вилту гибридных форм.

Таблица. Вилтоустойчивость внутри- и межвидовых гибридов хлопчатника

Внутривидовые гибриды	Процент больных растений	
	I повторность	II повторность
153-F x AP-200	66,7	42,9
AP-200 x S-5497	40,0	50,0
S-2607 x KK-1543	50,0	57,1
Antep x 159-F	50,0	85,7
St. – AP-317 (<i>G. hirsutum</i>)	57,1	
Межвидовые гибриды		
S-5497 x 6465	33,3	33,3
Todlo-16 x Acala-1517	25,0	33,3
Pima-S-4 x 18819	12,5	16,7
Senare x Indiya-295	50,0	37,5
St. – Ashgabad-25 (<i>G. barbadense</i>)	33,3	

Выводы

В результате повышенной стойкости к заболеванию, относительно устойчивые сорта при заражении вилтом дают значительно выше урожай по сравнению с неустойчивыми, у которых из-за болезни резко понижается продуктивность. Методом отдаленной гибридизации, широко применяемым в селекции хлопчатника, возникает возможность выведения сортов, сочетающих в себе как устойчивость к

заболеванию вертициллезом, так и высокие технологические качества волокна, которые присущи к средневолокнистым (*G. hirsutum*) видам хлопчатника.

Выделенные нами устойчивые и толерантные к вилту межвидовые гибриды хлопчатника, могут быть использованы в селекции исходным материалом при создании новых сортов, в качестве доноров устойчивости к вертициллезному вилту.

Литература

1. Технические культуры (под ред. Я.В. Губанова). – М.: Агропромиздат, 1986. – С. 185.
2. Горленко М.В. Сельскохозяйственная фитопатология. – М.: Высшая школа, 1968. – С.163.
3. Пересыпкин В.Ф. Сельскохозяйственная фитопатология. – М.: Агропромиздат, 1989. – 480 с.
4. Фирсов Г.А., Орлова Л.В. Некоторые проблемы сохранения биоразнообразия дендрофлоры Камчатки *In-situ* и *Ex-situ* // Материалы IV научной конференции «Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей». – Петропавловск-Камчатский: Камчат. НИРО, 2003. – С. 143.
5. Войтенко Ф.В. Методика долгосрочного прогноза вертициллезного вилта хлопчатника. – М.: Колос, 1970. – 15 с.
6. Мамедова А.Д., Мамедова Н.Х., Гасанова Г.И., Мамедова З.Б. Физиологическая и фитопатологическая оценка устойчивости тонковолокнистых сортов хлопчатника к засухе и вилту // Факторы экспериментальной эволюции организмов. – Киев: Логос, 2009. – 6. – С. 165–168.
7. Мамедова Н.Х. Изучение устойчивости гибридных форм хлопчатника к вертициллезному увяданию // II Международная научная конференция «Интродукция, селекция и защита растений». – Донецк, 2009. – 2. – С. 73–76.

MAMMADOVA N.KH., SHIKHLINSKI H.M., MAMMADOVA R.B.

Genetic Resources Institute of the Azerbaijan National Academy of Sciences, Azerbaijan, AZ 1106, Baku, Azadlyg avenue, 155, e-mail: naila.xurshud@yahoo.com

THE SELECTION AND QUALIFYING DURABILITY A NUMBER OF WILT DISEASES COTTON HYBRID FORMS

Aims. The comparative phytopathological assessment of durability to *Verticillium* wilt diseases interspecific (*G. hirsutum* L. x *G. hirsutum* L.) and intraspecific (*G. hirsutum* L. x *G. barbadense* L.) cross of hybrids on artificial infection background was carried out in Absheron Research Base of Genetic Resources Institute of ANAS. **Methods.** On the phytopathological assessment of durability has been used 5-point system of F.M. Vaytenok. **Results.** During the study it was determined that the intraspecific cotton hybrids are more durable to *verticillium* wilt diseases, but not interspecific cross of hybrids. This can explain that *G. barbadense* L. cotton specie is more durable *verticillium* wilt diseases and exactly that is why *G. barbadense* L. specie takes part in creation of interspecific cotton of hybrids. Thus interspecific cross of hybrids indicators of durability to wilt diseases is higher. **Conclusions.** It's possible to create new cotton sorts durable to wilt disease as well as highly technological fiber indicators completed in one genotype on the selection of cotton plant with widely using the long hybridization method. The selected forms from intraspecific hybrids which are durable and tolerant to wilt disease can be used as the beginning donor material on selection and creation of new cotton sorts.

Key words: cotton, *G. hirsutum* L., *G. barbadense* L., wilt, resistance.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ФЕНОТИПЫ ДЕРЕВЬЕВ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО В СВЯЗИ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ЛИСТОГРЫЗУЩИМ НАСЕКОМЫМ И ЕСТЕСТВЕННЫМ ОТБОРОМ

Устойчивость древесных растений к повреждению листьев различными видами филофагов рассматривается во многих исследованиях с привлечением в качестве маркеров веществ вторичного обмена [6, 7]. В листьях дуба черешчатого (*Quercus robur*) синтезируются разнообразные вторичные метаболиты – флавонолы, конденсированные танины, гидролизуемые танины [3]. Содержание этих групп веществ, дополненное определением общего содержания белка, определяли при изучении 55-летней культуры дуба черешчатого, в составе которой отмечено около 15% суховершинных деревьев, и произрастающего на той же территории многовекового НАСАЖДЕНИЯ (возраст деревьев 200–300 лет, Святогорский национальный природный парк). Основная цель работы изучить биохимическое разнообразие деревьев обоих насаждений, участие в формировании структуры популяции, связь с активностью повреждения листьев разными видами насекомых.

Материалы и методы

Листья для анализа отбирали с нижних побегов южной экспозиции – 6 листьев по возможности неповрежденных болезнями или насекомыми, то-есть системные листья дерева. Листья фиксировали в кипящем этаноле и после высушивания использовали для биохимического анализа. Энтомологическое обследование проводилось на следующий день после сбора образцов. Содержание белка (Б) определяли после осаждения амидо-черным [2]. Содержание флавонолов (ФЛ) по реакции с ALCL3 [1]; гидролизуемые танины (ГТ) по реакции с ферроцианид комплексом [4]; содержание конденсированных танинов определяли как сумму фракций – свободных и связанных с клеточными структурами компонентов [5].

Результаты и обсуждение

Анализы показали, что между многовековым насаждением и созданной из семян деревьев этого насаждения культуры (посадка 1957 г.) имеются различия, которые были ДОС-товерны для содержания в листьях Б, ГТ и КТ.

По содержанию ФЛ оба насаждения достоверно не различались (табл. 1).

Из наиболее существенных отличий между данными насаждениями можно отметить на 15% более высокий уровень содержания Б и на 220% более высокий уровень содержания КТ в листьях многовековых деревьев. Энтомологическое обследование также показало существенные различия между насаждениями по степени повреждения листьев листогрызущими насекомыми, доминирующими из которых были два вида – *Altica quercetorum* (блошак дубовый) и *Erannis defoliaria* (пяденица обдира-ло обычная), из патогенов – *Microsphaeras alphitoides* (мучнистая роса) (табл. 2).

Данные табл. 2 показывают, что листья молодой культуры намного активнее повреждаются доминирующими в насаждениях видами насекомых и инфекцией. Одной из причин этого может быть намного менее активный синтез КТ (табл. 1) в листьях молодой культуры. Именно эта группа компонентов рассматривается во многих работах как негативно влияющая на показатели развития (масса, скорость роста) личинок насекомых [6, 7]. Следующая особенность, характерная для обоих насаждений – это устойчивая негативная корреляция между содержанием в листьях Б и ГТ (табл. 3)

Данные, приведенные в таблице 3, дополнены показателями корреляции для 100-летней культуры из Харьковской области и ювенильных популяций – 2-х летняя культура и полусибовое потомство 600-летнего дерева. Материалы показывают, что в молодых культурах и ювенильной популяции коэффициенты корреляции относятся к слабому уровню, в то время, как в 100- и 300-летних насаждениях уровень корреляций достоверно средний. Во всех случаях определения корреляции этих признаков (Б-ГТ), как слабого, так и среднего уровня, имеют устойчивую негативную направленность с усилением связи в насаждениях дуба старшего возраста. То есть, вероятно, со временем происходит постепенная

элиминация особей с несбалансированным корреляционной структурой уровнем содержания данных групп веществ.

С учетом негативной корреляционной связи в каждом насаждении можно выделить три биохимических фенотипа: 1-й – содержание Б выше среднего для насаждения уровня, а содержание ГТ – соответственно ниже; 2-й фенотип – содержание Б ниже среднего уровня, а содержание ГТ, напротив, выше; 3-й фенотип – сбалансированность по негативной корреляции нарушена и повышенному содержанию Б соответствует повышенный уровень ГТ и наоборот. В каждой популяции (насаждении) достаточно четко выявляются данные фенотипы, численность которых может быть подсчитана и соответственно отражено их участие в структуре насаждения.

На рис. 1 можно отметить отличие биохимических показателей между 1-м и 2-м фенотипами в соответствии с корреляционной негативной структурой признаков. Обращает на себя внимание то, что численность особей с несбалансированным соотношением синтеза Б и ГТ (3-й фенотип) заметно выше в популяциях ювенильных. По мере действия естественного отбора (культура 55 лет, в которой не проводятся рубки ухода, и 300-летнее насаждение,

рис. 1, -3, 4), численность несбалансированных по корреляции особей падает и все насаждение представляет собой примерно равные пропорции всех биохимических фенотипов – около 30% каждый. Наблюдаемая тенденция снижения с возрастом численности деревьев 3-го биохимического фенотипа позволяет предположить, что это, вероятно, наиболее уязвимый биохимический вариант с точки зрения устойчивости к разнообразным внешним воздействиям. С другой стороны, наличие 3-го биохимического фенотипа объясняют поддержание в насаждениях старшего возраста корреляции Б – ГТ на среднем уровне. Если рассчитать корреляцию только для деревьев 1-го и 2-го фенотипов, она поднимается до уровня - 0,875. Однако, при наличии только двух фенотипов биохимическое разнообразие насаждения было бы снижено.

Повышенная уязвимость 3-го биохимического фенотипа выявилась более определенно, когда 55-летняя культура и многовековое насаждение были рассмотрены с позиций степени повреждения листьев каждого фенотипа доминирующими видами листогрызущих насекомых – *A. quercetorum* и *E. defoliaria* (рис. 2).

Таблица 1 Биохимическая характеристика листьев деревьев 300- и 55-летнего возраста состоянием на 26.06.2012 г. (% к сухой массе, под чертой CV%)

Характеристика деревьев	Б	ГТ	ФЛ	КТ
возраст 200–300 лет (16 особей)	9,83 ± 0,15 11,4	1,14 ± 0,07 48,9	0,54 ± 0,03 44,0	0,48 ± 0,029 64,0
возраст 55 лет (24 особи)	9,30 ± 0,12 11,4	1,41 ± 0,07 49,0	0,49 ± 0,024 49,3	0,21 ± 0,007 33,7
t st	2,95*	3,15*	1,5	9,0*

Таблица 2. Степень повреждения листьев дуба в насаждениях разного возраста (%)

Возраст насаждения	<i>A. quercetorum</i>	<i>E. defoliaria</i>	<i>M. albitoides</i>
200–300 лет	6,6 ± 1,26**	0,9 ± 0,42**	2,05 ± 1,11**
55 лет	13,5 ± 2,18	5,4 ± 1,24	4,63 ± 2,0

Примечание: ** P < 0,01.

Таблица 3. Коэффициенты корреляции признаков содержания Б – ГТ

Возрастная группа	Б – ГТ
200–300 лет	- 0,389*
100–120 лет	- 0,352*
55-летняя культура	- 0,110
2-х летняя культура	-0,158
полусибовое потомство, 6 месяцев	- 0,127

Примечание: * P < 0,05.

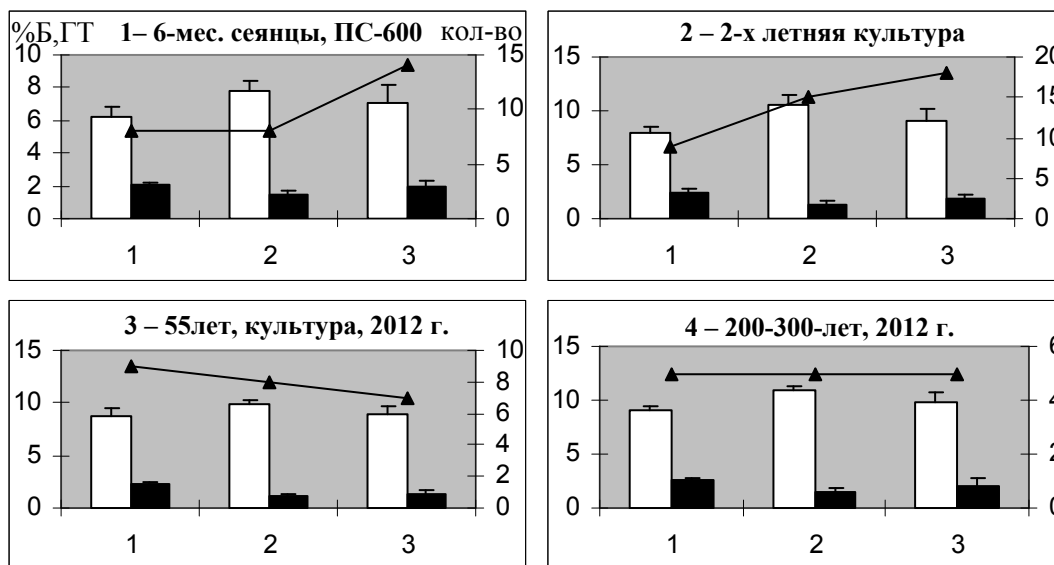


Рис. 1. Биохимические фенотипы (1–3) и их численность в популяциях дуба черешчатого разного возраста. 1-й фенотип – содержание Б максимально, содержание ГТ – минимально; 2-й фенотип – пропорции противоположные; 3-й фенотип – пропорции веществ смешанного характера. Б (масштаб 1:2) – белые столбцы; ГТ – черные. Линиями отмечена численность фенотипов в анализируемой выборке

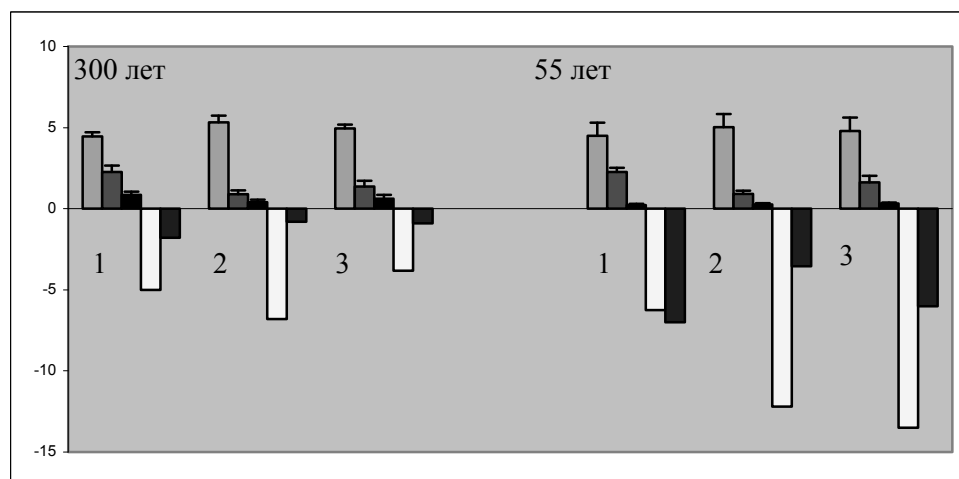


Рис. 2. Степень повреждения листьев насекомыми *A. quercetorum* (нижний белый столбец) и *E. defoliaria* (нижний черный). Биохимические фенотипы деревьев (те же, что на рис. 1) отражают содержание трех групп веществ – Б (масштаб 1:2), ГТ (%) и КТ (%)

Биохимические фенотипы многолетнего насаждения и культуры (рис. 2), для сбалансированных по корреляционной структуре 1-го и 2-го фенотипов показывают заметную связь с активностью повреждения разными видами листогрызущих насекомых. 1-й фенотип – низкое содержание Б и высокое ГТ по сравнению с двумя другими фенотипами наиболее активно поврежден *E. defoliaria*, как среди многовековых деревьев так и деревьев культуры. Это указывает на то, что данный вид приспособился эволюционно к использованию в качестве растения-хозяина деревьев с высоким

уровнем ГТ. Деревья 2-го биохимического фенотипа повреждаются преимущественно видом *A. quercetorum*, что указывает на определяющее значение для его расселения содержания Б в листьях растения-хозяина. 3-й фенотип (отсутствие сбалансированности) активно повреждают оба вида насекомых. Что касается деревьев 55-летней культуры, то рис. 2 наглядно показывает более активное повреждение насекомыми всех биохимических фенотипов по сравнению с 300-летними деревьями. Наиболее уязвимым является 3-й фенотип, листья деревьев которого значительно

повреждены как *E. defoliaria*, так и *A. quercetorum*. Дополнительный анализ раздельно групп суховершинных и здоровых деревьев культуры показал, что суховершинные деревья 3-го фенотипа отличаются одновременно повышенным содержанием как Б так и ГТ. То есть, по биохимическим показателям эти деревья привлекательны в качестве деревьев-хозяев для обоих видов листогрызущих насекомых. Повышенный уровень повреждения листьев снижает площадь листовой поверхности, способной синтезировать необходимые для жизнедеятельности метаболиты. В результате у таких деревьев постепенно развивается суховершинность – от 30–40% побегов в кроне до 80–90%, что ведет к их постепенному усыханию.

Выводы

Полученные данные показывают, что в формировании устойчивого многолетнего насаждения дуба черешчатого существенную роль может играть свойственный каждому дереву биохимический фенотип. Устойчивость насаждений и отдельных деревьев имеет многофакторную основу. Тем не менее, параллельное рассмотрение биохимических фенотипов по негативно коррелируемым признакам первичного и вторичного обмена и степени повреждения листьев разными видами насекомых позволяет отметить определенные тенденции в аспекте восприимчивости к

повреждениям, а также в формировании определенной структуры насаждения в возрастном аспекте.

Это позволяют сказать, что расселение насекомых на деревьях насаждений дуба не является хаотичным, а связано в значительной степени с биохимическим фенотипом дерева-хозяина, к которому в процессе эволюции приспособился данный вид. Наличие разнообразных фенотипов позволяет снизить конкуренцию между разными видами насекомых. Биохимические фенотипы с несбалансированными негативной корреляционной структурой сочетанием признаков таких групп веществ как Б и ГТ являются наиболее уязвимыми. В ювенильных растениях такие фенотипы численно доминирует, составляя около 45% выборки, однако вследствие привлекательности для разных видов насекомых, в дальнейшем это проявляется в более активном повреждении листьев и ослаблении деревьев. Последний фактор может быть одной из причин частичного элиминирования таких фенотипов в процессе естественного отбора. Однако около 30% деревьев с несбалансированным корреляционной структурой соотношением Б и ГТ сохраняются, расширяя при этом биохимическое разнообразие насаждения и снижая энтомологическую нагрузку на разные деревья.

Литература

1. Беликов В.В. Оценка содержания флавононол-производных в плодах *Silybum marianum* (L.) Gaerth. // Раст. рес. – 1985. – Вып. 3. – С. 350–358.
2. Бузун Г.А., Джемухадзе К.М., Милешко Л.Ф. Определение белка в растениях с помощью амидо-черного // Физиол. раст. – 1982. – 29. – С. 350–358.
3. Полякова Л.В., Журова П.Т. Фенольные соединения материнских деревьев и сеянцев полусибового потомства дуба черешчатого // Биологический вестник. – 2007. – 11. – С. 61–66.
4. Butler L., Bandyopahyay R., Mughogho L. Polyphenol concentration in grain, leaf and callus tissues of mold-susceptible and mold-resistant Sorghum cultivars // J. Agric. Food Chem. – 1986. – 34. – P. 425–429.
5. Julkunen-Tiitto R. Phenolic constituents in leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics // J. Agric. Food Chem. – 1985. – 33. – P. 213–217.
6. Kitamura M., Nakamura T., Hattoti K., Ishida T., Shibata S., Sato H., Kimura M. Among-tree variation in leaf traits and herbivore attacks in deciduous oak, *Quercus dentata* // Scand. J. Forest research. – 2007. – 22. – P. 211–218.
7. Lill J., Marques R. The effects of leaf quality on herbivore performance and attack from natural enemies // Oecologia. – 2001. – 126. – P. 23–29.

POLYAKOVA L.V., HAMAYUNOVA S.H., JUROVA P.T.

*Ukrainian institute of Forest research and agroforestmelioration,
Ukraine, 31024, Kharkiv, Pushkinska str., 86, e-mail: polyakova_lv@mail.ru*

BIOCHEMICAL PECULIARITIES OF COMMON OAK TREES IN CONNECTION WITH TOLERANCE TO HERBIVORES AND NATURE SELECTION

Aims. Biochemical properties of common oak (*Quercus robur* L.) many centuries trees (200–300 years old)

and trees of young culture (55 years old) were studied. **Methods.** The contents of protein (PR) and some groups of second metabolites in leaves were determined. The main species of herbivores were *Altica quercetorum* and *Erannis defoliaria*. **Results.** The contents of PR and condensed tannins (CT) in leaves of centuries trees were more higher. Correlations between PR content and hydrolysable tannins (HT) in all cases of determinations were negative. According these correlations all trees of each forest stand were divided on three biochemical phenotypes. **Conclusions.** Each biochemical phenotype of tree was optimal as host-tree for different herbivore species. Correlation PR–HT was much higher for many-centuries trees. Young culture characterized with low level of this correlation. It is possible to speculate that trees with some deviation in these correlations can be more ease eliminated from forest trees stand during nature selection.
Key words: *Quercus robur*, biochemical phenotypes, herbivores.

УДК 631.528. 2.23.582.28

ЭЙГЕС Н.С., ВОЛЧЕНКО Г.А., ВОЛЧЕНКО С.Г.

ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля,

Россия, 119334, г. Москва, Косыгина, 4, e-mail: volchenkos@mail.ru

ТОЛЕРАНТНОСТЬ К НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМУ ФИТОПАТОГЕНУ, ПОЛУЧЕННАЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ХИМИЧЕСКОГО МУТАГЕНЕЗА У ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Получить устойчивость к сапрофитным фитопатогенам, коими в наших исследованиях являются снежная плесень, тифулез (низкотемпературные фитопатогены) и к корневым гнилям трудно, применяя только традиционные методы селекции труднее, чем получить устойчивость к облигатным фитопатогенам [1]. Например, в России нет сортов озимой пшеницы, устойчивых к снежной плесени. При наличии провокационных условий, данное заболевание, как правило, проявляется. Это наблюдается в значительной части регионов России. Особенно благоприятными для развития снежной плесени условиями служат тяжелые глинистые почвы в Центральном регионе России и условия, связанные с выпадением снега на теплую мокрую землю осенью, что особенно губительно. В средней полосе России чаще развивается фузариозная снежная плесень. При массовом, сильном поражении – до 100% – это заболевание может унести значительную часть урожая, вплоть до его уничтожения. Например, в прошлом веке в США в год эпифитотии снежной плесени и широкого распространения этого сапрофита погибли почти все посевы озимой пшеницы в фермерских хозяйствах. Массовое распространение снежной плесени продолжалось в разные годы. Это побудило специалистов селекционным путём попытаться получить линии, устойчивые к этому патогену. В виде доноров были привлечены дикие сородичи пшеницы. В результате многочисленных скрещиваний и получения многих

линий в потомстве этих скрещиваний было выделено всего 2 устойчивые линии. Они явились источником устойчивых сортов и проблема устойчивости к снежной плесени была в Америке решена.

Материалы и методы

На толерантность и устойчивость к фузариозной снежной плесени испытывался ряд сортов и перспективных образцов озимой пшеницы, полученных с использованием метода химического мутагенеза И.А. Рапопорта. Исследования проводили только на естественных провокационных инфекционных фонах как в модельных экспериментах, так и в условиях хозяйств разных районов Московской области. В ряде случаев фон был комплексным и состоял из разных неблагоприятных факторов внешней среды.

Результаты и обсуждения

В России пока нет устойчивых сортов. Однако были получены линии, поражение которых не бывает столь велико и составляет в среднем в разные годы 30–40%. Такие линии отрастают, восстанавливаются и не теряют в урожае. Данные линии были получены в наших исследованиях при использовании метода химического мутагенеза. Они дали в последующих поколениях сорта менее восприимчивые в условиях эпифитотий к снежной плесени в сравнении с другими сортами, созданными при использовании только традиционных методов селекции, вне метода химического мутагенеза. Это, к примеру, хемомутантные сорта: Сибирская нива (включен

в Госреестр селекционных достижений, допущенных к использованию по Западно-Сибирскому региону), сорт Булава (включен в Госреестр по Восточному Казахстану). Последний представляет собой константный гибрид, полученный путём скрещивания хемомутанта с сортом Кавказ и некоторые другие сорта, а также хемомутантные образцы, полученные от скрещивания лучших хемомутантов с сортами, в том числе немутантного происхождения. Однако в настоящем исследовании были выделены образцы, сильно поражающиеся данным фитопатогеном – до 100%, в особенности в годы эпифитотий [1], но не теряющие в урожае. К данной группе относятся сорта: Имени Рапопорта (включён в Госреестр селекционных достижений, допущенных к использованию по Центральному региону), Солнечная (проходит Госсортоиспытание), Беседа, Белая (два последние сорта прошли Госсортоиспытания, но в Госреестр не включены). Все эти сорта представляют собой константные гибриды, полученные от скрещивания селекционно ценных мутантов с сортом Мироновская 808. Лучшие константные линии, полученные от этих скрещиваний, явились впоследствии родоначальниками названных сортов. К этой же группе относится ряд хемомутантных образцов, не теряющих урожай даже в условиях массовых сильных поражений. Примером может служить 2001 год, когда осенью 2000 года снег выпал на мокрую теплую землю, что нами наблюдалось в Подольском районе Московской области (учхоз Михайловское и на опытном поле Московской сельскохозяйственной Академии им. К.А. Тимирязева – МСХА). Почвы здесь тяжелые глинистые, агрофон низкий. В учхозе Михайловское (отделение Красная Пахра) в 2001 году возделывались хемомутантный сорт Имени Рапопорта и сорт Московская 39, созданный с использованием традиционных методов селекции, вне метода химического мутагенеза. Последний был принят нами за стандарт. Оба сорта были полностью поражены снежной плесенью – 100% поражение. Сорт Имени Рапопорта обладает высокими адаптивными свойствами, в частности высокими зимостойкостью и засухоустойчивостью. Одним из компонентов этих свойств является степень регенерационной способности. Хемомутантный сорт Имени Рапопорта обладает высокой регенерационной способностью вместе с высоким индексом кущения при сохранении узла кущения и способности его к отрастанию.

Всё это вместе обеспечило высокую плотность стеблестоя (в среднем 600–700 продуктивных стеблей из расчета на 1м²). Степень густоты стеблестоя по данным наших исследований и, по-видимому, всегда вносит наиболее весомый вклад (по сравнению с другими признаками, определяющими элементы структуры урожая) в урожай сорта того или иного года. Урожай хемомутантного сорта Имени Рапопорта составил в учхозе Михайловское 40 ц/га, сорт Московская 39 оказался в проигрыше: регенерационная способность и степень кустистости сильно уступили сорту Имени Рапопорта. Густота стояния этого сорта, который в настоящее время во многих случаях принимается за стандарт, была более чем вдвое ниже, чем у сорта Имени Рапопорта и составила в среднем 300 и менее продуктивных стеблей из расчета на 1м². Урожай составил 8 ц/га, т.е. в 5 раз ниже по сравнению с сортом Имени Рапопорта. Таким образом, можно заключить, что адаптивные свойства сорта, его регенерационная способность и способность к кущению определяют густоту стеблестоя и посредством этого – способность к формированию того или иного урожая. Описанная способность формировать урожай без урона даже при столь сильном поражении снежной плесенью, которое было в 2001 году в Подольском районе у сорта Имени Рапопорта и не терять качество зерна, мы определяем как толерантность. Благодаря густому стеблестоя и подавлению сорняков, сорт Имени Рапопорта не нуждался в гербициде, стоял без сорняков, сорт Московская 39 забивался сорной растительностью. Высокая регенерационная способность и толерантность к снежной плесени способствовали осуществлению возможности профилактической защиты окружающей среды и получению продукции, свободной от токсичных и вредных для здоровья человека ядохимикатов, благодаря самозащите хемомутантного сорта от сорняков. Нелёгкое финансовое положение многих хозяйств в настоящее время определяет к тому же меньшие затраты при возделывании толерантного сорта, что актуально.

На опытном поле МСХА, которое располагается за несколько километров от учхоза Михайловское на таких же тяжёлых глинистых почвах, фузариозная снежная плесень была в 2001 г. также сильно развита. На нём хемомутантные сорта Имени Рапопорта, Солнечная, Беседа, Белая были также сильно поражены фузариозной снежной плесенью и,

также, как в учхозе Михайловское – на 100%. Обладая толерантностью эти сорта отрасли, восстановили стеблестой и сформировали урожай 50–60 ц/га в конкурсном сортоиспытании, что превышает урожай стандартного сорта Московская 39 на 10–15 ц/га. Сорта Сибирская нива, Булава, и хемомутантные образцы меньше поразились фузариозной снежной плесенью на делянках конкурсного сортоиспытания по сравнению с сортами Имени Рапопорта, Солнечная, Беседа, Белая. Поражение сортов Булава и Сибирская нива составило 30–40%, урожай 50–60 ц/га, т.е. он соответствовал урожаю сортов Имени Рапопорта, Белая, Беседа, Солнечная, которые были поражены на 100%.

В течение более 10 лет (2003–2014 гг.) коллектив мутационной селекции и профилактической защиты окружающей среды ведёт исследования на экспериментальной базе Главного Ботанического сада, в Отделе отдалённой гибридизации (Снегири Истринского района Московской области). Здесь также присутствуют тяжёлые глинистые почвы. По-видимому, эти почвы немало инфицированы фузариозной снежной плесенью, т.к. провокационный инфекционный фон по отношению к ней всегда высок. Закономерность по степени поражения и возобновления стеблестоя вышеназванных хемомутантных сортов и образцов повторяется из года в год.

Данная закономерность подтверждается в Михнево Ступинского района Московской области. На полях Московского отделения Всероссийского Института растениеводства (МОВИР) им. Н.И. Вавилова в 2004 году по 1 гектару занимали хемомутантные сорта Белая и Беседа. Сорт Имени Рапопорта рос на 15 га, сорт Солнечная в конкурсном сортоиспытании. На таком же сильном инфекционном провокационном фоне и низком агрофоне, без удобрений и весенней подкормки хемомутантные сорта Белая и Беседа сформировали урожай 60 ц/га и более. Сорт Имени Рапопорта, росший на неудобьях и также без удобрений и весенней подкормки – 45 ц/га.

Фузариозная снежная плесень развивается в ряде случаев и на песчаных почвах, хотя несколько реже, чем на глинистых. Например, на песчаных и супесчаных почвах Ногинского района Московской области в хозяйстве Чапаевец был в 1993 году сильный инфекционный провокационный фон поражения снежной плесенью. Исследования проводили в районе деревень Беседы и Ботово на площади

150 га. Толерантность в виде отрастания и возобновления стеблестоя с хорошей регенерационной способностью у тех же представленных выше сортов тоже была высокой, но кустистость несколько уступала, очевидно в связи с ещё более низким агрофоном, что отразилось на густоте стеблестоя. Однако густота стеблестоя была достаточно плотной. Число продуктивных стеблей в среднем на 1м² составляло 400–450. Сорняки подавлялись. Состоялась безгербицидная профилактическая защита от сорняков. Однако урожай был ниже по сравнению с урожаями у представленных выше сортов, возделывавшихся на глинистых почвах и составляла 30–35 ц/га, также без удобрений и подкормок. Нужно сказать, что 90-е годы были весьма трудными в финансовом отношении для многих хозяйств. Поэтому высокие адаптивные свойства, толерантность к снежной плесени и нетребовательность к агрофону были в этот период особенно актуальны. Они актуальны и сейчас.

Показателен пример хозяйства Кудиново Ногинского района Московской области. Недалеко от деревни Исаково наблюдалось значительное развитие снежной плесени на поле площадью 80 га. Поражение составляло у сорта Белая в разных частях поля от 30 до 60% на легких песчаных почвах. Достаточно плотный стеблестой подавил развитие сорняков, но поскольку в поле были низкие места, так называемые «чаши», или «блюдца», определившие вымокание в этих местах и некоторое разрежение стеблестоя, густота стояния здесь была понижена. Тем не менее поле было чистым. Ни гербицид, ни фунгицид не были нужны, урожайность составила 37 ц/га.

Для нетолерантных сортов особенно опасна ситуация, когда сильное поражение снежной плесенью сочетается с другими неблагоприятными условиями перезимовки, например с условиями, провоцирующими вымерзание, ледяные корки, вымокание, выпревание (задыхание растений под долго лежащим снегом, когда он становится теплопроводным).

Вернёмся в Подольский район, учхоз Михайловское (отделение Красная Пахра в 1998 году). Сильно развитая снежная плесень в совокупности с выпреванием, ледяными корками, вымоканием, вымерзанием погубила на 95% стандартный сорт Инну, который в результате этого урожай не сформировал (см. рисунок), а сорт Имени Рапопорта, расположенный рядом на том же поле перезимовал, сохра-

нился на 95% и сформировал урожай 46,7 ц/га. Сорт Инна так же, как и сорт Московская 39 был создан с использованием только традиционных методов селекции, вне метода химического мутагенеза.

За период наших многолетних наблюдений в разных хозяйствах Московской области бывали ситуации, когда при 100%-ном поражении снежной плесенью и гибели узла кушения у части растений и отсутствия отрастания у них посевы были разреженными. В тех немногих случаях, когда посевы хемомутантных сортов озимой пшеницы были изрежены, это разрежение было чаще сосредоточено на бедных песчаных почвах и, как правило, около леса. Так было в 1993 году в хозяйстве Чапаевец Ногинского района близ деревни Ботово в отношении сорта Беседа и в 1988 году в хозяйстве Кудиново около деревни Марьино в отношении сортов Имени Рапопорта, Белая, Беседа. Подвергшиеся негативному естественному отбору, эти сорта изредились очевидно по причине «отсечения» у них неустойчивых генотипов на сильном провокационном инфекционном фоне низкого плодородия почвы. Здесь сыграла роль неоднородность генотипов этих сортов по малым мутациям количественных признаков, их разной концентрации при разных комбинациях в потомстве хемомутантных сортов. Наличие

малых мутаций в разных количествах и при разной силе их действия мы неоднократно наблюдали в отношении разных признаков.

Только один раз наблюдалось разрежение стеблестоя на тяжёлых глинистых почвах. Это было в 2004 году в Михнево Ступинского района Московской области на поле Московского отделения ВИР. У образца под номером 7564 (теперь сорт Солнечная), росшего рядом с лесом, наблюдалось выпадение части растений по причине генотипической неоднородности. Эта часть растений имела повреждённый узел кушения, что препятствовало восстановлению стеблестоя, аналогично как это было в двух предыдущих случаях в отношении сортов Имени Рапопорта, Беседа, Белая в 1993 и в 1988 гг.

Однако в описанных трёх случаях разрежения посевов при 100% поражении снежной плесенью нельзя отрицать толерантность, т.к. в обычных условиях была хорошая регенерационная способность и восстановление плотности стояния продуктивных стеблей. Просто провокационный фон в условиях расположенного рядом леса был особенно силён. Данные три случая выпадения части растений были использованы нами для отбора наиболее толерантных генотипов внутри каждого сорта. Теперь эти четыре сорта



Рис. Перезимовка хемомутантного сорта им. Рапопорта в сравнении с сортом Инна (стандарт) Московская обл. Подольский р-н. Учхоз Михайловское. 1998 г. с крайне неблагоприятным осенне-зимне-весенним периодом (слева – хемомутантный сорт Имени Рапопорта. 95% перезимовавших растений. Урожай 46,7 ц/га. Справа (через промежуток) – сорт Инна, немутантный, *стандарт*. 95% гибели растений после зимы: снежная плесень, вымокание, вымерзание, выпревание)

Имени Рапопорта, Беседа, Белая, Солнечная в условиях эпифитотий фузариозной снежной плесени особенно хорошо регенерируют и восстанавливают стеблестой. Последнее, очевидно, является одной из причин того, что в описанных выше случаях массового 100%-го поражения в 1988, 2001, 2004 и в другие провокационные годы эти сорта не теряли в урожае и формировали достаточно высокие урожаи даже на низких агрофонах, когда многие хозяйства в условиях настоящего времени не могут применять весь набор технологий, а в то же время возделывают хемомутантные сорта часто без пестицидов и гербицидов, при сохранении урожая даже в условиях эпифитотии фузариозной снежной плесени при массовом 100 %-ом поражении и при низком плодородии почвы. Данные сорта и образцы требуют уменьшенных объемов фунгицидов и гербицидов, или сохраняют урожай в их отсутствии. Это определяет сохранность

окружающей среды и продукции от загрязнения и отравления токсичными ядохимикатами.

Выводы

Выделены хемомутантные сорта и образцы озимой пшеницы, толерантные к фузариозной снежной плесени, что имеет основанием высокую регенерационную способность, способность к хорошему кущению и густому стеблестоя при сохранении узла кущения и урожая. Отборы на усиленном провокационном фоне при эпифитотии фузариозной снежной плесени повышают степень толерантности и более закрепляют её в поколениях.

Выделены хемомутантные сорта и образцы менее поражаемые фузариозной снежной плесенью по сравнению со стандартными сортами, созданными с использованием только традиционных методов селекции, вне метода химического мутагенеза.

Литература

1. Эйгес Н.С., Волченко Г.А., Волченко С.Г. Виды устойчивости к фитопатогенам, возникающие под влиянием супермутагена этиленмина у озимой пшеницы // Альманах научных открытий. Актуальные проблемы современной науки. Материалы научных трудов. – 2013. – 2, № 1. – С. 64–68.
2. Эйгес Н.С., Волченко Г.А., Волченко С.Г. Устойчивость к фитопатогенам, полученная с использованием метода химического мутагенеза на озимой пшенице // Збірник наукових праць Уманського Національного університету садівництва. – Умань, 2013. – Вып. 83. – С. 135–145.

EIGES N.S., VOLCHENKO G.A., VOLCHENKO S.G.

*FGBen Institute of Biochemical Physics N.M. Emanuel,
Russia, 119334, Moscow, Kosygin, 4, e-mail: volchenkos@mail.ru*

TOLERANCE TO LOW-TEMPERATURE PHYTOPATHOGENE, OBTAINED BY UTILIZATION OF THE CHEMICAL MUTAGENESIS METHOD ON WINTER WHEAT

Aims. Investigations of winter wheat perspective chemomutant varieties and patterns, received by utilization of chemical mutagenesis method on the resistance and tolerance to snow mould. Investigation of the tolerance and regeneration ability in various conditions. **Methods.** The objects of investigation are the best chemomutant varieties and perspective patterns, received by utilization of the chemical mutagenesis method in comparison with varieties, received by traditional methods only, without the chemical mutagenesis method. Provocative background for discovery the tolerance and resistance to phusariose snow mould was natural only and strong, on the level of epiphitoties. **Results.** In result of many years investigations in model experiments and in the farmings in various regions of Moscow oblast it was found the number of chemical mutant varieties and patterns, tolerant to snow mould. It determines preservation of the harvest even on low agrobackground of loamy and sandy light soils. It was found that the basis of the tolerance is a high regeneration ability to good bushing and to thick stem standing. Also the chemomutant varieties are the basis of the prophylactic protection of the environment and agricultural production against high toxic phungicides and herbicides. **Conclusion.** The chemical mutagenesis method of I.A. Rapoport is high effective, including in relation to creation a sign of tolerance to phuzarios snow mould on the basis of mutations complex, which determinates the high regeneration ability and ability to good bushing out and to form thick stem standing. Received data permit to decrease volumes of agricultural chemical weed-killers and pest-killers, or decline of them for prophylactic protection of environment and have ecology pure agricultural production.

Key words: Chemical mutagenesis method, resistance, tolerance, regeneration ability, mutant varieties.

RESTRICTION OF THE GROWTH OF T7-LIKE PHAGES BY PLASMID PROPHAGE P1

T7-like phages represent an example of the saving utilization of the genome. Their DNA of about 40 kb contains genes solely of phage origin that are sufficient to perform the basic function of bacteriophage, its reproduction. They are lytic bacteriophages and hence do not waste coding capabilities of their genome neither for lysogeny establishment nor for transduction of bacterial genes. Considerable part of T7 phage genome though is responsible for the interaction with the host, peculiarly for overcoming the cell barriers [1]. Thus, the structure of the attachment apparatus that allows for adsorption to core of LPS is responsible for the expansion of host range of T7-like phages [1]. Some of them (eg FE44) are able to overcome intergenera and interspecies barriers what characterizes them as polyvalent [2]. The next step of interaction consists in phage avoidance of action of protective systems of bacterial cells, primarily the restriction-modification (RM) complexes. Interactions of T7 phage group members with RM systems of type I and II are relatively studied while the question of impact by the type III systems on their growth remains opened [3].

The purpose of our work was to develop a system allowing for studying on the gene level the interaction of bacteriophages with cells both of native and uncommon hosts; to explore the interaction of the active phages with prophage elements in these systems.

Materials and methods

The object of the study was a T7-like polyvalent phage FE44 [2] obtained on different host bacteria – *E. coli* C600 (FE44/C600) and *E. "horticola"* 450 (FE44/450). Its genome was recently sequenced, annotated and deposited to GenBank database under accession number KF700371. Other members of the group T3, T7 and BA14 were used as controls. *Podoviridae* phage E105 and *Siphoviridae* erwiniaphages 49, 59 [4] and 59 mod/P1, obtained by passaging on the lysogenic strain 450(P1) were used in experiments performed on phytopathogens. Phage P1Cmc1ts100 [5] carrying chloramphenicol resistance marker (*Tn9*) and temperature-sensitive repressor protein C1 was used for lysogenization of the cells.

Three species of bacteria were used: laboratory strains of *E. coli* (*Eco*) C600, C1a, S/6,

BE and 112(P1); the causative agent of fire blight disease *Erwinia amylovora* (*Eam*) strains K8 (ATCC 29850), L4, L6, L7, K4, K5; *Erwinia "horticola"* (*Eho*) 450, 60-1N, 60-3m, 43I, 43II, 120, 23a and artificially lysogenized strains 450(49) and 60 (59, E105) – the phytopathogenic bacteria causing black bacteriosis of apples and European beech [6].

For cells lysogenization a volume of 5 ml of concentrated phage P1Cmc1ts100 suspension near 10^8 PFU/ml was applied on the top layer of semisolid agar containing cells of the corresponding recipient: *Eam*, *Eho* and *Eco*. After drying the plates were overturned and incubated at 28 °C for 28–30 hours. Bacterial cells picked out from the area of application were carried into liquid LB medium and incubated for 8–10 h at the same temperature. When the early stationary phase of growth was reached the bacteria were propagated to individual colonies on selective LB-plates with chloramphenicol (Cm) in concentration of 14 µg/ml.

Bioinformatic research was performed using BLASTn and BLASTp common tools (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), COBALT (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/>) tool for multiple protein alignment and APE plasmid editor for virtual digestion (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>).

Results and discussion

The *ocr* antirestriction function. T7-like phages are known to produce protein gp 0.3 (Ocr) to protect against type I RM systems. Ocr protein of T7 phage mimics the size and shape of curved DNA molecule while that of T3 possesses additional SAMase activity [1]. The role of gp 0.3 in T7-like phages interaction with type III RM system is a disputable issue: it can be argued that due to SAMase activity it counteracts type III restriction-modification complex which requires a cofactor AdoMet to function [3, 7].

FE44 phage turned out to be convenient to solve this issue since it is not able to express *ocr* function. When titrated on bacterial hosts carrying EcoB and EcoK restriction complexes (*E. coli* BE[EcoB], S/6[EcoB], J53[EcoK]) its efficiency of plating (EOP) decreased by value of 3–4 orders comparing to r^-m^- hosts (C600, C1a). In control experiments the EOP of T7 phage remained

constant or varied within one order of magnitude. Interestingly, bioinformatic analysis revealed the presence of gene 0.3 in FE44 genome. Predicted gp 0.3 protein features almost identical sequence to that of BA14 with single amino acid replacement of histidine in position 124 with proline found. The difference may seem insignificant however *ocr* expression is not observed. Thus, using FE44 the impact of type III RM enzyme on phage DNA excluding any interfering factors can be performed.

Construction of the bacterial strains systems and restriction exploration. Phage P1 is known to establish the type III RM-system EcoP1I in prophage state both in the cells of traditional host *E. coli* [5], and other enterobacteria (*Klebsiella*, *Pasteurella*, *Shigella*) [8], *P. atrosepticum* [9]. To study the interaction of EcoP1I with T7-like phages the systems formed by isogenic pairs comprising the parent and lysogen variant were constructed. Sensitive bacterial strains were treated with P1Cmc1ts100 and lysogens were selected as clones resistant to 14 µg/ml of chloramphenicol [5]. To verify the introduction of prophage DNA into the

cell and its maintenance in it the electrophoretic analysis of extrachromosomal DNA extracted from the parent cells and Cm^R-strains of *Eho*, *Eam* and *Eco* was performed.

As shown in fig. 1, compared to the parent strains, resistant to Cm clones of *Eho* and *Eam* carry additional extrachromosomal circular DNA. These molecules of DNA coincide in size with that extracted from *E. coli* C600(P1), C1a(P1) and of control plasmid P1 of *E. coli* 112(P1) strain; hence, they appear to be a plasmid prophage P1. This shows that phage P1 can be maintained in the cells of uncommon host as a circular plasmid molecule of approximately 94.8 kb similar to its maintenance in native host *E. coli* [5].

To estimate the activity of RM-system in constructed bacterial cells the efficiency of plating (EOP) of phages on P1 lysogens was compared to that on parent strain. FE44 was the single phage able to grow on all used bacteria while T3 and T7 failed to infect most of the phytopathogenic strains (table 1). Therefore specific erwinia phages E105, 59 and 49 were as the control in case of *Eho* system.

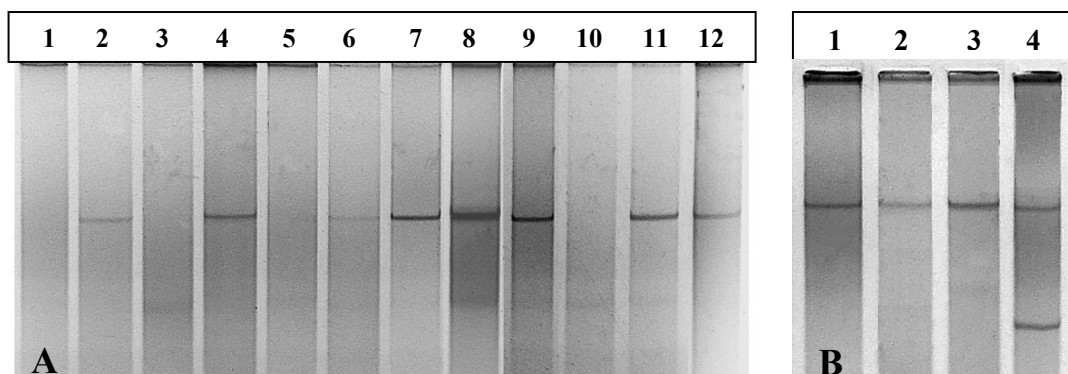


Fig. 1. Electrophoregram of extrachromosomal DNA extracted from parent and Cm^R- strains of *E. amylovora*, *E. "horticola"* and *E. coli*. **A.** *Eho*: 1 – 450, 2 – 50 (P1), 3 – 60-3m, 4 – 60-3m (P1), 5 – 60-1N, 6 – 60-1N (P1), 8.–120 (P1); *Eco*: 7,9.– 12 (P1), 10.–C1a, 11.–C1a (P1), 12.– C600 (P1); **B.** 1 – *Eco* 112 (P1), 2 – *Eho* 120, 3 – 120 (P1), 4 – *Eam* L4 (P1)

Table 1. Sensitivity of *Erwinia* genus representatives to T7-like phages

Strain	<i>E. "horticola"</i>									<i>E. amylovora</i>		
	60 - 3m	60 - 1n	60(59, E105)	450	450 (59)	43I	43I	23a	120	L4	K8	K4
T7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+ ^N	–
T3	+ ^{res}	–	–	–	–	+ ^t	+ ^t	+ ^{res}	+ ^{res}	+ ^N	+ ^N	–
FE44	+ ^N	+ ^N	+ ^N	+ ^N	+ ^N	+ ^t	–	+ ^{res}	+ ^{res}	–	+ ^N	+ ^N

Note: “–” – here and in table 2 signifies insensitivity to phage infection; “+^{res}” – indicates on the restriction of phage growth; “+^{res}” – stands for normal infection development.

Similar to other phages of T7 group interaction of phage FE44 with EcoP1I-carrying hosts results in the inevitable development of abortive infection (fig. 2). In system formed with *E. coli* C600 and C600(P1) and phage FE44/C600, as well as T3 and T7 phages their EOP decreased only by 1–2 orders of magnitude with each subsequent propagation. Still the form and size of plaques as well as the inability to restore normal phage reproduction in subsequent passaging indicated on the *abi*-infection. Interestingly, restriction of FE44 growth was similar to T3 while that of T7 was more stringent. This indicates that gp 0.3 is not involved in the interaction with type III RM system. DNA of T7-like phages is not modified by EcoP1I methylase, obviously for the reason of multiplicity of EcoP1I recognition sites on their DNA. Thus T7 DNA contains 126 and T3 has 154 recognition sequences while for FE44 this value constitutes 156.

Analogous abortive infection (EOP on lysogens about 10^{-3}) was discovered for phage E105 interaction with P1 RM-system in systems of *E. "horticola"* strain 60-1N and its lysogenic derivatives.

Another kind of interaction was determined in system formed by *E. coli* C1a and C1a(P1) strains and the used T7-like phages. The development of phage FE44/C600, T3 and T7 gave rise to abortive infection (*Abi*-phenotype) but the bacteriophages were completely eliminated after the first propagation on bacteria. Phage titers from 10^9 – 10^{10} PFU/ml on the parent strain decreased to zero on lysogenic. Similar results were obtained in *E. "horticola"* system in case of phage FE44/450 propagation on pairs 450, 450(P1) and 60-1N, 60-1N(P1). Such efficient restriction by P1 is likely associated not with the adsorption sites conversion in lysogens.

Again abortive was the phage T3 infection in lysogenic *E. amylovora* L4(P1) cells. This system was shown to be inefficient for studying the details of interaction between phage T3 and EcoP1I system due to the low EOP of phage both on lysogenic and parent strains.

In contrast to the mentioned cases phages 49 and 59 realize productive infection in *Eho* 450(P1) lysogens. EOP of phages decreased by 6 orders of magnitude after the first plating on P1 lysogens lawn. However plaque size and phage titers recovered in the following passages or when the phage 59 modP1 was used. Thus, DNA of 49 and 59 phages is efficiently modified by methyltransferase Mod of P1 RM-complex. Such features the phage lambda behavior in the system of *E. coli* P1 lysogens [5].

Conclusions

The constructed system of strains by P1 of *E. coli*, *E. "horticola"* and *E. amylovora* allow for the exploration of restriction-modification gene complex EcoP1I interaction with T7-like phages as well as with other polyvalent or specific phages.

The genes of EcoP1I RM system are fully expressed regardless the bacterial host lysogenized by phage P1. This proves the notion that RM-systems represent certain universal mobile genetic elements capable of functioning in any system and outspreading due to residing on phage DNA.

According to the level of restriction three types of phage-RM system interaction was discovered. Differences in phage responses to the presence of RM-system in the lysogenic host correlate with the number of recognition sequences on the DNA and the availability of adsorption sites while gp 0.3 Ocr protein was proved not to be involved in this interaction

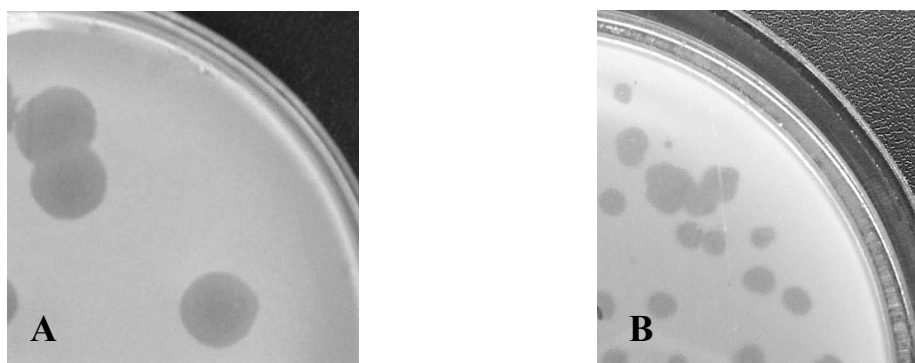


Fig. 2. Phage FE44 plaques formed on lawns of *E. coli* C600 (A) and C600 (P1) (B)

Table 2. Efficiency of plating of phages in the *E. coli* and *E. "horticola"* systems

Strain	Bacteriophage						
	T7	T3	FE44 ^a	E105	59	59mod	49
<i>Eco</i> C600	1.0	1.0	1.0	–	–	–	–
C600(P1)	5·10 ⁻²	0.18	0.16	–	–	–	–
C1a	1.0	1.0	1.0	–	–	–	–
C1a(P1)	0*	0*	0*	–	–	–	–
<i>Eho</i> 60-1N	–	–	1.0	1.0	x	x	x
<i>Eho</i> 60-1N	–	–	1.0	1.0	x	x	x
60-1N(P1) ₁	–	–	0*	7·10 ⁻³	x	x	x
60-1N(P1) ₂	–	–	0*	8·10 ⁻³	x	x	x
450	–	–	1.0	–	1.0	1.0	1.0
450(P1) ₂	–	–	0*	–	4.3·10 ⁻⁶	1.0	9.5·10 ⁻⁶

Note: "a" – On *Eco* strains the value is indicated for FE44/C600 phage and on *Eho* strains for FE44/450. "*0" – stands for the absence of individual plaques while zones of lysis are evident "x" – experiments not performed.

References

1. Molineux I.J. The T7 group // The Bacteriophages, 2nd edition, edited by R. Calendar. – Oxford University Press. – 2006. – P. 277–301.
2. Товкач Ф.И. Молекулярно-биологические свойства вирулентного бактериофага FE44 // Доповіді Національної академії наук України. – 2002. – № 6. – С. 175–178.
3. Moffatt B.A., Studier F.W. Entry of bacteriophage T7 DNA into the cell and escape from host restriction // J. Bacteriol. – 1988. – 170, N 5. – P. 2095–2105.
4. Товкач Ф.И., Шевченко Т.В., Горб Т.Е., Муквич Н.С., Романюк Л.В. Сравнительное изучение умеренных эрвиниофагов 49 и 59 // Микробиол. журн. – 2002. – 64, № 2. – P. 65–81.
5. Rosner J.L. Formation, induction, and curing of bacteriophage P1 lysogens // Virology. – 1972. – 48, N 3. – P. 679–689.
6. Товкач Ф.И., Мороз С.Н., Король Н.А., Файдюк Ю.В., Кушкина А.И. Поливалентность бактериофагов, изолированных из плодовых деревьев, пораженных бактериальным ожогом // Микробиол. журн. – 2013. – 75, № 2. – С. 80–88.
7. Kruger D.H., Reuter M., Hansen S., Schroeder C. Influence of phage T3 and T7 gene functions on a type III (EcoP1) DNA Restriction-Modification system *in vivo* // Mol Gen Genet. – 1982. – 185. – P. 457–461.
8. Goldberg R.B., Bender R.A., Streicher S.L. Direct selection for P1-sensitive mutants of enteric bacteria // J. Bacteriol. – 1974. – 118, N 3. – P. 810–814.
9. Бурова Л.М., Товкач Ф.И. Экспрессия генов профага P1 *Escherichia coli* в клетках фитопатогенных эрвиний // Микробиол. журн. – 2006. – 68, № 2. – С. 39–47.

FAIDIUK I.V.

D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnoho str., 154, e-mail: i.v.faidiuk@gmail.com

RESTRICTION OF THE GROWTH OF T7-LIKE PHAGES BY PLASMID PROPHAGE P1

Aims. Considerable part of T7 phage genome is responsible for interaction with the bacterial host, primarily for the avoidance of action of protective systems of cells, the restriction-modification complexes. Interactions of T7-like phages with RM systems of type I and II are relatively studied while the question of impact by the type III systems on their growth remains unclear. Developing a relevant system would allow us to study the interaction of bacteriophages with host cells on the gene level including the interplay with prophage elements and RM-systems. **Methods.** Biological, genetics and molecular biology approaches combined with bioinformatic research were used. **Results.** The ability of P1 to infect and lysogenise *Erwinia amylovora* and *Erwinia "horticola"* cells as well as its maintainance as a single-copy plasmid in the cells of uncommon hosts was shown. A set of lysogenic strains was obtained. According to the level of restriction three types of phage-RM system interaction were discovered. Though polyvalent, phage FE44 undergoes abortive infection similar to other members of T7 phage group. **Conclusions.** The genes of restriction-modification complex EcoP1I are fully expressed regardless the bacterial host lysogenized by phage P1.

Differences in interaction with cells are likely associated with the number of enzyme recognition sequences and the adsorption sites availability while gp 0.3 Ocr protein is not involved in this interaction. The constructed systems allow for the exploration of EcoP1I interaction with polyvalent phages able to grow both on *E. coli* and on such phytopathogens as *E. "horticola"* and *E. amylovora*.

Key words: T7-like phages, Type III restriction-modification complexes, antirestriction, polyvalent bacteriophages, phytopathogens.

ГЕНЕТИКА ЛЮДИНИ ТА МЕДИЧНА ГЕНЕТИКА

УДК 575.17

АТРАМЕНТОВА Л.А., ГОРПИНЧЕНКО М.Ю.

Харьковской национальный университет имени В.Н. Каразина,
Украина, 61022, г. Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: gelios-01@mail.ru

О ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ УКРАИНСКИХ ФАМИЛИЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ УРОВНЯ ИНБРИДИНГА

Одним из видов маркёров, позволяющих осуществлять масштабные популяционно-генетические исследования при невысоких финансовых затратах, являются фамилии. Фамилии обычно передаются от отца к потомкам. По мужской линии они повторяют наследование Y-хромосомы и потому называются квазигенетическими маркёрами. Частоты фамилий в населении аналогичных частотам аллелей в популяции одного локуса, вследствие чего к их анализу применимы методы популяционной генетики. Методику использования фамилий в качестве аналога генетических маркёров предложили Дж. Кроу и А. Мэндж в 1965 году [1]. С тех пор фамилии применялись для изучения генофондов многих европейских популяций [2–5], в том числе и российских [6–11]. Одной из важнейших характеристик популяционной структуры является уровень инбридинга. Показателем степени отклонения популяции от панмиксного состояния является коэффициент инбридинга. Значение коэффициента инбридинга показывает, насколько распределение генотипов в популяции отклоняется от теоретически ожидаемого равновесия Харди-Вайнберга. Коэффициент инбридинга используют при исследовании адаптивности популяции, оценивании рисков эпидемий, обусловленных наследственными причинами, прогнозировании частоты заболеваний моногенно-рецессивной природы, а также полигенных патологических состояний, в системе генетического контроля которых присутствуют рецессивные гены. Коэффициент инбридинга используют при расчёте риска при индивидуальном прогнозировании [12, 13]. Вопрос о том, в какой мере оценивание уровня инбридинга по фамилиям соответствует оценке инбридинга по классическим и ДНК-маркёрам до сих пор остаётся открытым.

Цель данного исследования – выяснить

возможность использования украинских фамилий для оценки инбридинга в населении Украины на примере двух районов Харьковской области.

Материалы и методы

Материалом исследования служили фамилии всех жителей Валковского и Коломакского районов. База данных была предоставлена Е.В.Балановской в соответствии с Договором о научном сотрудничестве между ХНУ имени В.Н.Каразина и МГНЦ РАМН. Площадь Валковского района составляет 1011 км², численность населения на 2006 г. 35 тыс. человек. В районе 102 населённых пункта. Площадь Коломакского района 330 км². В 2006 г. в 34 населённых пунктах района проживало 7,7 тыс. человек. Районы исследованы по разнообразию фамилий тотально. Суммарно в районах проанализированы фамилии 51475 человек (9040 фамилий). Для генетического анализа отобраны фамилии 30320 жителей Валковского района (4154 фамилии) и 7930 жителей Коломакского района (1084 фамилии). Для исключения случайных и недавних мигрантов в исследование использованы фамилии, частота которых в райцентре была не ниже пяти, в сёлах с населением более 250 человек – не ниже трёх, малые сёла обследованы полностью. Популяцией считался один населённый пункт. Все фамилии были приведены к единому стандарту – женские формы фамилий были заменены на мужские. Для расчёта частоты фамилий в каждой популяции использовалась программа Microsoft Office Excel 2007. Расчёт случайного инбридинга для каждого населённого пункта проводился по частотам фамилий в его населении с использованием методики Дж. Кроу и А. Мэндж [1]. Для проверки распределения данных коэффициентов корреляции и данных о численности населённых пунктов на

соответствие закону Гаусса был использован критерий W Шапиро-Уилка. Связь между показателем инбридинга и численностью жителей в населённом пункте оценивалась с помощью коэффициентов корреляции Пирсона и Спирмена [14].

Результаты и обсуждение

Численность населения, как известно, является структурообразующим фактором популяции [15]. Существуют различные методы оценки уровня инбридинга в человеческих популяциях [13]. Для малочисленных человеческих популяций характерны более высокие показатели [12]. В данном исследовании предстояло выяснить, соответствует ли показатели уровня инбридинга, рассчитанные с использованием украинских фамилий, коррелирует с численностью населения. Показатели инбридинга рассчитаны по фамилиям для каждого населённого пункта. Случайная составляющая f_z коэффициента изонимии, предложенного Crow и Mange [1], оценивает ожидаемую частоту однофамильных браков в предположении полной панмиксии. При этом все составляющие коэффициента изонимии связаны так же, как и F -статистики Райта [16]:

$$1 - f_t = (1 - f_n)(1 - f_r)$$

где f_t – тотальный инбридинг, определяемый соотношением случайного и неслучайного инбридинга (соответствует F_{IT} -Райта); f_n – неслучайный инбридинг, связанный с положительной или же отрицательной брачной ассортативностью (соответствует F_{IS}); f_r – случайный инбридинг (соответствует F_{ST}), связанный с подразделённостью тотальной популяции, оценивает вклад j -той субпопуляции в дифференциацию тотального генофонда.

Для любой популяции (j) величина случайного инбридинга по частотам фамилий рассчитывается следующим образом:

$$f_{r(j)} = \frac{I}{4}$$

где I – ожидаемая частота изонимных (однофамильных) браков в j -той популяции, т.е.

$$I = \sum_j^2 P$$

где P – частота j -той фамилии в j -той

субпопуляции, а коэффициент $1/4$ учитывает передачу фамилий лишь по мужской линии.

$$f_{r(j)} = \frac{\sum P_j^2}{4}$$

Рассчитанные с использованием украинских фамилий показатели инбридинга в населённых пунктах изученных районов приведены в табл. 1. Показатели инбридинга в изученных населённых пунктах распределялись в соответствии с нормальным законом, при этом распределение численности жителей в населённых пунктах было асимметричным. В связи с этим для оценки связи между этими переменными рассчитан коэффициент корреляции Спирмена, который показал обратную зависимость показателя инбридинга от численности населения. Коэффициент Спирмена для Валковского района составил $r_s = -0,788$ ($p = 0,01$), для Коломакского района $r_s = -0,891$ ($p = 0,01$). Для расчёта параметрического коэффициент корреляции Пирсона распределение численности жителей нормализовали путём логарифмирования.

Коэффициент корреляции Пирсона между численностью населения и коэффициентом инбридинга также оказался отрицательным и составил для Валковского района $r = -0,684$ ($p = 0,01$), для Коломакского – $r = -0,795$ ($p = 0,01$). Применение двух видов статистики – непараметрической и параметрической – выявило сильную обратную связь между количеством жителей в населённом пункте и коэффициентом случайного инбридинга, рассчитанного с использованием фамилий. Оба коэффициента корреляции оказались статистически высоко значимыми. При этом коэффициент корреляции Спирмена превосходил аналогичные значения коэффициента корреляции Пирсона. Это свидетельствует, что непараметрический анализ в подобного рода исследованиях обладает большей статистической мощностью, чем параметрический. Важным итогом проделанной работы является вывод о пригодности украинских фамилий в качестве квазигенетических маркёров в популяционно-генетических исследованиях украинского населения.

Таблица. Коэффициент случайного инбридинга в изучаемых населенных пунктах

Населенный пункт	Население		Количество фамилий	Коэффициент случайного инбридинга
	1	2		
Валковский район				
Валки		8807	629	0,00049
Ков'яги		3330	400	0,00126
Старий Мерчик		2173	323	0,00101
Високопілля		1665	197	0,00214
Сніжків		1491	224	0,00127
Шарівка		1219	177	0,002
Огульці		1206	172	0,00204
Баранове		997	121	0,00335
Гонтів Яр		798	135	0,002
Новий Мерчик		782	130	0,00183
Мельникове		769	82	0,00581
Сидоренкове		701	125	0,00171
Серпневе		688	135	0,00135
Черемушна		538	75	0,00399
Олександрівка		523	80	0,00292
Заміське		516	72	0,00348
Минківка		494	81	0,00289
Перекіп		444	74	0,00258

1	2	3	4
Благодатне	431	76	0,00319
Костів	423	82	0,00159
Привокзальне	333	32	0,00123
Кобзарівка	286	53	0,0036
Очеретове	279	32	0,00498
Добропілля	260	35	0,00555
Хворостове	208	72	0,01431
Литвинівка	203	76	0,00635
Вишневе	161	64	0,00589
Велика Губщина	153	73	0,00665
Рідкодуб	123	54	0,01115
Коломакський район			
Коломак	3460	282	0,00078
Шелестове	1967	248	0,00147
Різуненкове	983	129	0,00238
Покровка	370	55	0,00405
Шляхове	255	41	0,0047
Мирошниківка	251	40	0,00366
Жовтневе	232	124	0,00338
Андрусівка	190	79	0,006
Дмитрівка	119	45	0,01019
Пашенівка	103	43	0,01435

Выводы

1. Уровень инбридинга, рассчитанный по данным о распределении фамилий в населённых пунктах Валковского и Коломакского районов Харьковской области, варьирует в пределах $(0,49-14,35) \times 10^{-3}$.

2. Между уровнем инбридинга и количеством жителей в населённых пунктах имеется обратная связь, описываемая коэффициентом корреляции Спирмена (Валковский район $r_s = -0,788$, Коломакский район $r_s = -0,891$) и коэффициентом корреляции

Пирсона (Валковский район $r = -0,684$, Коломакский район $r = -0,795$).

3. Важным итогом проделанной работы является вывод о пригодности украинских фамилий в качестве квазигенетических маркеров в популяционно-генетических исследованиях украинского населения.

Авторы выражают благодарность проф. Е.В. Балановской за предоставленный материал для исследования и методологическую помощь.

Литература

1. Crow J.F., Mance A.P. Measurement of inbreeding from the frequency of marriages between persons of the same surname // *Eugen. Quart.* – 1965. – 12. – P. 199–203.
2. Barraï I., Rodriguer-Larralde A., Mamolini E., Scapoli C. Isonymy and isolation by distance in Italy // *Ann. Human Biol.* – 1999. – 71, N 6. – P. 947–961.
3. Lasker G.W., Mascie-Taylor C.G.N. Surnames in the five English villades: relationship to each other, to surrounding areas and to England and Wales // *J. Biosoc. Sci.* – 1983. – 5. – P. 25–34.
4. Rodriguer-Larralde A., Gonzales-Martin A., Scapoli C., Barraï I. The names of Spain: a study of the isonymy structure of Spain // *Am. J. Phys. Antropol.* – 2003. – 121, N 3. – P. 280–292.
5. Rodriguer-Larralde A., Barraï I., Nesti C. et al. Isonymy and isolation by distance in Germany // *Ann. Human Biol.* – 1998. – 70, N 6. – P. 1041–1056.
6. Балановская Е.В., Балановский О.П. Русь фамильная // *Химия и жизнь.* – 2007. – № 7.
7. Сорокина И.Н., Лепендина И.Н., Рудых Н.А., Верзилина А.В., Чурносоев М.И. Фамилии как квазигенетические маркеры при популяционно-генетических исследованиях // *Научные ведомости БелГУ. Сер. Медицина. Фармация.* – 2010. – № 22, вып. 12. – С. 72–79.
8. Сорокина И.Н., Балановская Е.В., Чурносоев М.И. Генофонд населения Белгородской области. I. Дифференциация всех районных популяций по данным антропоники // *Генетика.* – 2007. – 43, № 6. – С. 418–449.
9. Сорокина И.Н., Чурносоев М.И., Балановская Е.В. Генофонд населения Белгородской области. II. «Фамильные портреты» в группах районов с разным уровнем подразделенности и роль миграций в их формировании // *Генетика.* – 2007. – 43, № 8. – С. 1120–1128
10. Ельчинова Г.И., Зинченко Р.А. Допустимость использования татарских фамилий в качестве квазигенетического маркера в популяционно-генетических исследованиях // *Вестник Московского Университета. Серия XXIII. Антропология.* – 2010. – № 2. – С. 55–61
11. Юнкеров В.И., Григорьев С.Г., Резванцев М.В. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. – СПб, 2011.
12. Cavalli-Sforza L.L., Bodmer W.F. The Genetics of Human populations // San Francisco: Ed. W.H. Freeman and Company, 1971. – 965 p.
13. Наследственные болезни в популяциях человека / ред. Е.К. Гинтер. – М.: Медицина. – 2002. – 304 с.
14. Ли Ч. Введение в популяционную генетику. – М.: Мир, 1978. – 555 с.
15. Балановская Е.В., Почешхова Э.А., Балановский О.П., Гинтер Е.К. Геногеографический анализ подразделенной популяции II. География случайного инбридинга (по частотам фамилий у адыгов) // *Генетика.* – 2000. – 36, № 8. – С. 1126–1139.
16. Ельчинова Г.И., Вафина З.И., Порядина О.А., Зинченко Р.А. Распределение фамилий в Татарстане // *Вестник Московского Университета. Серия XXIII. Антропология.* – 2012. – № 2. – С. 76–86.

ATRAMENTOVA L.A., GORPINCHENKO M.Y.

V.N. Karazin National University of Kharkiv,

Ukraine, 61022, Kharkov, Svoboda sq., 4, e-mail: gelios-01@mail.ru

ABOUT THE USE OF UKRAINIAN SURNAMES TO ESTIMATE THE LEVEL OF INBREEDING IN THE COMMUNITIES WITH VARIOUS POPULATION SIZE

Aims. To investigate the possibility of using Ukrainian surnames to estimate inbreeding in the population of Ukraine. **Methods.** 30320 persons were analysed in Valkovsky area (4154 surnames) and 7930 persons in

Kolomak area (1084 surnames). Calculation of random inbreeding for each community was conducted over the frequencies of surnames in its population using *Crow & Mange* method. **Results.** The level of inbreeding was calculated from the data on the distribution of the surnames in the Valkovsky and Kolomak district; it varies $(0.49-14.35) \times 10^{-3}$. *Spearman correlation* coefficient between the level of inbreeding and the number of inhabitants in Valkovsky area reaches -0.788, in Kolomak area reaches -0.891. *Pearson correlation* coefficient between the level of inbreeding and the number of inhabitants reaches -0.684 in the Valkovsky area and reaches -0.795 in Kolomak area. **Conclusions.** Ukrainian surnames can be used as a marker for quasigenetic study of population structure. In the studied areas between the level of inbreeding and the number of inhabitants we registered a strong feedback.
Key words: Surname, quasigenetic markers, inbreeding.

УДК 616.89-008.454-053.6:576.316

БАГАЦКАЯ Н.В.

Государственное учреждение «Институт охраны здоровья детей и подростков НАМН Украины», Украина, 61153, м. Харьков, пр. 50-летия ВЛКСМ, 52-А, e-mail: iozdp@iozdp.org.ua

ЧАСТОТА СПОНТАННОГО И ИНДУЦИРОВАННОГО МУТАГЕНЕЗА В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЕТЕЙ С ДЕПРЕССИВНЫМИ РАССТРОЙСТВАМИ

Депрессивные состояния и ассоциированные с ними тревожные, фобические, обсессивные и соматоформные расстройства являются одной из важных проблем психического здоровья детей и подростков во всем мире, в том числе и в Украине [1–3]. Согласно результатам молекулярно-генетических исследований, доказано, что у носителей генов *CYP2D6* и *CYP2C19* повышаются метаболические процессы в организме, что приводит к возникновению депрессивных расстройств (ДР). Выявлено, что в формировании депрессий существенная роль принадлежит генам *HTR2A*, *MTHFR*, *SLC6A4* и др. [4]. Есть отдельные работы, посвященные исследованию хромосомного аппарата у больных с ДР, причем преимущественно у взрослых лиц. Установлено, что в хромосоме 3p25-26 локализован метаболитический рецептор глутамата 7, который также вовлечен в возникновение депрессий [5]. Другие исследователи полагают, что в возникновении ДР принимают участие гены, которые локализованы в хромосоме 15q25.5-26.2 [6]. В работах некоторых ученых установлены мутации в хромосомах 2p11-q14 и 13q21-33 [7], 2, 8, 4p16, 12q23-24, 16p13, 17, 21q22, Xq24-26, [8] и других [9], что свидетельствует о неоднозначности полученных результатов и подтверждают необходимость проведения дальнейших исследований.

Целью настоящего исследования явилась оценка спонтанного и индуцированного мутагенеза у детей и подростков с ДР.

Материалы и методы

Цитогенетический анализ проведен у 24 больных обоего пола с ДР до и после воздействия митомицином С и 24 здоровых сверстников в возрасте от 7 до 17 лет, обследованных в ГУ «ИОЗДП НАМН Украины».

Культивирование лимфоцитов периферической крови проводилось по стандартной схеме [10]. Материалом для цитогенетического анализа служили препараты хромосом, полученные из культуры лимфоцитов периферической крови (ЛПК). Для оценки влияния мутагена на стабильность хромосомного аппарата у пробандов на 67-м часе инкубации в культуральную смесь вносили митомицин С в конечной концентрации 3 мкг/мл. За 3 часа до фиксации в культуру клеток добавляли колхицин в конечной концентрации 7,5 мкг/мл. Культивирование ЛПК для оценки стабильности генома проводится в течение 48 часов, однако митомицин С являясь противоопухолевым антибиотиком, обладает сильным цитотоксическим эффектом, поэтому первые митозы после воздействия данным мутагеном могут появляться только на 72 часе культивирования лимфоцитов, в связи с чем культивирование ЛПК проводилось в течение 72 часов. Окраска препаратов хромосом: гомогенная и GTG с использованием красителя Гимза.

Анализировали от 50 до 100 метафаз без тестирующего влияния и с дополнительной мутагенной обработкой культуры *in vitro*.

Проанализировано 2359 метафазных пластинок у больных с депрессией до и 2266 пластинки после воздействия мутагеном-провокатором *in vitro*; у здоровых лиц – 2219 до и 1947 после соответственно. Учитывали все нарушения хроматидного, хромосомного и геномного типов. Метафазные пластинки изучались с помощью бинокулярного микроскопа *Leica CME* (Австрия), окуляр 10x18, объектив 100x, бинокулярная насадка 1,25x.

Статистическая обработка полученных результатов выполнена с использованием прикладного пакета программ *Excel, SPSS Statistics 17.0*. Для выявления значимости различий между сравниваемыми показателями использовали критерий Стьюдента [11].

Результаты и обсуждение

Согласно результатам цитогенетического анализа, кариотип у всех больных с ДР соответствовал нормальному женскому – 46,XX или мужскому – 46,XY. Известно, что на цитогенетическом уровне важную роль в дестабилизации генома человека имеет скрытая хромосомная нестабильность при нормальном кариотипе, которая проявляется как гиперчувствительность хромосом ЛПК к действию других мутагенов – *in vivo* и *in vitro*.

Общий уровень хромосомных нарушений у больных с ДР до влияния мутагеном-провокатором митомицином С составил 12,9 %, в то время как у здоровых пробандов – 2,25 %, $p < 0,001$. Спектр хромосомных нарушений у больных детей был представлен абберациями хроматидного (одиночными фрагментами, делециями короткого и длинного плеч) и хромосомного (парными фрагментами, удлинением и разрывами по центромере, обменами) типов, нарушениями геномного типа (преждевременным расхождением центромер и полиплоидией).

У здоровых детей спектр нарушений хромосом был менее выражен. Среди аббераций хроматидного типа выявлялись только одиночные фрагменты; хромосомного типа – парные фрагменты; геномного типа – преждевременное расхождение центромер и полиплоидные клетки. Причинами возникновения хромосомных нарушений могут быть разнообразные факторы внешней среды: температура, ультрафиолетовое излучение, радиация (как естественная, так и искусственная) [12], действие химических соединений – мутагенов (алкилирующих соединений, перекиси водорода, альдегидов и кетонов, антиметаболитов, солей тяжёлых

металлов, красителей, обладающих основными свойствами, веществ ароматического ряда, наркотиков, алкоголя, никотина).

После воздействия мутагеном-провокатором митомицином С на ЛПК больных с ДР общий уровень хромосомных нарушений возрос с 12,9 % до 21,1 %, в то время как у здоровых детей – с 2,25 % до 15,1 %. При этом уровень хромосомных нарушений возрос за счет увеличения частоты хроматидно-изохроматидных обменов (с 0,08 % до 0,66 %), дицентриков (с 0,25 % до 1,77 %) и других нарушений.

У здоровых детей под влиянием митомицина С на ЛПК повысилась частота одиночных и парных фрагментов, полиплоидных клеток и преждевременного расхождения центромер, однако нарушений хромосом *de novo* не появилось.

Анализ индивидуальных частот гиперчувствительности ЛПК больных с ДР к кластогенному действию мутагена-провокатора показал, что уровень аббераций хромосом у больных пробандов до воздействия митомицином С *in vitro* находился в пределах от 7,0 % до 26,0 %, а после мутагенной нагрузки – от 13,0 % до 36,0 % (рис. 1).

У здоровых детей индивидуальные частоты колебались от 0,0 % до 5,0 % до влияния мутагена *in vitro*, а после воздействия митомицином С – от 0,0 % до 36,0 % соответственно, то есть в обеих группах сравнения регистрировалось значительное увеличение индивидуального уровня индуцированного мутагенеза (рис. 2). Однако исследование надспонтанного индивидуального мутагенеза показало достоверное увеличение данного показателя у здоровых лиц, что свидетельствует о снижении адаптивного отклика у пробандов с ДР.

Возможно, что увеличение уровня хромосомных нарушений после воздействия мутагена-провокатора митомицина С на ЛПК объясняется тем, что специфические функционально активные белки, которые участвуют в упаковке первичной последовательности ДНК в наднуклеотидные структуры хроматина и метафазных хромосом, могут вносить значительный вклад в частоту хромосомных аббераций в популяциях клеток, подвергшихся генотоксическому воздействию. При определенных условиях часть разрывов нитей ДНК, благодаря этим белкам, может в нерепарированном состоянии пережить несколько поколений клеточных делений [13].

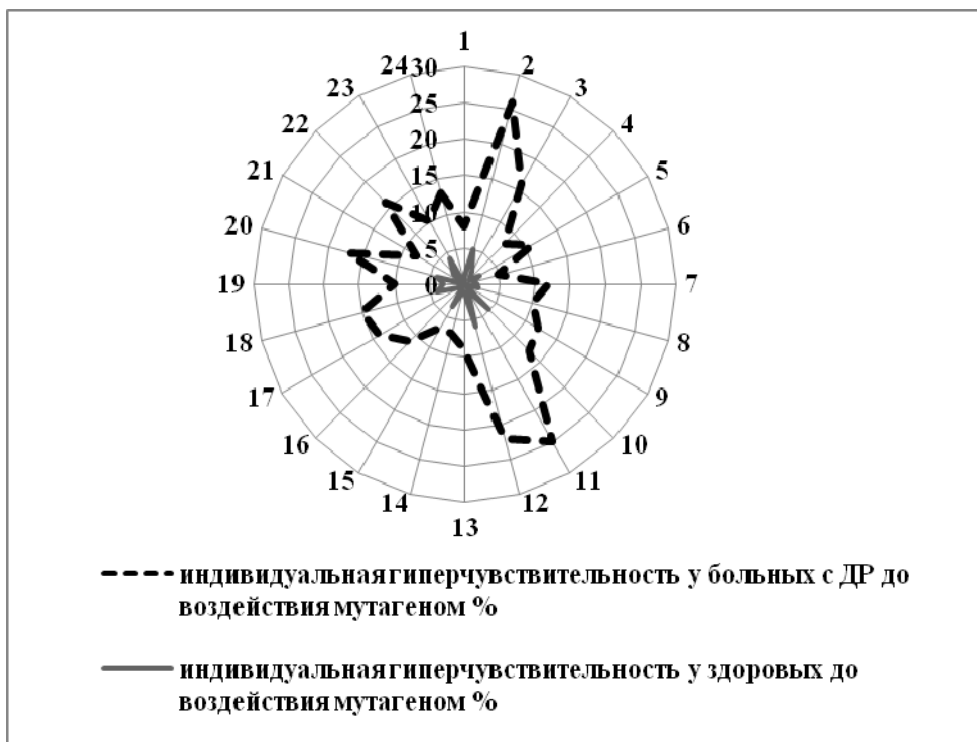


Рис. 1. Сравнительный анализ индивидуальной гиперчувствительности ЛПК больных с депрессией и здоровых лиц до воздействия митомицином С, %



Рис. 2. Сравнительный анализ индивидуальной гиперчувствительности ЛПК у больных и здоровых пробандов после воздействия митомицином С, %

Некоторые лекарственные вещества также могут выступать в качестве химических мутагенов. Наряду с физическими и химическими агентами генетической активностью обладают также некоторые факторы биологической природы, так как установлен мутагенный эффект многих вирусных инфекций (вирусы оспы, кори, эпидемического паротита, гриппа, гепатита) [14].

Выводы

Таким образом, в результате проведенного цитогенетического исследования определен уровень спонтанного и индуцированного мутагенеза у больных с ДР и здоровых сверстников. Установлено достоверное увеличение нарушений хроматидного, хромосомного и геномного типов, как у больных, так и здоровых детей после воздействия мутагеном-провокатором митомицином С на лимфоциты периферической крови.

Литература

1. Михайлов Б.В. Современное состояние проблемы депрессивных расстройств // Психічне здоров'я. – 2011. – № 3–4 (32–33). – С. 4–8.
2. Сухотина Н.К. Психическое здоровье детей и определяющие его факторы // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2013. – № 5. – С. 16–22.
3. Счастный Е.Д., Горбачевич Ю.Н. Тревожно-депрессивные расстройства у учащихся в системе начального профессионального образования [Электронный ресурс] // Медицинская психология в России. – 2012. – № 3 (14). – Режим доступа: <http://medpsy.ru>.
4. Lopez-Leyn S., Janssens A.C.J.W., Gonzalez-Zuloeta Ladd A.M. et al. Meta-analyses of genetic studies on major depressive disorder // *Mol. Psychiatry*. – 2008. – 13. – P. 772–785.
5. Pergadia M.L., Glowinski A.L., Wray N.R. A 3p26-3p25 genetic linkage finding for DSM-IV major depression in heavy smoking families // *Am. J. Psychiatry*. – 2011. – 168 (8). – P. 848–852.
6. Leteurtre F., Madalengoitia J., Orr A. et. al. Rational design and molecular effect of a new topoisomerase II inhibitor, azatoxin // *Cancer Res*. – 1992. – 52. – P. 4478–4483.
7. Goes F.S., Zandi P.P., Miao K. et al. Mood-incongruent Psychotic Features in Bipolar Disorder: Familial Aggregation and Suggestive Linkage to 2p11-q14 and 13q21-33 // *Am. Journal Psychiatry*. – 2007. – 164. – P. 236–237.
8. Middeldorp S.C.M., Sullivan P.F., Wray N.R. Suggestive Linkage on Chromosome 2, 8, and 17 for Lifetime Major Depression // *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* – 2009. – 150B (3). – P. 352–358.
9. Hamilton S.P. A new lead from genetic studies in depressed siblings: assessing studies of chromosome 3 // *Am. J. Psychiatry*. – 2011. – 168 (8). – P. 783–789.
10. Зерова-Любимова Т.Е., Горюченко Н.Г. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини: методичні рекомендації. – К., 2003. – 25 с.
11. Атраментова Л.А., Утевская О.М. Статистические методы в биологии: учебник для студ. высш. уч. зав. – Горловка: Ліхтар, 2008. – 248 с.
12. Болтіна І.В., Кравчук О.П. Частота аберацій хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові хворих на гліоми головного мозку при дії митоміцину С // Довкілля та здоров'я. – 2003. – № 2 (25). – С. 77.
13. Levinson D.F., Evgrafov O.V., Knowles J.A. et al. Genetics of recurrent early-onset major depression (GenRED): Significant linkage on chromosome 15q25-q26 after fine mapping with single nucleotide polymorphism markers // *Am. J. Psychiatry*. – 2007. – 164. – P. 259–264.
14. Kaplan M.I., Limoli C.L., Morgan W.F. Perpetuating radiation-induced chromosomal instability // *Radiat. Oncol. Invest.* – 1997. – 5. – P. 124–128.

BAGATSKAYA N.V.

State Institution "Institute for Children and Adolescents Health Care of the NAMS of Ukraine", Ukraine, 61153, Kharkiv, pr. 50-letya VLKSM, 52-A, e-mail: iozdp@iozdp.org.ua

SPONTANEOUS AND INDUCED MUTAGENESIS FREQUENCY IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF CHILDREN WITH DEPRESSIVE DISORDERS

Aims. To investigate spontaneous and induced mutagenesis in the peripheral blood lymphocytes of children with depression. **Methods.** Cytogenetic analysis has been carried out in 24 patients with depression before and after administration of mitomycin C, and in 24 healthy coevals, aged 7 to 17, who were under clinical research in the S.I. "ICAHC NAMS of Ukraine". **Results.** As a result of cytogenetic studies there were identified spontaneous and induced mutagenesis levels in children with depressive states. The total number of chromosome aberrations before the impact of mutagen-provocateur mitomycin C in patients with

depression came to 12.9 %, whereas in healthy probands it was 2.25 %. After exposure of peripheral blood lymphocytes to the mutagen impact the frequency of chromosome abnormalities in patients increased by 1.6 times (21.1 %) and in healthy children by 6.7 times (15.1 %), indicating a decreased adaptive response in children with depression. **Conclusions.** Single fragments prevailed among chromatid-type aberrations in patients; among chromosome-type they were elongation and breaks on the centromere and chromatid-isochromatid exchanges; among genome type – premature centromere divergence, as compared with the frequency of those disorders in healthy children.

Key words: patients, depression, healthy persons, chromosomes, mutagenesis.

УДК 613.26:633.13:614.876 (477)

БАНДАЖЕВСКИЙ Ю.И.¹, ДУБОВАЯ Н.Ф.², ШВАРТАУ В.В.¹, МИХАЛЬСКАЯ Л.Н.¹

¹ *Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,*

Украина, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: Yuri.by375@gmail.com, Schwartau@mail.ru

² *Национальная медицинская академия последипломного образования им. П.Л. Шупика,*

Украина, 04112, г. Киев, ул. Дорогожицкая, 9, e-mail: n_dubova@i.ua

ТЕРАТОГЕННЫЙ ЭФФЕКТ ЗЕРНА ОВСА ИЗ РАЙОНА, ПОСТРАДАВШЕГО ОТ АВАРИИ НА ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АТОМНОЙ ЭЛЕКТРОСТАНЦИИ

За годы, прошедшие после аварии на Чернобыльской атомной электростанции (ЧАЭС), площадь территории, отнесенной к зонам загрязнения радиоактивными элементами, составляет только в Украине 53,5 тыс. км² [1]. В связи с этим, остается открытым вопрос о возможности проживания на ней людей, а также получения сельскохозяйственной продукции, безопасной для здоровья человека. Для оценки безопасности продуктов питания, производимых на данной территории, могут быть использованы лабораторные животные, с последующей экстраполяцией полученных результатов на человека.

Цель. Целью настоящей работы явилось изучение влияния пищевого фактора – зерна овса, полученного с территории, загрязненной радиоактивными элементами вследствие аварии на ЧАЭС, на течение беременности и развитие зародышей лабораторных животных – сирийских хомячков.

Материалы и методы

В экспериментах были использованы половозрелые самки сирийского хомячка с массой тела 70–100 граммов. Данные животные были выбраны в связи с коротким периодом беременности (16 суток) и четко выраженным эстральным циклом. Диплоидный набор данных животных составляет 44 хромосомы [2].

Самок сирийского хомячка, с целью оплодотворения, подсаживали к самцам в период охоты (наличие характерной стойки). Срок оплодотворения определялся по наличию влажной пробки.

Животные, входящие в основную группу (30 животных), получали после оплодотворения, на протяжении всего периода беременности, в составе стандартного рациона питания [3], зерно овса (20 граммов в сутки на каждое животное), выращенное на территории Иванковского района Киевской области Украины в 2011 году, официально признанного пострадавшим от аварии на ЧАЭС в 1986 году (зерно № 1).

Животные, составившие контрольную группу (21 животное), после оплодотворения содержались на стандартном рационе питания [3], в состав которого входило зерно овса (20 граммов в сутки на каждое животное), выращенное в 2011 году на радиоактивно незагрязненной территории (зерно № 2).

Зерно овса № 1 и № 2 было подвергнуто анализу на содержание радиоактивных элементов Cs-137 и Sr-90 с помощью спектрометра энергий бета-излучения СЕБ 01-150 «АКП-С». Состав химических элементов в зерне определялся методом ИСП-спектрометрии на эмиссионном спектрометре ICAP6300 Duo МЕС (США) после предварительного измельчения зерен на мельнице, с последующим их сжиганием в азотной кислоте с помощью микроволновой подготовки проб Multiwave 3000 фирмы Anton Paar (Австрия).

Изучение состояния репродуктивных органов животных обеих групп производилось на 15-й день беременности, за день до предполагаемых родов. При этом, подсчитывалось число желтых тел в яичниках, мест имплантации в матке, количество живых и

погибших зародышей. Рассчитывались показатели предимплантационной и постимплантационной гибели зародышей. Определялась масса зародышей и плацент. Массу плаценты оценивали по отношению к массе плода в виде плацентарно-плодового коэффициента. После внешнего осмотра под бинокулярной лупой, с целью выявления видимых врожденных пороков развития, одна часть зародышей помещалась в смесь Буэна, другая – в 96° этиловый спирт.

Зародыши, фиксированные в смеси Буэна, подвергались исследованию по методу Вильсона-Дыбана с целью выявления врожденных пороков развития внутренних органов и головного мозга [4].

Зародыши, фиксированные в 96° этиловом спирте, обрабатывались по методу Даусона с окраской костных скелетов ализарином красным [4], для выявления врожденных дефектов костной системы. Всего вышеуказанными методами было исследовано 88 сформированных зародышей подопытной и 87 сформированных зародышей контрольной групп.

Содержание химических элементов в организме беременных самок сирийских хомячков подопытной и контрольной групп определялось с помощью спектрометрического метода на вышеуказанном оборудовании. Для этого был осуществлен забор ткани печени у 8 самок подопытной и 7 самок контрольной групп на 10-й день после их оплодотворения. Самки подопытной и контрольной групп в течение всего периода после оплодотворения и до взятия материала содержались в условиях эксперимента.

Математическая обработка и статистический анализ результатов исследования

проведены с использованием таблиц Microsoft Excel 2010 и пакета прикладных программ STATGRAPHICS 8.0.

Результаты и обсуждение

Радиометрическое исследование показало повышенное содержание радионуклидов Cs-137 и Sr-90 в пробе зерна овса, включенного в рацион питания животных основной группы, в сравнении с пробой зерна овса, потребляемого животными контрольной группы (для Cs-137 соответственно 49,8 Бк/кг и 12,6 Бк/кг, для Sr-90 соответственно 17,2 Бк/кг и 13,5 Бк/кг). В пробе зерна овса из подопытной группы было также существенно увеличено, по сравнению с зерном из контрольной группы, содержание элементов бария (Ba), марганца (Mn), стронция (Sr) (табл.). В основной группе обнаружено 13 самок, из числа 30 оплодотворенных, у которых к концу предполагаемой беременности отсутствовали зародыши в матке (43,3 %). В контрольной группе, составляющей 21 оплодотворенное животное, выявлено 5 самок, у которых к концу предполагаемой беременности отсутствовали зародыши в матке (23,8 %).

В подопытной и контрольной группах, значения показателей предимплантационной и постимплантационной гибели зародышей, средней массы тела сформированных плодов, плацентарно-плодового коэффициента, не имели достоверных различий.

Однако, в подопытной группе, в 7 из 17 случаев беременности ($41,2 \pm 12,3$ %), у 19 зародышей были выявлены врожденные пороки развития, тогда как, в контрольной группе врожденные пороки развития зарегистрированы у 2-х зародышей в 2-х из 16 случаев беременности ($12,5 \pm 8,5$ %, $p < 0,05$).

Таблица. Содержание химических элементов в зерне овса (мг/кг)

Химический элемент	Содержание химических элементов в исследуемой пробе овса, мг/кг		Химический элемент	Содержание химических элементов в исследуемой пробе овса, мг/кг	
	зерно № 1	зерно № 2		зерно № 1	зерно № 2
Al	24,75	48,90	Mn	96,63	46,94
B	0,00	0,00	Na	141,3	127,5
Ba	3,597	1,867	Ni	3,989	4,254
Ca	829,6	831,1	P	1495	1419
Cd	0,078	0,078	Pb	0,994	1,417
Co	0,397	0,357	S	9752	7452
Cr	0,6536	0,6932	Si	0,038	0,0472
Cu	4,616	3,361	Sr	2,889	1,473
Fe	133,0	102,6	V	1,327	1,097
K	3154	3026	Zn	35,94	29,19
Mg	1328	1135			

Врожденные пороки развития были представлены расщелиной верхней губы и твердого неба, черепно-мозговой грыжей, экзенцефалией.

Со стороны внутренних органов и головного мозга зародышей обеих групп не было выявлено значимых патологических изменений. Патология костной системы в виде сращения ребер была обнаружена у 2-х из 38 исследованных зародышей основной группы (5,26 %), при отсутствии в контрольной группе (36 исследованных зародышей).

В ткани печени самок, получавших зерно овса, выращенное на территории, пострадавшей от аварии на ЧАЭС, содержание селена (Se) составило $0,06 \pm 0,02$ мг/кг (в контроле – $0,12 \pm 0,02$ мг/кг, $p < 0,05$), бора (В) – $2,12 \pm 0,63$ мг/кг (в контроле – $3,68 \pm 0,72$ мг/кг, $p < 0,05$), фосфора (Р) – $2658,43 \pm 292,92$ мг/кг (в контроле – $3822,43 \pm 347,9$ мг/кг, $p < 0,05$), бария (Ва) – $1,08 \pm 0,41$ мг/кг (в контроле – $1,24 \pm 0,87$ мг/кг, $p > 0,05$).

Проведенное исследование выявило наличие выраженного тератогенного эффекта от употребления беременными животными в пищу зерна овса, выращенного на радиоактивно загрязненной территории. Обнаруженные в ходе данного экспериментального исследования, врожденные пороки развития относятся к группе мультифакториальных врожденных пороков, возникающих в популяции человека и животных при наличии генетической предрасположенности и воздействия внешнесредового фактора [5]. В настоящее время пороки данной группы преобладают в структуре врожденной патологии человека [6]. В популяции сирийских хомячков, использованных в работе, существует предрасположенность к возникновению врожденных пороков развития, о чем свидетельствуют 2 случая возникновения указанных пороков в контрольной группе.

Исходя из полученных результатов, в качестве внешнесредового фактора, оказывающего эмбриотропное действие и провоцирующего реализацию генетических дефектов в виде врожденных пороков развития, можно рассматривать, прежде всего, радионуклиды Cs-137 [7], а также химический элемент Ва [8], содержащиеся, в сравнении с контролем, в повышенном количестве в зерне, потребляемом в пищу беременными животными. Однако, определение Ва в печени самок подопытной группы не выявило достоверных различий по сравнению с контролем. В тоже время, были выявлены достоверные различия, между подопыт-

ной и контрольной группами, в содержании Se, В, Р – элементов, принимающих участие, прямо или косвенно, в репродуктивных процессах.

Не исключая негативного влияния радионуклидов Cs-137 на процессы внутриутробной регуляции, можно предположить, что именно дефицит указанных выше эссенциальных элементов, и прежде всего Se, негативно сказывается на процессах развития зародышей, способствуя проявлению генетически детерминированных состояний, какими являются врожденные пороки развития мультифакториальной группы.

Врожденные пороки развития, а именно, расщелина верхней губы и/или неба, обнаруженные у лабораторных животных в ходе данного эксперимента, с определенным постоянством встречаются в популяции человека [9]. В литературе имеются сведения об увеличении риска рождения детей с расщелиной твердого неба у женщин, которые проживали на радиоактивно загрязненной вследствие аварии на ЧАЭС территории и получили дозу суммарного радиоактивного облучения больше 5 мЗв [9]. В Баварии (Германия) зарегистрировано увеличение числа рождений детей с расщелинами верхней губы и/или неба в период с октября 1986 г. до декабря 1990 г. на 9,5 % [10]. Плоды человека с гестационным сроком 15–25 недель, абортированные в г. Гомеле по медико-генетическим показаниям, в связи с врожденными пороками развития центральной нервной системы, в том числе, анэнцефалией, экзенцефалией, черепно-мозговой грыжей, в сочетании с расщелиной верхней губы, содержали в своем организме большие количества радионуклидов Cs-137 [11].

Проведенное исследование свидетельствует о реальной опасности для здоровья людей продуктов питания, выращенных спустя 25 лет на территории, пострадавшей от аварии на ЧАЭС. Овес, как и другие сельскохозяйственные культуры, является составным компонентом пищевой цепочки, по которой, неблагоприятные для здоровья агенты, поступают из почвы в организм человека и животных. Полученные результаты указывают на необходимость проведения углубленных исследований влияния радиационно-химического фактора, присутствующего на радиоактивно загрязненной в результате аварии на ЧАЭС территории и поступающего в организм с продуктами питания, на процессы репродукции человека.

Выводы

1. Зерно овса, выращенное в 2011 году на территории, пострадавшей от аварии на ЧАЭС, содержало, в сравнении с контролем, повышенные количества радионуклидов Cs-137 и Sr-90, а также ряда химических элементов.
2. Употребление в пищу указанного зерна овса лабораторными животными – сирийскими

хотячками в период беременности, вызывало у их потомства врожденные пороки развития.

3. Полученные результаты обращают внимание на необходимость оценки роли радиационно-химического фактора, присутствующего на территории, пострадавшей от аварии на ЧАЭС, в репродуктивных потерях человека.

Литература

1. Atlas. Ukraine. Radioactive Contamination // Developed by Intelligence Systems GEO, Ltd. on the order of the Ministry of Emergencies of Ukraine. – К., 2011. – 52 p.
2. Шмидт Е.Ф., Серов А.В. Тайны семейства CRICETIDAE // Биомедицина. – 2005. – № 1. – С. 52–66.
3. Лоскутова З.Ф. Виварий. – М.: Медицина, 1980. – 93 с.
4. Дыбан А.П., Баранов В.С., Акимова И.М. Основные методические подходы к тестированию тератогенной активности химических веществ // Архив анатомии. – 1970. – 59, № 10. – С. 89–100.
5. Лазюк Г.И., Толарова М., Цейзель Э. Генетика врожденных пороков развития // Перспективы медицинской генетики; под ред. И.П. Бочкова. – М.: Медицина, 1982. – С. 187–240.
6. Бочков Н.П., Рослова Т.А., Якушина И.И. Медико-генетическое консультирование по поводу мутагенных и тератогенных воздействий // Мед. генетика. – 2009. – 8, № 1 (79). – С. 3–8.
7. Bandajevski Y.I., Dubovaya N.F. Les consequences de Tchernobyl sur la natalite. Cesium radioactif et processus de reproduction. – Gap.: Ed. Yves Michel; 2012. – 127 p.
8. Tarasenko N.Yu., Pronin O.A., Silayev A.A. Barium compounds as industrial poisons (an experimental study) // Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology. – 1977. – 21, N 4. – P. 361–373.
9. Тимченко О.І., Приходько Т.А., Линчак О.В. та інші. Генофонд і здоров'я: поширеність і чинники ризику виникнення щілини губи і/або піднебіння. – К.: Медінформ, 2008. – 156 с.
10. Scherb H., Weigelt E. Prevalence of cleft lip and palate in Bavaria, Gemany, before and after the Chernobyl nuclear power plant accident // Mund Kiefer Gesichts Chir. – 2004. – 8. – P. 107–110.
11. Бандажевский Ю.И., Переплетчиков А.М., Мишин А.В. Морфологическая и радиометрическая характеристика плодов, абортированных по медико-генетическим показаниям // Морфофункциональные аспекты действия радионуклидов на процессы антенатального и постнатального развития. – Гомель, 1998. – С. 28–31.

BANDAZHEUSKI Y.I.¹, DUBOVA N.F.², SCHWARTAU V.V.¹, MIKHALSKAYA L.N.¹

¹ Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivskaya str., 31/17, e-mail: Yuri.by375@gmail.com, Schwartau@mail.ru

² National Medical Academy of Postgraduate Education named after P.L. Shupyk, Ukraine, 04112, Kyiv, Dorogozhytska str., 9, e-mail: n_dubova@i.ua

TERATOGENIC EFFECT OF OATS GROWN IN AN AREA AFFECTED BY THE CHERNOBYL NUCLEAR POWER PLANT ACCIDENT

Aim. The aim of this paper was to study the influence of a food factor – oats obtained from an area contaminated with radioactive elements as a result of the Chernobyl accident on the course of pregnancy and development of embryos of laboratory animals – Syrian hamsters. **Methods.** Physiological, morphological (embryological), radiometric, physico-chemical, mathematical and statistical. **Results.** Oats grown in the area affected by the Chernobyl accident were found to contain increased amounts of radionuclides Cs-137 and Sr-90, as well as chemical elements Ba, Sr, Mn in comparison with the control (two times and more). Female Syrian hamsters in the experimental and control groups received the relevant oats as part of their diet from the moment of fertilization. The termination of pregnancy at the preimplantation stage was stated in 43.3 % of all cases of fertilization (in the control group – in 23.8 % of cases). The physiological course of pregnancy was recorded in 35.3 % of all pregnancies (in the control group – in 68.7 % of all pregnancies). Birth defects were detected in 41.2 % of all pregnancies (in the control group – in 12.5 % of all pregnancies, $p < 0.05$). **Conclusions.** This study shows a real danger to human health foods grown after 25 years on the area affected by the Chernobyl nuclear power plant. Needed to evaluate the role of radiation-chemical factors in the contaminated areas in the human reproductive losses.

Key words: radiation-chemical factor, Syrian hamsters, antenatal development, birth defects, radiation-contaminated areas, Chernobyl accident.

МАЛІ АНОМАЛІ РОЗВИТКУ: ЇХ ОСОБЛИВОСТІ ПРИ ДЕЯКИХ МУЛЬТИФАКТОРІАЛЬНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ

Одними із різноманітних генетичних маркерів схильності до мультифакторіальних захворювань є малі аномалії розвитку (МАР). Зацікавленість щодо особливостей фенотипу людини існувала у суспільстві з давніх часів. Сприйняття цих особливостей на протязі віків було досить неоднозначним. У різні історичні періоди люди з вадами розвитку та МАР вважались або «породженням нечистої сили» або «святими». Висувалися різноманітні теорії такі, як антропологічна теорія Ч. Ламброзо, що призводили до примусової стерилізації так званих «дегенеративних типів» [1]. Але поступово погляд на цю проблему змінювався, і в теперішній час більшість дослідників вивчають МАР з позиції їх ролі у виникненні та перебігу захворювань різної етіології.

Несприятливі екзогенні та ендогенні чинники можуть вносити істотні зміни в процес розвитку органів і систем організму та призводити до формування вроджених вад розвитку. Незначна інтенсивність чинників середовища або їх дія у моменти, суміжні із «критичними періодами» ембріонального розвитку організму, спричиняє формування так званих «малих» вад розвитку [2].

Вважається, що інформативні морфологічні варіанти або малі аномалії розвитку – це аномальні варіанти морфології деяких органів або тканин, що не потребують лікування. У клінічній генетиці та синдромології МАР є досить важливою діагностичною ознакою, яка може свідчити про високу імовірність складних порушень морфогенезу у вигляді вроджених вад розвитку, що потребують спеціальної діагностики, а, іноді, й хірургічного втручання. Діагностична цінність МАР є досить різноманітною, і принципово важливим є урахування їх кількості. У людини описано більш 200 інформативних морфогенетичних варіантів, але в клінічній практиці використовується близько 80 МАР [3].

Матеріали і методи

Нами вивчено особливості фенотипу у 119 підлітків із гіпоталамічним синдромом пубертатного періоду (ГСПП) (група 1), 43 дітей, батьки яких зазнали радіаційного опромі-

нення в дитячому та підлітковому віці внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС (група 2), 41 дитини з порушеннями психомоторного розвитку у віці до трьох років (група 3) і у 60 дітей контрольної групи (КГ).

Усі діти були оглянуті спеціалістами ІОЗДП НАМН України (педіатром, кардіологом, ендокринологом, психоневрологом, генетиком, окулістом, отоларингологом).

Характеризуючи фенотип, дотримувалися схеми розробленої, на кафедрі клінічної генетики та ультразвукової діагностики ХМАПО (1998 рік) [4], в якій фіксували наявність описових МАР, використовуючи прийняті в тератології терміни і поняття [5]. Також використовувалась класифікація, розроблена Merks Н.М. із співавторами [6]. Згідно з дослідженнями [7, 8], у здорової дитини кількість МАР може коливатися від 0 до 6.

Результати дослідження

При аналізі особливостей фенотипу у 81,7 % дітей контрольної групи спостерігалось до 6 МАР, середній рівень стигматизації (7-10 МАР) виявлено у 13,3 % здорових дітей, високий (10-14МАР) – у 3,3 % дітей. У хворих обстежених нами груп переважно спостерігався середній рівень МАР (7-10 МАР).

В усіх групах обстежених дітей достовірно частіше реєструвалось понад 6 МАР в одного хворого у порівнянні з контрольною групою ($p < 0,001$). Найбільша кількість хворих із понад 6 МАР (90,7 %) реєструвалась у групі дітей, батьки яких зазнали радіаційного опромінення в дитячому та підлітковому віці внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС. У хворих на ГСПП понад 6 МАР виявлено у 84,9 % підлітків, серед дітей із порушеннями психічного розвитку – у 78 % хворих. Найбільша кількість дітей із високим рівнем стигматизації (понад 14 МАР) виявлялась у 3 групі (табл. 1).

При вивченні топологічної належності МАР звертає на себе увагу нерівномірне розташування МАР у дітей із КГ: у черепно-лицьовій зоні розташовано 43,0 %, в області тулуба та кінцівок – 55,9 % МАР. Серед хворих 1 та 2 груп спостерігаються відмінності у

кількості МАР, розташованих в черепно-лицьовій зоні та в області тулуба і кінцівок, із переважною концентрацією МАР у черепно-лицьовій зоні (табл. 2).

Хворим третьої групи притаманна більш висока концентрація МАР у черепно-лицьовій зоні (79,6 %). При порівнянні отриманих даних із контрольною групою достовірно частіше виявляється підвищена концентрація МАР у черепно-лицьовій зоні у хворих 3 ($p < 0,001$) та 2 ($< 0,01$) груп.

У хворих усіх обстежуваних нами груп вірогідно частіше, у порівнянні із контрольною групою, зустрічаються МАР шкіри. Найчастіше МАР шкіри зустрічаються у хворих I та II груп, що можна розцінювати як прояви підвищеного пігментного обміну при системній дисплазії сполучної тканини (СДСТ) [9], яка є притаманною дітям, батьки яких зазнали радіаційного впливу внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС [10], та хворих на ГСПП.

При порівнянні окремих МАР встановлено, що достовірно частіше в усіх групах хворих зустрічаються антимоноголідний та монголоїдний розріз очей, дизморфічні вушні раковини, диспластичний ріст зубів, деформація грудної клітки, викривлення мизинця,

сандаляподібна щілина. У хворих третьої групи достовірно частіше ніж у контрольній групі визначались гіпертелоризм очний ($p < 0,001$), епікант ($p < 0,001$), блакитні склери ($p < 0,001$). Також у третій групі спостерігалися МАР, які відносяться до так званих високоспецифічних або високоінформативних для вродженої та спадкової патології ознак: трифаланговий великий палець, телекант, що обумовлено наявністю в даній групі хворих із хромосомною та моногенною патологією. Малі аномалії розвитку, що зустрічались в інших групах, відносились до неспецифічних ознак.

Спектр виявлених мікроаномалій відповідав морфогенетичним ознакам, характерним для дисплазії сполучної тканини (ДСТ).

Сполучна тканина посідає в організмі людини особливе місце, складає більше 50 % маси тіла і є складовою частиною всіх органів і тканин, вона приймає активну участь у розвитку патологічних процесів, забезпечує адекватну реакцію організму на дію будь-яких ушкоджуючих чинників. У наш час приділяється значна увага вивченню розвитку поліорганної патології на тлі синдрому недиференційованої дисплазії сполучної тканини.

Таблиця 1. Порівняльна характеристика кількості малих аномалій розвитку (МАР) у групах хворих

Кількість МАР в одного хворого	Контрольна група (%)	Група 1 (%)	Група 2 (%)	Група 3 (%)
До 6 МАР	81,7 ± 5,0	15,1 ± 3,3	7,0 ± 3,9	21,9 ± 6,5
Від 7 до 14 МАР	16,7 ± 4,9	71,4 ± 4,2	88,4 ± 4,9	73,2 ± 6,9
14-16 МАР	1,7 ± 1,7	0,8 ± 0,8	2,3 ± 2,3	4,9 ± 3,4
Понад 6 МАР	18,3 ± 5,0	84,9 ± 3,2	90,7 ± 4,4	78,0 ± 6,5

Таблиця 2. Топологічна належність малих аномалій розвитку у хворих різних груп

Малі аномалії розвитку	Контрольна група, %	Група 1, %	Група 2, %	Група 3, %
черепно-лицьової зони	43,0 ± 3,0	50,5 ± 2,2	50,1 ± 1,2	79,6 ± 1,9
тулуба і кінцівок	55,9 ± 3,0	40,7 ± 2,2	42,9 ± 1,1	17,1 ± 1,8
шкіри	1,1 ± 0,6	9,3 ± 1,3	7,0 ± 0,6	3,4 ± 0,9

Таблиця 3. Порівняльна характеристика малих аномалій (МАР) розвитку

Групи	МАР черепно-лицьової зони		МАР тулуба і кінцівок		МАР шкіри	
	t	p	t	p	t	p
Група 1	1,8	>0,5	0,4	>0,5	5,6	<0,001
Група 2	2,2	<0,5	3,1	<0,01	6,8	<0,001
Група 3	10,2	<0,001	10,9	<0,001	2,1	<0,01

Висновки

Таким чином, встановлено, що в хворих усіх обстежених нами груп вірогідно частіше визначаються понад 6 МАР, переважно у дітей цих груп спостерігався середній рівень стигматизації (7-10 МАР).

Виявлений у наших хворих високий рівень МАР, притаманних дисплазії сполучної ткани-

ни, може свідчити про вроджені або набуті дефекти біосинтезу колагену і, як наслідок, порушення функції сполучної тканини.

Подальше вивчення МАР при різноманітних патологічних станах людини, можливо, дозволить використовувати їх як маркери мультифакторіальних захворювань.

Література

1. Попов И.В. Малые аномалии развития: их место в системе современного врачевания (клинико-теоретическое исследование. – С.-Пб.: Виконт, 2004 – 165 с.
2. Здыбская Е.П. Клинико-генетический анализ малых аномалий развития и их роль в ранней диагностике наследственных заболеваний у детей // Ультразвукова перинатальна діагностика – 1995. – № 6–7. – С. 141–154.
3. Солонищенко В.Г., Красовская Т.В. Клиническая дисморфология хирургических болезней у детей // Детская хирургия. – 1998. – № 4. – С. 4–9.
4. Молодан Л.В., Бугаева Е.В., Демина О.О., Волчик И.В. Описание фенотипа: метод. рек. / ХИУВ; уклад. – Харьков, 1998. – 49 с.
5. Лазюк Г.И. Тератология человека. – М.: Медицина, 1991.
6. Merks H.M.J., van Karneebek C.D.M., Caron H.C., Hennekam R.C. Phenotypic abnormalities: Terminology and classification // American Journal of Medical Genetics – 2003. – N 123 A. – P. 211–230.
7. Гречанина Е.Я., Песочина Э.А., Зеленый В.М. Синдромологический анализ в клинической практике // Методические рекомендации. – Харьков, 1992. – 15 с.
8. Здыбская Е.П. Клинико-генетический анализ малых аномалий развития и их роль в ранней диагностике наследственных заболеваний у детей // Ультразвукова перинатальна діагностика. – 1995. – № 6–7. – С. 141–154.
9. Охупкіна О.В. Ознаки дизморфогенезу сполучної тканини в оцінці формування соматичної диспластикозалежної патології у дітей // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики: Зб. наук. пр. – Київ–Луганськ, 2010. – Вип. 18. – С. 313–319.
10. Степанова Е.И., Скварская Е.А. Генетические эффекты у детей, родившихся у ликвидаторов Чернобыльской аварии // Матеріали IV з'їзду медичних генетиків України. – 2008. – С. 73.

DEMENKOVA I.G.

SI “Institute for Children and Adolescents Health Care of the NAMS of Ukraine”,
Ukraine, 61153, Kharkiv, pr. 50-lytya VLKSM, 52-A, e-mail: deminn@ukr.net

SMALL DEVELOPMENTAL ANOMALIES: THEIR FEATURES IN SOME MULTIFACTORIAL DISEASES

Aim. To identify quantitative and qualitative character of small developmental anomalies (SDA) in multifactorial diseases. **Methods.** 119 adolescents with the hypothalamic syndrome of puberty (gr. I), 43 children, whose parents had experienced radiation impact in childhood and adolescence, owing to the Chernobyl disaster (gr. II), 41 children under 3 yr with an impaired psychomotor development (gr. III), and 60 children of the control group took part in the study. The authors used the scheme, developed in the department of clinical genetics and ultrasound diagnosis of Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education (KMAPE), Merks H.M. classification. **Results.** More than 6 SDA have been registered in the examined children. A higher SDA concentration in the cranio-facial area has been revealed in the patients from gr. II and gr. III. **Conclusions.** More than 6 SDA have been registered in our patients significantly more often, an average level of stigmatization (7-10 SDA) has been observed mainly in children of the groups under investigation. The revealed spectrum of SDA can testify to the congenital or acquired defects in collagen biosynthesis, and, as a consequence, to the connective tissue dysfunction.

Key words: small developmental anomalies, multifactorial diseases, children.

УДК 575.224.2:616-006.44

ДИБКОВ М.В.¹, ЗАВЕЛЕВИЧ М.П.², ГЛУЗМАН Д.Ф.², ПОЛЩУК Л.О.¹, МАЛЮТА О.В.¹, МАЛЮТА С.С.¹, ТЕЛЕГЕСЬВ Г.Д.¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: m.v.dybkov@imbg.org.ua

² Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 22

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА СИСТЕМА ДІАГНОСТИКИ ХРОНІЧНИХ МІЕЛОПРОЛІФЕРАТИВНИХ НОВОУТВОРЕНЬ

Використання молекулярно-генетичних маркерів вже є невід'ємною складовою частиною комплексних систем для діагностики та клінічного контролю лікування багатьох захворювань людини. Зокрема для мієлопроліферативних новоутворень дотепер описано когорту генетичних змін, багато з яких є не тільки генетичними маркерами даної групи захворювань, а є причиною їх розвитку. Ці зміни включають хромосомні транслокації, що призводять до утворення химерних білків, а також мутації, що приводять до зміни контролю активації білків, важливих для диференціації гемопоетичних клітин-попередників. До групи мієлопроліферативних новоутворень (МН) відносять захворювання, що характеризуються клональними процесами, котрі виникають внаслідок трансформації поліпотентної гемопоетичної стовбурової клітини. Характерною для них є проліферація клітин однієї чи кількох ліній мієлопоезу (гранулоцитів, мегакаріоцитів, еритроїдних елементів), що призводить до множинної гіперплазії. Мієлопроліферативні новоутворення виявляють переважно у дорослих після 50 років, однак діагностують і у дітей. Частота всіх типів МН за даними ВООЗ становить 6–10 на 100 тис. населення щорічно. Згідно з останньою редакцією класифікації ВООЗ [1] виділяють такі форми МН – хронічний мієлолейкоз, BCR-ABL1-позитивний (ХМЛ); хронічний нейтрофільний лейкоз (ХНЛ); справжня поліцитемія (СП); есенціальна тромбоцитемія (ЕТ); первинний мієлофіброз (ПМФ); хронічний еозинофільний лейкоз, неспецифікований іншим чином; мастоцитоз; мієлопроліферативне захворювання некласифіковане. Зазвичай діагностика хронічного нейтрофільного лейкозу та мастоцитозу не є складною за умови використання цитоморфологічних та цитохімічних підходів. Диференційна діагностика інших форм мієлопроліферативних новоутворень, зокрема хронічного мієлолейкозу, справжньої поліцитемії, первинного мієлофіброзу, есен-

ціальної тромбоцитемії та мієлопроліферативне новоутворення некласифіковане за допомогою вищезгаданих методів значно утруднене оскільки всі ці захворювання мають клінічні, гематологічні, та морфоцитологічні ознаки, що або є спільними, або перекриваються. Саме тому згідно з сучасною класифікацією ВООЗ 2008 р. [1] для підтвердження діагнозу було введено цілий ряд молекулярних маркерів як основних критеріїв диференційної діагностики мієлопроліферативних новоутворень. Одним з таких маркерів є філадельфійська хромосома, яка є першим достовірно встановленим маркером злоскісних перетворень гемопоетичних тканин людини, і яку описано ще в 1960 році. На молекулярному рівні її можна виявити за присутністю химерного гена *bcr/abl*. У 2005 році кілька груп дослідників [2–6] майже одночасно описали точкову мутацію 1849G > T в чотирнадцятому екзоні гена *jak2* на хромосомі 9p24, що призводила до амінокислотної заміни V617F, тобто валіну на фенілаланін у позиції 617. Дана мутація виявляється у 90–95 % хворих на справжню поліцитемію і приблизно у 50 % хворих на есенціальну тромбоцитемію та ідіопатичний мієлофіброз. Вважають, що на функціональному рівні ця заміна призводить до втрати регуляції та конститутивної активації JAK2 тирозинкінази. Це у свою чергу призводить до втрати регуляції JAK-STAT сигнального шляху зокрема викликає активацію трансдуктора сигналів та активатора транскрипції (STAT), мітогенактивованої протеїнкінази (МАРК) і фосфатидилінозитол-3-кінази (PI3K), які викликають трансформацію і проліферацію гемопоетичних клітин-попередників. У пацієнтів з клінічними ознаками справжньої поліцитемії у яких не виявляється мутація V617F (приблизно 5 % випадків СП) описано ряд змін в 12 екзоні гена *jak2*, що призводять до амінокислотних заміни чи делецій (K539L, H538QK539L, F537–K539delinsL тощо) [7]. І, нарешті, у частини хворих на есенціальну тромбоцитемію (ЕТ) та первинний мієлофіброз

(ПМФ) виявляють мутації в 10му екзоні гена рецептора тромбопоєтину *mpl*, що призводять до амінокислотних змін W515L, W515K [8], S505N тощо.

Окрім діагностики, молекулярно-генетичні методи відіграють все більшу роль у підборі оптимальних схем лікування новоутворень людини. Так, показано, що ряд мутацій у кіназному домені химерного гена *bcr/abl*, зокрема амінокислотної T315I заміни, призводить до утворення лікарської стійкості до специфічного інгібітору BCR-ABL тирозинкінази – іматинібу (Imatinib, STI571) [9]. Тому, визначення подібних змін до початку лікування є вкрай важливим.

Матеріали та методи

У роботі використовували (за інформованої згоди) зразки крові пацієнтів з попереднім діагнозом МН, що знаходилися на обстеженні і лікуванні в Київській міській клінічній лікарні № 9, Київській обласній клінічній лікарні № 1, Національному Інституті раку та в гематологічних відділеннях клінічних лікарень обласних центрів України. РНК отримували за Chomczynski, Sacchi [10]. Виявлення генетичних змін при мієлопроліферативних новоутвореннях проводили за допомогою запропонованих нами тест-систем: химерного гена *bcr/abl* – за допомогою зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) із специфічними праймерами [11, 12]; мутацію V617F гена *jak2* – за допомогою тетрамерної ПЛР з алейспецифічними праймерами [13, 14]; мутації в 12–16 екзонах гена *jak2* [15], мутації гена *mpl* [15] – за допомогою ЗТ-ПЛР та прямого сиквенування продуктів ПЛР. Для виявлення мутацій в *abl* ділянці химерного гена *bcr/abl* було підбрано специфічні олігонуклеотидні праймери 5'- GTGTGTGAAACTCCAGACTGTCC 5'- CATGCGGTAGTCCTTCTCTAGC (довжина ампліфікату — 1423 п.н.) та 5'- CAATGCCGCTGAGTATCTGCTG 5'- GAGAACTTGTGTAGGCCAGGCTC (довжина ампліфікату – 849 п.н) і також проводили ЗТ-ПЛР та пряме сиквенування продуктів ПЛР.

Результати та обговорення

Донедавна для аналізу генетичних змін, які відбуваються у хворих зі злякисними

новоутвореннями використовували каріотипування, яке дозволяє виявляти хромосомні перебудови, делеції, інверсії тощо. Даний метод і сьогодні є обов'язковим при клінічних обстеженнях пацієнтів з даним типом захворювання, оскільки він дозволяє проаналізувати каріотип хворого і виявляти додаткові хромосомні порушення. Поряд із цим, він має значні обмеження, насамперед через достатньо низьку чутливість та необхідність, в більшості випадків, проведення пункції кісткового мозку. Тому зазвичай використовують менш інвазивні методи діагностики та контролю лікування хворих зі злякисними новоутвореннями. Насамперед, це стосується використання полімеразної ланцюгової реакції. Хоча виявлення деяких мутацій при аналізі зразків крові хворих із мієлопроліферативними новоутвореннями можливо також без проведення зворотної транскрипції (мутації *jak2* V617F, мутацій в гені *mpl*), однак в більшості випадків необхідно також проводити виявлення злитого гена *bcr/abl*. А цей аналіз, внаслідок особливостей будови химерного гена (кілька точок розривів в значних за протяжністю інтронах) проводиться виключно за допомогою ЗТ-ПЛР, тому нами було прийнято за доцільне не проводити дві окремі процедури виділення РНК та ДНК, а проводити уніфіковану процедуру виділення РНК та отримання кДНК як для виявлення злитого гена *bcr/abl*, так і мутацій генів *jak2*, *mpl*, кіназного домену *abl* за допомогою ПЛР. Окрім того, для мажорної мутації V617F гена *jak2* в попередніх роботах [13, 14] нами було запропоновано використання тетрамерної полімеразної ланцюгової реакції з алейспецифічними праймерами, який дозволяє виявити мутацію за розміром отриманих ампліфікатів в простому агарозному гелі і характеризується високою чутливістю (мінімальна кількість клітин з мутацією 0,5–5 %).

Виходячи з вищезазначеного, на рис. наведено запропоновану нами схему молекулярно-генетичної діагностики та оптимізації протоколів лікування мієлопроліферативних новоутворень.

Запропонована система була апробована та впроваджена в клінічну практику онкогематологічних відділень м. Києва і ряду обласних центрів України.

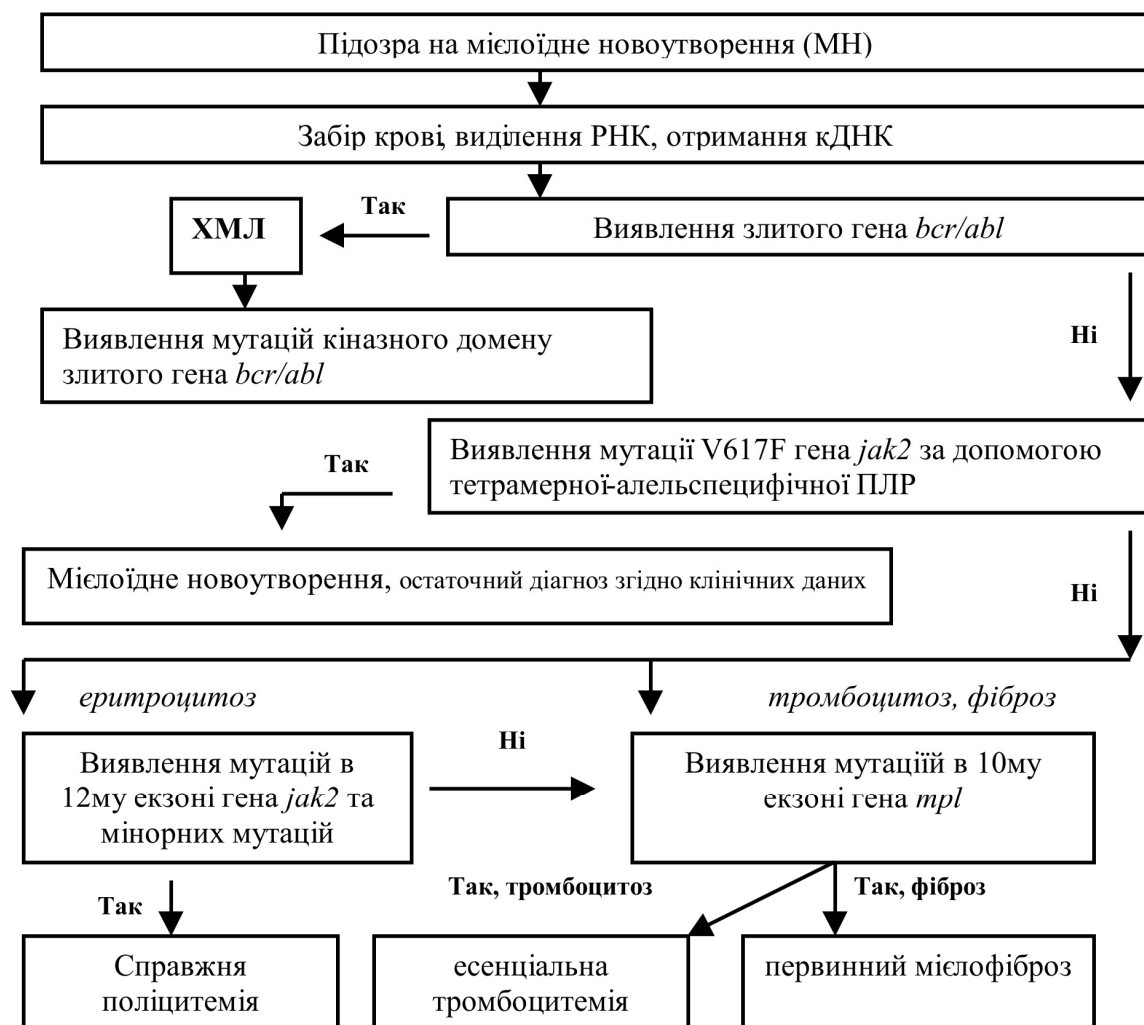


Рис. Схема молекулярно-генетичної діагностики та оптимізації схем лікування мієлопроліферативних новоутворень

Висновки

Молекулярно-генетичний аналіз займає центральне місце в діагностиці та клінічному веденні хворих із мієлоїдними новоутвореннями і дозволяє, у поєднанні з урахуванням клінічних, цитогенетичних та гістохімічних даних, проводити діагностику, вибір оптимальних схем лікування та контролювати стан пацієнтів під час лікування та ремісії.

Робота частково підтримана завдяки науковим проектам НАН України № 42/2010, 42/2011 «Вивчення молекулярно-генетичних змін при мієлопроліферативних захворюваннях і їх використання у клінічній діагностиці» та науково-технічного (інноваційного) проекту НАН України № 41/2012 «Комплексна діагностика мієлопроліферативних захворювань в обласних онкологічних центрах».

Література

1. Swerdlow S.H., Campo E., Harris et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. – Lyon: IARC Press. – 2008. – 439 p.
2. Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J., East C., Fourouclas N., Swanton S., Vassiliou G.S., Bench A.J., Boyd E.M., Curtin N., Scott M.A., Erber W.N., Green A.R. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders // Lancet. – 2005. – 365, N 9464. – P. 1054–1061.
3. Kralovics R., Passamonti F., Buser A.S., Teo S.S., Tiedt R., Passweg J.R., Tichelli A., Cazzola M., Skoda R.C. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders // N. Engl. J. Med. – 2005. – 352, N 17. – P. 1779–1790.

4. Levine R.L., Wadleigh M., Coombs J. et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis // *Cancer Cell*. – 2005. – 7, N 4. – P. 387–397.
5. Zhao R., Xing S., Li Z., Fu X., Li Q., Krantz S.B., Zhao Z.J. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera // *J. Biol. Chem.* – 2005. – 280, N 24. – P. 22788–22792.
6. James C., Ugo V., Le Couedic J.P., Delhommeau F., Lacout C., Garzon L., Raslova H., Berger R., Bennaceur-Griscelli A., Villeval J.L., Constantinescu S.N., Casadevall N., Vainchenker W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera // *Nature*. – 2005. – 434. – P. 1144–1148.
7. Scott L.M., Tong W., Levine R.L. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis // *N. Engl. J. Med.* – 2007. – 356, N 5. – P. 459–468.
8. Pardanani A.D., Levine R.L., Lasho T., Pikman Y., Mesa R.A., Wadleigh M., Steensma D.P., Elliott M.A., Wolanskyj A.P., Hogan W.J., McClure R.F., Litzow M.R., Gilliland D.G., Tefferi A.M. PL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients // *Blood*. – 2006. – 15, 108 (10). – P. 3472–3479.
9. Bixby D, Talpaz M. Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. – 2009. – P. 461–476.
10. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Analyt. Biochem.* – 1987. – 162. – P. 156–159.
11. Малюта С.С., Дибков М.В., Телегеев Г.Д., Мірошніченко Д.О. Спосіб діагностики Ph'лейкемії за допомогою специфічних праймерів. Деклараційний патент на корисну модель UA № 10385 від 15.11.2005. Бюл. № 11.
12. Малюта С.С., Телегеев Г.Д., Дибков М.В., Мірошніченко Д.О., Єльська Г.В. Розробка тест-системи для діагностики Ph-лейкемії за допомогою полімеразної ланцюгової реакції // *Наука та інновації*. – 2005. – 1, № 3, С. 70–75.
13. Дибков М.В., Малюта С.С., Телегеев Г.Д. Виявлення мутації V617F в гені *jak2* хворих на хронічні мієлопроліферативні неоплазми за допомогою T-ARMS ПЛР // *Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. праць*. – Київ: Логос, 2010. – 9. – С. 408–411.
14. Коваль С.В., Завелевич М.П., Дибков М.В., Телегеев Г.Д., Поліщук Л.О. Спосіб виявлення мутації V617F гена *jak2* за допомогою алейспецифічних праймерів. Патент на корисну модель UA № 81257 від 25.06.2013. Бюл. № 12.
15. Дибков М.В., Малюта С.С., Телегеев Г.Д. Використання генетичних маркерів для діагностики хронічних мієлопроліферативних неоплазм // *Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики. Збірник наукових праць*. – Київ-Луганськ, 2010. – Вип. 19. – С. 109–115.

DYBKOV M.V.¹, **ZAVELEVICH M.P.**², **GLUZMAN D.F.**², **POLISHCHUK L.O.**¹, **MALYUTA O.V.**¹, **MALIUTA S.S.**¹, **TELEGEEV G.D.**¹

¹ *Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 150, e-mail: m.v.dybkov@imbg.org.ua*

² *R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology Oncology and Radiobiology National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 22*

THE MOLECULAR-GENETIC SYSTEM FOR DIAGNOSTICS MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS

Aims. The myeloproliferative neoplasms (MPNs) are a group of diseases characterized by the rapid growth of abnormal uncontrolled proliferation myeloid cells. The definition of specific molecular-genetic abnormalities is important for diagnosis and treatment. **Methods.** Fusion genes *bcr-abl1* was detected by nested RT-PCR. Mutation V617F genes *jak2* was detected by T-ARMS PCR. Mutation of 12 exon gene *jak2*, exon 10 gene *mpl*, *abl* domain gene *bcr/abl* were detected by RT-PCR and direct sequencing. **Results.** Samples of blood of patients with different type MPNs were analyzed by the molecular-genetic system for diagnostics myeloproliferative neoplasms. **Conclusions.** Molecular genetic analysis is central to the diagnosis and clinical management of patients with myeloid neoplasms. It allows, in combination with clinical, cytogenetic and histochemical data to diagnose, choose the optimal treatment regimen and monitor the status of patients during treatment and remission.

Key words: myeloproliferative neoplasms; PCR; *bcr/abl*, *jak2*, *mpl* genes; mutation.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ НАРУШЕНИЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗА У МУЖЧИН СО СНИЖЕННОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИЕЙ

Классический анализ спермы не всегда позволяет выявить отцовский эффект, обуславливающий нарушения эмбрионального развития [1–3]. Причинами нарушений сперматогенеза могут быть такие генетические факторы, как генные мутации, микроделеции, анеуплоидии, повреждения ДНК и нарушения компактизации хроматина [3–5]. Фрагментация ДНК сперматозоидов – относительно недавно открытая предположительная причина мужского бесплодия, которая интенсивно исследуется в последнее десятилетие [6–10]. В то же время данные о возможном влиянии фрагментации ДНК сперматозоидов на ранние этапы эмбрионального развития, процесс формирования бластоцист, на повышенный риск замирания беременности на раннем сроке и частоту спонтанных абортов противоречивы [10, 11]. Причинами разрывов ДНК считают процессы изменения структуры хроматина в ходе сперматогенеза и апоптоз [12, 13].

Предполагается, что апоптоз служит конечным результатом различных патологических состояний и системой деградации, контролирующей сперматогенез [14–16]. Аномалии хроматина сперматозоидов часто ассоциированы с низкими показателями спермограммы, однако многие исследователи констатируют, что параметры фрагментации не имеют четкой корреляции с параметрами спермы, рекомендованными к исследованию ВОЗ (концентрацией, подвижностью, морфологией) [7–10]. В то же время в ряде исследований найдена отрицательная корреляция показателей фрагментации ДНК с параметрами спермограммы: концентрацией, подвижностью и долей морфологически аномальных сперматозоидов [11–13]. Спорным также остается вопрос о зависимости степени фрагментации ДНК от возраста пациента [12–16].

В связи с вышеизложенным целью данной работы стало исследование связи показателей фрагментации ДНК спермы с классическими параметрами спермограммы, с количеством незрелых сперматозоидов в эякуляте, зависи-

мость уровня фрагментации ДНК от возраста мужчины, а также анализ связи между наличием анеуплоидий в ядрах мужских гамет и количеством незрелых сперматозоидов у мужчин со сниженной репродуктивной функцией.

Материалы и методы

В ходе эксперимента было сформировано 3 группы пациентов. В группе 1 (n = 32, средний возраст $39,97 \pm 6,38$ лет), была исследована связь между уровнем анеуплоидных сперматозоидов и количеством незрелых сперматозоидов в эякуляте. Для пациентов группы 2 (n = 40, средний возраст $39,31 \pm 7,67$ лет), была исследована корреляция уровня фрагментации ДНК спермы с классическими параметрами спермограммы (подвижность и концентрация сперматозоидов, количество морфологически нормальных форм в эякуляте), а также зависимость уровня фрагментации ДНК спермы от возраста пациента. Для группы 3 (n = 70, средний возраст $39,53 \pm 6,88$ лет) была исследована связь между уровнем фрагментации ДНК спермы и количеством незрелых сперматозоидов в эякуляте.

Для анализа фрагментации ДНК сперматозоидов использован метод SCD (sperm chromatin dispersion) (HaloSperm, Halotech, Испания) [17–20]. Анализ проведен с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse 80i. Исследование степени зрелости сперматозоида основано на селекции сперматозоидов по степени связывания с гиалуроновой кислотой (hyaluron binding assay, НВА-тест) [21–24]. Для определения содержания зрелых сперматозоидов в эякуляте были использованы наборы компании Biocoat Incorporation (США). Исследование анеуплоидий в ядрах сперматозоидов проведено методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) [25–27]. Для флуоресцентной гибридизации применялись следующие ДНК-зонды: CEP Y (DYZ3) Satellite DNA SpectrumOrange, CEP X (DXZ1) Alpha Satellite DNA SpectrumGreen, CEP 18(D18Z1) Alpha Satellite DNA SpectrumAqua,

LSI 21 (loci D21S259, D21S341, D21S342, region 21q22.13-q22.2) SpectrumOrange (Vysis-Abbott, США). Для каждого пациента было оценено не менее 400 ядер сперматозоидов.

Данные проверены на соответствие закону нормального распределения. Исследование связей между признаками проводилось с помощью корреляционного анализа по Спирмену [27]. Расчёты выполнены в программе Statistica-6.

Результаты и обсуждение

В результате эксперимента выявлена статистически значимая отрицательная корреляция между уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов и такими параметрами классического анализа спермы, как подвижность ($r_s = -0,33 \pm 0,046$, $p < 0,05$) и количество морфологически нормальных форм ($r_s = -0,42 \pm 0,054$, $p < 0,05$). Полученные показатели имеют важное клиническое значение, учитывая неоднозначность результатов проведенных ранее исследований [22]. Данные об объекте и зависимость параметров спермограммы от уровня фрагментации ДНК спермы представлены в таблице 1.

В результате проведенного исследования показана положительная корреляция между уровнем фрагментацией ДНК сперматозоидов и возрастом мужчин для возрастной группы старше 30 лет ($r_s = 0,40 \pm 0,058$, $p < 0,05$). Для группы мужчин младше 30 лет связь степени фрагментации ДНК и возраста не доказана (табл. 2). Полученные данные имеют важное

практическое значение, уточняя возрастные показатели, определяющие репродуктивный потенциал мужчин, так как, по данным литературы, критический возраст для мужской фертильности колеблется в диапазоне 35–68 лет [14–18].

Выявлена статистически значимая отрицательная корреляция между количеством анеуплоидных по хромосоме 21 и количеством незрелых форм сперматозоидов в эякуляте у мужчин со сниженной репродуктивной функцией ($r_s = -0,38 \pm 0,058$, $p < 0,05$). При этом связь между уровнем анеуплоидных сперматозоидов по хромосомам 13, 16, 18, X, Y не доказана (табл. 3). Для пациентов третьей группы ($N = 70$) определена статистически значимая отрицательная корреляция между уровнем фрагментации ДНК спермы и количеством незрелых сперматозоидов в эякуляте ($r_s = -0,25 \pm 0,027$, $p < 0,05$).

Выводы

Показано связь возраста мужчины и нарушения упаковки хроматина в сперматозоидах. Доказана связь между уровнем фрагментации ДНК спермы и такими параметрами как подвижность и морфология сперматозоидов. Клинически значимым является возраст пациента старше 30 лет. Полученные результаты показывают необходимость исследования уровня фрагментации ДНК сперматозоидов у мужчин со сниженной репродуктивной функцией перед проведением программ ЭКО.

Таблица 1. Связь параметров спермограммы и уровня фрагментации ДНК спермы

Параметры спермограммы		Фрагментация ДНК, %	r_s	$r_{\text{крит.}}$	p
Подвижность, %	53,40 ± 9,58	16,38 ± 10,61	-0,33	0,31	$p < 0,05$
Концентрация, $\times 10^6$, / мл	60,49 ± 34,66	16,38 ± 10,61	-0,26	0,31	$p > 0,05$
Нормальная морфология, %	46,20 ± 12,68	16,38 ± 10,61	-0,42	0,31	$p < 0,05$

Примечание: p – уровень значимости, r_s – коэффициент корреляции Спирмена.

Таблица 2. Зависимость уровня фрагментации ДНК спермы от возраста пациентов

Возраст	N	Фрагментация ДНК, %	Средний возраст, лет	r_s	$r_{\text{крит.}}$	p
Менее 30 лет	8	14,65 ± 11,51	28,38 ± 0,63	-0,29	0,72	$p > 0,05$
Более 30 лет	32	16,81 ± 10,44	41,84 ± 6,66	0,40	0,36	$p < 0,05$
Общая группа	40	16,38 ± 10,61	39,31 ± 7,67	0,31	0,31	$p > 0,05$

Примечание: p – уровень значимости, r_s – коэффициент корреляции Спирмена.

Таблица 3. Частота анеуплоидий спермы с учетом количества незрелых сперматозоидов в эякуляте

Хромосома	Анеуплоидии, ср.значение, %	Количество зрелых форм, ср.значение, %	r_s	$r_{критич.}$	p
13	2,56 ± 2,07	75,65 ± 15,78	-0,06	0,36	$p > 0,05$
16	0,55 ± 0,23	75,65 ± 15,78	-0,02	0,36	$p > 0,05$
18	0,78 ± 0,48	75,65 ± 15,78	-0,07	0,36	$p > 0,05$
21	0,97 ± 0,39	75,65 ± 15,78	-0,38	0,36	$p < 0,05$
X, Y	1,25 ± 0,40	75,65 ± 15,78	0,15	0,36	$p > 0,05$

Примечание: p – уровень значимости, r_s – коэффициент Спирмена.

Литература

1. Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского и мужского бесплодия (теоретические и практические подходы): Руководство для врачей / Под ред. В.И. Кулакова, Б.В. Леонова. – 2-е изд., доп. – М.: Медицинскоу информационное агентство, 2004. – 782 с.
2. Воробьева О.А., Воскресенская А.В., Одинцов А.А., Филатов М.В. Мужское бесплодие и нарушение структурной организации хроматина сперматозоидов. Существует ли связь? // Проблемы репродукции. – 2005. – № 6. – С. 56–62.
3. Курило Л.Ф., Шилейко Л.В., Сорокина Т.М., Гришина Е.М. Структура наследственных нарушений репродуктивной системы // Вест РАМН. – 2000. – № 5. – С. 32–36
4. Agarwal A., Said T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility // Hum Reprod. – 2003. – 19, N 4. – P. 331–345.
5. Alan R. Thornhill, Karen S. Molecular diagnostics in preimplantation genetic diagnosis // J. of Molecul. Diagnosis. – 2002. – 4, N 1. – P. 11–29.
6. Benchaib M., Braun V., Lornage J. et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique // Hum. Reprod. – 2003. – 18, N 5. – P. 1023–1028.
7. Brugnon F., Van Assche E., Verheyen G. et al. Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. // Hum Reprod. – 2006. – 21, N 3. – P. 683–685.
8. Calle J.F., Muller A., Walschaerts M. et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study // Fertility and Sterility. – 2008. – 19, N 6. – P. 671–682.
9. Cayli S., Sakkas D., Vigue L., Demir R., Huszar G. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatin kinase, caspase-3 and Bcl_{XL} levels in mature and diminished maturity sperm // Mol. Hum. Reprod. – 2004. – 10, N 5. – P. 365–372.
10. Dohle G.R., Diemer T., Giwercm A., Jungwirth A., Kopa Z., Krausz C. Мужское бесплодие (научное редактирование: Акопян А.С.) // Европейская ассоциация урологов. – 2010. – 67 с.
11. Findikli N., Kahraman S., Kumtepe Y. Assessment of DNA fragmentation and aneuploidy on poor quality human embryos // Reprod Biomed Online. – 2004. – 8, N 2.–P. 196–206.
12. Henkel R., Kierspel E., Hajimohammad M. et al. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology // Reprod Biomed Online. – 2003. – N 7. – P. 477–484.
13. Hong Ye, Guo-ning Huang, Yang Gao, De Yi Liu. Relationship between human sperm-hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional *in vitro* fertilization // Hum. Reprod. – 2006. – 21, N 6. – P. 1545–1550.
14. Oehninger S., Chaturvedi S., Toner J. et al. Semen quality is there a paternal effect on pregnancy outcome in *in-vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection? // Hum Reprod. – 1998. – N 13. – P. 2161–2164.
15. Schlegel P.N., Paduch D.A. Yet another test of sperm chromatin structure // Fertil Steril. – 2005. – 84, N 4. – P. 854–859.
16. Seli E., Sakkas D. Spermatozoa nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART // Hum Reprod Update. – 2005. – 11, N 4. – P. 337–349.
17. Tesarik J., Mendoza C., Greco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI // Hum Reprod. – 2002. – N 17. – P. 184–189.
18. Mehdi Benchaib, ValeArie Braun, Jacqueline Lornage, Samia Hadj et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique // Hum Reprod. – 2003. – 18. – N 5. – P. 1023–1028.
19. M. Muratori, S. Marchiani, L. Tamburrino, V. Tocci, P. Failli, G. Forti, E. Baldi Nuclear staining identifies two populations of human sperm with different DNA fragmentation extent and relationship with semen parameters // Hum Reprod. – 2008. – 23, N 5. – P. 1035–1043.
20. Luke Simon, Gunnar Brunborg, Michael Stevenson, Deborah Lutton et al. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome // Hum Reprod. – 2010. – 25, N 7. – P. 1594–1608.

21. Sarah E.D., Sean P.F., Colin D.M. Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using in-situ hybridization // *Molecular Human Reproduction*. – 1997. – 3, N 7. – P. 585–598.
22. Staessen C., Hortournaye H., Michiels A., Devroey P., Lierbaers I. PGD in 47,XXY Klinefelter's syndrome patients // *Human Reproduction*. – 2003. – 9, N 4. – P. 319–330.
23. Speyer B.E., Pizzey A.R., Ranieri M., Joshi R., Delhanty J.D.A., Serhal P. Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation // *Hum Reprod*. – 2012. – 25, N 7. – P. 1609–1618.
24. Bronet F., Martorez E., Gaytarn M., Lin˜arn A., Cernuda D., Ariza M., Nogales M. et al. Sperm DNA fragmentation index does not correlate with the sperm or embryo aneuploidy rate in recurrent miscarriage or implantation failure patients // *Hum Reprod*. – 2012. – 27, N 7. – P. 1922–1929.
25. Borini A., Tarozzi N., Bizzaro D., Bonu M.A., Fava L., Flamigni C., Coticchio G. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART // *Hum Reprod*. – 2006. – 21, N 11. – P. 2876–2881.
26. Oleszczuk K., Giwercman A., Bungum M. Intra-individual variation of the sperm chromatin structure assay DNA fragmentation index in men from infertile couples // *Hum Reprod*. – 2011. – 26, N 12. – P. 3244–3248.
27. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 460 с.

ZHYLKOVA I.S.¹, FESKOV O.M.¹, BEZPECHNA I.M.¹, FEDOTA O.M.²

¹ *Center of Human Reproduction «Clinic of Professor Feskov O.M.»,
Ukraine, 61098, Kharkiv, Yelizarova str., 15, email: zhilkova@mail.ru*

² *Karazin's Kharkiv National University,
Ukraine, 61000, Kharkiv, Svobody Square, 4*

GENETIC FACTORS OF SPERMATOGENESIS FAILURES IN MEN WITH LOW REPRODUCTIVE FUNCTION

Aims. The correlation of DNA fragmentation level with classic sperm parameters, the male age and the level of immature spermatozoa and sperm aneuploidies was investigated. **Methods.** The level of the sperm DNA fragmentation was measured by the method of sperm chromatin dispersion. Semen aneuploidies were detected by the method of fluorescence in situ hybridization. The level of immature spermatozoa was measured by hyaluron binding assay. **Results.** There is a negative correlation between the DNA fragmentation level and sperm motility and sperm morphology. The significant negative correlation between DNA fragmentation level and immature spermatozoa level is proved. There is a negative correlation between the levels of DNA fragmentation and sperm aneuploidies. **Conclusions.** The failures of sperm DNA compactization influence on classic sperm parameters and correlates with the level of aneuploidies. There is a dependence of DNA fragmentation level on the male age. The critical clinically significant age for DNA fragmentation is 30 years old.

Key words: DNA fragmentation, aneuploidy, mature sperm, FISH.

УДК 616.379 – 008.64 – 053.2 / 5: 575

КОВАЛЕВА В.И., БУДРЕЙКО Е.А., ЧУМАК С.А.

ГУ «Институт охраны здоровья детей и подростков НАМН»,

Украина, 61153, г. Харьков, пр. 50-летия ВЛКСМ, 52-А, e-mail: iozdp@iozdp.org.ua

ИММУНОЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕТЕЙ, СТРАДАЮЩИХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ I ТИПА

Согласно определению экспертов ВОЗ, сахарный диабет (СД) является на сегодняшний день неинфекционной эпидемией. Если вначале 80-х годов прошлого века число больных СД было примерно 30 млн., то сегодня оно достигло более 366 млн., а по прогнозам экспертов Международной диабетической федерации и ВОЗ к 2030 году ожидается более 522 млн. [1]. Численность случаев СД I типа, что регистри-

руется ежегодно в мире, составляет 218000 лиц, ежегодный прирост заболеваемости детей равняется 3 % [2].

За последние два десятилетия достигнут некоторый прогресс в исследованиях генетических основ сахарного диабета. Так, сканирование выявило наличие различных хромосомных областей связанных с развитием сахарного диабета. Согласно генетической этиологии все

случаи заболеваемости диабетом делятся на 3 большие группы: моногенные, полигенные (около 90 % от всех случаев) и митохондриальные (связанные с мутациями в митохондриальной ДНК). Развитие моногенных форм обусловлено мутацией в одном гене. При полигенных формах влияние каждого гена, вовлеченного в развитие диабета, незначительна и генетическая предрасположенность определяется комбинацией аллелей многих генов. Полагают, что в развитие диабета I типа может быть вовлечено от 50 до 100 генов [3]. Известно также, что около 20 генов-кандидатов предрасположенности к СД I типа картировано на хромосоме 11p15 (IDDM2) и 6q15 (IDDM2); кроме того, ген инсулина – на хромосоме 11p15 (IDDM) [4]. В некоторых исследованиях было показано [5], что у человека, родившегося с генетической предрасположенностью, при встрече с провоцирующим фактором окружающей среды возникают иммунологические нарушения в β -клетках – инсулит, проявляющийся появлением аутореактивных Т-клеток и аутоантител, с постепенным разрушением β -клеток, снижением инсулиновой секреции и развитием СД I типа, когда уже погибают 90 % клеток.

В настоящее время накоплено достаточно данных о том, что у носителей мутаций манифестация диабета провоцируется факторами, которые вызывают снижение восприимчивости к инсулину. К ним относятся также и такие состояния, как период активного роста и полового созревания, избыточная масса тела, инфекционный процесс и другие [6].

Среди генетических факторов особое внимание привлекает исследование хромосомного аппарата у больных СД I типа. Данный вопрос изучается [7–10] для определения иммунореактивности организма человека, диагностики иммунодефицитных состояний, для оценки Т-клеточного иммунитета, а также – пролиферативной способности лимфоцитов, так как в активно делящихся клетках ассоциаций нет или они представлены двумя акроцентрическими хромосомами.

Изучение закономерностей образования ассоциаций акроцентрических хромосом (ААХ) человека давно привлекало к себе внимание ученых, однако, впервые этот феномен был описан в 1961 г. Fergusson-Smith и Handmaker и получил название «спутничная ассоциация». Авторы полагали, что если ядрышки в интерфазном ядре имеют тенденцию к слиянию, то этот процесс приводит к взаимной ориента-

ции и сближению коротких плеч акроцентрических хромосом. Данные М.А. Guichaona и соавт. (1986) также свидетельствуют в пользу «конъюгационной» гипотезе образования ААХ [9].

В работе [11], было показано, что у онкологических больных наблюдается повышенная ассоциативная способность хромосом, которая может приводить к нерасхождению акроцентрических хромосом в митозе, вследствие чего могут возникать хромосомные перестройки (реципрокные транслокации, делеции и т.д.).

При изучении частоты вступления хромосом в ассоциации у больных ревматоидным артритом было установлено [12], что среднее число ассоциирующих акроцентрических хромосом на клетку у больных с ревматоидным артритом было в 1,7 раз ниже в сравнении со здоровыми сверстниками, что указывает на снижение пролиферативной активности Т-лимфоцитов.

Учитывая вышесказанное, исследование цитогенетических показателей в лимфоцитах периферической крови детей, больных СД I типа, является необходимым и актуальным, поскольку успешное лечение сахарного диабета определяет с одной стороны прогноз жизни пациентов, а с другой – снижение затрат для лечения этого тяжелого хронического заболевания.

Материалы и методы

Цитогенетическое исследование выполнено у 23 детей, больных СД I типа и у 40 практически здоровых сверстников. Культивирование лимфоцитов периферической крови проводили по стандартному методу [13]. Продолжительность культивирования с митогеном (Sigma Германия) составила 72 часа. Препараты хромосом окрашивали общепринятым способом GTG – методом с использованием красителя Гимза. От каждого пациента анализировали от 50 до 100 метафаз. Ассоциации акроцентрических хромосом (ААХ) оценивались с помощью критериев, разработанных К.Д. Zang и Е. Back (1968), которые основаны на специфичности расположения ассоциирующих акроцентрических хромосом (АХ) в метафазе: короткие плечи АХ ориентированы по отношению друг к другу и расположение между ними без учета спутников (сателлитов) не превышает размер длинного плеча хромосомы из группы G; при параллельной или дуговой ориентации осей хромосом центромеры ассоциирующих хромосом лежат на одной центромерной линии

(линия, проходящая через центромеру, перпендикулярна оси хромосом). Всего проанализировано 2213 метафаз у больных, страдающих СД I типа и 2319 пластинок у здоровых детей. В исследовании учитывались: уровень ААХ; среднее количество ассоциаций на клетку; общее и среднее число хромосом, участвующих в ассоциации (СЧААХ), распределение ассоциаций по их числу. Коэффициент СЧААХ рассчитывали как отношение общего количества хромосом, вступающих в ассоциации, к общему числу проанализированных клеток. Анализ метафазных пластинок проводили с помощью бинокулярного микроскопа фирмы Leica Galen III (Австрия), окуляр 15×, объектив 100×, бинокулярная насадка 1,25×. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакетов прикладных программ Excel, SPSS «Statistical 17,0».

Результаты и обсуждения

С учетом аутоиммунного характера сахарного диабета нами была определена динамика ассоциаций акроцентрических хромосом у больных, страдающих сахарным диабетом I типа, так как частота ААХ является важным показателем реактивности организма, отражающим активность лимфоидных клеток *in vivo*. Всего в ассоциации было вовлечено 1221 акроцентрическая хромосома. Процент клеток с ассоциациями составил $20,15 \pm 0,85$ %, а среднее количество ассоциаций на клетку – 0,55, что не превышало частоту данного показателя у здоровых лиц – 1,07 [10]. Среднее число ассоциирующихся акроцентрических хромосом (СЧААХ) на клетку составило – 1,81, что в 2,19 раза реже, чем у здоровых сверстников – 3,97 [10].

В анализируемых лимфоцитах периферической крови детей, страдающих СД I типа, частота класса лимфоцитов с различным числом ААХ значительно колебалась. Так, наиболее частыми были ассоциации, состоящие из двух АХ – $11,70 \pm 0,68$ %, затем ассоциации, состоящие из трех АХ – $4,02 \pm 0,45$ %, четырех АХ – $3,25 \pm 0,38$ %, пяти АХ $0,59 \pm 0,16$ %, шести – $0,41 \pm 0,14$ % и семи $0,14 \pm 0,08$ % ААХ. Более частое определение классов лимфоцитов с двумя и тремя ассоциирующимися акроцентрическими хромосомами (КЛ2, КЛ3) можно объяснить тем, что ААХ являются следствием слияния гомологичного ядрышкового материала в интерфазном ядре, поэтому большинство ассоциирующих групп состоит из двух и трех ААХ. При слиянии ядрышек между ЯОР

акроцентриков устанавливается связь, состоящая из белковых, РНК-ковых, ДНК-ковых нитей, причем она прочнее при ассоциации двух или трех, чем более хромосом [14].

Частота ААХ тесно связана с их иммунореактивностью. Наиболее тесно коррелируют с пролиферативной активностью лимфоцитов частота клеток с 0 и 2 ААХ (КЛ0 + 2), отражающая клеточную иммунореактивность, реально имеющуюся на момент обследования *in vivo*. Клетки с 3 и более ААХ (КЛ3 + 10) считаются неактивными, временно интактными, длительно рециркулирующими. У детей, страдающих СД I типа, выявлено снижение способности акроцентрических хромосом вступать в ассоциацию, что приводит, в свою очередь, к уменьшению частоты КЛ0 + 2 и свидетельствует о снижении иммунореактивности организма больных.

По данным [15], в периферической крови больных хламидийной инфекцией происходит перераспределение частот активных (КЛ0 + 2) и неактивных (КЛ3 + 10) лимфоцитов. Так, частота (КЛ0 + 2) увеличивалась и достигала достоверных отличий от показателей в группе больных вне обострения ($37,7 \pm 2,0$ % и $26,3 \pm 1,8$ % соответственно; $p < 0,01$) и здоровых лиц ($34,7 \pm 2,0$ и $29,6 \pm 1,9$ % соответственно; $p < 0,05$).

В группе обследованных больных количество активированных Т-лимфоцитов с двумя ассоциирующимися акроцентрическими хромосомами составило $11,70 \pm 0,68$ %, тогда как в популяционном контроле этот показатель равен $35,0 \pm 2,0$ % ($p < 0,001$) [10], что свидетельствует о снижении пролиферативной активности Т-лимфоцитов. Это позволило нам отнести детей, страдающих СД I типа, к лицам с вторичным иммунодефицитом.

Согласно литературным данным [10], основной причиной снижения частоты КЛ0 + 2 в периферической крови является перераспределение в организме активированных лимфоцитов и временное их депонирование в местах локализации антигенов и развития специфических иммунных реакций.

Выводы

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о более низкой, по сравнению со здоровыми сверстниками, ассоциативной способности акроцентрических хромосом у пробандов с СД I типа, что указывает на снижение иммунореактивности организма обследованных нами больных детей.

Литература

1. Кехіопуло Х.Ф. Оцінка взаємозв'язків між інсулінорезистентністю, ендотеліальною дисфункцією, дисліпідемією, вмістом адипонектину і С-реактивного білка // Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія. – 2013. – № 3 (44) – С. 41–46.
2. Никонова Т.П. Сахарный диабет 1-го типа и латентный аутоиммунный диабет взрослых (LADA): клинические, иммунологические и гормонально-метаболические аспекты // Международный эндокринологический журнал. – 2011. – № 7 (39). – С. 24–32.
3. Воронько О.С., Бодоев Н.В., Арчаков А.И. Использование SNP-маркеров для оценки индивидуальной генетической предрасположенности к сахарному диабету типа 1 и 2 // Биомедицинская химия. – 2007. – 53, вып. 4. – С. 373–384.
4. Болдырева М.Н., Хаитов Р.М., Дедов И.И., Богатова О.В., Гуськова И.А., Янкевич Т.Э., Зилов А.В., Осокина И.В., Евсеева И.В., Ганичева Л.Л., Кашенин М.Н., Алексеев Л.П. Новый взгляд на механизм HLA-ассоциированной предрасположенности к сахарному диабету 1-го типа. Теоретические и прикладные аспекты // Иммунология. – 2005. – № 6. – С. 324–329.
5. Титович Е.В. Молекулярно-генетические, иммунологические основы и перспективы профилактики сахарного диабета у детей // Проблемы эндокринологии – 2011. – № 1. – С. 9–18.
6. Рахимова Г.Н., Рахимова Д.А. HLA-антигены I класса в группе детей с повышенным риском развития инсулин зависимого сахарного диабета // Мед. иммунология. – 2002. – № 4–5. – С. 633–636.
7. Лебединская Л.А. Изменение вещественного компонента информационно-генетической системы организма у больных рецидивирующим генитальным герпесом // Дерматология и венерология – 2002. – № 4 (18). – С. 52–56.
8. Стабровская Н.В. Функциональная активность рибосомальных генов при детских аллергиях: автореф. дисс.... канд. биол. наук. – Москва, 2010. – 18 с.
9. Храмов А.В., Иванов В.П., Трубникова Е.В., Стабровская Н.В., Бачинский О.Н., Кохтенко Е.В. Многомерный анализ функциональной активности рибосомальных генов при хронической обструктивной болезни легких // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 5. – С. 369–373.
10. Фролов А.К., Арцимович Н.Г., Сохин А.А. Иммуноцитогенетика. – М.: Медицина, 1993. – 240с.
11. Трубникова Е.В. Эпидемиология, цитогенетические эффекты и фенотипические особенности у больных со злокачественными лимфомами: дисс....канд. биол. наук. – Курск, 2006. – 173 с.
12. Багацкая Н.В., Медзяновская Е.В. Особенности ассоциирования акроцентрических хромосом у больных ревматоидным артритом // Вісник ХНУ ім. В.Н. Каразіна. Серія Біологія. – 2011. – Вип. 14, № 971. – С. 71–76.
13. Зерова-Любимова Т.Е., Горовенко Н.Г. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини: методичні рекомендації. – К., 2003. – 25 с.
14. Микельсаар В.И. Структурный полиморфизм хромосом человека: автореф. дисс.... д-ра биол. наук. – М., 1979. – 42 с.
15. Мавров И.И., Лебединская Л.А. Состояние информационно-генетической системы организма больных хламидийной инфекцией // Архив клинической и экспериментальной медицины. – 2003. – 12, № 2. – С. 222–226.

KOVALEVA V.I., BUDREYKO E.A., CHUMAK S.A.

*SI "Institute for Children and Adolescents Health Care of the NAMS of Ukraine",
Ukraine, 61153, Kharkiv, pr. 50-letya VLKSM, 52-A, e-mail:iozdp@iozdp.org.ua*

IMMUNOCYTOGENETIC CHARACTERISTICS IN CHILDREN WITH TYPE I DIABETES MELLITUS

Aims. The purpose of our study was to assess associative ability of acrocentric chromosomes (AC) in the peripheral blood lymphocytes of patients with type I diabetes mellitus. **Methods.** The analysis technique was performed according to the standard semimicromethod. Associations of acrocentric chromosomes (AAC) were assessed using D. Lang and E. Back (1968) criteria. **Results.** The results obtained have demonstrated that the number of activated T- lymphocytes with two AAC in children, suffering from type I diabetes, is 11.70 %, whereas in the population control this finding comes to 35.0 %. The average number of AAC per one cell in our patients was 2.19 less frequent than that in healthy age-matched persons and amounted to 1.81 vs. 3.97. **Conclusions.** The findings of our study indicate a lower associative ability of AC in probands with type I diabetes, which allows our authors to refer them to the persons with secondary immunodeficiency.

Key words: type I diabetes mellitus, children, acrocentric chromosomes, associations.

УДК 548.33:575.113.1:576.38:314.1(477)
ЛЕВКОВИЧ Н.М.¹, ГОРОВЕНКО Н.Г.^{1,2}

¹ ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН»
Україна, 04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67, e-mail: levkovich83@mail.ru

² Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика
Україна, 04112, м. Київ, вул. Дорогожицька, 9, e-mail: medgen2006@mail.ru

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ НАСЕЛЕННЯ УКРАЇНИ ЗА ПОЛІМОРФНИМИ ВАРІАНТАМИ ГЕНІВ СИСТЕМИ ДЕТОКСИКАЦІЇ КСЕНОБІОТИКІВ

На організм людини постійно впливають несприятливі фактори навколишнього середовища, в тому числі чужорідні сполуки – ксенобіотики. Природні та синтезовані хімічні речовини, що містяться в повітрі, воді, їжі, у лікарських засобах (ЛЗ) є потенційними мутагенами, канцерогенами та тератогенами [1]. В цілому, токсична дія ксенобіотиків на живі організми визначається їх здатністю порушувати процеси життєдіяльності, що може бути причиною розвитку різних захворювань. Провідну роль в захисті організму від дії ксенобіотиків відіграє система детоксикації ксенобіотиків (ДК) [2].

Система ДК здійснює ферментативне перетворення чужорідних речовин (екзотоксинів, ЛЗ, канцерогенів та ін.) в полярні водорозчинні метаболіти, що легко виводяться з організму. Система захисту організму від ксенобіотиків є трьохетапним процесом: I фаза – реакції біотрансформації здійснюються, головним чином, ізоферментами цитохрому Р-450, в процесі яких відбувається приєднання до ксенобіотиків нових або модифікація наявних функціональних груп (наприклад, -ОН, -NH₂, -SH), що робить ксенобіотики більш гідрофільними і забезпечує їх активацію; II фаза – синтетичні реакції: кон'югація (приєднання) ксенобіотиків та/або їх метаболітів з ендogenous речовинами, в результаті чого утворюються гідрофільні кон'югати; III фаза або фаза евакуації – активна секреція ксенобіотиків та/або їх метаболітів у сечу чи жовч (здійснюється за допомогою глікопротеїну-Р, транспортерів органічних аніонів (ОАТР-С, ОАТ-1, ОАТ-3) і катіонів (ОСТ-1)). Особливості роботи системи ДК визначаються унікальним для кожної людини поєднанням поліморфних варіантів генів відповідних ферментів, що призводить до різної адаптаційної здатності, тобто стійкості або чутливості індивідів до впливу пошкоджуючих зовнішніх чинників [3]. Наявність мутантних варіантів генів ферментів ДК та транспортерів ЛЗ може бути причиною несприятливих реакцій у відповіді організму

людини на дію ксенобіотиків та призводити до виникнення захворювань.

Частота тих чи інших поліморфних варіантів генів ДК в популяціях людини суттєво залежить від їх етнічної приналежності. Тому знання про етнічні/популяційні варіації поліморфних варіантів генів ДК може мати вирішальне значення для виявлення, в конкретних популяційних групах, ризику розвитку небажаних лікарських реакцій і патологічних станів, пов'язаних з порушенням роботи цієї системи.

Обрані нами, на основі попереднього аналізу літературних даних, поліморфні варіанти генів *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* та *MDR1* є ключовими в процесах біотрансформації, метаболізму і транспорту основних груп ЛЗ, що широко застосовуються в практичній медицині. Частоти досліджуваних поліморфних варіантів цих генів у населення України раніше не вивчалися.

Ген *CYP2D6* (ОМІМ *124030) локалізований на хромосомі 22q13.1. В гені *CYP2D6* для населення Європи найбільш часто визначається алельний варіант *4 – однонуклеотидна заміна G1934A (rs3892097) на межі 3 інтрону та 4 екзону наявність якої приводить до некоректного сплайсингу мРНК, результатом чого є зміщення рамки зчитування, передчасне завершення трансляції та утворення дефектного білкового продукту позбавленого ферментативної активності [4].

Ген *CYP2C19* (ОМІМ *124020) локалізований на хромосомі 10q24.-q24.3. Алельний варіант *2 гена *CYP2C19* (rs4244285), характерний лише для європейців, утворюється заміною гуаніну (G) на аденін (A) в позиції 681 п'ятого екзону «дикого» типу (G681) і утворює аберантний сайт сплайсингу [5]. Ця однонуклеотидна заміна приводить до зсуву рамки зчитування мРНК починаючи з 215 амінокислотного залишку та передчасно створює стоп-кодон на 20 амінокислотних залишки раніше, результатом чого є усичений, нефункціональний білок.

Ген *CYP2C9* (ОМІМ *601130) локалізований на хромосомі 10q24 та кодує протеїн (ензим) *CYP2C9*. Відомо два алельні варіанти значимі для білого населення Європи: *2 і 3. Алель *1 є «диким» типом і кодує нормальний протеїн. Алель *2 містить заміну С430Т, що приводить до заміни аргініну на цистеїн в положенні 144 амінокислотної послідовності (R144C, rs1799853). Алель *3 визначається нуклеотидною заміною А1075С, що приводить до заміни лейцину на ізолейцин в положенні 359 амінокислотної послідовності (I359L, rs1057910). Обидва варіанти асоційовані з достовірним зниженням ферментативної активності [6].

Ген *MDR1*, який локалізований на хромосомі7 (7q21.1), кодує глікопротеїн Р (P-gp) – активний транспортер. Р-глікопротеїн експресується головним чином в тих органах і тканинах, на які вливають токсичні або потенційно токсичні для організму речовини та їх продукти: наднирниках, кишковнику, печінці, нирках, мозку, клітинах крові [7] та приймає участь в активному транспорті широкого кола ЛЗ. Доведено, що поліморфізм С3435Т (rs1045642) в 26 екзоні впливає на експресію Р-gp [8].

Визначення частот генотипів за найбільш поширеними поліморфними варіантами генів системи ДК (*CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* та *MDR1*) у населення України є необхідним підґрунтям для практичного впровадження індивідуалізації застосування ЛЗ, які метаболізуються ферментами, що кодуються цими генами, та при розрахунку ризику розвитку мультифакторних захворювань.

Матеріали і методи

Для визначення частоти поліморфних варіантів генів *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* у населення України було сформовано групу дослідження, що представлена 918 особами української національності обох статей, віком від 0 до 98 років (середній вік – 48,43 ± 0,62 років).

Генотипування за поліморфними варіантами С430Т, А1075С, G681А, G1934А та С3435Т генів *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *MDR1* проводили методами алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції (*CYP2C9*) та поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (*CYP2C19*, *CYP2D6* та *MDR1*). Детекцію продуктів алель-специфічної ампліфікації та ПДРФ проводили методом горизонтального електрофорезу в 2 % агарозному гелі. Статистичну обробку отриманих результатів

проводили з використанням пакету прикладних програм Statistica 10.0 фірми StatSoft Inc. (США) і MS Excel. Для оцінки відповідності розподілу генотипів очікуваним значенням при рівновазі Харді-Вайнберга в вибірці та порівняння з частотами алелів і генотипів різних груп використовували критерій χ^2 Пірсона. У випадках, коли об'єм вибірки не перевищував 10, застосовували критерій χ^2 з поправкою Йетса. Для всіх видів аналізу різницю вважали статистично достовірною при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

В результаті проведеного дослідження визначено частоти генотипів та алелів за поліморфними варіантами зазначених генів у населення України та їх порівняльному аналізу з частотами різних популяцій, в яких проводились подібні дослідження.

Було встановлено наступні частоти генотипів за поліморфним варіантом G1934А гена *CYP2D6*: 1934GG – 64,93 %, 1934GA – 31,26 %, 1934AA – 3,81 %. Частота алелів становила $p_G = 0,81$ та $q_A = 0,19$. Розраховано спостережувану ($H_o = 0,3126$) та очікувану ($H_e = 0,3137$) гетерозиготність за досліджуваним поліморфним варіантом, які достовірно не відрізнялись.

Визначена нами частота алелів за поліморфним варіантом G1934А гена *CYP2D6* була близькою до частот встановлених для представників Росії, Башкортостану та Португалії ($p > 0,05$), є достовірно нижчою за таку в популяціях Польщі ($p < 0,01$) і Данії ($p < 0,02$) та достовірно вищою, ніж у представників населення азіатських країн ($p < 0,0000001$).

При генотипуванні за поліморфним варіантом G681А гена *CYP2C19* нами було отримано частоти генотипів: 681GG – 76,91 %, 681GA – 21,13 %, 681AA – 1,96 %. Було розраховано, що частота алелів становила $p_G = 0,8747$ та $q_A = 0,1253$. Величини спостережуваної та очікуваної гетерозиготності $H_o = 0,2113$ та $H_e = 0,2189$ достовірно не відрізнялись ($p > 0,05$). Виявлено достовірні гендерні відмінності в частоті генотипів за поліморфним варіантом G681А гена *CYP2C19*, так генотип 681GG достовірно частіше зустрічається у осіб чоловічої статі [$\chi^2 = 4,59$, $p = 0,03$], а генотип 681AA – у осіб жіночої статі [$\chi^2 = 3,95$, $p = 0,04$]. Подальший аналіз виявив, що у чоловіків достовірно частіше зустрічається алель 681G, ніж у жінок [$\chi^2 = 6,34$, $p = 0,01$].

При порівняльному аналізі частоти алелів 681G та 681А гена *CYP2C19* у населення України та представників інших популяційних

груп було визначено, що частота поширення алелю 681А гена *CYP2C19* у населення України близька за значенням, характерним для представників країн Європи, Канади та Єгипту ($p > 0,05$), достовірно вища від таких в популяціях Саудівської Аравії ($p < 0,00001$), Колумбії ($p < 0,003$) і Гани ($p < 0,0005$), та достовірно нижча від показників, характерних для населення Індії ($p < 0,00001$), Китаю ($p < 0,00001$) та Австралії ($p < 0,00001$).

При генотипуванні за поліморфним варіантом С430Т гена *CYP2C9* отримано наступні частоти генотипів: 430СС – 84,86 %, 430СТ – 13,18 %, 430ТТ – 1,96 %. Для поліморфного варіанту А1075С гена *CYP2C9*, частоти генотипів були такими: 1075АА – 85,51 %, 1075АС – 14,05 %, 1075СС – 0,44 %. 11 (1,2 %) обстежених були ідентифіковані як компаундні гетерозиготи і мали генотип 430СТ/1075АС. Частота алелів становила $p_{430C} = 0,9145$ і $q_{430T} = 0,0855$ та $p_{1075A} = 0,9254$ і $q_{1075C} = 0,0746$. При співставленні теоретично очікуваних частот генотипів з фактично одержаними було виявлено статистично достовірну різницю для генотипу 430ТТ [$\chi^2 = 4,06$, $p = 0,02$]. Для поліморфного варіанту С430Т гена *CYP2C9* спостережувана і очікувана гетерозиготність складала 0,1318 та 0,1557 відповідно, а для поліморфного варіанту А1075С гена *CYP2C9* – $H_o = 0,1405$, а $H_e = 0,1383$.

Аналіз частоти алелів за досліджуваними поліморфними варіантами гена *CYP2C9* дозволив встановити, що алель «дикого типу» переважав у представників всіх груп порівняння. Алель 430Т був відсутній у азіатів. У представників Іспанії ($p < 0,0009$), Єгипту ($p < 0,02$) та Ірану ($p < 0,00001$) зустрічався достовірно частіше, а у афро-американців ($p < 0,003$) і канадських індіанців ($p < 0,006$) – достовірно рідше ніж у нашому дослідженні. Алель 1075С достовірно частіше, в порівнянні з українцями, зустрічався лише у населення Туреччини ($p < 0,01$), в той час як для населення азіатських країн ($p < 0,00001$), Ірану ($p < 0,00001$) та афро-американців ($p < 0,0002$) частота алелю 1075С була достовірно нижчою, ніж у нашому дослідженні. Для населення України частота алелів за поліморфними варіантами С430Т і А1075С гена *CYP2C9* достовірно не відрізнялась від даних, отриманих дослідниками для населення інших європейських країн ($p > 0,05$), таких як Росія, Британія, Італія та Швеція.

За результатами генотипування за поліморфним варіантом С3435Т гена *MDR1*

було отримано наступні частоти генотипів: 3435СС – 22,55 %, 3435СТ – 50,65 %, 3435ТТ – 26,80 %. Частота алелів становила $p_C = 0,4787$ та $q_T = 0,5212$. Рівні спостережуваної і очікуваної гетерозиготності склали 0,5056 та 0,4989 відповідно.

Проведена порівняльна оцінка частоти алелів за поліморфним варіантом С3435Т гена *MDR1* між населенням України та іншими популяційними групами показала, що частота алелю 3435Т в нашому дослідженні подібна до частоти у турків, португальців та білого населення Англії й Німеччини ($p > 0,05$) і є достовірно вищою, ніж у жителів південно-західної Азії ($p < 0,0001$), та достовірно нижчою, ніж у афро-американців ($p < 0,0001$), населення центральної Польщі ($p < 0,001$) та Японії ($p < 0,0001$).

Таким чином, відмінності в розподілі частот алелів та генотипів в залежності від статі було виявлено лише для поліморфного варіанту G681А гена *CYP2C19*. У всіх вікових підгрупах дослідження не спостерігалось достовірної різниці в розподілі частот генотипів та алелів ($p > 0,05$). Теоретичне число генотипів за всіма поліморфними варіантами, окрім С430Т гена *CYP2C9* достовірно не відрізнялось ($p > 0,05$) від фактично отриманих частот згідно рівняння Харді-Вайнберга.

Було проведено аналіз комбінацій генотипів п'яти досліджуваних поліморфних варіантів, який показав, що у населення України виявлено лише 68 комбінацій з 243 можливих. Серед них найчастішою була комбінація: *CYP2D6*1934GG / *MDR1*3435СТ / *CYP2C9*430СС / *CYP2C9*1075АА / *CYP2C19*681GG, яка спостерігалась у 159 (17,32 %) осіб групи дослідження. Виявлено, що 5 сполучень не зустрічаються у осіб жіночої статі, а 23 – у осіб чоловічої статі. Комбінації генотипів *CYP2D6*1934GG / *MDR1*3435СТ / *CYP2C9*430СС / *CYP2C9*1075АА / *CYP2C19*681GA [$\chi^2 = 4,77$, $p = 0,02$] та *CYP2D6*1934GG / *MDR1*3435СТ / *CYP2C9*430ТТ / *CYP2C9*1075АА / *CYP2C19*681GG достовірно частіше зустрічались у осіб чоловічої статі [$\chi^2 = 3,91$, $p = 0,04$].

Висновки

Нами здійснено визначення частоти генотипів за найбільш поширеними поліморфними варіантами генів системи ДК та транспортера Р-глікопротеїна у населення України. Отримані дані ще раз підтверджують доцільність використання перерахованих поліморфних варіантів для дослідження в якості

прогностичних фармакогенетичних маркерів при індивідуалізації терапії певними ЛЗ. Зважаючи на те, що досліджувані гени можуть

змінювати ризик мультифакторних захворювань можна проводити їх аналіз при розрахунку ризику розвитку патологічних станів.

Література

1. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины / Под ред. В. С. Баранова. – СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. – 528 с.
2. Бочков Н.П. Наследственные болезни. Национальное руководство / Н.П. Бочков. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 936 с.
3. Zienolddiny S., Skaug V. Single nucleotide polymorphisms as susceptibility, prognostic, and therapeutic markers of nonsmall cell lung cancer // *Lung Cancer: Targets and Therapy*. – 2012. – 3. – P. 1–4.
4. Sachse N., Brockmoller J., Bauer S., Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences // *Am. J. Hum. Genet.* – 1997. – 60, N 2. – P. 284–295.
5. S.M. de Morais, Wilkinson G.R., Blaisdell J. et al. The major genetic defect responsible for polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans // *J. Biol. Chem.* – 1994. – 269 (22). – P. 15419–15422.
6. Funk M., Endler G., Freitag R. et. al CYP2C9*2 and CYP2C9*3 Alleles Confer Lower Risk for Myocardial Infarction // *Clinical Chemistry*. – 2004. – 50 (12). – P. 2395–2398.
7. Сычев Д.А., Игнатъев И.В., Раменская Г.В., Колхир С.В., Кукес В.Г. Значение полиморфизма гена MDR1, кодирующего гликопротеин-P для индивидуализации фармакотерапии // *Клиническая фармакология и терапия*. – 2005. – N 14 (1). – С. 1–5.
8. Hoffmeyer S., Burk O., O. von Richter, Arnold H.P., Brockmoller J., Johne A., Cascorbi I., Gerloff T., Roots I., Eichelbaum M., Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2000. – 97 – P. 3473–3478.

LEVKOVICH N.M.¹, GOROVENKO N.G.²

¹ State Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS of Ukraine, Ukraine, 04114, Kyiv, Vyshhorodska str., 67, e-mail: levkovich83@mail.ru

² Shupyk National Medical Academy Of Postgraduate Education, Ukraine, 03112, Kyiv, Dorogozhytska str., 9, e-mail: medgen2006@mail.ru

GENETIC STRUCTURE CHARACTERISTICS OF POLYMORPHIC VARIANTS XENOBIOTICS DETOXIFICATION SYSTEM GENE IN UKRAINIAN POPULATION

Aims. Determine the genotype frequencies for the most prevalent polymorphic variants of xenobiotic detoxification genes (*CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* and *MDR1*) in the Ukrainian population for the practical implementation of drugs individualizing use and in the calculation of the multifactorial diseases risk.

Methods. 918 Ukrainian were genotyped for major polymorphic variants of xenobiotic detoxification genes. Genotyping was performed using of allele-specific polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) methods. **Results.** Provided data characterizing the genotypes frequency of the studied polymorphic variants of *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* and *MDR1* genes in the Ukrainian population. It's proved the absence of significant differences in the distribution of received genotype frequency compared with other Europeans. **Conclusions.** Obtained data justify the use of listed polymorphic variants for study as prognostic pharmacogenetic markers in individualizing drugs therapy.

Key words: gene polymorphism, detoxification.

УДК 575:572:152.9

ЛУЧКО Е.Н.

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Украина, 61022, г. Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: ekaterina_luchko@mail.ru

ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ В ПРОЯВЛЕНИИ АГРЕССИВНОСТИ И ЭМПАТИИ У ЖИТЕЛЕЙ УКРАИНСКОГО МЕГАПОЛИСА

Агрессивность является одной из центральных характеристик личности, которая возникла в эволюции для успешной борьбы за ограниченные ресурсы, гарантируя, таким

образом, выживание вида [1]. Под агрессивностью понимают любую форму поведения, нацеленного на оскорбление или причинение вреда другому живому существу, не желающему подобного обращения [2]. Одни исследователи рассматривают агрессивность как важную адаптационную характеристику поведения индивида, другие трактуют агрессивность исключительно как деструктивное свойство личности, которое отражает его врожденно-биологические или социально-приобретенные особенности [3].

Эмпатия как эмоциональная единица была введена сравнительно недавно и является тем понятием, которое недостаточно изучено в области экспериментальной психологии и генетики. Под эмпатией понимают временное проживание в жизни другого человека, осторожное перемещение в ней без того, чтобы делать какие-то оценки [4]. Способность к эмпатии имеет важнейшее значение в развитии социальных навыков личности. В современной литературе по генетике поведения человека имеется очень скудная информация о данной проблеме [5]. Учёные не пришли к единому мнению, являются ли эмпатические реакции врожденными или они приобретаются в ходе развития, но их раннее появление в онтогенезе не подлежит сомнению [4].

Изучение биологических основ агрессивности и эмпатии является актуальным вопросом, поскольку агрессивность и снижение способности к сочувствию характерно для различных психосоматических заболеваний, в частности для психопатий. В свою очередь, люди, страдающие психопатиями, чаще проявляют антисоциальное поведение, склонны к насилию в семье и даже преступлениям. Данные о связи между эмпатией и агрессивностью в населении Украины вообще отсутствуют, что тормозит дальнейший углублённый генетический анализ этих характеристик. Цель данного исследования: выяснить, как связаны показатели эмпатии и агрессивности у мужчин и женщин – жителей восточно-украинского мегаполиса.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 1493 жителя города Харькова в возрасте 45–65 лет (637 мужчин и 856 женщин), давших информированное согласие на анкетирование при условии конфиденциальности. Для оценки уровня агрессивности использован опросник Ассингера [6], для оценки уровня эмпатии – опросник Меграбяна-Эпштейна [6]. Сформированные группы сравнения не различались

средним возрастом и его дисперсией. База данных сформирована в программе Microsoft Excel. Расчёты выполнены в программе Statistica. Проверка распределения данных на соответствие закону Гаусса проведена методом Колмогорова-Смирнова. Распределение показателей агрессивности и эмпатии значительно не отличались от нормального, что дало возможность применить параметрические методы статистики. Рассчитаны средние арифметические \bar{x} , стандартные отклонения s , статистические ошибки средних арифметических $S_{\bar{x}}$ доверительные интервалы средних арифметических, коэффициент корреляции Пирсона r . Сравнение средних арифметических проводилось с помощью непарного критерия Стьюдента t . Проверку статистических гипотез проводили на уровне значимости 0,05 [7].

Результаты и обсуждение

Изучение популяционного распределения поведенческих признаков является необходимым предварительным этапом разностороннего генетического анализа, в том числе генеалогического и молекулярный.

Проведённое исследование показало, что между возрастом и агрессивностью как у женщин, так и мужчин нет статистически значимой связи ($r = 0,05$ у мужчин и $r = -0,22$ у женщин; $p < 0,05$, табл. 1). Не наблюдается также статистически значимой связи между возрастом и эмпатией ($r = -0,04$ у мужчин и $r = -0,21$ у женщин; $p < 0,05$, табл. 1). Полученные нами данные не противоречат тому известному факту, что черты темперамента к 20 годам стабилизируются и с возрастом не меняются, поскольку большинство отделов головного мозга, отвечающих за черты темперамента, формируются именно к этому возрасту и далее остаются относительно стабильными [8].

В изученном нами населении средний бал агрессивности у мужчин немного выше ($\bar{X}_{\text{муж.}} = 40,0$), чем у женщин ($\bar{X}_{\text{жен.}} = 38,9$; $p < 0,05$; табл. 2), что согласуется с общепринятым мнением, что у мужчин агрессивность выражена сильнее, чем у женщин [2]. Известно, что женщины рассматривают агрессию как средство выражения гнева и снятия стресса, а мужчины, напротив, относятся к агрессии как к инструменту, считая её моделью поведения, к которому прибегают для получения разнообразного социального и материального вознаграждения [2]. Отмечено, что уровень эмпатии, как правило, выше у женщин, чем у мужчин [9].

В нашем населении выраженность эмпатии у мужчин значимо выше, чем у женщин ($\bar{X}_{\text{муж}} = 5,4$ и $\bar{X}_{\text{жен}} = 4,8$; $p < 0,05$, табл. 2). Одной из возможных причин этого факта может быть «маскулинизация» женского населения, связанная с выполнением женщинами мужских функций (в связи с распространением неполных семей). Кроме того, можно предположить, что у мужчин происходит изменение гормонального фона под действием загрязнений окружающей среды (красители, многие консерванты и др.), которые по химическому составу сходны с эстрогеном [10]. Нарушения гормонального фона в свою очередь могут приводить к изменению личностных характеристик.

Полученный нами результат об отсутствии у данной когорты связи между возрастом с одной стороны и эмпатией и агрессивностью с другой позволяет сделать важный методологический вывод, касающийся продолжения исследований. Отсутствие

корреляционной связи между возрастом и исследованными поведенческими признаками избавляет от необходимости в данном возрастном интервале строго подбирать группы по возрасту.

Это однако, не означает, что на формирование личностных характеристик, как агрессивность и эмпатия не влияют социальное положение, воспитание, демографический статус и генетические факторы.

Выводы

1. У мужчин и женщин в возрасте 45–65 лет уровень эмпатии и агрессивности не зависит от возраста.

2. Средний бал агрессивности у мужчин выше чем у женщин ($\bar{X}_{\text{муж.}} = 40,0$; $\bar{X}_{\text{жен.}} = 38,9$). По уровню эмпатии мужчины также превосходят женщин ($\bar{X}_{\text{муж.}} = 5,4$ и $\bar{X}_{\text{жен.}} = 4,8$; $p < 0,05$).

Таблица 1. Коэффициенты корреляции (r) между показателями агрессивности, эмпатии и возрастом

Показатели	Мужчины	Женщины
Агрессивность	0,05	-0,22
Эмпатия	-0,04	-0,21

Примечание: r – коэффициент корреляции Пирсона.

Таблица 2. Характеристики распределения общей агрессии по Ассингеру и эмпатии по Меграбяну-Эпштейну

Статистики	Агрессивность		Эмпатия	
	мужчины	женщины	мужчины	женщины
n	637	856	637	856
\bar{X}	40,0	38,9	5,4	4,8
Me	40,0	39,0	5,0	5,0
Mo	39,6	38,2	5,0	5,0
min	31,0	27,0	1,0	1,0
max	47,0	49,0	10,0	10,0
s	3,1	3,3	2,1	2,1
S_x	0,3	0,4	0,1	0,2
As	-0,27	-0,32	0,42	0,18
Ex	0,22	0,28	-0,15	-0,54
95 % ДИ	39,75-40,25	38,67-39,13	5,23-5,56	4,65-4,84

Примечание. n – число обследованных, \bar{X} – среднее арифметическое, Me – медиана, Mo – мода, min – минимальное значение, max – максимальное значение, s – стандартное отклонение, S_x – ошибка среднего арифметического, As – асимметрия, Ex – эксцесс, 95 % ДИ – 95 % доверительный интервал.

Литература

1. Филиппова О.В. Популяционно-генетический анализ поведенческих признаков: опыт изучения населения Украины: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – К.: 2009. – 2 с.
2. Берон Р., Ричардсон Д. Агрессия. – СПб.: Питер, 2001. – 352 с.

3. Берковиц Л. Агрессия. Причины, последствия, контроль. – СПб.: Прайм-Еврознак, 2007.
4. Гаврилова Т.П. Понятие эмпатии в зарубежной психологии. Исторический обзор и современное состояние проблемы // Вопросы психологии. – 2005. – № 2. – С. 147–156.
5. Kose S.A Psychobiological model of temperament and character: TCI // Yeni Symposium. – 2003. – N 41 (2). – P. 86–97.
6. Психологические тесты: в 2 т. / [ред. А.А. Карелин]. – М.: Гуманит. изд. центр ВЛАДОС, 2002. – 1. – 312 с.
7. Елисеев Ю.Ю., Бочанова Е.В., Гейслер Д.А., Гитун Т.В. Психосоматические исследования. – Москва: Высшая школа, 2003. – 369 с.
8. Паренко М.К., Егорова Ю.В. Возрастные особенности организма человека. – Нижний Новгород: Нить Ариадны, 2011. – 36 с.
9. Decety J., Jackson P.L. The functional architecture of human empathy // Behavioral and Cognitive Neuroscience. – 2004. – Reviews 3. – P. 71–100.
10. Орлов Р.С., Ноздрачев А.Д. Нормальная физиология. – Москва: «ГЭОТАР-Медиа», 2006.

LUCHKO E.N.

V.N. Kharkiv National University,

Ukraine, 61022, Kharkiv, Svobody str., 4, e-mail: ekaterina_luchko@mail.ru

GENDER DIFFERENCE IN AGGRESSION AND EMPATHY BETWEEN UKRAINIAN HABITANTS

Aims. Studying of biological sleep of aggression and empathy is an important question because deviation of personal characteristics in this or that way may lead to different psychic states. In turn, people, suffering psychopathy, are able to show unsocial behavior (crime, violence, etc). Lack of information about the link between aggression and empathy in Ukrainian population restrains the further genetic analysis of these characteristics. **Methods.** 1493 Kharkiv citizens aged 45–65 (637 males and 856 females) took part in the studying. The Assinger’s questionnaire was used to estimate aggression, the Megrabyan – Epstein’s questionnaire was used to estimate empathy. **Results.** The empathy and aggression level in males and females aged 45–65 does not depend on age. The average male aggression point is higher than the female one. As for empathy males also exceed females. **Conclusions.** Such personal characteristics as aggression and empathy do not depend on age which does not mean that formation of those personal characteristics are not influenced by social status, upbringing, demographic status and genetic factors. In our population males are more aggressive than females. At the same time males are more apt to empathy than females.

Key words: gender, empathy, aggression, correlation.

УДК 575.17

МУСТАФАЕВА Л.А.¹, КОЗАК Н.А.²

¹ *Крымское республиканское учреждение «Медицинский центр по обслуживанию депортированных народов»,*

Украина, 95000, г. Симферополь, ул. Камская, 12а, e-mail: liliya.must@gmail.com

² *Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина,*

Украина, 61022, г. Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: kozaknatasha@mail.ru

РЕПРОДУКТИВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КРЫМСКОТАТАРСКИХ ЖЕНЩИН

Информация о генетических процессах в конкретных популяциях играет важную роль в понимании многих социально-демографических и медицинских проблем. Исследования, проведенные в экономически развитых странах, показали, что около половины человеческого генофонда в следующем поколении не воспроизводится из-за гибели эмбрионов, мёртворождений, неонатальной смертности и смертности до наступления репродуктивного

возраста, безбрачия и бесплодных браков [1]. Репродуктивное поведение женщин в значительной степени зависит от культурных традиций и различается у представителей разных этносов. Многонациональное население Украины в этом плане исследовано крайне слабо [2, 3]. В настоящее время в автономной республике Крым в связи с репатриацией повышается удельный вес крымских татар, культурные традиции которых сложились на

основе мусульманской религии. В настоящее время в Крыму проживает более 250 тысяч крымских татар [4], которые подразделяются на три субэтнуса: южнобережные, степные и горно-предгорные [5]. Исследования репродуктивных характеристик славянского и неславянского населения отдельных городов Украины, в том числе и Крыма, выявили некоторые их особенности [3]. При этом целенаправленное изучение крымскотатарского этноса ещё не проводилось. Целью данной статьи было изучение репродуктивного поведения крымскотатарских женщин с учётом субэтнической подразделённости.

Материалы и методы

Данные были собраны в 2013 г. в женской консультации Крымского республиканского учреждения «Медицинский центр по обслуживанию депортированных народов» (г. Симферополь). Проведено анонимное анкетирование женщин, находящихся в пострепродуктивном возрасте: от 45 до 90 лет. Анкета включала вопросы о годе рождения женщины, её национальности с учётом субэтнуса, а также национальности её родителей. Этническую принадлежность, записанную по самоидентификации, сверяли с родословной. Учитывалось количество беременностей и их исход: медицинские и спонтанные аборт, внематочные беременности, количество мёртворождений и живорождений.

Проведена проверка распределения числа беременностей и их исходов на соответствие закону Гаусса. Рассчитаны общезначимые статистики: среднее арифметическое (\bar{x}), стандартное отклонение (s), медиана (Me), мода (Mo) [6]. Сравнение средних арифметических для нормально распределяющих переменных проведено с использованием критерия t Стьюдента. Дисперсии сравнивались с помощью критерия Фишера F . Сравнение свободно распределяющихся переменных проведено с помощью критерия U Манна-Уитни. Сравнение групп по качественным признакам выполнено с помощью критерия χ^2 . Доли сравнивали после u -преобразования с использованием критерия F . В случае множественных сравнений вводили поправку Бонферрони [7]. Заключение относительно нулевых статистических гипотез принимали на уровне значимости 0,05.

Результаты и обсуждение

Распределение числа беременностей и их исходов у женщин в течение репродуктивного периода (рис.) свидетельствует о статистически значимых различиях между субэтнсами по

количеству беременностей и медицинских абортов. В среднем у крымскотатарской женщины за репродуктивный период было 3,6 беременностей (у представительниц степного и южного субэтносов 4,0, у представительниц предгорного 2,6, $p < 0.05$, рис., а). На одну женщину усреднено приходится менее одного медицинского аборта (один у южных и степных, 0,65 у предгорных, $p < 0,05$, рис., б). У крымскотатарской женщины за репродуктивный период происходит примерно 0,3 спонтанных аборта (рис., в), 0,04 внематочных беременности, 2,7 родов, 0,1 мёртворождений и 2,6 живорождений (рис., г).

В среднем 3 % крымских татарок не внесли вклад в генофонд следующего поколения. У южных татар доля таких женщин была наименьшей (2 %), у женщин степного и предгорного субэтносов, этот показатель примерно в два раза выше (4 %, табл., $p < 0,05$). Почти половина женщин (45 %) прибегали к искусственному прерыванию беременности: чаще всего южные татарки (54 %), реже степные (40 %) и предгорные (33 %, $p < 0,05$). Спонтанные аборт отметили в среднем 23 % женщин, и только одна указала на внематочную беременность, мёртворождения были в анамнезе 8,5 % женщин. Искусственно было прервано почти четверть беременностей (24 %), реализованные зиготы (роды) составили 69 %, остальные были утрачены в результате спонтанных и искусственных абортов.

Различия в смертности и плодовитости между разными группами населения определяют их естественный дифференциальный прирост [8]. Репродуктивные характеристики крымскотатарских женщин сравнили с аналогичными данными для славянских женщин (украинок и русских), проживающих в г. Евпатория (АО Крым) [3].

Сравнение выявило существенные статистически значимые отличия между этими группами населения. Так, генофонд крымскотатарского этноса воспроизводится более полно (97 %), чем генофонд славян (95 %). Славянки прибегали к искусственному прерыванию беременности почти в два раза чаще (83 %), чем татарки (45 %). Внематочные беременности отметили 0,5 % татарок, что в 14 раз реже, чем славянки (7 %). Процент искусственно прерванных беременностей у татарок в 2,4 раза меньше, чем у славянок (24 и 58 % соответственно).

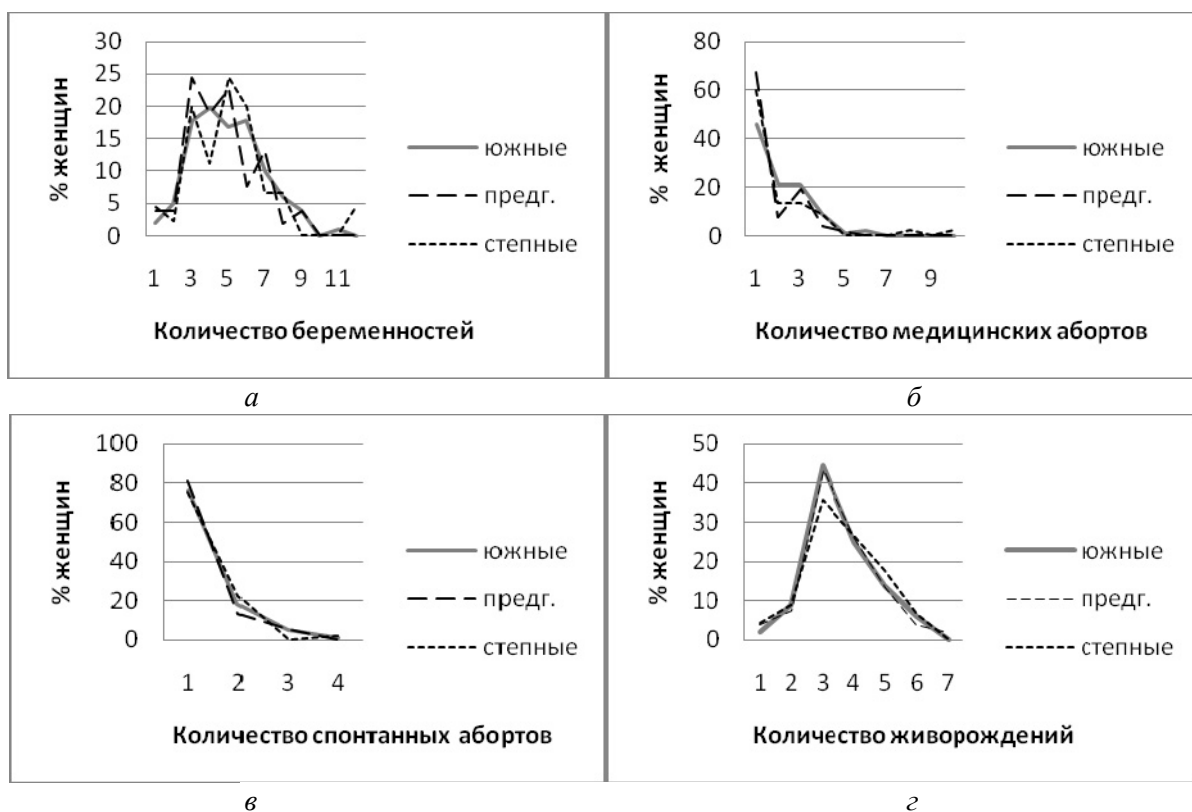


Рис. Распределение числа беременностей и их исходов (а – беременности, б – медицинские аборт, в – спонтанные аборт, г – живорождения)

Таблица. Репродуктивные характеристики

Показатель	Общая группа	Субэтноты		
		Южный	Предгорный	Степной
<i>Количество женщин (n):</i>	199	101	53	45
не имевших беременностей, %	3,0	2,0	3,8	4,4
не рожавших, %	3,0	2,0	3,8	4,4
имевших медицинские аборт, %	45,2	54,0	32,7	40,0
имевших спонтанные аборт, %	22,6	23,8	18,9	24,4
имевших внематочные беременности, %	0,5	0,0	1,9	0,0
имевших мертворождения, %	8,5	7,9	9,4	8,9
<i>Искусственно прерванные беременности, %</i>	23,7	25,8	17,8	25,0
<i>Реализованные зиготы, %</i>	68,8	66,5	74,9	67,4

Примечание: n – количество наблюдений

И, как следствие, доля реализованных зигот у татарок в два раза превышает этот показатель у славянок (69 % и 33 %). По количеству беременностей, славянки почти в полтора раза превосходят крымских татарок (5,3 и 3,6 соответственно), но, несмотря на большее количество беременностей, у славянок рождается меньше детей, чем у крымских татарок (в среднем 1,8 и 2,7 ребёнка соответственно). За репродуктивный период славянка делает в среднем три медицинских аборт, татарка 0,9. В настоящее время славянское население АО Крым характеризуется

суженным типом естественного воспроизводства, а крымскотатарское население – расширенным. Межэтнические различия в темпах естественного прироста могут изменить этнический и конфессиональный состав населения Крыма и, соответственно, структуру его генофонда.

Выводы

1. Исследование репродуктивного поведения крымскотатарских женщин разных субэтноты выявило статистически значимые различия по количеству беременностей и медицинских абортов.

2. Для крымскотатарского населения АО Крым характерно расширенное воспроизводство, в отличие от суженного у славянской части населения.

Авторы выражают благодарность проф. Л.А. Атраментовой за идею исследования и помощь в анализе данных.

Литература

1. Penrose L.S. Genetical aspects of human infertility // Proc. Roy. Soc. Ser. B. – 1963. – 159. N 974. – P. 93.
2. Атраментова Л.А., Федчун Л.И., Поволоцкий С.А. Дифференциальная плодовитость в харьковской популяции // Генетика. – 1993. – 29, № 3. – С. 520–530.
3. Атраментова Л.А., Мещерякова И.П., Филиппова О.В. Репродуктивные характеристики и индекс Кроу в различных группах населения Евпатории // Генетика. – 2013. – 49, № 12. – С.1398–1406.
4. Государственный комитет статистики Украины. Всеукраїнський перепис населення 2001. Русская версия. Результаты. Национальность и родной язык. – 2003 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://2001.ukrcensus.gov.ua/rus/results/>
5. Очерки истории и культуры крымских татар / кол. авт.: под ред. Э. Чубарова. – Симферополь: Крымучпедгиз, 2005. – 208 с.
6. Атраментова Л.А., Утевская О.М. Статистические методы в биологии. – Горловка: ЧП «Видавництво ліхтар», 2008. – 248 с.
7. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
8. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / под ред. Алтухова Ю.П. – М.: Наука, 2004. – 619 с.

MUSTAFAEVA L.A.¹, KOZAK N.A.²

¹ *Crimean Republican "Medical Center of deported peoples to service", Ukraine, 95000, Simferopol, Kamskaya str., 12a, e-mail: liliya.must@gmail.com*

² *V.N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine, 61022, Kharkiv, Svobody sq., 8, e-mail: kozaknatasha@mail.ru*

REPRODUCTIVE CHARACTERISTICS OF CRIMEAN TATAR WOMEN

Aims. Reproductive behavior of women largely depends on cultural traditions and differs in representatives of various ethnic groups. Multinational population of Ukraine has been scarcely researched. The purpose of this research is to study the reproductive characteristics of Crimean Tatar women. **Methods.** 200 women aged 45–90 have been examined. In the research the number of pregnancies, medical and spontaneous abortions ectopic pregnancies, stillbirths and live births have been found out. According to the listed indicators the women of the southern, steppe and mountain subethnoses were compared and also Crimean Tatar and Slavic women. **Results.** The average number of pregnancies among Crimean Tatar women– 3.6, abortions – 0.9, spontaneous abortions – 0.3, ectopic pregnancies – 0.04, stillbirths – 0.1, live births – 2.6. **Conclusions.** For the Crimean Tatar people characteristically enlarged reproduction of the population. **Key words:** Crimean Tatar, reproductive characteristics.

УДК 618.176 – 053.6: 575.1

НАЧЕТОВА Т.А.

Государственное учреждение «Институт охраны здоровья детей и подростков Национальной академии медицинских наук Украины»,

Украина, 61153, г. Харьков, пр. 50-летия ВЛКСМ, 52-А, e-mail: iozdp@iozdp.org.ua

ДЕРМАТОГЛИФИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У ДЕВОЧЕК-ПОДРОСТКОВ С РАЗЛИЧНЫМИ КЛИНИЧЕСКИМИ ВАРИАНТАМИ ВТОРИЧНОЙ АМЕНОРЕИ

В последние годы по-прежнему остается актуальной проблема, связанная с изучением различных аспектов вторичной аменореи (ВА) у девочек-подростков, что обусловлено постоянным ростом ее распространенности [1].

Выделяют следующие клинические варианты вторичной аменореи – ВА с менархе; ВА, возникающая после других нарушений менструального цикла; ВА, начавшаяся после длительного периода регулярных менструаций [2].

По критериям, предложенным Картером [3], ВА относится к мультифакториальным заболеваниям, при этом роль генетических факторов в ее формировании нуждается в уточнении. Одним из морфогенетических маркеров формирования различных заболеваний является дерматоглифика, которая широко используется в медицине еще с середины прошлого века. Вышеизложенное свидетельствует об актуальности использования дерматоглифических показателей в оценке генетической гетерогенности клинических вариантов ВА.

Целью настоящего исследования явилось изучение качественных дерматоглифических показателей у девочек-подростков с различными клиническими вариантами вторичной аменореи.

Материалы и методы

Для реализации поставленной цели у 102 больных с ВА 13–17 лет с ВА и у 50 девочек-подростков (ГК) того же возраста с регулярным менструальным циклом (МЦ) был проведен анализ дерматоглифических показателей (ДП) по методике, предложенной Н. Cummins, Ch. Midlo.

Пациентки с ВА были распределены на 3 группы: группа I (n = 32, менструации у девочки были не чаще, чем 1 раз в 6 месяцев), группа II (n = 48, возникновению ВА предшествовали различные нарушения МЦ), группа III (n = 22, до появления ВА МЦ был регулярным).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «Statgraphics Centurion». Для оценки достоверности различий в сравниваемых группах применяли метод углового преобразований Фишера.

У всех законных представителей больных с ВА и подростков из ГК, а также у девочек, достигших 14-летнего возраста, получены информированные согласия на проведение исследования. Проведение исследования одобрено Комитетом по биоэтике нашего института.

Результаты и обсуждение

У больных из группы I по сравнению с девочками из ГК чаще были зарегистрированы такие рисунки, как сложные узоры (C/Y) на I пальце (33,3 % и 12,0 %; Pф < 0,05), большие ульнарные петли (L^u) на III (76,7 % и 54,0 %; Pф < 0,05) и IV пальцах (66,7 % и 46,0 %; Pф < 0,05), завитки (W) на V пальце левой руки (26,7 % и 8,0 %; Pф < 0,05), окончания главной ладонной линии A в поле 5` (16,7 % и 4,0 %; Pф < 0,05) и линии B в поле 5`` (26,7 % и 10,0 %; Pф < 0,05) правой руки; главной ладонной линии A в поле

2 (43,2 % и 22,2 %; Pф < 0,05) на левой руке, сочетанный узор в виде ульнарных и карпальных дуг (A^u/A^c) на гипотенаре (30,0 % и 14,0 %; Pф < 0,05) правой руки, большие петли (L) на III межпальцевой подушечке (33,3 % и 8,0 %; Pф < 0,05), дополнительный пальцевый трирадиус (id) на IV межпальцевой подушечке левой руки (20,0 % и 2,0 %; Pф < 0,05).

В группе II по сравнению с девочками с регулярным МЦ значительно чаще наблюдались большие ульнарные петли (L^u) на II пальце левой руки (31,9 % и 10,0 %; Pф < 0,05), окончание главной ладонной линии D в поле 7 (17,0 % и 4,0 %; Pф < 0,05), отсутствие узора (0) на III межпальцевой подушечке (63,8 % и 40,0 %; Pф < 0,05), малые петли (l) на IV межпальцевой подушечке на правой руке (25,5 % и 8,0 %; Pф < 0,05), отсутствие узора (0) на III межпальцевой подушечке на левой руке (46,8 % и 28,0 %; Pф < 0,05).

У обследованных из группы III по сравнению с девочками из ГК чаще имели место рисунки (A^u/A^c) на гипотенаре левой руки, сложные узоры (C/Y) на I пальце левой руки (26,1 % и 10,0 %; Pф < 0,05), окончание главной ладонной линии A в поле 5` правой руки (21,7 % и 4,0 %; Pф < 0,05), окончание главной ладонной линии A в поле 4 левой руки (39,1 % и 20,0 %; Pф < 0,05), наличие различных рисунков на IV межпальцевой подушечке левой руки (78,3 % и 40,0 %; Pф < 0,05).

У девочек-подростков группы I по сравнению с пациентками группы II чаще регистрировались большие радиальные петли (L^r) на II пальце (20,0 и 2,1 %; Pф < 0,05), большие ульнарные петли (L^u) на III пальце (46,7 и 55,3 %; Pф < 0,05), завитки (W) на V пальце левой руки (26,7 и 8,5 %; Pф < 0,05), окончание главной ладонной линии A в поле 2 левой руки (43,3 и 10,9 %; Pф < 0,05), большие радиальные петли (L^r) на гипотенаре (20,0 и 6,3 %; Pф < 0,05), окончания главных ладонных линий C в поле 7 (41,3 и 17,5 %; Pф < 0,05) и D в поле 9 правой руки (43,3 и 21,7 %; Pф < 0,05).

У больных группы II чаще, чем у пациенток группы I выявлялись большие ульнарные петли (L^u) на II пальце левой руки (31,9 и 13,3 %; Pф < 0,05), окончание главной ладонной линии A в поле 4 (63,0 и 36,6 %; Pф < 0,05) и линии D в поле 7 левой руки (28,2 и 10,0 %; Pф < 0,05), сочетанный узор (L^r/A^c) на гипотенаре правой руки (25,5 и 6,7 %; Pф < 0,05), отсутствие узоров (0) на III межпальцевой подушечке правой руки (46,8 и 16,7 %; Pф < 0,05).

У пациенток группы I в отличие от девочек группы III чаще наблюдались сложные узоры (C/Y) на I пальце (33,3 % и 13,0 %; $P_f < 0,05$), большие радиальные петли (L^1) на II пальце (20,4 % и 4,3 %; $P_f < 0,05$), большие ульнарные петли (L^u) на III пальце (76,7 % и 47,8 %; $P_f < 0,05$) и реже – завитки (W) на III пальце левой руки (6,7 % и 30,4 %; $P_f < 0,05$).

В группе II чаще, чем в группе III выявлялись малые ульнарные петли (I^u) на III пальце правой руки (19,2 % и 4,3 %; $P_f < 0,05$) и окончание главной ладонной линии B в поле 5' левой руки (26,1 % и 8,7 %; $P_f < 0,05$) и реже – малые радиальные петли (I^1) на II пальце левой руки (2,1 % и 17,4 %; $P_f < 0,05$), завитки (W) на III пальце левой руки (12,8 % и 30,4 %; $P_f < 0,05$) и окончание главной ладонной линии A в поле 2 левой руки (10,9 % и 30,4 %; $P_f < 0,05$).

В наших предыдущих работах было показано, что девочки-подростки с различными клиническими вариантами ВА характеризуются неодинаковой частотой позднего и раннего менархе, отставанием развития вторичных половых признаков, отклонением индекса массы тела от нормативных показателей, гирсутизмом, наследственной отягощенностью по нарушениям менструальной функции, отличительными особенностями в перинатальном анамнезе и гормональном обеспечении [4–6].

Можно предположить, что клинический полиморфизм связан с разнообразием дерматоглифической картины, в связи с тем, что на ее формирование наряду с половой, расовой и этнической принадлежностью, оказывают

влияние морфогенетические факторы изменчивости тканевого уровня, в частности, нейтральный и сосудистый, а также генетические факторы [7].

В литературных источниках приводятся сведения о связи дерматоглифических показателей с физическим потенциалом и адаптационными возможностями [8–10]. Выделены характерные дерматоглифические комплексы для прогнозирования формирования задержки полового развития, гиперандрогении, СПКЯ [11–13]. Было показано, что изменения дерматоглифического рисунка коррелируют с уровнем эстрадиола и соотношением тестостерон/эстрадиол [14], уровнем индекса массы тела ИМТ, объемом талии, индексом инсулинорезистентности НОМА [15]. Эти данные подтверждают выявленную нами связь между клиническим и дерматоглифическим полиморфизмом ВА. В то же время полученные нами результаты подтверждают выдвинутое [16] положение о взаимосвязи соматических, дерматоглифических и психологических признаков в структуре общей конституции человека.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о связи между клиническим и дерматоглифическим полиморфизмом ВА у девочек-подростков. Выявленные характерные дерматокомплексы различных клинических вариантов ВА могут быть положены в основу разработки прогностических таблиц формирования данных нарушений менструальной функции для определения контингентов групп риска их возникновения.

Литература

1. Левенець С.О., Начьотова Т.А., Перевозчиков В.В. та ін. Поширеність розладів функції статеві системи серед сучасних дівчаток та дівчат-підлітків та чинники ризику їх виникнення // Педіатрія, акушерство та гінекологія. – 2010. – № 6. – С. 94–96.
2. Левенець С.О., Начьотова Т.А. Математична модель визначення клінічних варіантів вторинної аменореї у дівчат-підлітків // Авторське свідоцтво 40961, UA. – № 41205; заявл. 12.09.11; опубл. 15.11.11, Бюл. № 25.
3. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека: пер. с англ. – М.: Мир, 1989. – 1. – 312 с.
4. Начетова Т.А., Кашкалда Д.А., Череватова С.Х. Особенности гормонального статуса девочек-подростков с вторичной аменореей // Репродуктивна ендокринологія. – 2011. – № 4. – С. 86.
5. Левенець С.А. Начетова Т.А. Частота клинических признаков патологического течения пубертата у девочек с вторичной аменореей // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики: зб. наук. праць. – К.–Луганськ, 2012. – Вип. 23. – С. 163–170.
6. Начетова Т.А. Взаимосвязь клинических признаков патологического течения пубертата у девочек-подростков с вторичной аменореей с факторами перинатального анамнеза и состоянием репродуктивной системы их матерей // Перинатология и педиатрия. – 2012. – № 4. – С. 110–111.
7. Хайруллин Р.М., Никитюк Д.Б., Крикун Е.Н. Факторы изменчивости кожных узоров пальцев. – Ульяновск: УлГУ, 2005. – 152 с.
8. Абрамова Т.Ф., Никитина Т.М., Изаак С.И. и др. Асимметрия признаков пальцевой дерматоглифики, физический потенциал и физические качества человека // Морфология. – 2000. – 118, № 5. – С. 56–59.
9. Солониченко В.Г. Адаптивные фенотипы человека и аналитическая дерматоглифика // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2003. – № 11. – С. 123–128.
10. Лысов П.К., Вихрук А.Я., Вихрук Т.В. Дерматоглифические узоры как морфологические критерии

адаптационних можливостей учасників // Сборник науч трудов к 80-летию проф. П.Ф. Степанова. – Смоленск: СГМА. – 2004. – С. 116–118.

11. Левенець С.О., Начьотова Т.А. Спосіб прогнозування формування затримки статевого розвитку у дівчат-підлітків / Патент № 59158, Україна, А61В10/00, заявник і патентовласник ІОЗДП АМН України. – № 2003032378, заявл. 19.03.2003, опубл. 15.08.2003.
12. Гаспаров А.С., Кулаков А.В. Клинико-генетические параллели у больных с болезнью поликистозных яичников (БПКЯ) // Проблемы репродукции. – 1995. – № 3. – С. 30–32.
13. Кривич И.П. Особенности дерматоглифических показателей у девочек и девушек с гиперандрогенией различного генеза // Акушерство и гинекология. – 1987. – № 9. – С. 57–58.
14. Василенко Ю.А. Параллелизм изменений дерматоглифики, эндокринного и психического статуса в популяции детского населения, проживающего в районах с высокой антропогенной нагрузкой: автореф. дис. д-ра мед. наук. – Ставрополь, 2005. – 20 с.
15. Дмитриев А.Н. Метаболический синдром: маркеры индивидуальной предрасположенности, диагностика доклинической стадии, обоснование тактики ведения пациентов: автореф. дис.... д-ра мед. наук. – Екатеринбург, 2011. – 22 с.
16. Негашева М.А. Системный подход при изучении взаимосвязей соматических, дерматоглифических и психоэмоциональных признаков в структуре общей конституции человека // Морфология. – 2008. – № 1. – С. 73–77.

NACHOTOVA T.A.

State Institution “Institute for Children and Adolescents Health Care of the NAMS of Ukraine”, Ukraine, 61153, Kharkiv, pr. 50-letya VLKSM, 52-A, e-mail: iozdp@ukrpost.ua

DERMATOGLYPHIC PATTERNS OF ADOLESCENT GIRLS WITH OF DIFFERENT CLINICAL TYPES OF SECONDARY AMENORRHEA

Aims. The investigate dermatoglyphic patterns of adolescent girls with of different clinical types of secondary amenorrhea. **Methods.** In order to find morphogenetic markers of different clinical types of secondary amenorrhea (SA) in adolescent girls, an analysis of dermatoglyphic patterns has been carried out in 102 adolescent girls with SA aged from 13 to 17, who were under clinical research in the S.I. “ІСАНС NAMS of Ukraine”; the control group consisted of 50 girls of the same age with a regular menstrual cycle. **Results.** It has been shown that the clinical types of SA have typical morphogenetic (dermatoglyphic) complexes. **Conclusions.** The suggested dermatoglyphic complexes can be applied for the prediction of SA in girls.

Key words: dermatoglyphic patterns, adolescent girls, secondary amenorrhea.

УДК 575.21:577.2

ПІДПАЛА О.В., ЛУКАШ Л.Л.

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, e-mail: pidpala@ukr.net

КОМПОЗИЦІЙНІ КЛАСТЕРНІ СТРУКТУРИ МОБІЛЬНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ЕЛЕМЕНТІВ У ІНТРОНАХ ГЕНА *MGMT* ЯК ДЖЕРЕЛО РЕГУЛЯТОРНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

Ген *MGMT* людини кодує репаративний фермент O^6 -метилгуанін-ДНК метилтрансферазу, який видаляє алкільні групи з O^6 -позиції гуаніну у ДНК і захищає клітини від їхнього токсичного та мутагенного впливів. Експресія даного гена та активність самого ензиму мають широкі межі як між-, так і внутрішньоіндивідуальної варіації [1], що вказує на складну його регуляцію. Дослідження останніх років зацентровані на залученні мобільних генетичних елементів (МГЕ) до

генної регуляції. Зокрема показано, що МГЕ можуть бути джерелом різноманітних регуляторних послідовностей, таких як сайти альтернативного сплайсингу [2], цис-регуляторні модулі, які є кластерами сайтів зв'язування транскрипційних факторів [3, 4], чи виконувати роль альтернативних промоторів [5]. У своїх попередніх дослідженнях ми вивчали розподіл МГЕ у промоторній ділянці гена *MGMT* людини і у його структурних частинах [6, 7]. У межах промоторної ділянки виявили

послідовність частково делетованого *AluSp*-повтору, що має гомологію із сайтами зв'язування для восьми транскрипційних факторів, а саме Elk-1; SREBP; Sp1; GATA-2; Tst-1; E47; E2F та Oct-1 [6]. Аналізуючи розподіл МГЕ у самому гені, виявили, що вони присутні лише в інтронних послідовностях із перевагою *LINE*-елементів. У двох інтронах МГЕ утворюють композиційні кластерні структури, які можуть бути джерелом різноманітних регуляторних послідовностей [7]. Тому метою даної роботи є аналіз зазначених композиційних кластерних структур на наявність послідовностей, що гомологічні сайтам зв'язування транскрипційних факторів.

Матеріали і методи

Нуклеотидні послідовності гена *MGMT* людини взято на сайті Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Результати пошуку та ідентифікації МГЕ здійснено за допомогою програми CENSOR (<http://www.girinst.org>). Функціональні сайти визначено програмою TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites (ver 1.3) (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>).

Результати та обговорення

Відомо, що МГЕ мають тенденцію до кластеризації у внутрішньогенних ділянках генів та в інтронах [8]. У інтронних послідовностях гена *MGMT* людини виявлено композиційні кластерні структури МГЕ [7]. Із шести структур для подальшого аналізу відібрали ті, які, крім фрагментів *LINE*-елементів, містять і *Alu*-повтори. Таких композиційних кластерів виявлено два, по одному в інтроні 2 та в інтроні 3 (табл. 1). Довжина першого кластера становить 1339 п.н. До його складу, крім повнорозмірного *AluSg*-повтору, який розташований у протилежному до транскрипції напрямку, входять фрагменти двох *LINE*-елементів. У межах *AluSg*-повтору

виявлено гомологію із сайтами зв'язування для чотирьох транскрипційних факторів, а саме YY1, р300, С/ЕВР і для транскрипційного активатора генів теплового шоку HSF2.

Цікаво, що аналіз консенсусної послідовності *Alu*-повторів показав, що вона містить консервативні ділянки, з якими теоретично може зв'язуватись транскрипційний фактор YY1 [9]. Відомо, що у геномі людини є велика кількість консенсусних сайтів для зв'язування транскрипційного фактора YY1, і частина із них (24 %) локалізована в *Alu*-повторах. Зазначається, що близько 50 % *Alu*-повторів містять потенційний сайт для зв'язування YY1 [9]. Це дозволило висловити припущення про роль *Alu*-повторів у активації та у пригніченні транскрипції. Припущення опосередковано підтверджується даними про здатність білка YY1 зв'язуватись із регуляторними ділянками гена і таким чином підвищувати, або пригнічувати рівень транскрипції [10]. Властивість YY1 залучати до сайту свого зв'язування із ДНК інші білки також може впливати на активність геному. Наприклад, YY1, специфічно зв'язуючись із білком hRPD3, який виявляє гістондеацетилазну активність, може ініціювати у певних ділянках геному утворення комплексу, який переводить хроматин у неактивний стан [11]. Така взаємодія може призводити до зміни рівня транскрипції.

Крім цього, білок YY1 може взаємодіяти із білком ADPRT, який має АДФ-рибозилтрансферазну активність [12]. Показано, що білок YY1, взаємодіючи із білком ADPRT, стимулює його авто-рибозилування [13]. На основі цих даних запропоновано механізм, за допомогою якого може здійснюватись негативна регуляція транскрипції за участю *Alu*-повторів. Білок YY1 зв'язується із *Alu*-повтором, «приваблює» білок ADPRT та ініціює його авто-рибозилування.

Таблиця 1. Складові послідовностей кластерних структур у інтронах гена *MGMT* людини

Координати у межах інтрону	Мобільний генетичний елемент, назва	Довжина, п.н.	Клас/родина	Ланцюг	Інтрон, номер
103739-104018	<i>AluSg</i>	281	NonLTR/SINE/SINE1	-	2
104019-104712	<i>LIME ORF2</i>	820	NonLTR/L1	+	2
104713-105077	<i>LIME ORF2</i>	448	NonLTR/L1	+	2
13431-14056	<i>LIMEC 5</i>	636	NonLTR/L1	+	3
14060-14677	<i>LIME ORF2</i>	712	NonLTR/L1	+	3
14681-14963	<i>AluSz6</i>	284	NonLTR/SINE/SINE1	+	3

У певній ділянці гена виникає комплекс, який стерично протидіє утворенню комплексу ініціації транскрипції. На думку авторів подібним чином може здійснюватись регуляція генів, які знаходяться під контролем гормон-асоційованих елементів. Про це свідчать дані про взаємодію білка ADPRT із комплексом TR/RXR, що ускладнює зв'язування ядерних рецепторів із комплексом ініціації [14].

У консенсусній послідовності *Alu*-повторів також виявлено блок AGGTCA, із яким можуть зв'язуватись транскрипційні фактори, які належать до родини ядерних гормональних рецепторів. Основна частина (більше ніж 70 %) потенційних гормон-асоційованих елементів для тиреоїдного гормону, ретиноїдної кислоти і естрогенів розташована саме в *Alu*-повторах. У клітинах CV-1 показано, що зв'язуючись із ядерними рецепторами, *Alu*-асоційований елемент DR-4 може регулювати транскрипційну активність залежно від присутності гормону щитовидної залози [9]. Білки великої родини ядерних гормональних рецепторів можуть зв'язуватися не лише із AGGTCA-блоком, але і з різними варіантами, що виникають внаслідок його дуплікації. Висловлено припущення, що *Alu*-повтори є "контейнерами", які містять набори потенційних послідовностей для зв'язування різноманітних транскрипційних факторів [15, 16].

У межах фрагментів *LINE*-елементів, які входять до композиційної кластерної структури у межах інтрону 2 гена *MGMT* виявлено гомологію із сайтами зв'язування для 17 транскрипційних факторів. Серед низки виявлених потенційних сайтів, хотілося б виокремити сайти зв'язування для білків теплового шоку (HSF2), C/EBP, SRY, STAT, Oct, GATA і AP-1. Крім того, виявлено ТАТА бокс і сайти для зв'язування із глюкокортикоїдним рецептором (GR) і RORalpha1 (orphan hormone nuclear receptor). Це особливо цікаво, оскільки раніше показано наявність сайтів для зв'язування із глюкокортикоїдним рецептором у межах *Alu*-повторів [9]. Також виявлено, що гормон-акцепторні елементи для тиреоїдного гормону, естрогенів і ретиноїдної кислоти переважно локалізовані в *Alu*-повторах [9].

Наявність ТАТА боксу може бути передумовою для існування альтернативного промотору в гені *MGMT* людини у межах інтрону 2. Варто зазначити, що крім внутрішнього промотору L1 містить антисенсовий промотор (АСП) [17]. Аналіз бази

даних експресованих послідовностей геному людини виявив 49 химерних транскриптів, які починаються в АСП L1 і входять до складу мРНК відомих генів [18]. У 45 випадках напрямок транскрипції із АСП L1 і з промотора гена збігався, а у чотирьох активність АСП призводила до утворення відповідної комплементарної РНК. Передбачається, що співнаправлений із геном АСП L1 може слугувати альтернативним промотором і призводити або до появи химерної мРНК, яка транслюється з утворенням того ж білка (у випадку L1, «вищележачого» відносно точки початку транскрипції), або ж до утворення 5'-вкорочених мРНК, трансляція яких призводить до появи різних N-кінцевих форм білка (у випадку розташування L1 в інтроні гена). Крім того, особливої уваги заслуговує активність АСП співнаправлена із геном L1, що розташований в інтроні, оскільки у цьому випадку утворюються химерні РНК, які містять послідовності, комплементарні ексонам гена, що потенційно можуть регулювати активність відповідного гена за механізмом РНК-інтерференції.

Варто згадати і про гіпотезу «розривання гена» («gene-breaking»), згідно якої L1, що розташований в інтроні гена у протилежній напрямку транскрипції гена орієнтації, може «разбивати» транскрипт на дві частини: 1 – РНК, яка охоплює «вище лежачий» екзон і закінчується в антисенсовому сайті поліаденілування L1 і 2 – транскрипт, який утворюється із АСП L1 і охоплює «нищележачі» екзони [19].

Другий досліджений нами композиційний кластер розташований у межах інтрону 3 гена *MGMT* людини. Він має довжину 1533 п.н. і складається із двох фрагментів *LINE*-елементів і повнорозмірного *AluSz6*-повтору. Напрямок транскрипції усіх складових частин кластерної композиційної структури у цьому випадку збігається із напрямком транскрипції гена. Цікаво, що, як і у випадку *AluSg*-повтору із кластера в інтроні 2, *AluSz6*-повтор також містить елемент відгуку на білки теплового шоку HSF2. У межах фрагментів *LINE*-елементів серед інших потенційних сайтів, як і у попередньому кластері, виявлено гомологію із сайтами зв'язування для C/EBP, SRY, STAT, Oct, GATA і AP-1, ТАТА бокс і сайти для зв'язування із RORalpha1 (orphan hormone nuclear receptor).

Як видно із наведених у табл. 2

результатів, для деяких транскрипційних факторів, послідовності, які гомологічні їхнім сайтам зв'язування, присутні у ретроелементах, що належать до різних родин. Є й такі, що присутні лише у послідовностях фрагментів *LINE*-елементів, це зокрема TATA бокс і потенційний гормон-асоційований елемент для ретиноїдного орфанового рецептора RORalpha1 (orphan hormone nuclear receptor).

Отже, проаналізувавши дві композиційні кластерні структури в інтроні 2 та в інтроні 3 гена *MGMT* людини, до складу яких входять *Alu*-повтори і фрагменти *LINE*-елементів виявили, що обидва *Alu*-повтори містять

послідовності, що гомологічні елементам відгуку на білки теплового шоку, а кластерні структури у межах фрагментів *LINE*-елементів мають TATA бокс послідовності. Це дає підстави розглядати проаналізовані композиційні кластерні структури МГЕ у межах інтронних послідовностей гена *MGMT* людини як потенційні альтернативні промотори.

Висновки

Показано, що композиційні кластерні структури МГЕ у інтронах 2 і 3 гена *MGMT* людини збагачені промотороспецифічними елементами і мають потенціал для формування альтернативних промоторів.

Таблиця 2. Представленість потенційних сайтів зв'язування у межах композиційних кластерних структур МГЕ в інтронах гена *MGMT* людини

Транскрипційний фактор, назва	Складові елементи композиційних кластерів					
	інтрон 2			інтрон 3		
	<i>AluSg</i>	<i>LIME_ORF2</i>	<i>LIME_ORF2</i>	<i>LIMEC_5</i>	<i>LIME_ORF2</i>	<i>AluSz6</i>
C/EBP	+	+	+	+	+	
Oct-1		+	+	+	+	+
SRY		+	+	+	+	+
GATA		+	+	+	+	+
HSF2	+	+	+			+
AP-1		+		+		+
Pbx-1		+		+	+	
MZF1		+	+	+		
TATA		+			+	
STAT			+		+	
RORalp		+			+	

Література

1. Pegg A.E. Repair of O⁶-alkylguanine by alkyltransferases // *Mutat. Res.* – 2000. – 262, № 2–3. – P. 83–100.
2. Callinan P.A., Batzer M.A. Retrotransposable elements and human disease // *Genome Dyn.* – 2006. – 1. – P. 104–115.
3. Sorek R., Ast G., Graur D. Alu-containing exons are alternatively spliced // *Genome Res.* – 2002. – 12, N 7. – P. 1060–1067.
4. Jordan I.K., Rogozin I.B., Glazko G.V., Koonin E.V. Origin of a substantial fraction of human regulatory sequences from transposable elements // *Trends Genet.* – 2003. – 19, N 2. – P. 68–72.
5. Shankar R., Grover D., Brahmachari S.K., Mukerji M. Evolution and distribution of RNA polymerase II regulatory sites from RNA polymerase III dependant mobile Alu elements // *BMC Evol. Biol.* – 2004. – 4, N 1. – P. 37.
6. Підпала О.В., Яцишина А.П., Лукаш Л.Л. Потенційні цис-елементи *AluSp*-повтору в промоторі гена *MGMT* // *Фактори експериментальної еволюції організмів.* – 2009. – 7. – С. 42–47.
7. Підпала О.В., Лукаш Л.Л. Розподіл мобільних генетичних елементів у гені O(6)-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза людини // *Актуальні проблеми сучасної біології та здоров'я людини.* – 2012. – 12. – С. 150–154.
8. Sela N., Mersch B., Hotz-Wagenblatt A., Ast G. Characteristics of transposable element exonization within human and mouse // *PloS One.* – 2010. – 5, N 6. – e10907.
9. Oei S., Babich V.S., Kazakov V.I., Usmanova N.M., Kropotov A.V., Tomilin N.V. Clusters of regulatory signals for RNA polymerase II transcription associated with Alu family repeats and CpG islands in human promoters // *Genomics.* – 2004. – 83, N 5. – P.873–882.
10. Thomas M.J., Seto E. Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key? // *Gene.* – 1999. – 236, N 2. – P. 197–208.

11. Yang W.M., Inouye C., Zeng Y., Bearss D., Seto E. Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – 93, N 23. – P. 12845–12850.
12. Oei S.L., Griesenbeck J., Schweiger M., Babich V., Kropotov A., Tomilin N. Interaction of the transcription factor YY1 with human poly (ADP-ribosyl) transferase // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1997. – 240, N 1. – P. 108–111.
13. Griesenbeck J., Ziegler M., Tomilin N., Schweiger M., Oei S.L. Stimulation of the catalytic activity of poly (ADP-ribosyl) transferase by transcription factor Yin Yang 1 // *FEBS Lett.* – 1999. – 443, N 1. – P. 20–24.
14. Kakizawa T., Miyamoto T., Ichikawa K., Kaneko A., Suzuki S., Hara M., Nagasawa T., Takeda T., Mori Ji., Kumagai M., Hashizume K. Functional interaction between Oct-1 and retinoid X receptor // *Biol. Chem.* – 1999. – 274, N 27. – P. 19103–19108.
15. Umesono K., Murakami K.K., Thompson C.C., Evans R.M. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors // *Cell.* – 1991. – 65, N 7. – P. 1255–1266.
16. Mangelsdorf D.J., Evans R.M. The RXR heterodimers and orphan receptors // *Cell.* – 1995. – 83, N 6. – P. 841–850.
17. Speek M. Antisense promoter of human L1 retrotransposon drives transcription of adjacent cellular genes // *Mol. Cell. Biol.* – 2001. – 21, N 6. – P. 1973–1985.
18. Matlik K., Redik K., Speek M. L1 antisense promoter drives tissue-specific transcription of human genes // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2006. – N 1. – P. 71753.
19. Wheelan S.J., Aizawa Y., Han J.S., Boeke J.D. Gene-breaking: a new paradigm for human retrotransposon-mediated gene evolution // *Genome. Res.* – 2005. – 15, N 8. – P. 1073–1078.

PIDPALA O.V., LUKASH L.L.

Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: pidpala@ukr.net

COMPOSITE CLUSTER STRUCTURE OF MOBILE GENETIC ELEMENTS IN THE *MGMT* GENE INTRON AS A SOURCE OF REGULATORY SEQUENCES

Aims. It was carried out analysis of the composite cluster structures MGE in intron 2 and 3 of human *MGMT* gene for the sequences homologous to binding sites of transcription factors. **Methods.** Searching and identifying MGE was realised by using CENSOR (<http://www.girinst.org>). Functional sites were defined by program TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites (ver 1.3) (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). **Results.** Composite clusters in the introns 2 and 3 of human *MGMT* gene consist of Alu-repeat and fragments of LINE-elements. Both sequences are enriched promoterspecific elements including the TATA box, AP-1, Sp1, SREBP-1, Oct-1, HSF2 and others. Except that fragments of the LINE-elements have sites binding for the glucocorticoid receptor and orphan hormone nuclear receptor. **Conclusions.** The obtained results allow to consider analyzed intron clusters of MGE as potential alternative promoters.

Key words: human O⁶-methylguanin-DNA methyltransferase gene, mobile genetic elements, composite cluster structures.

УДК 611-018.5:616.1:616-018:616.13-004.6.005:1:575.191

ПІСКУН Р.П., БІЛОШИЦЬКА А.В., ГРИНЧАК Н.М., ШЕВЧУК Т.І., ГОРБАТЮК С.М., ПІСКУН І.І., РОМАШКІНА О.А., САВИЦЬКА А.А.

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова, Україна, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, e-mail: piskun2006@mail.ru

ГЕННА ТЕРАПІЯ: ОСОБЛИВОСТІ ТА ДОСВІД ЗАСТОСУВАННЯ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АТЕРОСКЛЕРОЗІ

Рубіж другого й третього тисячоліть у медицині ознаменувався значним поширенням захворювань серцево-судинної системи, які за даними ВООЗ, посідають перше місце в структурі смертності населення планети [1].

В Україні хвороби системи кровообігу становлять 62 % у структурі загальної смертності. Інфаркт міокарда, ішемічна хвороба серця, мозковий інсульт – це клінічно маніфестовані форми атеросклерозу. Тому одними з

найбільш актуальних задач сучасної медицини є діагностика, лікування і профілактика атеросклерозу.

Відомо, що атеросклероз відноситься до мультифакторіальної патології, до розвитку якої поряд з впливом навколишнього середовища призводить спадковість. Ось чому чисельні клінічні та експериментальні спроби профілактики та лікування цієї хвороби при використанні фармакологічних препаратів, що знижують рівень холестеролу, тригліцеридів та ліпопротеїнів низької щільності у крові, виявили, що це лише тимчасовий ефект (тільки на час прийому ліків) [2]. В той же час немає надійних засобів, що збільшували б рівень антиатерогенних ліпопротеїнів високої щільності [3].

Результати великої кількості популяційних, клінічних та експериментальних досліджень свідчать, що існує зв'язок між наявністю мутацій окремих генів та порушеннями ліпідного обміну [4]. Завдяки успіхам молекулярної біології було доведено, що однією з причин порушень ліпопротеїдного обміну є мутації гена Апо-Е – гена головного білка ліпопротеїнів високої щільності [5], які мають антиатеросклеротичні функції. Тому усунення порушень шляхом генної терапії – введення гена апоЕ- може бути значним внеском в вирішення проблеми виникнення, прогресування та корекції атеросклеротичних порушень в організмі.

Мета дослідження. Встановити морфофункціональні зміни в клітинах та кровоносних судинах органів при експериментальному атеросклерозі та його генній корекції в умовах профілактичного і лікувального введення гену Апо-Е.

Матеріали і методи

Досліди проведені на білих лабораторних щурах-самцях масою 180–200 г. Утримання тварин та маніпуляції з ними проводилися у відповідності до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Тварини утримувались у науково-експериментальній клініці Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова під постійним наглядом та регулярно зважувались.

Всі піддослідні тварини були розділені на 5 груп: 1 – інтактна; 2 група – щурі, яким щоденно

протягом 30 днів вводився 4 (6) – Метил-2-тіоурацил в дозі 12 мг/кг для пригнічення функції щитоподібної залози; 3 – щурі, яким моделювався атеросклероз за класичною методикою М.М. Анічкова; 4 група – «профілактика» – щурі, яким попередньо моделювання атеросклерозу вводився ген аполіпопротеїну Е (апоЕ); 5 група – «лікування» – щурі, яким на тлі моделювання атеросклерозу вводився ген апоЕ. Протягом 30 днів щоденно щурам 3, 4 і 5 груп внутрішньошлунково за допомогою зонду з оливою вводили холестерол, попередньо розчиняючи його в соняшниковій олії, в дозі 0,5 г/кг і 4(6) – метил-2-тіоурацил. Тваринам 4 профілактичної групи вводили ген апоЕ по 50 мкг на тварину внутрішньом'язово в перший день досліду. Тваринам 5 групи з лікувальною метою вводили ген апоЕ в тій же дозі на 15 день досліду. В ролі вектора використовували ліпосоми ДОТАР Methosulfate salt (Product Code: D 1163 0,4 ml 121,60 C₄₃H₈₃NO₈S FW 7774,2 фірми «SIGMA») з розрахунку 1 мкг ДНК апоЕ на 5 мг ДОТАР. Плазмиду, що несе ген ізоформи ε2 людини апоЕ, з'єднаний з цитомегаловірусним промотором, включали в структуру ліпосоми безпосередньо перед введенням щурам.

Результати та обговорення

Ефективність трансфекції оцінювалась із застосуванням методу зворотньоотранскрип-тазної полімеразної ланцюгової реакції (RT-PCR) в зразках тканини печінки та м'язів, отриманих на останню (30) добу експерименту. Візуалізація продуктів ампліфікації (295 пар нуклеотидів і 180 пар нуклеотидів відповідно для першої і другої пари праймерів) проводилась за допомогою електрофорезу в 2 % агарозному гелі (рис. 1).

Генетична (генна) терапія це один з провідних напрямків молекулярної медицини, яка найближчим часом буде мати значний вплив на здоров'я людства.

Основою генної терапії являється генна інженерія. Генетична (генна) інженерія – це прикладна галузь молекулярної біології, генетики та біохімії, яка розробляє методи перебудови геномів організмів вилученням або введенням окремих генів чи їхніх груп; синтезу генів поза організмом; виділення з клітин та перебудову окремих генів або їх частин; копіювання та розмноження виділених або синтезованих генів; введення генів чи їх груп у геном інших організмів; експериментальне поєднання різних геномів в одній клітині.

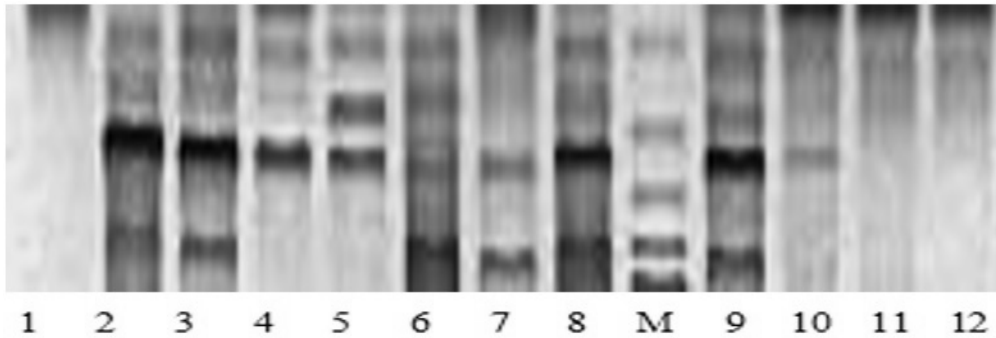


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації РНК apoE-гена (230 п.н.):
 № 1 – «-» – контроль;
 №№2-9 – зразки тканин шурів, яким вводилась плазміда, що несе apoE-ген людини;
 № 10 – «+» – контроль;
 №№ 11-12 – зразки тканин контрольних тварин (без введення плазмідної ДНК)

Експериментальне перенесення генів в інший геном називають трансгенезом. Він базується на технології рекомбінантної ДНК. Організми, які мають у складі свого геному чужорідні гени інших організмів, називаються трансгенними.

У зв'язку з недостатньо вивченими наслідками втручання в геном людини – генна інженерія статевих клітин у більшості країн заборонена.

Як правило, експериментують перенесення генів еукаріотів у клітини бактерій. У геном бактерій вводять гени, які кодують інсулін пацюка або людини, гени рРНК дрозофіли або жаби тощо. Вбудовані гени у нормі «зчитують» інформацію в клітині бактерії, завдяки чому вона синтезує відповідні сполуки (гормон інсулін, рРНК тощо).

Успішний розвиток генного аналізу робить можливим застосування генних методів лікуванні хвороб – генної терапії. Медичні генетики отримують можливість змінювати гени, відповідальні за деякі спадкові захворювання і порушення, вставляти замість дефектних (мутантних) генів – нормальні. Нові гени дозволяють задіяним клітинам функціонувати правильно.

З розшифровкою людського геному (Human Genome Project – HGP – 2003 р.) ДНК-технології, які з'являються і вдосконалюються, досягли сьогодні нових висот. Обширні знання про повний набір генів людини і їх хромосому організацію вже використовуються на практиці в діагностичних лабораторіях, що дозволяє вченим і клініцистам досліджувати вроджені генетичні помилки і надавати більш точні

генетичні рекомендації постраждалим сім'ям.

По суті ж, генна терапія – це ремонт генів, або точніше реконструкція генів і геномів. У прямому сенсі слова генна терапія означає лікування шляхом введення в тканини або в клітини смислових (або антисмислової) послідовностей ДНК (або РНК).

Концепція генної терапії існує впродовж декількох десятиліть. Суть її зводиться до того, що найбільш радикальним способом боротьби з різними генетичними захворюваннями є діяльність, спрямована на виправлення або знищення самої генетичної причини захворювання, а не її наслідків.

Тобто генна терапія це етіологічне лікування, яке ґрунтується на корекції первинного генетичного дефекту шляхом зміни генотипу. По суті, генна терапія – це виправлення специфічного спадкового захворювання шляхом введення в клітину-мішень функціонуючої нормальної генетичної конструкції.

Позитивна генотерапія направлена на введення нормального гена для заміщення неактивного мутантного гена.

Негативна генотерапія направлена на пригнічення функції гіперекспресованого гена. Генотерапія може проводитися *ex vivo* і *in vivo*.

Генотерапія *ex vivo* – виправлення генетичного дефекту в ізольованих з органа соматичних клітинах. Вона складається з таких етапів: 1) отримання клітин від хворого; 2) виправлення генетичного дефекту за допомогою перенесення потрібного гена; 3) відбір і збільшення кількості генетично виправлених клітин; 4) введення цих клітин пацієнту.

Для введення гена запропоновано

ретровірусні й аденовірусні вектори, ліпосоми, фізичні методи (електропорація, ультразвук, лазерні мікроін'єкції, генні пістолети – мікрочастинки золота, вкриті ДНК, вистрілюються в тканини).

Перша успішна спроба генотерапії *ex vivo* була проведена в США 14 вересня 1990 р. у 4-х річної дівчинки з рідкісною спадковою хворобою – тяжким комбінованим первинним імунodefіцитом, обумовленим мутацією в гені аденозиндезамінази А (АДА). Цей день вважають датою народження генної терапії. У хворої було виділено Т-лімфоцити, в які *in vitro* за допомогою ретровірусного вектора ввели ген АДА. Модифіковані таким чином лімфоцити культивували і протягом двох років із певною періодичністю вводили хворій. У пацієнтки спостерігалася експресія гена АДА і клінічне поліпшення. Лікування виявилось ефективним, пацієнтка жива і досі, але введення лімфоцитів їй необхідно повторювати кожні 3–6 міс.

Довгострокова генотерапія була вперше успішно проведена при спадковій сімейній гіперхолестеринемії у жінки 29 років. Хворій була зроблена часткова (близько 15 %) гепатоектомія. За допомогою ретровірусного вектора в отриману культуру клітин печінки був введений ген рецептора ліпопротеїнів низької густини. Трансгенні гепатоцити були повернені пацієнтці через катетер у ворітну вену і досягли печінки. В результаті вміст ліпопротеїнів низької густини у крові хворої зменшився на 15–30 %, що значно поліпшило її стан.

Водночас, генотерапія соматичних клітин – один із найбільш передових напрямів лікування як спадкових так і неспадкових хвороб. Її розвиток тісно пов'язаний із розшифровкою будови генів, здійснений програмою «Геном людини». На 2003 р. було запропоновано більше 600 протоколів генної терапії різних захворювань, із них на моногенні хвороби припадає тільки 12 %. Більша частина досліджень стосується генотерапії онкологічних, терапевтичних, інфекційних захворювань та генних вакцин.

На жаль, не у кожному випадку можливе виділення клітин у пацієнта для генетичної модифікації з подальшим поверненням їх в організм. Тому застосовується генотерапія *in vivo* – генетична модифікація клітин безпосередньо в організмі хворого. Основна проблема генотерапії *in vivo* – доставка гена в необхідну тканину і забезпечення його експресії.

Так, генотерапія муковісцидозу можлива тільки *in vivo*. Проте більше 20 клінічних спроб

генотерапії муковісцидозу закінчилися невдачею через погане включення гена в клітини, що не діляться, і короткочасну експресію введеного гена. Крім того, можливий розвиток імунної відповіді на вірусний вектор, провокація пухлини і непередбачуваний вплив на геном клітини при вбудовуванні вектора в невідповідну ділянку ДНК.

Таким чином, програми генної терапії для клінічних випробувань включають наступні розділи:

- вибір нозології для проведення курсу генної терапії;
- обґрунтоване визначення типу клітин, які підлягають генетичній модифікації;
- конструювання екзогенної ДНК;
- біологічна безпека генної конструкції, яка вводиться, що включає досліди на культурах клітин і на модельних (трансгенних) тваринах;
- аналіз експресії введених генів;
- оцінка клінічного (терапевтичного) ефекту;
- можливі побічні наслідки і способи їх попередження.

Найбільш істотним елементом в програмі генної терапії є аналіз наслідків проведених процедур. Він включає:

- пошук модифікованих клітин в організмі пацієнта після перенесення гена і відстеження динаміки цих клітин в певних тканинах. Цей пошук полегшується при наявності маркерного гена в конструкції;
- аналіз експресії введених генів шляхом ідентифікації і кількісної оцінки відповідного РНК-транскрипту або білкового продукту гена;
- аналіз корекції первинного біохімічного дефекту;
- зіставлення отриманих даних з результатами комплексного медичного обстеження;
- внесення необхідних виправлень і доповнень у проведenu схему лікування.

Враховуючи вищевикладене, генна терапія на сучасному етапі – це лікування спадкових, онкологічних, деяких інфекційних та інших захворювань.

У наших дослідженнях об'єктом були патологічні зміни, що виникають в клітинах та тканинах органів на тлі атеросклерозу та його генної корекції. Проведено макроморфометричну оцінку структурних компонентів та особливостей паренхіми серця, нирок, легень, печінки і щитоподібної залози в нормі, при експериментальному атеросклерозі та при його корекції. Визначено структурні особливості кровоносних судин органів, що проявляються

збільшенням площі поперечного перерізу артерії на 60,09 %, зовнішнього діаметру – на 91,1 %, товщини стінки судин – на 60,9 %, площі стінки судин – на 46,8 % та індексу Вогенворта – у 3 рази, а також зменшенням площі просвіту на 14,8 % і внутрішнього діаметру артерій на 66,9 % порівняно з групою інтактних тварин. Проведено порівняльне вивчення особливостей біохімічних показників ліпідного обміну сироватки крові, цитолітичних ферментів печінки та гормонів щитоподібної залози. З комплексним урахуванням морфофункціональних змін вивчених структур органів співставлено отримані результати для оцінки впливу профілактичного та лікувального введення гену ароЕ.

Висновки

1. Встановлено, що експериментальний атеросклероз проявляється порушеннями ліпідного спектру сироватки крові, про що свідчить зростання рівнів загального холестерину, загальних ліпідів, ліпопротеїнів низької щільності індексу атерогенності та

зниження концентрації ліпопротеїнів високої щільності. У досліджених внутрішніх органах виявлено структурну перебудову у вигляді ліпідної дистрофії, деструкції та осередкового некрозу клітинних елементів паренхіми і явищ фіброзу строми, що виникають в результаті зниження пропускної здатності артеріальних судин і дисфункції мікроциркуляторного русла.

2. Застосування гену аполіпопротеїну Е як з метою профілактики, так і з метою лікування атеросклерозу в експерименті призводить до зменшення патологічних змін в артеріях та судинах мікроциркуляторного русла, що супроводжується покращенням кровопостачання в вивчених органах і ремоделювання їх клітинних компонентів в напрямку структурно-функціональної нормалізації.

3. Отримані дані можуть слугувати експериментальним обґрунтуванням доцільності застосування гену аполіпопротеїну Е в клінічних випробовуваннях при відповідних патологічних станах.

Література

1. Коркушко О.В. Лишневакая В.Ю., Дужак Г.В. Возрастные особенности функционального состояния эндотелия микрососудов // Кровообіг та гемостаз. – 2007. – № 4. – С. 5–10.
2. Терещенко О.С. Крестор – нова ера в лікуванні атеросклерозу // Українська Медичинська Газета. – 2006. – № 5. – С. 28–29.
3. Кордюм В.А. Генотерапія атеросклерозу // Теоретична медицина. – 2004. – № 10, № 2. – С. 121.
4. Akishita M. Artherosclerosis and hyperlipidemia // JMAJ: Jap. Med. Assoc. J. – 2004. – 47, N 4. – P. 175–178.
5. Machlej R.W. Apolipoprotein E cholesterol transport protein with expanding role in cell biology // Science. – 1988. – 240, N 4852. – P. 622–630.

PISKUN R.P., BILOSHITSKA A.V., GRYNCHAK N.M., SHEVCHUK T.I., GORBATYUK S.M., PISKUN I.I., ROMASHKINA O.A., SAVYTSKA A.A.

*Vinnitskyi national medical university named after M.I. Pirogov,
Ukraine, 21018, Vinnitsya, Pirogova str., 56, e-mail: piskyn2006@mail.ru*

GENE THERAPY, ITS PECULIARITIES AND THE EXPERIENCE OF ITS APPLICATION IN CASE OF EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS

Aim. Defining the structural peculiarities of parenchyma as well as blood vessels of heart, liver, kidneys, lungs, thyroid gland in their norm, in condition of the designed pathology and in the case of its gene correction. Comparing the obtained results in order to evaluate the influence of the preventing effect as well as the medicinal one in the condition of Apo-E gene injection taking into account the morphological and functional changes of studied structures of organs. **Methods.** Modeling, macromorphometrical, histological, histochemical, micrometrical, electronic microscopic, biochemical and statistic methods. **Results.** Atherosclerosis was determined to reproduce the lipid spectrum changes of blood serum as well as the localized necrosis of the parenchyma's cell elements and the stroma's fibrosis as a result of the reduced arterial vessels capacity and due to the disfunction of the microvasculature. **Conclusions.** Preventive usage of Apo-E gene as well as its medicinal application in the condition of the experimental atherosclerosis results the reduced pathological changes in the arteries and in the vessels of the microvasculature, and it improves the blood supply in the organs which have been studied.

Key words: experimental atherosclerosis, gene therapy, morphology.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ ЛИЦ РАЗНОГО ВОЗРАСТА, ВЫПОЛНЕННОЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО G-ОКРАШИВАНИЯ МЕТАФАЗНЫХ ХРОМОСОМ

Эффективным методом оценки влияния факторов окружающей среды на организм человека является цитогенетический анализ лимфоцитов периферической крови, позволяющий определить уровень хромосомных нарушений в соматических клетках. Спонтанный уровень аберраций хромосом в лимфоцитах крови человека может варьировать в зависимости от внешних (природный радиационный фон) и внутренних (обмен веществ в организме, гормональный баланс) факторов, изменяющихся в течение жизни [1–3]. Многие научные исследования свидетельствуют, что с увеличением возраста спонтанный уровень аберраций хромосом в лимфоцитах человека может повышаться, что потенциально опасно для здоровья с точки зрения развития онкологической патологии [4–6].

Материал и методы

Материалом цитогенетического исследования были лимфоциты периферической крови лиц разного возраста – подросткового, среднего, пожилого и долгожителей (по 10 человек в каждой возрастной группе), проживающих в г. Киеве.

Лимфоциты крови культивировали согласно стандартной методике [7]. Дифференциальное G-окрашивание препаратов метафазных хромосом выполняли с использованием трипсина и красителя Гимза [8]. Цитогенетический анализ проводили под микроскопом при увеличении $\times 1000$. Учитывали весь спектр аберраций хромосом согласно международной номенклатуре [9]. Анализировали не менее 100 метафазных пластинок на каждого обследованного.

При статистическом анализе данных использовали критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Анализ полученных результатов показал, что среднegrupповые частоты аберраций хромосом достоверно повышались с увеличением возраста обследованных лиц от 10 до 70 лет ($p < 0,05$) (рис. 1). У долгожителей (90–100 лет) уровень аберраций хромосом был ниже по сравнению с волонтерами пожилого возраста.

Уровни хромосомных повреждений у долгожителей и лиц среднего возраста достоверно не различались ($p > 0,05$).

Сравнивая полученные результаты с литературными источниками, можно отметить следующее. По данным польских исследователей, которые использовали G-дифференциальное окрашивание метафазных хромосом лимфоцитов периферической крови здоровых волонтеров в возрасте от 21 до 78 лет, показано повышение всех типов аберраций хромосом с увеличением возраста [10]. В исследованиях В.Г. Илющенко, выполненных при помощи равномерного окрашивания метафазных хромосом, также показано повышение хромосомных аберраций с увеличением возраста (были обследованы волонтеры в возрасте от одного года до ста лет). Однако, максимальные повреждения хромосом в данном исследовании наблюдались в возрасте 90–100 лет [11].

При спонтанном мутационном процессе у подростков, лиц среднего возраста и долгожителей повреждения хроматидного типа встречались с частотами, среднegrupповые значения которых не имели достоверной разницы между собой ($p > 0,05$) и были представлены хроматидными разрывами. У пожилых волонтеров уровень хроматидных аберраций превышал частоты этих повреждений в других возрастных группах ($p < 0,05$). У них зарегистрированы не только хроматидные разрывы, но и обмены.

У обследованных взрослых волонтеров не зарегистрировано статистически значимой разницы между частотами аберраций хромосомного типа ($p > 0,05$) (рис. 2). У подростков их уровень был ниже, чем в других обследованных группах ($p < 0,05$). Среди аберраций хромосомного типа у всех обследованных преобладали делеции хромосом. У подростков они были представлены терминальными повреждениями, а в группах взрослых волонтеров – как терминальными, так и интерстициальными делециями. С увеличением возраста обследованных лиц зарегистрировано накопление транслокаций и инверсий, индуци-

рованное спонтанным мутационным процессом. Во всех возрастных группах частота дицентрических хромосом соответствовала популяционной.

Анализ распределения зарегистрированных разрывов хромосом в кариотипе показал, что во всех группах эухроматиновые участки хромосом повреждались чаще гетерохроматиновых районов.

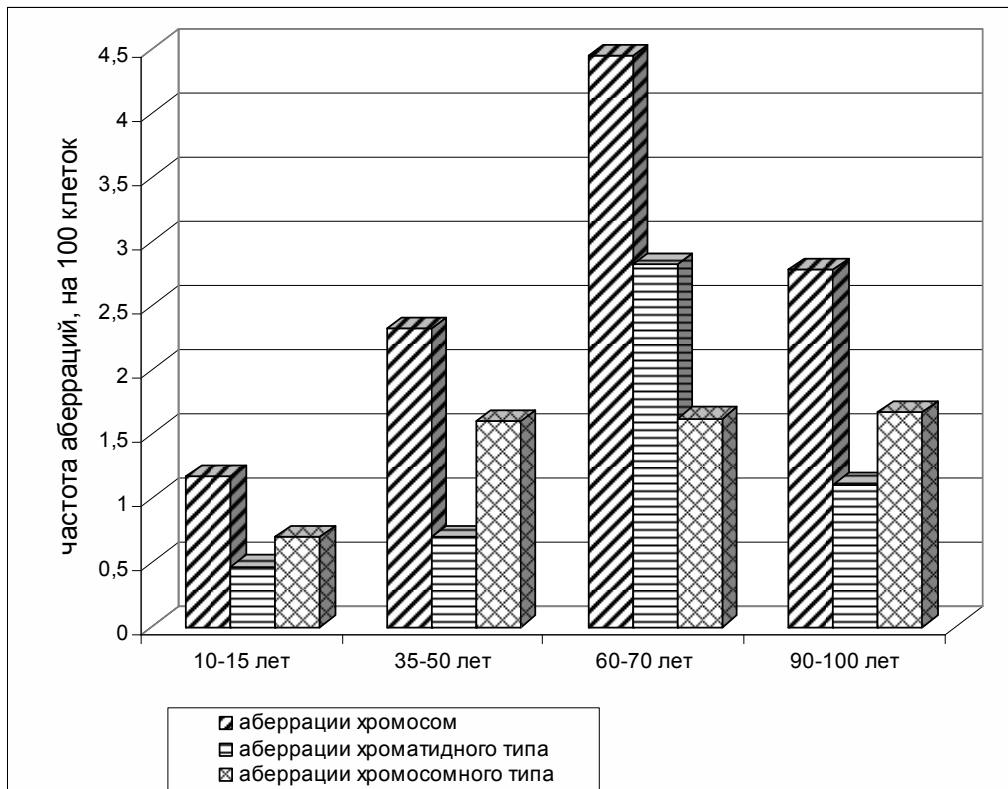


Рис. 1. Основные цитогенетические показатели в лимфоцитах периферической крови лиц разного возраста

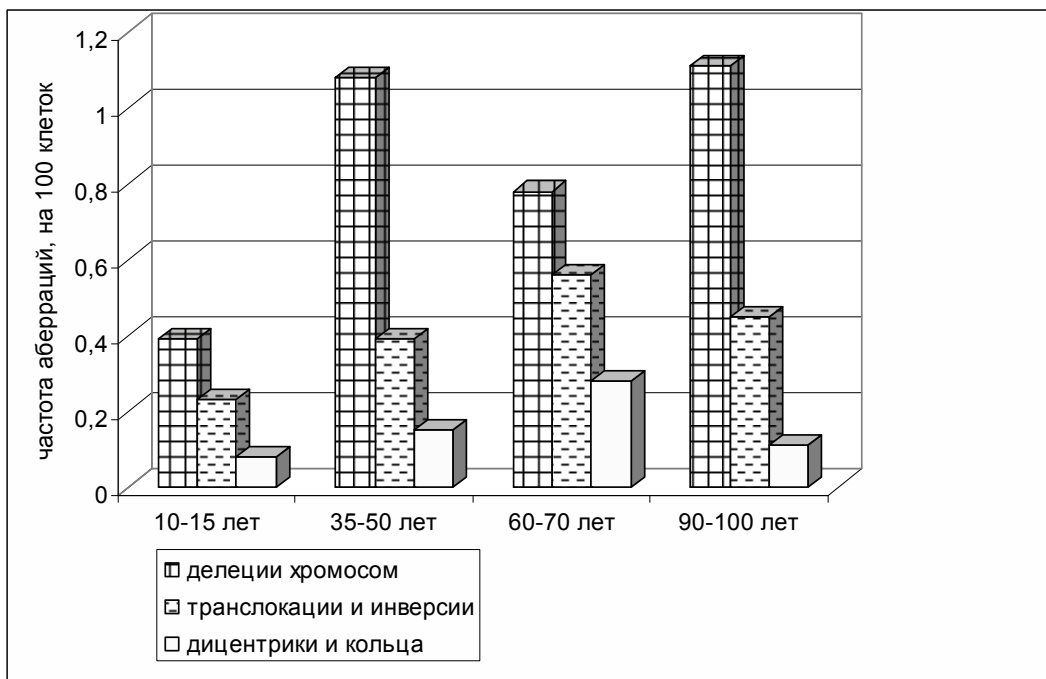


Рис. 2. Стабильные и нестабильные аберрации хромосом в лимфоцитах периферической крови лиц разного возраста

Выводы

С использованием дифференциального G-окрашивания определены частоты aberrаций хромосом в лимфоцитах крови подростков, лиц среднего, пожилого возраста и долгожителей, проживающих в Киеве. Установлено, что при

спонтанном мутационном процессе уровень aberrаций хромосом повышался с увеличением возраста обследованных лиц от 10 до 70 лет ($p < 0,05$). У долгожителей (90–100 лет) частота aberrаций хромосом была ниже, чем у лиц пожилого возраста.

Литература

1. Бочков Н.П., Чеботарёв А.Н., Катосова Л.Д., Платонова В.И. База данных для анализа количественных характеристик частоты хромосомных aberrаций в культуре лимфоцитов периферической крови человека // Вестник РАМН. – 2001. – № 2. – С. 21–29.
2. Дьоміна Е.А., Бариліак І.Р., Пілінська М.А. Глосарій з радіаційної цитогенетики // Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2009. – Т. 7, № 1. – С. 125–163.
3. Дёмина Э.А., Пилинская М.А., Петунин Ю.И., Ключин Д.А. Радиационная цитогенетика: русско-английский словарь-справочник – К.: Здоров'я – 2009. – 368 с.
4. Любимова Н.Е., Воробцова И.Е. Влияние возраста и низкодозового облучения на частоту хромосомных aberrаций в лимфоцитах человека // Радиационная биология. Радиозэкология. – 2007. – 47, № 1. – С. 80–85.
5. Erceg P., Milosevic D.P., Despotovic N., Davidovic M. Chromosomal changes in ageing // J. of Genetics. – 2007. – 86, N 3. – P. 277–278.
6. Воробцова И.Е., Семенов А.В. Возрастная динамика частоты спонтанных и индуцированных *in vitro* хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови человека при естественном и лучевом старении // Радиационная биология. Радиозэкология. – 2010. – 50, № 3. – С. 253–258.
7. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини: Метод. рекомендації / КМАПО МОЗ України. – Київ, 2003. – 23 с.
8. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes // Lancet. – 1971. – 2. – P. 971–972.
9. An International system for human cytogenetic nomenclature: high-resolution banding (2013) / Standing committee on Human Cytogenetic nomenclature. – Basel: Karger, 2013. – 140 p.
10. Wojda A., Zietkiewicz E., Mossakowska M., Pawlowski W., Skrzypczak K., Witt M. Correlation Between the Level of Cytogenetic Aberrations in Cultured Human Lymphocytes and the Age and Gender of Donors // J. Gerontology. – 2006. – 61, N 8. – P. 763–772.
11. Илющенко В.Г. Классификация спонтанной генотипической клеточной адаптации // Цитология и генетика. – 2002. – 36, № 5. – С. 34–42.

TALAN O.A., SHEMETUN O.V., KURINNYI D.A., PILINSKAYA M.A.

SI “National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”,

Ukraine, 04050, Kyiv, Melnikov str., 53, e-mail: okstal@ukr.net

CYTOGENETIC EXAMINATION OF PEOPLE OF DIFFERENT AGES PERFORMED USING THE G-BANDING OF METAPHASE CHROMOSOMES

Aim. To study of spontaneous frequency and spectrum of aberrations chromosomes in peripheral blood lymphocytes conditionally healthy volunteers of different age. **Methods.** Cultivation of peripheral blood lymphocytes received from ten conditionally healthy volunteers during 48 hours; G-banding staining of metaphase chromosome slides; scoring of slides under the microscope (cytogenetic analysis); identification of the full range of chromatid and chromosome aberration types. **Results.** Spontaneous frequencies of chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of people in age from 10 to 100 years were determined using G-banding metaphase chromosome staining. The increase of chromosome aberrations frequency from adolescents to middle and elderly persons and lowering of chromosome mutagenesis in somatic cells of centenarians was shown. **Conclusions.** At the spontaneous mutational process of chromosomes aberrations frequency in peripheral blood lymphocytes were increased significantly with increasing age of the surveyed volunteers from 10 to 70 years old. For long-livers frequency of chromosome aberrations was lower than in the elderly one.

Key words: frequency of chromosome aberrations, age, G-banding chromosome staining, human peripheral blood lymphocytes.

УДК: 575.17.599.9

УЛЬЯНОВА М.В., ЛАВРЯШИНА М.Б., ДРУЖИНИН В.Г.

ФГБОУ ВПО «Кемеровский государственный университет»,
Россия, 650043, г. Кемерово, ул. Красная, 6, e-mail: ulmar2003@mail.ru

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСОБЕННОСТЕЙ РЕПРОДУКЦИИ В КОРЕННЫХ ЭТНОСОВ СИБИРИ

Воспроизводство – свойство, присущее всему живому. Но для человека особенности репродукции обусловлены факторами как биологической, так и социальной природы. К сожалению, репродуктивные особенности коренных народов Сибири исследованы явно недостаточно. Сибирские народы всегда характеризовались высоким уровнем рождаемости и, как следствие, естественным (расширенным) типом воспроизводства. Однако, как показали недавние исследования, практика планирования семьи и регулирования рождаемости получает все большее распространение в ряде этнических групп Сибири. Это, в свою очередь, отражается на изменении роли естественного отбора, который является одним из факторов микроэволюции популяций человека.

Материалы и методы

Для определения особенностей воспроизводства коренного населения по данным демографических анкет был проведен анализ возрастных и витальных характеристик у 954 женщин завершеного репродуктивного периода (старше 45 лет). Исследованы такие этносы как хакасы (N = 355), алтайцы (N = 380), шорцы (N = 121) и сибирские татары (N = 98), проживающие в Аскизском, Бейском, Орджоникидзевском, Таштыпском и Ширинском районах Республики Хакасия; Кош-Агачском, Онгудайском, Турочакском и Улаганском районах Республики Алтай; Таштагольском районе Кемеровской области, Тобольском районе Тюменской области.

Учитывались следующие показатели: возраст начала половой жизни, менархе и менопаузы; возраст матери при рождении первого и последнего ребенка; число беременностей и их исходы (живорождения, мертворождения, спонтанное прерывание беременности, медицинские аборт), а также случаи смерти детей до начала репродуктивного периода. На основании витальных статистик рассчитывались параметры естественного отбора по методу, предложенному Crow [1].

Статистическая обработка генетически значимых демографических данных про-

водилась стандартными биометрическими методами [2, 3]. Для множественных сравнений использовался дисперсионный анализ. Уровень различий между конкретными выборками оценивался с помощью критерия наименьшей значимой разности (LSD), основанного на N сравниваемых группах, который эквивалентен t-критерию для независимых выборок [4].

Результаты и обсуждение

При анализе возрастных характеристик показано, что для хакасок и сибирских татарок характерен более ранний возраст начала менархе по сравнению с алтайками ($p \leq 0,01$) (табл. 1). Физиологический репродуктивный период (разница между средним возрастом начала менопаузы и менархе) у всех изученных этносов примерно одинаков (около 33 лет), за исключением сибирских татарок, у которых продолжительность физиологического периода составила 34,07 года. Однако, у всех этносов реальный репродуктивный период (разница между средним возрастом рождения последнего и первого ребенка) оказался менее 1/3 от физиологического. По этому показателю промежуточное положение между алтайками (10,49 года) и женщинами хакасского этноса (7,46 года) занимают шорки (9,69 года) и сибирские татарки (8,29 года). У алтайских женщин средний возраст рождения последнего ребенка достоверно выше, чем у хакасок ($p \leq 0,001$) и сибирских татарок ($p \leq 0,001$).

Для изучения возможного изменения параметров репродукции во времени общие группы женщин с завершённым репродуктивным периодом были разделены на две подгруппы. В первую были включены женщины в возрасте на момент анкетирования от 45 до 64 лет включительно, во вторую от 65 лет и старше. У алтаек за поколение снизился средний возраст наступления менопаузы ($p \leq 0,001$), а, следовательно, и реальный репродуктивный период, одновременно у них уменьшается средний возраст начала менархе ($p \leq 0,001$). Снижение среднего возраста наступления менархе также выявлено у хакасок ($p \leq 0,001$) и сибирских татарок ($p \leq 0,05$). Кроме того, в двух этнических группах – алтайцы и

сибирские татары – у женщин 45–64 лет снизился средний возраст рождения последнего ребенка ($p \leq 0,001$).

Таким образом, анализ средневозрастных репродуктивных характеристик свидетельствует о существовании физиологических отличий между изученными этносами. Эти отличия касаются темпов полового созревания и продолжительности репродуктивного периода.

На протяженность реального репродуктивного периода, по-видимому, основное влияние оказывают не природные, а социальные факторы, так как при одинаковой длительности у коренных этносов физиологического репродуктивного периода, протяженность реального – варьирует, то есть, вероятно, имеет место искусственное регулирование рождаемости.

При анализе витальных характеристик показано, что все изученные параметры, за исключением среднего числа медицинских абортов, характеризуются более высокими средними значениями у женщин шорской национальности (табл. 2). Медицинские аборты в качестве инструмента регулирования рождаемости чаще применяют женщины-хакаски по сравнению с алтайками и сибирскими татарками. У шорок зарегистрировано самое большое число беременностей, однако, у них и самый высокий среди изученных этносов показатель

пренатальных потерь. Пренатальные потери рассчитывались как сумма средних значений спонтанных абортов и мертворождений. У всех четырех коренных сибирских этносов значение показателя мертворождений практически одинаково. Следовательно, высокий уровень пренатальных потерь у шорок определяется высоким средним числом спонтанных абортов, которое превышает таковое у алтаек ($p \leq 0,001$), хакасок ($p \leq 0,01$) и сибирских татарок ($p \leq 0,001$). Дорепродуктивные потери (разница между средним числом живорожденных и доживших до репродуктивного возраста детей) у хакасок и татарок почти в два раза ниже, чем у шорок и алтаек.

Изучение вариации витальных показателей во времени показало достоверное снижение за поколение среднего числа беременностей и живорожденных детей у всех этносов, за исключением хакасского, что свидетельствует о снижении рождаемости в коренных сибирских популяциях. Только для алтайского этноса отмечено снижение среднего числа медицинских абортов ($p \leq 0,001$) в возрастной группе до 64 лет, что свидетельствует о внедрении практики планирования семьи в алтайском населении. Показано снижение уровня пренатальных потерь у алтайцев ($p \leq 0,05$), шорцев ($p \leq 0,01$) и сибирских татар ($p \leq 0,05$) за поколение.

Таблица 1. Средневозрастные характеристики женщин заверщенного репродуктивного периода

Этнос	Группа	Средний возраст, $x \pm s.e.$			
		начала		при рождении ребенка	
		менархе	менопаузы	первого	последнего
Алтайцы ¹	Общая	14,36 ± 0,08 ^{3,4}	47,65 ± 0,28	22,43 ± 0,19 ³	32,92 ± 0,32 ^{2,4}
	45-64 гг.	14,19 ± 0,08	47,09 ± 0,32	22,49 ± 0,19	32,38 ± 0,33
	≥ 65 лет	15,28 ± 0,21	49,55 ± 0,49	22,05 ± 0,56	35,96 ± 0,94
Хакасы ²	Общая	14,28 ± 0,09	47,59 ± 0,29	22,79 ± 0,20 ³	30,25 ± 0,29 ¹
	45-64 гг.	14,09 ± 0,09	47,82 ± 0,31	22,66 ± 0,26	29,97 ± 0,32
	≥ 65 лет	14,81 ± 0,19	47,06 ± 0,64	23,19 ± 0,31	31,04 ± 0,64
Шорцы ³	Общая	13,94 ± 0,17 ¹	47,22 ± 0,50	22,12 ± 0,51	31,81 ± 0,84
	45-64 гг.	13,88 ± 1,32	46,67 ± 3,39	22,28 ± 3,46	31,38 ± 6,38
	≥ 65 лет	14,03 ± 1,84	48,00 ± 5,27	21,88 ± 4,58	32,43 ± 6,35
Татары сибирские ⁴	Общая	13,94 ± 0,14 ¹	48,01 ± 0,33	21,99 ± 0,35	30,28 ± 0,60 ¹
	45-64 гг.	13,89 ± 0,15	47,87 ± 0,36	21,81 ± 0,37	28,77 ± 0,53
	≥ 65 лет	14,18 ± 0,38	48,50 ± 0,77	22,87 ± 1,04	37,73 ± 1,21

Примечание: здесь и далее: индекс показывает наличие значимых отличий (критерий LSD, $p < 0,05$) между этносами (1 – алтайцы, 2 – хакасы, 3 – шорцы, 4 – татары сибирские), полужирным выделены значимые отличия между возрастными группами.

Таблица 2. Витальные характеристики женщин – представительниц коренных народов Сибири (средние значения)

Этнос	Группа	Витальные характеристики					
		1	2	3	4	5	6
Алтайцы ¹	Общая	6,40 ²	0,44 ³	1,99 ²	3,97	3,53	0,44
	45-64 гг.	5,73	0,40	1,57	3,72	3,29	0,43
	≥ 65 лет	9,16	0,63	4,35	5,40	4,89	0,51
Хакасы ²	Общая	7,15 ^{1,3,4}	0,46	3,59 ^{1,4}	3,12	2,93	0,19
	45-64 гг.	7,15	0,45	3,70	3,03	2,86	0,17
	≥ 65 лет	7,16	0,52	3,22	3,41	3,15	0,26
Шорцы ³	Общая	8,09 ^{1,4}	0,71 ^{1,2,4}	3,00	4,36	3,77	0,59
	45-64 гг.	7,23	0,55	2,99	3,69	3,12	0,57
	≥ 65 лет	9,45	0,96	3,02	5,43	4,79	0,64
Татары сибирские ⁴	Общая	4,92 ^{1,2,3,4}	0,50 ³	0,92 ²	3,50	3,33	0,17
	45-64 гг.	4,52	0,44	1,02	3,05	2,84	0,21
	≥ 65 лет	6,82	0,76	0,41	5,65	5,65	0,00

Примечание: 1 – беременности, 2 – пренатальные потери, 3 – медицинские аборт, 4 – живорожденные, 5 – дожившие до репродукции, 6 – дорепродуктивные потери.

Таким образом, сравнение витальных характеристик у коренных народов Сибири выявило различия в особенностях репродуктивного поведения. Отмечена положительная динамика в уменьшении пренатальных и дорепродуктивных потерь. Высокий их уровень, отмеченный у шорцев, отчасти может быть связан с высоким уровнем инбридинга, показанный нашими исследованиями для этого этноса [5]. Снижение числа медицинских абортов свидетельствует о росте значимости планирования семьи среди коренного населения.

На основе витальных статистик рассчитывался индекс Кроу, который дает максимально возможную оценку интенсивности отбора в предположении, что все различия в плодовитости обусловлены генетически (табл. 3). Полученные значения индекса (I_{tot}) по мере убывания позволили выстроить ряд: шорцы > сибирские татары > алтайцы > хакасы и свидетельствуют о том, что шорцы и сибирские татары испытывают большее давление естественного отбора, чем хакасы и алтайцы. Возрастная динамика индекса показала, что, у шорок и сибирских татарок «младшей» возрастной группы по сравнению с поколением женщин более старшего возраста, величина индекса Кроу возрастает, а у хакасок, напротив, снижается. В структуре индекса преобладает компонента, связанная с дифференциальной плодовитостью, над компонентой, обусловленной дифференциальной смертностью, т.е. в исследованных коренных

популяциях естественный отбор действует главным образом через дифференциальную плодовитость. У хакасок и шорок старшего поколения вклад дифференциальной плодовитости в общую структуру индекса Кроу выше, чем у женщин первой возрастной подгруппы.

Выводы

- исследованные коренные народы Сибири отличаются друг от друга особенностями репродуктивных показателей, репродуктивного поведения, а также вкладом природной и социальной составляющей в формирование данных особенностей;

- снижение уровня пренатальных и дорепродуктивных потерь во времени может свидетельствовать о совершенствовании системы здравоохранения на этнических территориях;

- во всех изученных группах коренных народов Сибири выявлено снижение среднего числа беременностей и живорождений, что отражает наличие демографического перехода к суженному уровню естественного воспроизводства.

- расчетные значения индекса Кроу (I_{tot}) свидетельствуют о том, что шорцы и сибирские татары испытывают большее давление естественного отбора, чем хакасы и алтайцы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке грантов РФФИ № 13-06-98014р, РФФИ № 14-06-00272, Государственного задания Минобрнауки № 2014/164.

Таблица 3. Структура индекса Кроу у коренных сибирских народов

	Группа	Индекс Кроу и его компоненты			
		I_m	I_f	I_{tot}	I_m/I_{tot} , %
Алтайцы	Общая	0,134	0,245	0,411	32,60
	45-64 гг.	0,129	0,222	0,379	34,04
	≥ 65 лет	0,104	0,221	0,348	29,89
Хакасы	Общая	0,071	0,256	0,345	20,58
	45-64 гг.	0,067	0,239	0,322	20,81
	≥ 65 лет	0,092	0,279	0,396	23,23
Шорцы	Общая	0,148	0,348	0,548	27,01
	45-64 гг.	0,161	0,453	0,687	23,44
	≥ 65 лет	0,143	0,343	0,535	26,73
Татары сибирские	Общая	0,051	0,409	0,481	10,61
	45-64 гг.	0,074	0,319	0,412	17,95
	≥ 65 лет	0,000	0,302	0,302	0,00

Примечание: I_m – компонента отбора, связанная с дифференциальной смертностью, I_f – компонента отбора, связанная с дифференциальной плодовитостью, I_{tot} – тотальная компонента отбора.

Литература

1. Crow J.F. Some possibilities for measuring selection intensities in man // Human Biol. – 1958. – 30. – P. 1–13.
2. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
4. Боровиков В.П. STATISTICA. Искусство анализа данных на компьютере: для профессионалов. – СПб: Питер, 2003. – 502 с.
5. Ульянова М.В. Динамика популяционно-генетической структуры шорцев Южной Сибири: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Томск: Учреждение РАМН НИИ медицинской генетики СО РАМН, 2010. – 23 с.

ULYANOVA M.V., LAVRYASHINA M.B., DRUZHININ V.G.

Kemerovo State University,

Russia, 650043, Kemerovo, Red, 6, e-mail: ulmar2003@mail.ru

COMPARISON OF REPRODUCTION FEATURES OF THE INDIGENOUS ETHNIC GROUPS OF SIBERIA

Aims. Identify peculiarities of reproduction in indigenous Siberian ethnic groups: Altai, Khakassia, Shor, Siberian Tatars and assess the impact factor of natural selection. **Methods.** According to demographic profiles were analyzed age and vital characteristics. Based on vital statistics parameters of natural selection were calculated by the method proposed by Crow. **Results.** Khakasians and Siberian Tatars shown earlier age at menarche compared with Altai. Physiological reproductive period in all ethnic groups was 33–34 years old, the actual reproductive period – less than 1/3 of the physiological. The research showed a reduction in the level of prenatal and pre-reproductive losses, the average number of pregnancies and live births per generation in all ethnic groups. **Conclusions.** Indigenous peoples of Siberia differ from each other by peculiarity of reproductive health indicators and reproductive behavior. In all groups of indigenous peoples of Siberia revealed the presence of the demographic transition to narrowed level of natural reproduction. The values were calculated by Crow's index (I_{tot}) and it is shows a higher pressure of natural selection in populations of Shor and Siberian Tatars.

Key words: reproduction, the indigenous peoples of Siberia, natural selection.

УДК 631.527:633.521

ЛОГІНОВ М.І.¹, РОСНОВСЬКИЙ М.Г.¹, ЛОГІНОВ А.М.²

¹ Глухівський національний педагогічний університет імені Олександра Довженка, Україна, 41400, м. Глухів, вул. Києво-Московська, 24, e-mail: gnpu@mail.ru

² Глухівський агротехнічний інститут імені С.А. Ковпака Сумського національного аграрного університету,

Україна, 41400, м. Глухів, вул. Терещенків, 36

СЕЛЕКЦІЯ ЛЬОНУ-ДОВГУНЦЯ: ІСТОРИЧНІ АСПЕКТИ РОЗВИТКУ

Льон-довгунець (*Linum usitatissimum* L.) – одна з важливих сільськогосподарських культур, які вирощуються в поліських та західних регіонах України. Продукція льону широко використовується в текстильній, лакофарбовій, харчовій та інших галузях народного господарства. Нині в світі льон займає майже 7 млн. га посівних площ, з них льон-довгунець – біля 1,2 млн. В Україні в окремі роки льоном-довгунцем засівали до 240 тис. га [1, 2].

Селекційна робота з льоном-довгунцем розпочалась у Росії Д.Л. Рудзінським у 1908 р. на селекційній станції колишньої Петровської сільськогосподарської академії в Москві [3]. Він прийшов до висновку, що найбільш вірним методом селекції льону-довгунця є індивідуальний добір. При цьому слід приділяти особливу увагу на довжину стебла і кількість отриманого з них волокна. В результаті проведених робіт у 1927 р. були створені перші селекційні сорти, які були найбільш розповсюдженими і конкурентоздатними в порівнянні з місцевими сортами. Сорт 806/3 характеризувався високою прядивною здатністю волокна, він і донині широко використовується селекційній практиці в якості донора за цією ознакою.

Значний внесок у розвиток методичних питань селекції льону належить Л.Ф. Альтгаузену [3]. Важливим результатом його досліджень стало те, що він перший науково обґрунтував ту схему селекції льону, яка стала основою для всіх подальших методичних розробок.

Селекційна робота з льоном-довгунцем велась також на Псковській сільськогосподарській станції Н.А. Д'яконовим з 1911 р. і на Енгельгардтовській сільськогосподарській станції К.Г. Ренардом з 1913р. В 1930–1933 рр. були районовані сорти Псковський поліпшений Н.А. Д'яконова і 0107, 0109, 0113, 0120, 0262,

0264, 0266 та Альфа К.Г. Ренарда.

Основним недоліком селекції льону на той час було те, що оцінку і добір селекційного матеріалу проводили в основному за побічними ознаками. Але практика селекційної роботи показала: у зразків льону, які рівнозначні за морфологічними ознаками, часто буває не однаковий як абсолютний, так і відносний показник вмісту волокна у стеблах. Тому селекційна робота не привела до видатних результатів.

Матеріали і методи

Після створення в 1930 р. ВНДІ льону з мережею зональних дослідних станцій селекційна робота з льоном стала проводитись більш цілеспрямовано за єдиною методикою. В короткий строк із кряжових форм льону шляхом індивідуального добору були створені високопродуктивні селекційні сорти: 1288/12, Прядильщик, Светоч – Н.Д. Матвеева, Н.Т. Митрофанова, В.Е. Земіт; Ударник, Победитель, Текстильщик – А.А. Слініна; Стахановец – В.Н. Ключкова. За вмістом волокна всі ці сорти відносяться до низьковолокнистих (16–18%).

Починаючи з 50-х років, активно розгорнулися роботи по створенню сортів льону з поліпшеними господарсько цінними ознаками. З цією метою вивчалась мінливість і успадкування ознак, способи індукції мінливості для створення стабільних форм поліпшених рослин.

Велику увагу дослідниками було приділено вивченню вихідного матеріалу і методам його оцінки. У першу чергу це пов'язано з розширенням генетичної різноманітності селекційного матеріалу. Нині створена велика світова колекція льону, яке знаходиться в 20 країнах. Найбільші колекції мають: Росія (5501 зразок ВНДІ льону і 5100 – VIP), Німеччина (3500), США (2659), Румунія (2136), Чехія (1792), Франція (1526), Україна (1026) та

багато фірм і організацій інших країн [4].

Одним з головних напрямків розвитку селекції льону у цей період стала розробка методичних питань. Багато уваги приділялось такій важливій господарсько-цінній ознаці, як стійкість стебла до вилягання. Стійкість до вилягання обумовлена комплексом властивостей і ознак рослин льону біологічного і морфологічного характеру. Діаметр стебла, ступінь розвитку кореневої системи позитивно пов'язані зі стійкістю рослин до вилягання, а вміст волокна – негативно. В той же час дана ознака залежить також від метеорологічних та агротехнічних умов.

Результати та обговорення

Розробка і застосування методів оцінки рослин льону за ознакою стійкості до вилягання, вивчення характеру успадкування дозволили вивести сорти, які мають нижчій ступінь полягання. Так був створений сорт Л-1120 (районований у 1951 р.), який в подальшому став одним з донорів при виведенні нових, стійких до вилягання сортів.

Ю.І. Рогаш запропонувала оцінювати стійкість рослин льону за ступенем скривленості основи стебла [5]. Її дослідями встановлено, що ця ознака успадковується проміжно, але в більшості випадків спостерігається відхилення в бік стійкої батьківської форми. Крім того, розроблені методи визначення ступеня полягання рослин за масою гіпокотилля, масою 10-сантиметрового відрізка комеля стебла, за показником відношення висоти стебла до його діаметра (миклості), та масі підсім'ядольного коліна [6, 7].

Найбільш вирішеною проблемою в селекції льону-довгунця можна вважати створення високоволокнистих сортів завдяки надійним методам оцінки селекційного матеріалу на всіх етапах селекції. Суттєвий вклад у розвиток цього напрямку селекції внесли А.Р. Рогаш, А.М. Марченков, А.П. Крепков, Л.М. Каргопольцев, Т.А. Александрова, Л.С. Атрашкевич, Н.В. Струкова, С.Ф. Тихвинський, І.І. Карпуніна, А.М. Богук, В.П. Динник та інші дослідники [8–10]. Вміст волокна у стеблах сучасних сортів становить 28–32%, а в окремих лініях даний показник досягає 36–43% [11].

Основним методом селекції льону є внутрішньовидова гібридизація з наступним індивідуальним доборою та всебічною оцінкою селекційного матеріалу за господарськими і біологічними ознаками. Багато уваги дослідниками було приділено вивченню комбінаційної

здатності (КЗ) сортів [12, 13]. Виявлена висока КЗ у сортів Л-1120, Оршанський 2, Верхневолзький – за урожаєм насіння, Білінка, Регіна, Торжокський 4, Л-1120 – за стійкістю до вилягання. Ці сорти рекомендовано вико ристовувати при підборі пар для схрещувань.

У 1960–1970 рр. районовані високоволокнисті сорти: И-16, ВНИИЛ-11, ВНИИЛ-17, Тверця селекції ВНДІ льону, Псковський 1, Спартак, П-359, К-6 селекції Псковської сільськогосподарської дослідної станції; Т-5, Т-7, Т-9, Т-10 селекції Томської дослідної станції; ЛД-147 селекції НДІ землеробства і тваринництва західних регіонів України; Оршанський 2 селекції Білоруського НДІ землеробства.

Завдяки зусиллям селекціонерів у 1980 – 1990 рр. у виробництво були впроваджені сорти із вмістом волокна вище 30%. Були районовані такі сорти, як Торжокський 4, Лазурний, Новоторжський, Славний 82, Апексім, А-29 селекції ВНДІ льону; Могильовський, Прогрес, Призив 81, Дашківський, Могильовський 2 селекції Могильовської сільськогосподарської дослідної станції; Спартак, Псковський 85 селекції Псковської сільськогосподарської дослідної станції; Смоленський, С-108, Союз селекції Смоленської сільськогосподарської дослідної станції; Оршанський 72 селекції Білоруського НДІ землеробства, сорт Сальдо естонської селекції та інші.

В цей же період був районований ряд сортів української селекції. Зокрема, сорт Зоря 87 селекції ВДІ землеробства і тваринництва західних регіонів і НДІ землеробства, сорт Київський, Український 2 і Блакитний селекції НДІ землеробства, сорт Мрія і Сінільга селекції НДІСГ Полісся, сорти Чарівний, Глухівський ювілейний, Глінум, Глазур, Глобус, Гладіатор селекції Інституту луб'яних культур. Серед українських сортів слід виділити сорт Зоря 87, який відрізняється високою якістю волокна і є національним стандартом за даною ознакою при порівняльній оцінці сортів у Державному сорто випробуванні.

Однією з актуальних проблем селекції льону-довгунця є створення сортів, які поєднували б високу продуктивність із поліпшеною якістю волокна. Для одержання сортів з високою якістю волокна, крім знання закономірностей успадкування даної ознаки, потрібні надійні і достовірні методи оцінки селекційного матеріалу на кожному етапі селекційного процесу.

Існує багато селекційних методів визначення якості волокна. Деякі з них

засновані на визначенні побічних ознак [14, 15], інші базуються на інструментальній оцінці волокна [16], анатомічних [17, 18], фізичних [19] та хімічних [20] властивостей. На жаль, ці методи дуже трудомісткі, мало пристосовані для проведення масових аналізів і практично не використовуються в селекційній практиці.

В останні роки створено метод визначення якості волокна в індивідуальних рослинах за відносним розривним навантаженням (ВРН) пряжі, який ґрунтується на визначенні показників гнучкості і міцності волокна [21]. Використання цього методу дає можливість контролювати ознаку якості волокна на ранніх етапах селекційного процесу на рівні індивідуальної рослини.

Найбільш перспективним напрямком у боротьбі з хворобами льону є створення стійких сортів. Однак слід відзначити, що досі немає сортів з достатнім комплексом стійкості до захворювань [22]. У природі йде постійний расоутворювальний процес, проходить адаптація і накопичення вірулентних рас, змінюється склад популяції патогену. Тому існує необхідність систематичної селекційної роботи на підвищення ступеня імунітету льону.

Поряд з традиційними методами селекції – гібридизацією та добором в селекційній роботі з льоном-довгунцем використовуються також методи експериментального мутагенезу, поліплоїдії і біотехнології. Застосування вказаних методів дає можливість отримати новий вихідний матеріал для селекції, а також поліпшити існуючі сорти [23, 24]. Внаслідок дії хімічних мутагенів виявлені мутанти з підвищеним вмістом волокна в стеблах, з різною тривалістю періоду вегетації, з вищим ступенем стійкості до вилягання та хвороб. Мутанти з комплексом господарсько-цінних ознак використовуються як вихідний матеріал при гібридизації [25]. Слід відмітити, що українськими селекціонерами з допомогою хімічного мутагенезу створені два сорти льону-довгунця – Зоря 87 та Чарівний.

Біотехнологія відкриває принципово нові

перспективи мінливості геному льону, поліпшення комплексу важливих біологічних і господарсько – цінних ознак сортопопуляцій. Отримані протопласти культивованих і диких видів льону та регенерації з них рослин [26].

Одержано гаплоїдні рослини з пиляків льону [25]. Ведуться значні роботи по виявленню можливостей застосування морфогенетичних методів у селекційних цілях для одержання рослин-регенерантів з різних вегетативних і генеративних органів вихідних рослин льону [28, 29].

Висновки

Підсумовуючи вищевикладене, слід підкреслити, що в науковому забезпеченні льонарства з боку генетиків і селекціонерів зроблено чимало. Селекція сьогодні – це найбільш наукомісткий напрямок біологічної науки. Але перед нею стоять нові завдання, пов'язані з вирішенням різнобічних питань. Потрібне подальше удосконалення і розробка теоретичних основ генетики і методів селекції льону-довгунця, поповнення і всебічне вивчення світової колекції за основними біологічними і господарсько-цінними ознаками, виявлення зразків з високою комбінаційною здатністю як перспективних донорів.

Великим недоліком у селекції льону в Україні є те, що зовсім призупинена дослідна і практична робота з біотехнології, недостатньо використовуються на практиці теоретичні дослідження з питань експериментального мутагенезу і інших методів створення нового вихідного матеріалу. Необхідно зробити корінні зміни у вирішенні проблем селекції на підвищення якості волокна.

Нині є гостра потреба у створенні національного селекційно-генетичного центру України по льону, який повинен координувати всі фундаментальні дослідження і розробку методичних питань з генетики, селекції і насінництва цієї культури, створення нових сортів з комплексом позитивних господарських, біологічних і адаптивних властивостей.

Література

1. Жученко А.А. Лен в России и мировые тенденции его производства // Селекция, семеноводство, возделывание и первичная обработка льна-долгунца. – Торжок: ВНИИЛ. – 1994. – Вып. 28–29. – С. 5–23.
2. Евминов В.М., Карпецъ І.П. Льон-довгунецъ // Технічні культури. – К.: Урожай. – 1982. – С. 5–68.
3. Матвеев Н.Д. Методика селекции льна-долгунца на волокно // Селекция и семеноводство льна-долгунца. – М.–Л.: Сельхозгиз, 1934. – С. 45–84.
4. Жученко А.А., Рожмина Т.А., Курчакова Л.Н., Ущяповский И.В., Киселева Т.С. Сбор, сохранение, изучение и использование генетических ресурсов // Селекция, семеноводство, возделывание и первичная обработка льна-долгунца. – Торжок: ВНИИЛ. – 1894. – Вып. 28–29. – С. 75–94.
5. Рогаш Ю.И. Наследование и изменчивость устойчивости льна-долгунца к полеганию // Сб. науч. тр. –

- Торжок: ВНИИЛ, 1975. – Вып. XII. – С. 26–33.
6. Александрова Т.А., Барцева А.А. Морфологические и анатомические особенности стебля льна-долгунца в связи с устойчивостью к полеганию // Селекция, семеноводство и агротехника возделывания льна-долгунца. – Торжок: ВНИИЛ. – 1978. – Вып. XV. – С. 21–25.
 7. Афонин М.М., Миронова Е.Д. Влияние строения стебля льна на устойчивость к полеганию // Лен и конопля. – 1984. – № 4. – С. 20–22.
 8. Рогаш А.Р., Марченков А.Н. Результаты и перспективы селекции льна-долгунца // Селекция, семеноводство и технология возделывания технических культур. – М. – 1980. – С. 125–134.
 9. Крепков А.П. Особенности селекции льна-долгунца на Томской ГСХОС // Сб. науч. тр. – Томск: Томская с.-х. оп. ст., 1997. – С. 5–12.
 10. Каргопольцев Л.Н., Хомутовский П.Р. Достижения селекции и характеристика сортов льна-долгунца // Селекция интенсивных сортов полевых культур. – Горки. – 1991. – С. 28–33.
 11. Александрова Т.А., Марченков А.Н. Результаты и перспективы селекции льна-долгунца // Селекция, семеноводство, возделывание и первичная обработка льна-долгунца. – Торжок: ВНИИЛ. – 1994. – Вып. 28–29. – С. 34–37.
 12. Карпунина И.М., Корниенко Г.П. Комбинационная способность сортов льна-долгунца // Лен и конопля. – 1981. – № 1. – С. 35–36.
 13. Хотылева Л.В., Полонецкая Л.М. Генетический контроль количественных признаков и оценка комбинационной способности сортов льна-долгунца в первом и втором гибридном поколениях // Сельскохозяйственная биология. – 1987. – № 1. – С. 72–75.
 14. Полякова А.К. Сравнительное изучение методов оценки качества волокна на первых этапах селекции льна-долгунца: Автореф. дис... канд. с.-х. наук: 06.01.05. –Вир.–Л., 1975. – 22 с.
 15. Логинов М.И. Оценка качества волокна индивидуальных растений льна-долгунца на ранних этапах селекции // Селекция, семеноводство, возделывание и первичная обработка льна-долгунца. – Торжок: ВНИИЛ. – 1994 – Вып. 28–29. – С. 70–74.
 16. Шушкин А.А. Технологическая оценка селекционных сортов льна. – М.: Россельхозиздат, 1962. – 104 с.
 17. Ордина Н.А. Оценка качества волокна в льняных стеблях по анатомическим признакам // Лен и конопля. – 1960. – № 6. – С. 20–22.
 18. Тихвинский С.Ф., Дудина А.Н. Новый метод оценки качества волокна льна-долгунца // Биологические и агрономические основы повышения урожайности с.-х. культур. – Пермь, 1976. – С. 145–150.
 19. А.с.1621206 СССР, А.01 Н1/04 Способ оценки прядильной способности льняного волокна на ранних этапах селекции / Новицкий Г.Г., Синицин А.И., Фазлыев Ф.Х., Шешенин В.А., Марченков А.Н., Сергеев И.П. – 4 с. Д.с.п., 1986.
 20. Ас. 917808 СССР, А01 Н1/04 Способ предварительной оценки селекционного материала льна-долгунца на качество волокна / Афонин М.И., Кошелева Л.Т., Миронова Е.Д., Бахнова К.В. – 2с. Оpubл. 07.04.82, Бюл. № 12.
 21. Тимонин М.А., Логинов М.И. Метод оценки качества волокна в индивидуальных растениях льна-долгунца на ранних этапах селекции // Сб. науч. тр. Томской с.-х. оп. ст. – Томск, 1997. – С. 50–53.
 22. Марченков А.Н., Крылова Т.В. Селекция льна-долгунца на устойчивость к болезням // Защита растений. – 1977. – № 10. – С. 18–19.
 23. Дубинин Н.П. Сельскохозяйственная генетика на новом этапе // Вестник сельскохозяйственной науки. – 1976. – № 9. – С. 34–42.
 24. Шаров И.Я. Получение исходного материала для селекции путем обработки семян льна-долгунца супермутагенами // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – Л., 1972. – 48, вып. 2. – С. 117–125.
 25. Бачалис К.П. Получение селекционно-ценных форм льна методом экспериментального мутагенеза // Тезисы докладов. Третий съезд Всесоюзного общества генетиков и селекционеров. – Л.: Наука, 1977. – С. 32.
 26. Baracat M.N., Cocing E.C. Plant regeneration from protoplast derived tissues of *Linum usitatissimum* L (flax) // Plant cell Reports. – 1983. – 2. – P. 314–317.
 27. Hugan A.Mc., Swartz M.A. Tissue culture derived salt tolerant line of flax (*Linum usitatissimum*) // Plant Physiology. – 1984. – 117. – P. 109–117.
 28. Mathevs V.N., Narayanaswamy S. Phytohormone control of regeneration in culture tissue of flax // Pflanzphysiologie. – Bd. 80. – 1976. – P. 436–442.
 29. Marray B.E., Handiside R.I., Keller M.A. *In vitro* regeneration shoots and stem explants of haploid flax (*Linum usitatissimum*) // Canad. J. of Genetic. and Cytol. – 1977. – 19, N 1. – P. 177–186.

LOGINOV M.I.¹, ROSNOVSKIY M.H.¹, LOGINOV A.M.²

¹ Oleksandr Dovzhenko Hlukhiv national pedagogical university,
Ukraine, 41400, Hlukhiv, Kievo-Moskovska str., 24, e-mail: gnpu@mail.ru

² S.A. Kovpak Hlukhiv agrotechnical institute of Sumy national agrarian university,
Ukraine, 41400, Hlukhiv, Tereshchenkiv str., 36

LONG FIBER FLAX SELECTION: HISTORICAL ASPECT OF DEVELOPMENT

Aims. Works on long fiber flax selecting which were begun in 1908 had a range of drawbacks: material estimating was conducted according to the indirect characteristics. **Methods.** Afterwards the selected material was estimated according to plants fastness to lodging, fiber quality, and perseverance to diseases. **Results.** As the result of the work done there was selected new sorts of highly productive and fiber qualitative long fiber flax. **Conclusions.** It's necessary to improve the theoretical basis of long fiber flax selection, enrich and study the world collection far and wide, find out specimens with high combination ability for being used in the selection process.

Key words: lonf fiber flax: the history of selection.

УДК 573.3:001

МАЛЕЦКИЙ С.И.

Институт цитологии и генетики ФАНО,

Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Акад. Лаврентьева, 10, e-mail: stas@bionet.nsc.ru

МОРФОГЕНЕЗ И БИОСФЕРОЦЕНТРИЧЕСКАЯ ПАРАДИГМА ЖИЗНИ В.И. ВЕРНАДСКОГО

Фундаментальные свойства биосферы, по мнению В.И. Вернадского, определяется законами Космоса. Создав новую науку (космо-биогеохимию), он по новому сформулировал представления о природе живого, которую можно обозначить как «биосфероцентрическая парадигма» (БЦП) жизни [1]. Он писал: «Биогеохимия вносит в научное изучение явлений жизни совершенно другую трактовку естественных живых тел, чем та, к которой привык биолог. <...> Рассматривая живой организм в аспекте биосферы, она обращается к составляющим его *атомам*. <...> Жизнь проявляется в непрерывно идущих <...>, закономерных миграциях атомов из биосферы в живое вещество, с одной стороны, и, с другой стороны, в обратных их миграциях из живого вещества в биосферу» [1]. «Биогеохимия дополняет работу биолога, внося в исследование явлений жизни такие ее проявления, которых мало или совсем не касались биологи. <...> Биогеохимия исходит из атомов и изучает влияние атомов, строящих живой организм, на геохимию биосферы, на ее атомную структуру. Из множества признаков живого организма она выбирает немногие, но это будут как раз *наиболее существенные* в их отражении в биосфере» [2].

По поводу своих взглядов на природу

живого Вернадский писал: «Я ясно стал осознавать, что мне суждено сказать человечеству новое в том учении о живом веществе, которое я создаю, и что есть мое призвание, моя обязанность, наложенная на меня, которую я должен проводить в жизнь – как пророк, чувствующий внутри себя голос, призывающий его к деятельности. <...> Я считаю, мои представления о живом веществе вносят новое в понимание природы, и связанное их изложение составляет *не науку*, но «*учение*» в общей схеме знаний, которое не было до сих пор в цельном виде высказано» [3].

Симметрия. Один из фундаментальных постулатов БЦП Вернадского – констатация *несоответствия геометрических пространств у живого и косного вещества планеты*. «Между живыми и косными естественными телами биосферы нет переходов – граница между ними на всем протяжении геологической истории резкая и ясная. <...> Вещество биосферы состоит из двух состояний, материально и энергетически различных – живого и косного. Хотя живое вещество в биосфере материально ничтожно, энергетически оно выступает на первое место. Этим определяется новое чрезвычайно важное свойство биосферы – ее геометрическая разнородность. Можно допустить <...>, что живое вещество проявляет

иную геометрию, чем геометрия Эвклида» [2]. Вслед за Л. Пастером, он осознал, что наряду с физическими и химическими свойствами органических молекул необходимо принимать во внимание их геометрические свойства, что, по нашему мнению, привело Вернадского к пониманию *геометрического кода жизни* [1].

При описании строения молекул и живых тел В.И. Вернадский использует понятие «симметрия» – соответствие в расположении частей объекта относительно некой точки, прямой или плоскости. В естествознании с симметрией связаны законы сохранения энергии, количества движения, строение атомов, молекул, структура кристаллов и пр., а также свойства живого вещества. В начале XX в. он писал: «Принцип симметрии <...> уже более 100 лет как проник в науку в современной форме и раскрылся нам с поразительной яркостью в одной из наиболее совершенной отрасли физики – кристаллографии. Новым в науке явилось не выявление принципа симметрии, а выявление его всеобщности» [2].

Известно, что оптическая изомерия присуща, вероятно, всем органическим молекулам. Одновременное сосуществование правых (R) и левых (L) молекул в косной материи и нарушение этой симметрии у живых тел – атрибутивное свойство, отличающее живое вещество от косного. Органические молекулы, синтезируемые в клетках, вращают плоскость поляризованного света всегда только в одном направлении (диссимметрия). Другими словами, диссимметрия встречается в живом веществе, тогда как молекулам из неживой природы присуща зеркальная симметрия (смесь левых и правых молекул) [1, 2].

Геометрия молекул и кодирование. По Вернадскому роль атомов в понимании жизненных процессов не до конца понята: «вся химия биосферы как оболочки планеты изменена под влиянием жизни. Механизм этого влияния расположен *на атомном уровне*. Это воздействие обнаруживается не в молекулярной области окружающей среды, а на атомном уровне < ... > Отсюда логически можно заключить, что воздействие жизни на симметрию атомов может простирается и на другие биогенные химические элементы. В таком случае это будет главным фактором проявления жизни» [5]. Сравнивая кристаллы алмаза и графита, имеющие идентичный химический состав, но разное строение кристаллов, В.И. Вернадский фактически осознал и природу *биологического кодирования* [1].

Именно геометрические свойства атомов углерода определяют структуру всех органических молекул и их физико-химические свойства. Эти свойства (аналоговая форма информации) определяет процессы узнавания (комплементарности) между молекулами, геометрию надмолекулярных образований, т. е. фактически определяют морфогенетические процессы в ходе самоусложнения организма.

С этой точки зрения можно под другим углом посмотреть на миф об «уникальности» химического кода ДНК. Можно утверждать, что нуклеиновым кислотам присуще, как минимум, два типа кодирования: *первичное – геометрическое, вторичное – арифметическое или цифровое*. Кодированная роль нуклеиновых кислот ДНК в синтезе полипептидов в клетках определяется изначально не столько последовательностью нуклеотидов (вторичная или *цифровая форма кодирования*), сколько геометрической структурой ее молекул (*первичное или геометрическое кодирование*). Геометрия молекул ДНК представлена двумя вертикально переплетенными между собой спиралями. Длина шага у каждой из этих спиралей составляет 34 Д, ширина 21 А. Цифры 21 и 34 (отношение длины и ширины молекулы ДНК) – это числа из последовательности Фибоначчи, и их соотношение равно значению $\phi = 0,61803...$ или $\Phi = 1,61803...$ (золотое сечение), т. е. химический (или цифровой) код ДНК основан на геометрический (золотой) пропорции.

«С биологической точки зрения мы можем рассматривать идеи генетического кодирования как средство копирования и сохранения целостности, но указанное кодирование не принадлежит каким либо конкретным атомам (углероду, водороду, кислороду, азоту), составляющим ДНК. <...> Носителем постоянства является не только сочетание нуклеотидов в молекуле ДНК, *но также и ее винтовая форма, которая отвечает за способность к воспроизводимости ДНК*. Эта форма, являющаяся особым типом в группе регулярных спиралей, основана на постоянных геометрических пропорциях.< ...> Эти пропорции можно понимать как существующие, без каких-либо материальных аналогов, как абстрактные геометрические отношения. *Архитектура существования тел определяется невидимым, нематериальным миром чистых форм и геометрии*» [6].

Очевидно, что геометрия (архитектура) полимерных органических молекул напрямую

связана с информацией. «Наследственная информация» – это не только линейная последовательность нуклеотидов в молекулах ДНК (одна из форм информационной записи), что потребовало бы от молекул ДНК обладание гигантской информационной емкостью, которая у них попросту отсутствует. Значительная часть информации динамично сосредоточена в молекулярных и надмолекулярных компонентах клеток и реализуются без прямого участия молекул ДНК (*аналоговая форма информации*). Аналоговые коды присущи молекулам и структурам различного уровня и различной природы, формируя изменчивость как внутри клеток, а также на уровне тканей и органов.

Аналоговая информация присуща всем белковым молекулам, позволяя им выполнять важнейшие функции обмена веществ, так как структурная комплементарность при фермент-субстратном взаимодействии высоко специфична и аналогична принципу «ключ-замок». Благодаря комплементарности различные лиганды вызывают метаболические эффекты в клетках через рецепторы, получившие своё обозначение по названию лигандов: ацетилхолиновые, дофаминовые, гистаминовые и др. Комплементарности белков-ферментов с субстратами соответствуют изменениям архитектуры их молекул в результате гидрофобных, полярных и ионных взаимодействий (сближение и ориентация реагирующих групп фермента и субстрата). «На процесс ферментативного превращения веществ активное действие оказывают факторы среды, изменяющие геометрическое соответствие структуры активного центра ферментов и субстратов. В итоге ускорение каталитических реакций может возрасти до гигантских значений – в 10^{15} раз» [7].

Биосфера и внешняя среда для живого. В дискурсе о биосфере широко используется понятия квантовой физики, привнесшие новое понимание отношений между средой существования и живыми телами. Для биосферы среда – это электромагнитные излучения и электромагнитные поля (ЭМП) Космоса, взаимодействующие с ЭМП атомов и молекул, входящих в состав как живых, так и косных тел. «Почему же электромагнитная сигнализация в биосфере осуществляется посредством ЭМП радиочастот, низких и инфракрасных? Потому, что из всех мыслимых типов связи радиосвязь является наиболее экономичной и информативной. <...> В биосфере преимущества связей посредством ЭМП по сравнению со звуковой,

световой и химической обусловлены следующими причинами: а) сигналы ЭМП <...> распространяются в любых средах обитания жизни – в речной и морской воде, в почве и в тканях организмов; б) такие сигналы могут передаваться при любых метеорологических условиях и в любое время суток; в) они могут передаваться на любые расстояния на планете; г) в отличие от избирательности к другим раздражителям все биосистемы реагирует на ЭМП. <...> Чувствительность к ЭМП у биосистем возрастает по мере их усложнения: от макромолекул – к клеткам, изолированным органам, организму. Так же возрастает чувствительность и в ряду организмов от простейших до хордовых» [8].

Все живое непрерывно находится под воздействием ЭМП, которые влияют не только на структуры отдельных молекул, но и на клетки в целом, меняя геометрию их компонентов через рецепторы клеточных мембран. «Наноантенны белков-рецепторов способны улавливать колебания ЭМП, таких как свет, звук и радиоволны. Такие антенны вибрируют наподобие камертона, и если колебания энергии во внешней среде оказываются в резонансе с антенной белка-рецептора, в нем происходит перераспределение заряда, и он изменит свою конфигурацию. <...> Коль скоро белки рецепторы могут воспринимать энергетические поля, нам необходимо отказаться от представления, что на физиологические процессы в клетке могут влиять только молекулы того или иного вещества. <...> После того как белки-рецепторы проинформируют клетку о внешних сигналах, ей надлежит предпринять адекватные ответные действия, направленные на поддержание жизнедеятельности. Эта задача белков-эффекторов. В целом тандем рецепторов и эффекторов можно назвать коммутатором: он реагирует по типу «раздражение – отклик» [9]. Изменения в геометрии белков-рецепторов и белкоэффекторов поддерживают жизнедеятельность клеток через изменения геометрии входящих в состав клеток молекул.

Морфогенез. В рамках БЦП Вернадского можно сформулировать общие представления о морфогенетических процессах в клетках животных и растений как о непрерывных процессах самоорганизации, реализуемых под влиянием внешних сил. Это положение прекрасно иллюстрируют тексты проф. Л.В. Белоусова из МГУ по проблеме морфогенеза. «Трудно избежать парадоксального на первый

взгляд утверждения, что генетические факторы при своей важности вовсе не содержат в себе сколь-нибудь однозначной информации о развитии. <...> Долгое время в эмбриологии господствовал преформизм – учение, утверждающее, что морфогенез как процесс самоусложнения вообще фиктивен, а все структуры организмов пространственно размечены «изначально», в некий загадочный момент развития. И хотя открытие Дришем эмбриональных регуляций более 100 лет тому назад строго доказало отсутствие изначальной «разметки», отдельные фрагменты этого воззрения существуют до сих пор. К ним относятся утверждения, что сам по себе развивающийся организм не обладает самостоятельной динамикой, а лишь пассивно воспринимает предельно детализированную информацию, записанную на какой-либо другой матрице. Таковы существующие представления о том, что морфогенез и вообще все процессы развития «запрограммированы генетически». Доведение этого утверждения до его логического предела означало бы, что если мы располагаем полной информацией о структуре генома особи данного вида, мы сможем предсказать его морфогенез. Но вся совокупность имеющихся фактов – как классических, так и недавних – показывает несостоятельность этого утверждения (впрочем, и без того экспериментально не проверяемого). <...> Еще важнее помнить, что **генóm и морфогенез – сущности совершенно разного порядка**. При всех изменениях взглядов на гены со времен Менделя они всегда рассматриваются как статические дискретные факторы, тогда как морфогенез – это разворачивающийся в пространстве-времени континуальный (нерасчленимый по ходу своему на отдельные признаки) процесс. Даже если принять, что каждый шаг морфогенеза связан с активацией или репрессией определенных генов (на самом деле это не так), то пространственно временное расписание активации/репрессии генов должно определяться не ими самими, а вне-(эпигенетическими факторами, прямо или косвенно связанными с морфогенезом. <...> Какие же свойства морфогенеза могут быть адекватно описаны на языке теории самоорганизации? *Прежде всего – это самоусложнение <...> спонтанное (протекающее без внешних воздействий) понижение порядка симметрии объекта (диссимметризация).* <...> Морфогенез представляет собой наиболее подробный и в то же время упорядоченный

процесс самоусложнения из всех происходящих как в живой, так и в неживой природе. Тем не менее, общепринятой теории морфогенеза до сих пор не существует» [10].

Представления о морфогенезе Л.Д. Белоусова находится в полном соответствии с взглядами В.И. Вернадского на природу живого. Однако они не соответствуют геноцентрической парадигме (ГЦП) наследственности, согласно которой именно гены (молекулы ДНК или РНК) контролируют не только отдельные признаки у растений, животных и микроорганизмов, но определяют также и весь ход их развития от рождения до смерти, а также и весь ход эволюции жизни на Земле [9]. Согласно ГЦП только изменения в генах (мутации) и создание на их основе новых комбинаций определяет ход эволюцию всего живого: «основной единицей отбора служит не вид, не группа и даже, строго говоря, не индивидуум. Основная единица – это ген. <...> Крупная мутация, затрагивающая основной план эмбрионального развития, может открыть шлюзы для эволюции во всех направлениях в течение последующих миллионов лет» [11].

Гено- и молекулярно центрические представления о живом, весьма популярные среди современных биологов, находятся в противоречии с множеством экспериментальных наблюдений и со взглядами В.И. Вернадского на природу живого. «Большинство биологов считают, что свойства живого в полной мере проявляются в отдельном организме, что единицей живого является клетка, и что специфика живого связана с особой упорядоченностью биологических структур. Успехи молекулярной биологии привели многих ученых к убеждению, что первооснова этой упорядоченности заложена в особенностях физической структуры ДНК, а, следовательно, законы возникновения и эволюции жизни можно свести к элементарным физическим процессам. *Однако современные биофизические исследования не подтверждают, а опровергают эти радужные надежды*» [8].

Существенные различия между БЦП и ГЦП во взглядах на природу живого наиболее очевидны при рассмотрении морфогенеза у растений и животных, т. е. при рассмотрении образования морфологических структур в процессе их развития. Клетки, как известно, представляет собой высокоорганизованный биохимический реактор, способный воспроизводить себя во всей сложности состава и структуры. Их свойства в ходе развития

однозначно отражаются на ходе морфогенеза как процесса самоусложнения. В качестве иллюстрации рассмотрим геометрическую полярность и симметрию частей растений – ориентация морфобиологических структур в пространстве, приводящих к возникновению различий на противоположных концах клеток, тканей, органов и организма в целом. Полярность у многоклеточных растений связана с полярностью клеток, из которых построено их тело, и обусловлена геометрией входящих в состав клеток молекул. «Характерная черта морфогенеза растений – наличие постоянно действующих локализованных меристем, благодаря чему рост растения продолжается в течение всего онтогенеза, < ... > формируются новые побеги, цветки, корни, создается метамерность строения тела. Симметрия как определяющий фактор морфогенеза может быть радиальной (в корнях, стеблях, цветках), била-

теральной (в листьях) винтовой, симметрией подобия < ... > (спиральность расположения листьев на стебле, зачатков листьев и цветков на конусе нарастания и криволинейной (правые и левые листья, семена, плоды, сосуды древесины)» [12]. Роль генов в реализации полярности и симметрии при морфогенезе растений даже не просматриваются.

БЦП В.И. Вернадского – это целостный взгляд на биосферу и природу живого вещества. По В.И. Вернадскому, осознать природное разнообразие жизни можно не через молекулярный, а через связь атомного и биосферного уровней. «Сейчас, когда биогеохимия конкретно, научно поставила на очередь дня связь жизни не только с физикой частичных сил и с химическими силами, что было известно и раньше, но и со строением атомов, с изотопами, – оставаться в таком инертном положении научная мысль не может» [2].

Литература

1. Малецкий С.И. Геометрический код жизни по Владимиру Вернадскому // Вестник украинского общества генетиков и селекционеров. – 2013. – 11. №2.
2. Вернадский В.И. Науки о жизни в системе научного знания // Тр. по философии естествознания (Библиотека тр. В.И. Вернадского). – М.: Наука, 2000. – С. 414–451.
3. Саенко Г.Н. Владимир Иванович Вернадский: учёный и мыслитель. – М.: Наука, 2002. – 225 с.
4. Малецкий С.И. Геометрические свойства наследственности у растений // Достижения и проблемы генетики, селекции и биотехнологии. – Киев: Логос, 2012. – 4. – С. 144–150.
5. Аксенов Г.П. О природе времени и пространства. – М.: КРАСАНД, 2010. – 352 с.
6. Лолор Р. Сакральная геометрия. Философия и практика. – М.: Варфоломеев, 2010. – 112 с.
7. БЭС (Большой энцикл. словарь. Химия). – М.: изд-во «Большая Российская энциклопедия», 2000. – 792 с.
8. Пресман А.С. Идеи В.И. Вернадского в современной биологии (планетно-космические основы организации жизни). – М.: Знание, 1976. – 64 с.
9. Липтон Б. Умные клетки: биология убеждений. Как мышление влияет на гены, клетки и ДНК. – М.: ООО изд-во «София», 2011. – 224 с.
10. Белоусов Л.В. Морфогенез, морфомеханика и геном // Вестник ВОГиС. – 2009. – 13, № 1. – С. 29–35.
11. Докинз Р. Эгоистичный ген // Пер. с англ. – М.: Мир, 1993. – 318 с.
12. (БЭС) Биологический энциклопед. словарь. – М.: изд-во «Советская энциклопедия», 1989. – 786 с.

MALETSKII S.I.

Institute of cytology and genetics FASO,

Russia, 630090, Novosibirsk, av. Lavrenteva, 10, e-mail: stas@bionet.nsc.ru

MORPHOGENESIS AND BIOSPHEROCENTRIC PARADIGM OF LIFE V.I. VERNADSKY

Aims. Briefly describe the views of V.I. Vernadsky on the nature of the living which allowed him to of ideas which can be denoted as “biosferocentrics paradigm” (BSP) of life. **Methods.** BSP to re-evaluate the role of atoms in the implementation of biochemical functions considering the basic properties of organic molecules should be viewed through the symmetry at the atomic level. The impact of life processes on the symmetry of the atoms can extend to any organic molecules that are the main factor manifestations of life. **Results.** Within BSP can formulate a general idea of morphogenetic processes as a continuous process of self-implemented under the influence of external forces. **Conclusions.** Vernadsky to realize the natural diversity of life can not through molecular levels. He wrote: “Now that the biogeochemistry specifically, research has put on the agenda the relationship of life not only with physics and chemical forces, but with the structure of atoms, – remain in an inert state scientific thought can not”.

Key words: biosphere, morphogenesis, paradigm, symmetry.

СУЩЕСТВУЕТ ЛИ НЕОБХОДИМОСТЬ В ГИПОТЕЗЕ УНИВЕРСАЛЬНОГО ГЕНОМА?

Изучение механизмов биологической эволюции по-прежнему остается актуальной задачей, несмотря на существование множества ее концептуальных моделей – начиная от дарвиновской и заканчивая гипотезой М. Шермана [1]. Очевидно, что новые эволюционные концепции (идеи, представления) появляются по причине неполноты или противоречивости (по мнению авторов концепций), прежде всего, дарвиновской теории (ДТ) и основанной на ней синтетической теории эволюции (СТЭ). Главным образом, указанным теориям «вменяется в вину» невозможность объяснить возникновение сложных структур и функций (например, глаза, танца пчел и т.п.). Использование принципов декомпозиции и биологического усиления, с нашей точки зрения, может быть вполне достаточно для преодоления этого кажущегося противоречия, о чем мы уже писали [2].

Чаще всего тема «парадокса сложности» возникает при описании эволюционных скачков, которые якобы не вписываются в ДТ и СТЭ, в рамках которых используется принцип градуализма. Особый интерес в связи с этим у биологов-эволюционистов вызывает ситуация с так называемым «кембрийским взрывом» (КВ), который считается чуть ли самым значительным событием в эволюции животных. Так, если самые древние прокариотические организмы появились около 3,5 млрд. лет назад, т.е. спустя 1–1,5 млрд. лет после образования самой Земли, то практически все многообразие типов современных животных было сформировано в кембрийском периоде палеозойской эры приблизительно 490–540 млн. лет назад. Длится этот период примерно 50 млн. лет, что существенно меньше, чем длительность предыдущих архейской и протерозойской эр (около 1,0 и 2,0 млрд. лет, соответственно). Этот «взрыв» как бы разделит историю эволюции жизни на земле на два основных периода – на период, когда существовали преимущественно одноклеточные организмы (бактерии и водоросли), и на короткий период, в течение которого появилось основное разнообразие форм многоклеточных животных, наблюдаемое по сей день. При этом парадоксальность

ситуации состоит в том, что до сих пор нет достоверных свидетельств существования переходных форм, т.е. КВ не предшествовало длительному накоплению постепенных изменений и усложнений. Дарвину «кембрийский взрыв» тоже казался загадкой, которую невозможно было объяснить в рамках его собственной (по сути градуалистической) теории, и которая признавалась им в качестве убедительного аргумента против предложенной им теории эволюции.

Хотя с момента окончания кембрийского периода прошло уже более чем 500 млн. лет, но за это время не появилось ни одного нового типа животных с принципиально новым типом строения. Данное обстоятельство можно объяснить тремя типами гипотез: геологическими, экологическими и биологическими. Во-первых, существуют геологические данные о существенных изменениях положения земной оси относительно твердой оболочки, образованной континентами, за чем могли последовать значимые изменения эволюционных факторов. Во-вторых, выдвинута так называемая «кислородная» гипотеза (и большинство исследователей склоняется именно к ней), в соответствии с которой за период, предшествующий кембрийскому произошло значимое увеличение концентрации кислорода в земной атмосфере, что способствовало переходу к более эффективному аэробному метаболизму и снижению интенсивности ультрафиолетового излучения на земной поверхности. Указанные изменения могли привести к появлению дополнительного количества экологических ниш, которые и были в кембрии реализованы путем ускоренного формообразования (точнее, морфофункциогенеза). [3]. В конце концов, эволюция не может быть самоцелью живой материи, хотя и существует определенная инерционность эволюционных процессов. Следует учитывать также конечность разнообразия экологических ниш в земных условиях, формирующих определенные «запросы» для осваивающих их популяций. Вероятно, во всю последующую геологическую историю Земли условия не так сильно менялись,

чтобы возникали принципиально новые по своим характеристикам экониши, требующие, в свою очередь, от организмов принципиально новых форм и функций. Если мы постулируем однозначную связь формообразования (таксонообразования) с появлением новых экониш, то переходным формам организмов должны соответствовать переходные формы климатических и прочих условий (экониш). Если и не было вторых, то неоткуда было появиться и первым. Однако, фактически, были и первые и вторые, но появлялись (и исчезали) в относительной короткий по геологическим меркам срок. Быстрые адаптивные радиации характерны для периодов, наступающих сразу после крупных экологических кризисов. Кембрийский взрыв как раз и является ярким примером быстрой («катастрофической») адаптивной радиации. Стоит, однако, при этом помнить, что сам по себе экологический кризис не гарантирует ускоренной эволюции и даже просто адекватной филогенетической реакции (адаптации). В общем случае при изменении значений экологических параметров возможно как отставание, так и опережение необходимых эволюционных преобразований.

Как бы там ни было, но очевидно, что со временем экологические условия, с одной стороны, становились жестче (например, появление полярных областей холода), а, с другой – мягче (упомянутая выше защита от солнечного ультрафиолета). Все это указывает на необходимость учета двух возможных механизмов эволюционных преобразований – за счет появления новых экологических ниш, в которых могут быть реализованы наличный генетический и эпигенетический потенциалы, и за счет стрессирующего и, как следствие, мутагенного (эпигенного) действия экологических факторов. Последнее обстоятельство указывает на возможную роль собственно биологических (генетических, эпигенетических) факторов, объясняющих причины кембрийского взрыва.

Еще одним поводом для ревизии канонических теорий эволюции является так называемый парадокс величины *C* (*C*-value парадокс), суть которого состоит в том, что размеры генома эукариот настолько велики, что их потенциальная генная (информационная) емкость существенно превышает наличное (потребное) число генов. Кроме этого, вариация величины *C* у эукариот составляет 80 тыс. раз, а «эволюционно примитивные» реликтовые формы по содержанию ДНК на клетку зачастую

превосходят представителей эволюционно «продвинутых» таксономических групп. По словам Б.М. Медникова «Судить о степени эволюционной продвинутой по размерам генома столь же правомочно, как оценивать общественное положение человека по его весу» [4].

Выяснилось, что главным «виновником», ответственным за существование *C*-парадокса является не кодирующая часть ДНК. Так, доля негенной ДНК может оставлять почти 99% всего генома. Количественная разница же между геномами представителей многоклеточных (притом, что эволюционно они сильно отстают друг от друга) значительно меньше. Гены многоклеточных эукариотических организмов в процессе эволюции дублировались либо мутационно изменялись, но принципиально новых генов почти не появлялось, что также сложно объяснить с позиций дарвиновской концепции эволюции [1]. При этом, вероятно, следует учитывать то обстоятельство, что эволюция могла идти и по пути совершенствования регуляторных систем, для чего не требуется появления качественно новых генов. В данном случае, следует говорить о своеобразной «эндогенной эволюции», не обусловленной переходом в новую экологическую нишу.

Вызывает также определенное затруднение для объяснения факт того, что генетические программы развития морфологически различных, но функционально подобных органов включаются одинаковым способом. Так, ген, включающий развитие глазного яблока у хордовых животных и членистоногих, представляет практически один и тот же ген, называемый *Pax6*. По теории Дарвина такого не может быть, поскольку у предков данных типов животных глаз не было. Похоже на то, что генетическая основа сходных качеств и функций существовала еще у предков, но никак себя не проявляла. Известны и другие подобные примеры (сходство генетических механизмов формирования речи человека и обучения птиц пению). Особенно показателен пример с *Hox*-генами, ответственными за план формирования отдельных сегментов тела, который (план) аналогичен у всех типов животных. Кроме этого, оказалось, что последовательность *Hox*-генов на хромосоме соответствует пространственно-временному порядку развития сегментов (головы, груди и т.д.), которые они кодируют. Это тоже трудно объяснить на языке дарвиновской теории, в соответствии с которой необходимые мутантные

локусы появлялись в случайной последовательности, т.е. в случайных местах хромосом эукариот или в нуклеоиде прокариот. Здесь, вероятно, будет уместным сказать, что символичность, знаковость генетического кода не имеет абсолютного значения. Противоположную точку зрения следует рассматривать в качестве проявления своеобразного кодоцентризма. На самом деле, может оказаться, что многоуровневая организация генетического материала в определенной степени отражает структурно-функциональную организацию биологических систем. Яркой иллюстрацией к сказанному (хоть и из весьма далекой от теории эволюции сферы) является пример из нейрофизиологии с расшифровкой визуальных объектов по содержанию спектров нейронной активности мозга. Нейроны не только кодируют информацию, но и в значительной степени топографией своей активности воспроизводят реальные (пространственные, временные) характеристики объектов, на которые направлено внимание.

Указанные выше обстоятельства («трудности» эволюционной теории) побудили Михаила Шермана [1] предложить новую модель эволюционных механизмов, отражающую их генетическую основу. Правда, он сразу и откровенно мистифицирует («креационизирует») эту модель, считая, что причины особых событий, произошедших в начале кембрийского периода не могли иметь земного происхождения, и, что здесь не могло обойтись без «вмешательства извне» («акта творения»). Тем не менее, в модели Шермана наличествует элемент «сермяжной правды», который мы и рассмотрим.

Модель М. Шермана предполагает появление в кембрийском периоде многоклеточных организмов, обладающих «универсальным геномом», в котором содержится генетическая информация о плане строения всех существующих и поныне типов животных. Другими словами, предполагается, что представитель любого типа организации имеет (или имел) в своем геноме информацию любого другого типа и, в конечном счете, именно разница во включении программ определила принадлежность к тому или иному типу организации. Таким образом, одни животные стали червями, а другие хордовыми.

В дальнейшем «доводка» генетических программ, по мнению М. Шермана, могла происходить в соответствии с концепцией Дарвина, т.е. путем небольших случайных

изменений и последующего отбора. Очевидно, что определенный биологический (структурно-функциональный) прогресс все же был, что нашло отражение в существовании более совершенных форм многоклеточных организмов (например, млекопитающих). Фактически, автором гипотезы (претендующей на «высокое звание» теории) в неявном виде утверждается идея об отсутствии прямой генетической связи (т.е. генетической преемственности) между разными типами хордовых животных – основная (базовая) информация предсуществовала еще на этапе, когда возникли основные типы многоклеточных организмов. С логической точки зрения такая позиция вполне корректна. Действительно, одновременное существование простых и сложных типов организмов вовсе не означает, что вторые произошли от первых. Фактически, предполагается наличие родственных связей между многоклеточными организмами в виде общего предка, а не в виде непрерывного (и иногда разветвляющегося) ряда все более и более усложняющихся со временем форм. Забегая вперед, скажем, что, может быть, в этом содержится самое главное рациональное зерно воззрений М. Шермана, дополняющее традиционное («фрактальное») представление генеалогического дерева. Во всяком случае, логично предположить существование двух вариантов генеалогического дерева – классического, с ветвями нескольких порядков разветвления и щеткоподобного (или кисточкоподобного), наиболее полно иллюстрирующее идею М. Шермана об «универсальном геноме». В любом случае, здесь на примере биологической эволюции поднимается очень важная проблема общей теории системогенеза – проблема возникновения нового качества у элементов, изменения их количества и отношений между ними [5].

Мы считаем, что в процессе эволюции происходила иерархизация генома, т.е. часть генов (генома) приобретала регуляторные (управляющие) функции. Данные гены, будучи способными вызывать полную структурно-функциональную реорганизацию (модифицировать морфогенез или даже просто его «породить»), занимают более высокое «положение» по сравнению со структурными генами, поэтому их можно назвать метагенами, а некоторые даже суперметагенами (регуляторы метагенов).

М. Шерман предлагает искать универсальный геном у примитивных многоклеточных, представителями которых являются кишечечно-

полостные. При этом важно было ответить на вопрос – или в процессе эволюции появляются новые гены, которые в принципе отсутствовали у предковых форм и тогда можно строить «классическое» эволюционное дерево, или происходит потеря генов первичного «универсального генома», что означает щеткоподобность эволюционного древа. М. Шерман предполагает вторую возможность, считая, что у предков кишечнополостных было гораздо больше генов, но они «потерялись» из-за неиспользования, и в доказательство приводит пример отсутствия у плоских червей генов, кодирующих белки семейства *EphR*, но имеющихся у человека. Идея Шермана состоит в том, что если у более примитивных, чем черви, форм такие гены сохранились, то это будет подтверждением его гипотезы.

В неявном виде гипотеза М. Шермана базируется на факте избыточности биологических систем, которая проявляет себя на всех уровнях биологической интеграции и, в частности, на макромолекулярном уровне. Возможно несколько путей возникновения избыточности генома, т.е. такого, у которого не вся наличная генетическая информация задействована в морфо-функциогенезе и собственно в онтогенезе. Наряду с явлением полифункциональности генов увеличение информационной емкости генома возможно за счет полногеномной и частичной дубликации генных локусов. Правда, остается открытым вопрос о механизме дубликации генетического материала. Неясно также были ли это нейтральные макромутации (геномные мутации), заложившие основы для дальнейшего адаптиогенеза, или они сразу имели адаптивный характер остается неясным.

Информационному расширению генома могла способствовать и вставки чужеродных генетических текстов, и хромосомные рекомбинации, точечные и хромосомные мутации. Подобная ситуация несколько не противоречит законам генетического наследования, поскольку нейтральные изменения генома тоже наследуются.

Можно согласиться с мыслью М. Шермана о том, что отсутствие какой-либо структуры и/или органа у более простого организма не обязательно указывает на их обязательное появление (приобретение) в процессе эволюции (что, фактически, означает необязательность прогрессивной эволюции), но также может указывать на факт потери или структурно-функционального упрощения у данного

организма за последние 500 млн. лет эволюции.

Достоинство предложенной модели состоит еще и в том, что она обладает определенной эвристичностью, т.е. предсказательной силой, главным образом, указывая на существование у более примитивных организмов генетических программ структурно-функционального развития эволюционно «продвинутых» организмов.

Необходимо также учитывать то, что регуляторных генов (генов «домашнего хозяйства») не так уж много и требуется (генетическая «поддержка» плана строения тела, функционирования выделительной системы, локомоторных органов, сенсорных систем, системы пищеварения, выделительной система, иммунитета, систем размножения, нервной и кровеносной систем), и что они могли первично существовать в виде квазигенов (протогенов). Ведь первичная молекула ДНК не представляла собой «гроздь» генов, не имеющих ни возможности транскрибироваться, ни, тем более, транслироваться.

Гены не только мутируют (мутируют «старые» гены вследствие точечных мутации), кодируя приобретение новых функций и/или оптимизируя существующие, но возникают и новые гены на новой структурной основе (например, вследствие дубликации наличного генетического материала или путем горизонтального или вертикального переноса генов). Новые гены на новой структурной основе возникают как спонтанно («непреднамеренно») в силу эндогенных процессов, так «преднамеренно» в ответ на стрессирующие «запросы» среды, представленной совокупностью биотических и абиотических факторов. Например, популяция в процессе своей жизнедеятельности сама может «породить» фактор в принципе любой природы, который, с одной стороны, будет выступать фактором изменчивости, и, с другой стороны, должна будет к нему приспосабливаться, т.е. фактор может выступить одновременно и фактором отбора [6]. О спонтанности и индуцибельности мутации, разумеется, следует говорить и в отношении точечных мутаций.

Идея избыточности «универсального генома» М. Шермана требует ответа еще на один вопрос (снова системологическая проблема) – мог ли возникнуть геном с такой степенью избыточности? Каковы вообще пределы биологической избыточности, каков механизм биологической избыточности и как его проявление зависит от уровня структурно-

функциональной организации биосистем? В этом отношении интерес представляют взгляды С.Б. Пашутина [7] на механизмы биологической эволюции. Он, в частности, считает, что можно представить «...эволюционный процесс как предварительное, за длительный срок, накопление потенциально или условно полезных химических сочетаний, которые ожидают подходящих условий, чтобы оказаться востребованными... докембрийский этап филогенеза можно рассматривать, как чрезвычайно важную стадию биологической эволюции... Его историческая ценность заключалась в накоплении «биосырья». Не исключено также, что элементы «универсального генома» существовали у одноклеточных предшественников многоклеточных организмов и их возникновение и эволюция происходило на основе «самосборки» предсуществующих генетических систем.

В заключение следует заметить, что вместо того, чтобы обвинять Михаила Шермана в креационистских настроениях (против чего,

кстати, он и сам не возражает), не лучше ли подумать о принципиальной возможности существования «универсального генома» (или о возможности геновой и/или геномной избыточности) и о том, как он мог возникнуть (если мог вообще). В конце концов, гипотеза М. Шермана не претендует на статус новой эволюционной теории, она лишь призвана описать определенный этап биологической эволюции, а именно, этап после возникновения «универсального генома». Самого механизма возникновения такого генома гипотеза не касается. Даже, если гипотеза М. Шермана не подтвердится, она уже сыграла положительную роль, являя собой яркий пример проявления принципа поризма [8], в соответствии с которым поризм – это утверждение («непредвиденное следствие»), сформулированное в ходе решения какой-либо задачи, которое по содержанию своему охватывает намного более широкий круг явлений, нежели тот, к которому эта задача относилась. И ошибочные теории могут быть пористичны.

Литература

1. Sherman M. Universal genome in the origin of metazoan // Cell Cycle. – 2007. – 6, N 15. – P. 1873–1877.
2. Михеев А.Н. Эпигенетическое усиление мутационных изменений, повышающее разрешающую способность естественного отбора // «Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології», сб. наук. праць. – К.: Логос, 2012. – 4. – С. 165–170.
3. Sperling E., Friederich C., Ramanc A., Girguis P., Levin L., Knolla A. Oxygen, ecology, and the Cambrian radiation of animals [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.pnas.org/cdi/doi/10.1073/2013/07/pnas/1312778110.
4. Медников Б.М. Происхождение и эволюция нуклеиновых кислот // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева. – 1980. – 25, № 4. – С. 425–431.
5. Урманцев Ю.А. Эволюционика, или Общая теория развития систем природы, общества и мышления. – М.: Либрикон, 2009. – 240 с.
6. Михеев А.Н. Может ли фактор генетической и/или эпигенетической изменчивости быть одновременно фактором отбора измененных им форм? // Сб. научных праць «Фактори експериментальної еволюції організмів». – Київ: Логос, 2010. – 8. – С. 56–61.
7. Пашутин С.Б. Биологическая эволюция и морфогенез // Биология. Приложение к газете «Первое сентября». – 2004. – N 45. – С. 2–5; N 46. – С. 22–23.
8. Корогодина В.И., Корогодина В.Л. Информация как основа жизни. – Дубна: Издательский центр «Феникс», 2000. – 208 с.

MIKHAYEV A.

*Institute of cell biology and genetic engineering of NAN of Ukraine,
Ukraine, 03143, Kiev, Zabolotnogo str., 148, e-mail: mikhalex7@yahoo.com*

IS THERE NECESSITY FOR HYPOTHESIS OF UNIVERSAL GENOME?

On the example of hypothesis about the «universal genome» of M. Sherman important questions in relation to the rates (speeds) of evolutionary transformations of the biological systems and problem of abundance (inertness) of evolutionary transformations are considered in the article. Geological, ecological and biological mechanisms which explain the phenomenon of the Cambrian explosion are selected. It is demonstrated that hypothesis of “universal genome” of not contradicts to modern evolutionary views.

Key words: hypothesis about the «universal genome», evolutionary transformations of the biological systems, phenomenon of the Cambrian explosion.

УДК [631.523+633.1](001.9+091)
СТЕЛЬМАХ А.Ф.

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства і сортовивчення НААН
України,
Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дорога, 3, e-mail: stegen@ukr.net

ЧИ МОГЛИ БУТИ ТОЧКИ ЗІТКНЕННЯ ПОЛОЖЕНЬ КЛАСИЧНОЇ ГЕНЕТИКИ ТА «МІЧУРИНСЬКОЇ БІОЛОГІЇ»?

Як вихованцеві білоруської школи класичної генетики і, зокрема, академіка М.В.Турбіна, мені за його рекомендацією довелося наприкінці 60-х років минулого сторіччя очолити відділ генетики Всесоюзного селекційно-генетичного інституту ім. Т.Д. Лисенка з завданням допомогти у подоланні наслідків «лисенківщини» та у спрямуванні наукових програм інституту на шляхи класичної генетики. Як відбувалася в інституті подібна «перебудова» і до яких результатів вона призвела, докладно описано в попередній статті [1]. Слід зазначити, що крім порад учителя, з чого можна розпочинати переконування співробітників інституту (який, до речі, був головним розсадником «лисенківщини» й активним поширювачем її в країні) в істинності хромосомної теорії спадковості, М.В. Турбін попереджував щодо небезпеки «виплеснути із ночов разом з брудною водою й дитину». Згадана стаття пояснює, як втілювались ці поради у наукових програмах інституту.

У науковій та суспільній літературі існує безліч публікацій з критики багатьох положень так званої «мічуринської біології», що розповсюдилася в країні у період «лисенківщини», особливо в генетиці. І навіть нещодавно була опублікована стаття, яка спеціально присвячена тільки обвинуваченням Селекційно-генетичного інституту в усіх гріхах [2]. На відміну від неї академік С.П. Лифенко наводить факти, що не все було так погано в той період, були й позитивні результати сільськогосподарської та біологічної науки [3]. Подібні публікації мають певний резон з точок зору авторів (частково й за істиною), але вони не аналізують і не знімають основного протиріччя між положеннями тогочасної класичної та «лисенківської» генетики. З моєї точки зору головна провина в розповсюдженні «лисенківщини», стосується не тільки (скоріше не стільки) Т.Д. Лисенка персонально або Селекційно-генетичного інституту взагалі, скільки партійних та державних органів усіх рівнів з їхньою жорсткою підтримкою (навіть відвертим

тиском) після «ідеологічно-філософського обґрунтування» її положень як «соціалістичної науки». І, безумовно, чималий вклад внесли несумлінні приборчники (завзяті пристосуванці), які масово поставляли сфальшовані докази. За умов вільних наукових дискусій без тиску й репресій усе могло би роз'яснитися.

На цей час еволюція положень сучасної генетики рослин досягла точки, коли запропонована 1984 року модель кількісних ознак [4] була названа як «Теорія еколого-генетичної організації кількісних ознак» (російською мовою ТЭГОКП) [5]. Як це відбувалося та які селекційно-генетичні наслідки дозволяє ця теорія, детально викладено в останніх публікаціях академіка В.О. Драгавцева [6, 7]. З моєї точки зору, ця теорія практично знімає одне з головних протиріччя поглядів класичних генетиків і «лисенківців» та дозволяє перекинути місток між ними.

Матеріали і методи

Поряд з аналізом інформації з окремих джерел наукової літератури в цій статті насамперед використано особистий досвід автора як учасника «подолання наслідків «лисенківщини». Але головну роль зіграли останні наукові публікації В.О. Драгавцева, який люб'язно дозволив використати їх у тезисному вигляді для аналізу й порівняння поглядів класичних генетиків та «лисенківців». На моє прохання про такий дозвіл він відповів електронним листом (російською мовою): «Ты очень правильно ставишь вопрос и абсолютно правильно понимаешь необходимость перебрасывать мосты между теми двумя крайностями на уровне современных знаний. Конечно же, я согласен, чтобы ты делал всё, что считаешь нужным (уточн. А.С. – с моими публикациями), только ты можешь корректно изложить эти проблемы, поскольку ты долго работал в Одессе и долго контактировал с Н.В.Турбиным. Ты очень точно и строго всё изложил, я абсолютно согласен с тобой! [E-mail лист від 20.01.2014, dravial@mail.ru → stegen@ukr.net]».

Результати та обговорення

Головним каменем спотикання поглядів класичних генетиків та «лисенківців» було перш за все само розуміння поняття спадковості та механізмів мінливості ознак і формування пристосованості. Генетики вважали, що спадкова інформація майбутніх ознак організму записана в гіпотетичних факторах (матеріальних генах, які розташовані в хромосомах – звідсіля й хромосомна теорія спадковості), вона реалізується в процесі росту й розвитку і може змінюватися шляхом мутацій, рекомбінацій..., а пристосованість формується через добір у певних умовах середовища. «Лисенківці» ж повністю відхиляли хромосомну теорію спадковості і стверджували, що не існує ніяких матеріальних її носіїв, що вона є комплексною властивістю конкретного організму, реалізується в певні ознаки в даних умовах, а в інших умовах зовнішнього середовища змінюється («виховується, формується») одразу адекватно (= відповідно) змінам умов без потреби подальшого добору для формування пристосованості. Тобто перші ставили в основу гени як матеріальні носії, а останні надавали перевагу умовам середовища. Хто ж був ближче до істини, і чи міг бути місток для узгодження обох точок зору?

Протягом усієї історії розвитку світової генетики як науки вона оперує феноменологічними поняттями як ген, алель, пенетрантність і експресивність, гетерозис, успадковуваність, плейотропія та ін. Але й до цього часу ці поняття віддалені від біохімічних і молекулярних механізмів спадкової передачі та реалізації процесів онтогенезу. І навіть повне секвенування ДНК геномів не пояснює, що ж таке ген [8]. Знання структури ДНК, як первинного рівня організації спадкового матеріалу, механізмів її реплікації й транскрипції не пояснюють повністю, як послідовності основ зумовлюють функціонування ДНК, що залежить від багатоступеневої передачі інформації різного роду [9]. Наступним рівнем організації спадкового матеріалу виступає складно упорядкована хромосома, на рівні якої працюють системи диференціальної активності генів протягом онтогенезу, екологічно індуковані гени відповіді на різного роду шоки, епігенетичні процеси онтогенезу, що регулюють темпи цвітіння. Нарешті існує й епігенетичний рівень організації спадковості, коли здійснюється спадкове переключення морфогенезу з однієї програми на іншу під впливом чинників середовища. Це може бути як феномен

реалізаційної мінливості [10], не пов'язаний ні з генотипом ні з умовами середовища (зумовлений тільки механікою розвитку), так і міксоплоїдія, геномний імпринтінг, епігенетичний контроль експресії генів та ін. [11–13], які часто зустрічаються у світі рослин.

На першому етапі розвитку генетики як науки формула «ген – ознака» ідеалізувала гіпотетичну природу фактора (гена), не піддаючи сумніву спрощений прямий перехід від гена до ознаки, хоча у дійсності всі реалізовані ознаки є результатом складних реакцій усієї конституції конкретної зиготи. І навіть Т.Г. Морган попереджував про хибність такого спрощеного підходу [14], з цього приводу в згаданій роботі В.О. Драгавцев зазначає: «Если бы Т.Д. Лысенко знал английский язык и смог прочитать приветственную речь Т.Г. Моргана в 1909г. в Сент-Луисе (Миссури) на ежегодном съезде Американской ассоциации селекционеров, то, очевидно, он ругал бы генетиков СССР только одним устрашающим словом «менделисты» (*вейсманисты*, прим. автора) но никак не «менделисты-морганисты» [6]. Пізніше й М.І. Вавілов підкреслював, що організм не слід розуміти спрощено як мозаїку ознак, у якому окремі кільця можна просто замінити іншими, до організму слід підходити з урахуванням усієї складності ознак і властивостей органів та їх функцій, їх взаємозв'язку із середовищем у процесі розвитку тощо [15]. Спрощені уявлення про детермінацію ознаки геном могли лише певною мірою відповідати фактам успадкування відмінностей для якісних ознак, що чітко ідентифікуються та контролюються алелями поодиноких генів зі значними відмінностями їх ефектів.

Спроби перенести подібні принципи на генетику кількісних ознак досі не пояснюють (або не виявляють) всі складнощі вказаних взаємозв'язків. На основі гіпотези полігенів були розроблені теорія й методи діалельного аналізу за Б. Хейманом [16], однак вони не враховують динаміку лімітуючих ріст і розвиток рослин чинників середовища за фазами онтогенезу. До цього часу ні в класичній, ні в біометричній, ні в молекулярній генетиках не існує жодної гіпотези щодо механізмів явища взаємодії «генотип – середовище». На відмінність від тварин, у рослин, які вимушені вести прикріплений спосіб життя, дане явище виступає на перший план для генетиків рослин. Конкуренція між рослинами за елементи живлення всередині посіву (у т.ч. й за світло)

здатна знизити експресію будь-якого структурного гена в 50–100 разів [17], тільки конкуренція за світло може знизити кількість рослин на одиницю площі в 30–50 разів, усуваючи менш конкурентоздатних індивідуумів. Відсутність у рослин систем внутрішньої терморегуляції призводить до значної залежності процесів їх росту та розвитку від коливань температури та інших лімітуючих чинників середовища, відображаючи максимальну єдність організму й середовища. Саме тому генетична мінливість кількісних ознак в популяціях вищих рослин досягає лише 10–15%, а модифікаційна – 85–90%, і дефіцит знань про природу модифікацій стає найбільш суттєвою проблемою сучасної генетики [18].

Упевненість молекулярних генетиків у тому, що незабаром комбінування генів «інженерними» методами дозволить легко вирішити будь-які селекційні проблеми, обмежується невідомістю про шляхи від гена до складної ознаки. І якщо біометрична генетика пішла частково вперед від менделівських уявлень «ген – ознака» через введення поняття середовищної дисперсії (яка враховує хоча б усереднений параметр мінливості середовища), то молекулярна генетика знову повернулася назад до вихідного менделізму, який зовсім не враховує вплив чинників середовища. Із понад 50 тисяч генів у геномах рослин лише у поодиноких видів вивчено й локалізовано в хромосомах 200–300 менделівських генів, більшість же адаптивна та господарська цінних полігенів залишаються не ідентифікованими [19]. Серед них і гени продуктивності, величини та гомеостазу врожаю (або пластичність сорту), горизонтального імунітету, гетерозису, всіх типів стійкості до стресів [20]. Якщо менделівська модель зовсім не враховує фактор середовища, а моделі біометричної генетики Р. Фішера, С. Райта, К. Мазера та ін. запроваджують лише один формальний статистичний параметр середовищної дисперсії, що сумарно поєднує все різноманіття чинників середовища (як за їх видами, так і за їх інтенсивністю та часом їх впливу в онтогенезі і т.д.), то й такі моделі не в змозі відобразити повністю всю специфіку впливу різних лімітів середовища на еколого-генетичну організацію ознаки.

Ще 1984-го року вперше була опублікована модель еколого-генетичної організації кількісних ознак [12], яка значною мірою просуває нас уперед у цьому відношенні, оскільки головним її положенням є твердження, що при зміні чинника зовнішнього середовища,

який лімітує ріст і/або розвиток рослини, змінюються й спектр та кількість генів, що детермінують одну й ту ж ознаку («перевизначення генетичних формул»). Саме лімітуючий чинник середовища «змушує» впливати на розвиток ознаки «продукти генів», дія яких призведе до максимального протистояння стресовому чиннику. Для складних ознак, що зазнають взаємодію «генотип – середовище», неможливо дати стабільну («паспортну») характеристику для всіх можливих умов середовища. Наприклад, при вирощуванні сортів в умовах виникнення посухи різноманіття генетичних систем протидії даному стресу буде важливим компонентом «генетичної формули» комплексної ознаки продуктивності. Коли ж такі сорти вирощуються в зоні сприятливого вологозабезпечення, але інтенсивного розповсюдження збудників хвороб, генетичні системи посухостійкості не впливають на формування такої ознаки, і на перший план у «генетичних формулах» виступають системи контролю стійкості до захворювань. Спектр продуктів генів «під ознакою» буде мінятися в різних умовах (від однієї екологічної точки до іншої, а в тій же самій точці – від року до року, а в конкретному році – від фази розвитку до фази, а в межах фази – від доби до доби...). Виходить, якщо об'єм поняття «генотип індивідуума» (=сукупність генів усього генома) є цілком стабільним, то об'єм поняття «генотип ознаки» відображає надзвичайно мінливі спектри та кількість генів, які варіюють у різних координатах умов. Саме це й мав на увазі М.І. Вавілов ще 1935-го року, стверджуючи: «Мы не будем удивлены, если основательное изучение наследственности количественных признаков приведёт к коренной ревизии менделистских представлений» [21].

Таким чином, із наведених міркувань можна бачити, що класичні генетики зосереджували головну увагу на генотипі (спадковій інформації організму), «лисенківці» ж надавали перевагу вивченню особливостей реалізації інформації (в ознаках) у певних умовах середовища, стверджуючи можливість «успадкокування набутих ознак». А це лише окремі кільця (початкове й кінцеве) одного й того ж ланцюга «від гена до ознаки». І пропонується «Теорія еколого-генетичної організації кількісних ознак» справді є сполучною ланкою між двома здавалося б протилежними точками зору, в генетиці складних господарська цінних ознак рослин перш за все.

Висновки

Непримиренні протиріччя поглядів класичних генетиків і прибічників «мічуринської біології (=лисенківців)» практично повністю знімаються сучасною «Теорією еколого-генетичної організації кількісних ознак». Від записаної в геномі організму генетичної інформації до її реалізації в ознаку спостерігається складний комплекс внутрішньорганізменних та генотип-

середовищних взаємодій, в ході яких відбувається «перевизначення генетичних формул» ознак. Генотип реалізованої ознаки може бути виявленим (і успадковуватися) лише для даних конкретних умов середовища, в інших умовах (з відмінними стресовими чинниками) генотип складних ознак виявляється зміненим (і ці зміни успадковуються лише в таких умовах!). Чим таке положення відрізняється від «успадковування набутих ознак»?!

Література

1. Стельмах А.Ф., Файт В.І. Історія досліджень з генетики рослин у Селекційно-генетичному інституті протягом 100 років // Фактори експ. евол. організмів. – 2013. – 2. – С. 351–355.
2. Урсу Д. Генетика в Одессе: сто лет борьбы и поражения // Юго-запад. Одессика. – 2012. – 14. – С. 210–257.
3. Лифенко С.П. Селекційно-генетичний інститут, 100 років. – Одеса: Астропринт, 2012. – 130 с.
4. Драгавцев В.А., Литун П.П., Шкель Н.М., Нечипоренко Н.Н. Модель еколого-генетического контроля количественных признаков растений // Доклады АН СССР. – 1984. – 274, № 3. – С. 720–723.
5. Толковый словарь терминов по общей и молекулярной биологии, общей и прикладной генетике, селекции, ДНК-технологии и биоинформатике. – Академкнига, Медкнига. – 2008. – II. – С. 308.
6. Драгавцев В.А. Уроки эволюции генетики растений // Биосфера. – 2012. – 4, № 3. – С. 251–262.
7. Драгавцев В.А. Как помочь накормить человечество // Биосфера. – 2013. – 5, № 3. – С. 279–289.
8. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены предрасположенности. (Введ. в предикт. медицину). – СПб.: Интермедика, 2000. – 272 с.
9. Свердлов Е.Д. ДНК в клетке: от молекулярной иконы к проблеме «что есть жизнь?» // Вестник РАН. – 2003. – 73, №6. – С. 497–505.
10. Васильев А.Г. Эпигенетические основы фенетики: на пути к эволюционной меромии. – Екатеринбург: Академкнига, 2005. – 640 с.
11. Alleman M., Doctor J. Genomic imprinting in plants: observation and evolutionary implications // Plant Molecular Biology. – 2000. – 43. – P. 147–161.
12. Sung S., Amasino R.M. Vernalization and epigenetics: how plants remember winter // Curr. Opin. Plant Biol. – 2004. – 7. – P. 4–10.
13. Greval S.I.S., Moazed D. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression // Science. – 2003. – 301. – P. 798–802.
14. Голубовский М.Д. Век генетики: эволюция идей и понятий. – СПб.: Изд. «Борей Арт.», 2000. – 262 с.
15. Вавилов Н.И. Критический обзор современного состояния генетической теории селекции растений и животных // Н.И. Вавилов. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. – Л.: Наука, 1987. – С. 224–246.
16. Nayman V.I. The theory and analysis of diallel crosses. I. Genetics. – 1954. – 39, N 3. – P. 789–809. and 1958. – 43, № 1. – P. 63–85.
17. Рафес П.М. Основы биогеоценологии // Биосфера. – 2012. – 4, № 1. – С. 98–125.
18. Синская Е.Н. Проблемы популяций у высших растений. Вып. 2 // О категориях и законах изменчивости в популяциях высших растений. – Л.: Сельхозиздат, 1963. – 124 с.
19. Глазко В.И. Экологическая генетика как основа современного этапа развития аграрной цивилизации // Мат. к библ. деят. с-х. н. А.А. Жученко. – М., 2005. – С. 27–28.
20. Драгавцев В.А., Макарова Г.А., Кочетов А.А., Кочерина Н.В., Мирская Г.В., Синявина Н.Г. Некоторые задачи агрофизического обеспечения селекционных технологий для генетического повышения продуктивности и урожая растений // Агрофизика. – 2011. – № 1. – С. 14–22.
21. Вавилов Н.И. Избранные труды. – М.-Л., 1965. – 5. – С. 275.

STELMAKH A.F.

*Plant Breeding and Genetics Institute – NCSCI of NAASU,
Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopolskaya road, 3, e-mail: stegen@ukr.net*

COULD THERE BE A COMMON GROUND FOR THE VIEWS OF CLASSICAL GENETICS AND “MICHURIN’S BIOLOGY”?

Aims. To compare some theses of modern plant genetics and the views of “lysenkoists”. **Methods.** Utilization of scientific literature data and personal experience. **Results.** Supporters of “lysenkoism” denied

the chromosomal theory of heredity and maintained the straight “inheritance of acquired traits”. Modern plant genetics assert that from coded in the individual genome genetic information to its implementation into the trait there are realizing the complex of innerorganism and genotype-environment interactions, during which the trait “genetic formula” is reconstructing. Genotype of realized character may be identified (and inherited) for certain environment only, under other conditions (with different stress factors) genotype of complex traits is found to be changed (and these changes are inherited, however in such environment only!). Does this thesis differ from the “inheritance of acquired traits”?! **Conclusions.** Irreconcilable contradictions of classical geneticists and supporters of “Michurin’s biology (=lysenkoists)” views are almost entirely removed with modern “Theory of the ecology-genetic organization of quantitative traits”.
Key words: “lysenkoism”, modern plant genetics, quantitative traits, likeness of views.

УДК 57(091)
ФОМИНА И.Р.

*Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
Россия, 142290, Московская обл., г. Пуцино, ул. Институтская, 2, e-mail: irafomi@rambler.ru
Biosphere Systems International Foundation,
USA, 85755, Arizona*

РАЗВИТИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О ВОЗНИКНОВЕНИИ ЖИЗНИ НА ЗЕМЛЕ

В разное время относительно возникновения жизни на Земле выдвигались разные научные теории, которые можно разделить на 4 группы: самозарождения; стационарного состояния жизни; панспермии; биохимической эволюции. Две первых интересны только с исторической точки зрения: Луи Пастер окончательно опроверг теорию спонтанного зарождения жизни в современных условиях, а идея о вечном существовании Земли (в отличие от концепции креационизма эта теория отвечала критерию Поппера, т.е. была фальсифицируемой), населенной живыми существами, опровергнута данными о конечном времени существования звёзд. Современное состояние дискуссии о занесении бактериальных спор на Землю (панспермия) обсуждается в литературе, например [1].

В представленном кратком обзоре рассмотрено развитие теории биохимической эволюции, в основном той ее части, которая касается гипотез о пребиотическом этапе формирования циклических процессов взаимопревращения неорганического и органического углерода.

«... вселенная не только чуднее, чем мы себе представляем, но и чуднее, чем можем представить». (John Haldane, – ... the universe is not only queerer than we suppose, but queerer than we can suppose)

Согласно теории Опарина [2], возникновение жизни на Земле протекало в условиях высокой концентрации органических веществ абиогенного происхождения. По современным представлениям, абиогенный синтез низкомолекулярной органики мог начаться в период, когда атмосфера Планеты состояла из горячих паров воды, водорода, аммиака и метана [3]. Моделирование разных вариантов этих условий, включая имитацию вулканических парогазовых выбросов доказало возможность образования целого спектра амино- и органических кислот, пуринов, пиримидинов и сахаров [4, 5]. А моделирование условий верхней мантии Земли на глубинах 100–150 км позволило синтезировать из смеси воды и карбоната кальция в присутствии окиси двухвалентного железа углеводороды с длиной молекулы до 7 атомов углерода [6]. Однако абиогенный синтез более сложных молекул, по мнению Опарина – полипептидных, и, главное, их объединение в обособленные от окружающей среды коацерватные капли, могло произойти только после постепенного остывания Земли и образования Мирового Океана.

Экологической нишей для синтеза, конденсации и эволюции пребиотической органики, весьма вероятно, служили морские гидротермальные источники [7–9]. Их горячий, восстановительный, щелочной гидротермальный раствор, несущий сероводород, выходил из Земной коры в более холодную и окислительную, вдобавок обогащенную

двухвалентными ионами железа, никеля и других металлов, воду Океана. Коллоидный осадок моносульфида железа, конденсируясь на стенках этого «химического реактора», формировал поверхность раздела фаз с температурным, окислительно-восстановительным и рН градиентами. В микроскопических порах такого коллоида [9] абиогенный синтез органических молекул был обеспечен энергией, катализаторами и обособленностью от окружающей среды.

В недавней работе [10] более вероятной эконишей для зарождения жизни показаны наземные, бескислородные, геотермальные системы, где высокое отношение K^+/Na^+ и относительно высокое содержание соединений цинка, марганца и фосфора в местах конденсации пара (лужицах, озерах) соответствует ионному составу цитоплазмы современных клеток.

Поскольку полипептиды не способны к репликации, вопрос о том, как пребиотические органические колонии стали «ассимилирующими, метаболизирующими, структурообразующими и реплицирующимися» [11] решается в рамках двух основных концепций: 1) репликация генетического материала и его трансляция возникли и эволюционировали сопряженно; 2) живые органические системы развились из ансамблей молекул, способных быть матрицей и катализатором одновременно. Открытие таких веществ, названных рибозимами, позволило выдвинуть и развить идею РНК-мира [12]. Ключевые этапы эволюции и специализации молекул РНК в процессе перехода от древнего РНК-мира к миру генетически детерминированного биосинтеза белков плодотворно разрабатываются [11, 13, 14]. Особый интерес представляет проблема возникновения генетического кода. Каким образом самореплицирующиеся рибозимы, способные осуществлять катализ ряда реакций, в том числе образования пептидной связи между аминокислотами, смогли стать «книгой» – информацией о структуре этих пептидов? Механизм самопроизвольного упорядочения органического мира [15, 16], возможно, играл ключевую роль в этом процессе.

Концепция о качественном переходе от ансамблей органических молекул к клетке как целостному организму предполагает также длительную пребиотическую эволюцию экзо- и эндорганических циклических взаимопревращений соединений углерода в обособленных от

окружающей среды локусах [9]. Признание наиболее вероятным местом самозарождения пребиотических, а затем и биотических органических систем наземные и/или морские геотермальные «реакторы» древней Планеты позволяет предположить первичность формирования хемоавтотрофного обмена энергией и веществом с окружающей средой [9, 17, 18]. Альтернативная гипотеза о гетеротрофных прото клетках, питающихся абиогенно синтезированной органикой, отстаивается в ряде работ, например [10].

Химической энергии гидротермального «реактора» было достаточно для субстратного фосфорилирования, без затраты органики, в реакциях окисления неорганических соединений, например сульфитов. В пользу этого предположения свидетельствует реакция образования аденозинфосфосульфата как интермедиата субстратного фосфорилирования, сохранившаяся у *Thiobacillus thioparus* [19]. С данной точки зрения развитие цитохром-содержащих ЭТЦ является более поздним этапом эволюции, обусловленным развитием мембран и клеточных оболочек, повышающих степень свободы, а именно «свободного существования» [9] уже живой системы от поры неживого хозяина.

Поскольку автотрофия есть не только использование неорганического источника энергии и донора электронов для биосинтетических реакций, но и наличие цикла этих реакций, способного осуществлять фиксацию и восстановление CO_2 , такой архаический бицикл мог зародиться и даже самоорганизоваться/самооптимизироваться, согласно биомиметической модели [20], в виде «сопряженных между собой циклов (восстановительного цитратного, ВЦ, и 3-гидроксипропионатного) в парагенезисе с углеводородами как источниками углерода для интермедиатов цикла в гидротермальном геохимическом окружении древней Земли». Эта модель согласуется с более ранними представлениями [7, 18] о ключевой роли ВЦ цикла в архаическом метаболизме. Альтернативную точку зрения высказывают авторы [9], полагающие архаическим путем фиксации и восстановления CO_2 ацетил-КоА путь Вуда-Люнгдала.

Специальный фотохимический эксперимент [21], показавший абиотическое протекание трех восстановительных реакций ВЦ цикла на поверхности освещенного коллоида моносульфида цинка, при нейтральной рН и

температуре 15 °С, свидетельствует, что на стадии пребиотической эволюции в порах моносльфидов металлов, обладающих свойствами полупроводникового фотокатализатора, была возможна самоорганизация не только хемоавтотрофного, но и фотоавтотрофного метаболизма. Моделирование абиогенных фотокаталитических систем, способных к синтезу макроэргических соединений [22] и абиогенный фотосинтез/фотоселекция природных нуклеотидов [23] свидетельствуют о ключевой роли света в процессах предбиологической эволюции. Это подтверждает идею [10] о зарождении жизни в наземных геотермальных системах, хотя авторы данной статьи фотокаталитический синтез органических соединений выводят за пределы саморазвивающихся и самовоспроизводящихся гетеротрофных протоклеток.

Заключение

По современным представлениям, метаболические пути фиксации и восстановления неорганического углерода, взаимопревращения

и окисления органических соединений самоорганизовались на стадии пребиотической эволюции в виде автокаталитических процессов в микроскопических порах коллоидных осадков моносльфидов металлов. В этих порах данные процессы были обособлены от окружающей среды поверхностью раздела фаз, обладающей каталитической активностью. Передача каталитической функции рибозимам и пептидам и возникновение генетического кода обусловили качественный скачок между неживой и живой природой; а формирование мембран внутри и вокруг протоклеток и развитие клеточных оболочек определило образование клеток как целостных организмов, их разделение между тремя доменами: археями, бактериями и эукариотами [24]; альтернативную гипотезу о происхождении архей из бактерий [25], – и, главное, освободило от необходимости «ютиться» в порах осадочных пород [9]. Теперь «свободноживущим» живым системам принадлежала вся Планета!

Литература

1. Розанов А. Ю. Бактериально-палеонтологический подход к изучению метеоритов // Вестник РАН. – 2000. – 70, № 3. – С. 214–226.
2. Опарин А.И. Жизнь, ее природа, происхождение и развитие. – М.: Изд. АН СССР, 1960. – 192 с.
3. Tian F., Toon O.B., Pavlov A.A., De Sterck H. A hydrogen-rich early Earth atmosphere // Science. – 2005. – 308, № 5724. – P. 1014–1017.
4. Miller S.L. Production of amino acids under possible primitive Earth conditions // Science. – 1953. – 117, № 3046. – P. 528–529.
5. Johnson A.P., Cleaves H.J., Dworkin J.P., Glavin D.P., Lazcano A., Bada J.L. The Miller volcanic spark discharge experiment // Science. – 2008. – 322, № 5900. – P. 404.
6. Кучеров В.Г., Колесников А.Ю., Дюжева Т.И., Куликова Л.Ф., Николаев Н.Н., Сазанова О.А., Бражкин В.В. Синтез сложных углеводородных систем при термобарических параметрах, соответствующих условиям верхней мантии // ДАН. – 2010. – 433, № 3. – С. 361–364.
7. Wächtershäuser G. Before enzymes and templates: theory of surface metabolism // Microbiol. Rev. – 1988. – 52. – P. 452–484.
8. Russell M.J., Hall A.J. The emergence of life from iron monosulphide bubbles at a submarine hydrothermal redox and pH front // J. Geol. Soc. (Lond.) – 1997. – 154. – P. 377–402.
9. Martin W., Russell M.J. On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. – 2003. – 358. – P. 59–85.
10. Mulikjanian A.Y., Bychkov A.Yu., Dibrova D.V., Galperin M.Y., Koonin E.V. Origin of first cells at terrestrial, anoxic geothermal fields // PNAS. – 2012. – 109, № 14. – P. E821–E830.
11. Спирин А.С. Мир РНК и биосинтез белков [Электронный ресурс]. – Лекция № 1. – 2009. – Режим доступа: http://topreferat.znate.ru/pars_docs/refs/22/21232/21232.pdf
12. Gilbert W. Origin of life: The RNA world // Nature. – 1986. – 319. – P. 618.
13. Bokov K., Steinberg S.V. A hierarchical model for evolution of 23S ribosomal RNA // Nature. – 2009. – 457. – P. 977–980.
14. Szostak J.W. The eightfold path to non-enzymatic RNA replication [Электронный ресурс] // J. Sys. Chem. – 2012. – 3, № 2. – Режим доступа: <http://www.jsystchem.com/content/pdf/1759-2208-3-2.pdf>
15. Галимов Э.М. Феномен жизни: Между равновесием и нелинейностью. Происхождение и принципы эволюции. – М.: Эдиториал УРСС, 2001. – 356 с.
16. Дементьев В.А. Компьютерное моделирование процесса возникновения генетического кода // Проблемы зарождения и эволюции биосферы (ред. Э.М. Галимов). – М.: Кн. дом Либроком, 2008. – С. 79–94.

17. Заварзин Г.А. Становление системы биогеохимических циклов // Палеонтологический журнал. – 2003. – № 6. – С. 16–24.
18. Wächtershäuser G. From volcanic origins of chemoautotrophic life to Bacteria, Archaea and Eukarya // Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci. – 2006. – 361. – P. 1787–1808.
19. Кондратьева Е.Н. Фототрофные бактерии. Хемоавтотрофные бактерии // Жизнь растений. Том 1. Введение, бактерии и актиномицеты (ред. Н.А. Красильников, А.А. Уранов). – М.: Просвещение, 1974. – С. 323–352.
20. Маракушев С.А., Белоногова О.В. Зарождение хемоавтотрофного метаболизма в гидротермах и происхождение предковых таксонов бактерий // ДАН. – 2011. – 439, № 2. – С. 263–269.
21. Zhang X.V., Martin S.T. Driving parts of Krebs cycle in reverse through mineral photochemistry // J. Am. Chem. Soc. – 2006. – 128, N 50. – P. 16032–16033.
22. Крицкий М.С., Телегина Т.А., Колесников М.П., Людникова Т.А., Вечтомова Ю.Л., Голуб О.А. Фотовозбужденные молекулы флавиновых и птериновых коферментов в эволюции // Биохимия. – 2010. – 75, № 10. – С. 1348–1366.
23. Powner M.W., Gerland B., Sutherland J.D. Synthesis of activated pyrimidine ribonucleotides in prebiotically plausible conditions // Nature. – 2009. – 459. – P. 239–242.
24. Woese C.R. Interpreting the universal phylogenetic tree // PNAS. – 2000. – 97. – P. 8392–8396.
25. Gupta R.S. What are archaeobacteria: life's third domain or monoderm prokaryotes related to Gram-positive bacteria? A new proposal for the classification of prokaryotic organisms // Mol. Microbiol. – 1998. – 29. – P. 695–708.

FOMINA I.R.

*Institute of Basic Biological Problems RAS,
Russia, 142290, Moscow Region, Pushchino, Institutskaya str., 2, e-mail: irafomi@rambler.ru
Biosphere Systems International Foundation,
USA, 85755, Arizona*

THE DEVELOPMENT OF IDEAS ABOUT THE ORIGIN OF LIFE ON EARTH

Aims. The purpose of present brief review is to cover the development of the theory of biological evolution, mainly that its part which concerns the hypothesis of prebiotic stage of the formation of cyclic processes interconversion of inorganic and organic carbon. **Results.** The review presents and summarizes the literature data, reflecting the development of the Oparin's theory since the middle of last century to the present time. **Conclusions.** According to modern concepts, the pathways of fixing and restoring of inorganic carbon, as well interconversion and oxidation of organic compounds have been formed at the stage of prebiotic evolution as autocatalytic processes in microscopic pores of colloidal precipitation of metal sulfides. In these pores the processes were detached from the environment by a phase interface surface with catalytic activity. Transferring of catalytic function to ribozymes and peptides, and the emergence of the genetic code was the qualitative leap between the inanimate and animate nature; and membrane formation in and around protocell and development of cell envelopes determined the formation of cells as a whole organisms, their separation between the three domains: the archaea, bacteria and eukaryotes, and, most importantly, freed from the need "to live" in the pores of sedimentary rocks. Now "free-living" living systems belonged to the whole Planet!
Key words: autocatalytic processes, origin of life, prebiotic evolution.

НАУКОВЕ ВИДАННЯ

**ФАКТОРИ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ
ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ**

**ФАКТОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ**

**FACTORS IN EXPERIMENTAL
EVOLUTION OF ORGANISMS**

Збірник наукових праць
ТОМ 14

Технічний редактор *М. З. Мосула*
Комп'ютерна верстка *О. В. Лохвицький*
Коректура автора
Художнє оформлення *Є. Ю. Музиченка*

Підписано до друку 25.07.2014. Формат 60×84¹/₈ Папір офс. № 1.
Гарнітура “Таймс”. Друк офс. Ум. друк. арк. 30,2 Обл.-вид. арк. 31,9
Наклад 300 прим. Зам. 500.

Віддруковано у видавництві “ЛОГОС” з оригіналів автора.
Свідоцтво суб’єкта видавничої справи ДК № 201 від 27.09.2000 р.
01030, Київ-30, вул. Богдана Хмельницького, 10, тел. 235-6003