

Національна академія наук України  
Українська академія аграрних наук  
Академія медичних наук України  
Українське товариство генетиків і селекціонерів  
ім. М.І. Вавилова

# **ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ**

Національна академія наук України  
Українська академія аграрних наук  
Академія медичних наук України  
Українське товариство генетиків і селекціонерів  
ім. М.І. Вавилова

# **ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ**

*Збірник наукових праць*

**ТОМ 4**

*Присвячено:*

90-річчю від часу заснування  
Української академії наук

**Київ  
ЛОГОС  
2008**

## **РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ**

Барил'як І.Р. – д - р мед. наук; Блюм Я.Б. – д-р біол. наук, академік НАНУ; Вагіна І.М. – канд. біол.наук; Дубровна О.В. – д-р біол. наук (заст.головного редактора); Кунах В.А. – д-р біол. наук, чл.- кор. НАНУ (головний редактор); Кучук М.В. – д-р біол. наук; Лялько І.І. – канд.біол.наук; Лукаш Л.Л. – д-р біол. наук; Малюта С.С. – д-р біол. наук, чл.-кор. НАНУ; Михайлов В.Г. - д-р с.-г. наук, чл.- кор. УААН; Моргун В.В. – д-р біол. наук, академік НАНУ; Сиволап Ю.М. – д-р біол. наук, академік УААН; Созінов О.О. – д-р біол. наук, академік НАНУ

*Затверджено до друку рішенням  
вченої ради Інституту молекулярної біології  
і генетики НАН України (протокол №7 від 30 травня)*

**УДК 578.08.631.52**

**Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр./Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І.Вавилова**

**/К.: Логос, 2008.-**

**Т.4**

У збірнику представлено наукові праці вітчизняних та зарубіжних спеціалістів, написані спеціально для даного видання, присвяченого 90-річчю від часу заснування Української академії наук. В оглядових і експериментальних статтях наведено дані з основних напрямів генетико - біотехнологічного розширення генетичної мінливості живих організмів, генетики господарсько - цінних ознак рослин і тварин, сучасних методів біотехнології і генетичної інженерії при створенні нового покоління сортів і гібридів культурних рослин, ДНК-технологій і молекулярних маркерів у селекції рослин і тварин, генетики людини та медичної генетики; результати аналізу та оцінки генетичних ресурсів, висвітлено актуальні питання викладання генетики, селекції та біотехнології.

Для спеціалістів у галузі генетики, селекції, біотехнології, екології, а також викладачів і студентів вищих навчальних закладів III-IV рівнів акредитації.

## ЗАГАЛЬНІ ПИТАННЯ ЕВОЛЮЦІЇ

**БУРКАТ В.П., ПОДОБА Б.Є., ГУЗЄВ І.В., БОДРЯШОВА К.В.**

*Інститут розведення і генетики тварин УААН*

*Україна, 08321, Київська область, Бориспільський р-н, с. Чубинське, вул. Погребняка 1*

### МІКРОЕВОЛЮЦІЙНІ ПРОЦЕСИ В ПОПУЛЯЦІЯХ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН

В світі сучасних тенденцій трансформації сільськогосподарського виробництва важливого значення набула глобальна проблема збереження генетичної різноманітності [5]. Основним фактором загострення цієї проблеми в тваринництві стало розширене використання обмеженого генофонду спеціалізованих порід. Це призвело до істотного зменшення поголів'я місцевих порід, які відзначаються адаптованістю до певних еколого-кліматичних умов, невибагливістю щодо кормової бази, міцністю конституції, мають підвищений рівень загальної резистентності, високу відтворювальну здатність, багатоплідність і ряд інших цінних якостей, є носіями унікальних генів і генних комплексів, відтворення яких методами сучасної селекції неможливе або потребує значних витрат [7].

Тому важливою проблемою селекційно-генетичних розробок в тваринництві є збереження генетичної різноманітності сільськогосподарських тварин, для конструктивного вирішення якої розроблена методологія, що передбачає регулювання структури і чисельності генофондових популяцій в поєднанні з кріоконсервацією і довгостроковим збереженням гамет, ембріонів і зразків ДНК. Проведення селекційної роботи в популяціях обмеженої чисельності спрямоване на добір генотипів, що забезпечують збереження генетичної специфіки порід, при гетерогенному підборі для зменшення інбредної депресії [6].

При цьому генофонд тварин розглядається як елемент біорізноманітності в поєднанні з його потенційною роллю у вирішенні завдань сільськогосподарського виробництва [1]. Загальнодержавною програмою селекції у тваринництві на період до 2010 року передбачено забезпечити збереження генофонду існуючих, локальних і зникаючих порід [8].

Найбільш прийнятною організаційною формою збереження генетичної специфіки племінних ресурсів визначено надання статусу генофондових відповідним суб'єктам племінної справи у тваринництві. При цьому роль генофондових популяцій не обмежується збереженням біорізноманітності, а вони перетворюються на своєрідні експериментальні полігони з проведення фундаментальних генетичних досліджень. Впровадження в широку практику генетичної експертизи походження і аномалій племінних тварин сприяло створенню інформаційної бази для маркірування генетичного матеріалу при вирішенні широкого кола проблем розведення і селекції тварин на індивідуальному і популяційному рівнях [4]. Перспективним є застосування генетичних маркерів для оцінки генофонду тварин і дослідження мікроеволюційних процесів популяцій великої рогатої худоби і свиней.

#### **Матеріал і методи.**

За матеріалами імуногенетичного тестування при експертизі походження племінних тварин досліджена імуногенетична структура 22 племінних стад великої рогатої худоби загальною чисельністю 13988 голів – сірої української, білоголової української, лебединської, бурої карпатської, симентальської, українських чорно-рябої і червоно-рябої молочних порід, а також трьох стад свиней загальною чисельністю 653 голови – великої білої, дюрк і миргородської порід.

Спрямованість мікроеволюційних процесів встановлювали шляхом співставлення теоретично очікуваної і фактичної гомозиготності досліджуваних популяцій великої рогатої худоби за генетичними системами груп крові F і B, за системами E і L – свиней. Очікувану гомозиготність (Ca) розраховували як суму

квадратів генних частот алелів відповідної генетичної системи, фактичну гомозиготність (H) – за часткою гомозиготних генотипів, а реалізацію гомозиготності (W) – як здобуток H від Ca [10].

#### Результати та обговорення.

За системою EAF великої рогатої худоби в усіх досліджених породах встановлена підвищена концентрація алелю F<sup>F</sup>, в середньому його генна частота дорівнює 0,839 при найменшій частоті 0,661 у білоголової української та найвищій – 0,866 у чорно-рябої худоби. Оцінка розподілу генотипів в досліджених стадах засвідчує збалансованість більшості з них при деякому дефіциті гетерозигот F<sup>FV</sup>. Лише в п'яти стадах встановлене вірогідне відхилення фактичного розподілу генотипів від теоретично очікуваного (табл. 1). Відносно підвищена частота алелю F<sup>V</sup> в стадах ДПЗ «Терезине», ДПЗ «Поливанівка», Маслівського сільгосптехнікуму обумовлює найбільшу частку гетерозиготних генотипів.

Таблиця 1

Генетична структура деяких стад за системою F груп крові

Господарство	n	Частота генів		Розподіл генотипів, %						$\chi^2$
		F	V	FF		FV		VV		
				Ф*	Т**	Ф	Т	Ф	Т	
ДПЗ «Поливанівка»	727	0,703	0,297	52,8	49,4	34,9	41,8	12,2	8,8	19,5
ДПЗ «Терезине»	715	0,740	0,260	61,0	54,7	26,0	38,5	13,0	6,7	75,3
ДПЗ «Олександрівка»	2183	0,882	0,118	79,7	77,8	17,1	20,8	3,2	1,4	68,8
ДПЗ «Чайка»	250	0,910	0,09	85,2	82,8	11,6	16,4	3,2	0,8	21,7
Маслівський сільгосптехнікум	444	0,820	0,180	70,0	67,2	23,9	29,5	6,1	3,2	16,5

\*Ф – фактичний розподіл генотипів,

\*\*Т – теоретично очікуваний

Найбільша незбалансованість спостерігається в стаді племзаводу «Терезине» ( $\chi^2=75,3$ ), де дефіцит генотипів F<sup>V</sup> досягає 0,125, а гомозигот VV на 0,063 більше очікуваної їх частоти. Основним фактором незбалансованості цього стада є досить інтенсивне використання на ньому гомозиготного за алелем V плідника Судина 1698624, який в даному випадку маркірує цінний спадковий матеріал родоначальника лінії.

Слід зауважити, що всі популяції великої рогатої худоби, які селекціонуються, не є строго панміктичними, тому що в них відсутнє вільне парування, а кількість самців різко обмежена, як правило, здійснюється спрямований добір і підбір. Тому саме незбалансованість, невідповідність розподілу генотипів закону Гарді-Вайнберга повинно бути не винятком, а нормою при використанні плідників із специфічними маркерами в порівнянні з алелофондом стада. Так, в стаді племзаводу «Христинівський» вірогідний ( $P<0,001$ ) надлишок гетерозигот за алелями трансферинового локусу спричинив інтенсивне використання плідника Апельсина 3500 з генотипом AE при високій (більше 0,7) частоті в стаді алелю D.

Отже на формування генетичної структури популяцій істотно впливають генотипи плідників. Поряд з цим в еволюції генофонду стад певну роль відіграють генетичні процеси, які пов'язані з різною адаптаційною та селективною цінністю генетичного матеріалу, що успадковується від матерів (материнські алелі). Так, в генофондовому стаді сірої української породи племзаводу «Поливанівка» встановлена підвищена в середньому на 9% елімінація одержаних від плідників алелів системи B

груп крові, а успадкування материнського оригінального для породи алелю  $VI_QT1$  становило 63,2%.

Переважає успадкування спадкового матеріалу матерів, який маркується алелями генетичної системи EAB, зафіксоване при аналізі імуногенетичної структури родин в стадах симентальської, червоної польської, чорно-рябої худоби.

Такий рух алелів в родинях дав підстави для розвитку уявлення про те, що в популяціях великої рогатої худоби відбуваються генетичні процеси, які сприяють збереженню генетичного матеріалу, що його вносять матері [11]. Зазначені особливості успадкування материнських алелів задовільно пояснюються припущенням щодо існування генетичних механізмів, які в оогенезі визначають переважне перетворення в яйцеклітину тих продуктів поділу ооцитів, які одержані від матерів, тобто є носіями материнських хромосом. Цю особливість поведінки генетичного матеріалу в оогенезі ми відносимо до одного з механізмів природного добору на гаметному рівні.

Існування презиготичної селекції, яка пов'язана з участю в формуванні генотипу гамети не тільки диплоїдного (премейотичного), а і гаплоїдного (постмейотичного) набору хромосом, встановлена як при сперматогенезі, так і на стадії оогенезу [3, 12].

Наявність мікроеволюційних процесів на гаметному рівні підтверджує припущення, що в популяціях тварин добір діє періодично протягом критичних етапів онтогенезу, які безпосередньо пов'язані з реалізацією генетичної інформації на певних стадіях відтворення та індивідуального розвитку [9].

Це дало підстави [2] вважати пренатальну стадію розвитку особин провідним селекційним станом у формоутворювальному процесі.

Очевидно, мікроеволюційні процеси на гаметному рівні сприяють підтриманню підвищеного рівня гетерозиготності в популяціях тварин на різних етапах генезису порід. Імуногенетичний аналіз генетичних ресурсів молочних і м'ясних порід великої рогатої худоби України показує, що в більшості племінних стад спостерігається дефіцит фактичної кількості гомозиготних генотипів в порівнянні з теоретично очікуваною. Зокрема, в українській чорно-рябій молочній породі в селекційних групах бажаного екстер'єрного типу теоретично очікувалось 11,8 % гомозигот при їх фактичній наявності 1,3%, тобто очікувана гомозиготність була реалізована лише на 11,0%.

Схожа закономірність спостерігається і в племінних стадах різних порід свиней при їх імуногенетичному аналізі за локусами EAE і EAL.

Порівняння генофондів порід за коефіцієнтом гомозиготності показує теоретично очікувану частку гомозигот в популяції, вказує на більшу консолідованість великої білої породи. Більшу мінливість генофонду за системами E і L має порода дюррок. В цій породі встановлений найбільший дефіцит (0,274) гомозиготних генотипів за системою EAL, що вказує на генетичні процеси, які сприяють підтриманню гетерозиготності популяції. Такі процеси притаманні всім породам, що показують значення коефіцієнту фактичної реалізації теоретично очікуваної гомозиготності (W): найбільший у великої білої в системі EAE – 0,809 та в системі EAL у миргородської – 0,813, а найменший у миргородській в системі E (0,439) і у дюррок в системі L (0,445).

Таблиця 2

#### Характеристика трьох порід свиней за генною частотою алелів

Алелі, показники гомозиготності	Велика біла (n=237)	Миргородська (n=293)	Дюррок (n=123)
$E^{aeg}$	0,105	0,123	0,150
$E^{bdg}$	0,278	0,352	0,175
$E^{cdf}$	0,282	0,195	0,337
$E^{cdg}$	0,355	0,331	0,338
Ca	0,29	0,29	0,28
H	0,24	0,13	0,15

W	0,81	0,44	0,52
L <sup>adhi</sup>	0,112	0,232	0,468
L <sup>bcgi</sup>	0,778	0,705	0,524
L <sup>bdfi</sup>	0,110	0,063	0,008
Ca	0,63	0,56	0,49
H	0,41	0,45	0,22
W	0,65	0,81	0,45

В середньому за двома системами найбільшою є реалізація гомозиготності у тварин великої білої – 0,73, середня у миргородської – 0,63, найменша у дюрок 0,48.

В найбільш поліморфній системі E (табл. 3) у всіх породах знайдено по 8 генотипів, при цьому миргородська порода відрізняється підвищеною концентрацією генотипів E<sup>bdg</sup>/E<sup>edg</sup> і E<sup>bdg</sup>/E<sup>edf</sup>, які перевищують ці частоти у великій білій на 13,4 і 7,8, а дюрок на 18,9 і 4,2 відсотків відповідно (P<0,001). Крім того в порівнянні з великою білою і дюрок миргородську породу характеризує відносно вища частота генотипу E<sup>aeg</sup>/E<sup>bdg</sup> – 12,4 % проти 5,5% і 4,9% відповідно (P<0,001). Одночасно генотипу E<sup>edf</sup>/E<sup>edg</sup> в миргородській породі значно менше – 12,5% проти 26,3 % і 28,5 % (P<0,001).

Таблиця 3

Частота генотипів тварин в стадах трьох порід свиней (%)

Генотипи	Велика біла	Миргородська	Дюрок
E <sup>bdg</sup> /E <sup>bdg</sup>	10,6	3,8	1,6
E <sup>edf</sup> /E <sup>edf</sup>	5,5	1,7	6,5
E <sup>edg</sup> /E <sup>edg</sup>	7,6	7,2	6,5
E <sup>aeg</sup> /E <sup>bdg</sup>	5,5	12,4	4,9
E <sup>aeg</sup> /E <sup>edf</sup>	7,2	3,8	10,6
E <sup>aeg</sup> /E <sup>edg</sup>	8,5	8,6	14,6
E <sup>bdg</sup> /E <sup>edf</sup>	11,9	19,7	15,5
E <sup>bdg</sup> /E <sup>edg</sup>	16,9	30,3	11,4
E <sup>edf</sup> /E <sup>edg</sup>	26,3	12,5	28,5
L <sup>adhi</sup> /L <sup>adhi</sup>	1,1	2,0	16,9
L <sup>bcgi</sup> /L <sup>bcgi</sup>	52,2	43,0	21,1
L <sup>bdfi</sup> /L <sup>bdfi</sup>	1,1	0,0	0,0
L <sup>adhi</sup> /L <sup>bcgi</sup>	19,7	42,4	59,2
L <sup>adhi</sup> /L <sup>bdfi</sup>	3,4	0,0	0,0
L <sup>bcgi</sup> /L <sup>bdfi</sup>	22,5	12,6	2,8

### Висновки

Імуногенетичними дослідженнями мікроеволюційних процесів в стадах великої рогатої худоби і свиней встановлена дія генетичних механізмів, які забезпечують підтримання гетерозиготності при чистопородному розведенні цих видів тварин. Одним з факторів, що протидіє збільшенню гомозиготності генофондових популяцій, є природний добір, який в процесі онтогенезу обумовлює переважне успадкування в ряду поколінь спадкового матеріалу матерів.

### Література

1. Буркат В.П., Подоба Б.Є., Гузев І.В. Генофонд тварин// Енциклопедія сучасної України. – 2006. – Т. 5. – С.467-470.
2. Вагин Ю.В., Вагина И.Н. Дарвиновский отбор у млекопитающих на пренатальной стадии онтогенеза// Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. /за ред. М.В.Роїка. – К.: КВІЦ, 2004. – С. 16-24.
3. Дыбан А.П. Структура и функция хромосом и действие генов в раннем эмбриональном развитии млекопитающих// Третий съезд всесоюзного общества генетиков и селекционеров им. Н.И.Вавилова, Л.: Наука, 1977. – С. 151.

4. Иммуногенетическая экспертиза в селекционном процессе/ Буркат В.П., Мельник Ю.Ф., Ефименко М.Я. и др.// Научное наследие П.Н. Кулешова и современное развитие зоотехнической науки и практики животноводства: Сб. матер. Междунар. научно-пр. конф., посв. 150-летию ... П.Н.Кулешова, 26-29 окт. 2004 г. – М., 2006. – С. 85-90.
5. Мельник Ю.Ф., Буркат В.П., Гузев И.В. Селекционный процесс и состояние генетических ресурсов животноводства в Украине. – К.: Аграрна наука. – 2002. – 68 с.
6. Методологічні аспекти збереження генофонду сільськогосподарських тварин/ М.В.Зубець, В.П.Буркат, Ю.Ф.Мельник та ін.; Наук. ред. І.В.Гузев. – К.: Аграрна наука, 2007. – 120 с.
7. Національна програма збереження та раціонального використання генетичних ресурсів сільськогосподарських тварин України/ М.В.Зубець, В.П.Буркат, М.Я.Єфименко та ін.// Розвиток наукової спадщини акад. М.Ф.Іванова щодо породоутворення та селекції сільськогосподарських тварин. – К.: Асоціація «Україна», 1996. – С.53-56.
8. Закон України Про Загальнодержавну програму селекції у тваринництві на період до 2010 року// Нормативно-правові акти з питань плеємінної справи у тваринництві. – К., 2004. – С. 17-21.
9. Рэфф Р., Кофлан Т. Эмбрионы, гены и эволюция. – М.: Мир, 1986. – 402с.
10. Стоянов Р.О. Оцінка генетичної ситуації в популяціях сільськогосподарських тварин з використанням генетичних маркерів// Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві. – К.: Аграрна наука, 2005. – С. 234-236.
11. Эйсер Ф.Ф., Подоба Б.Е. Исследование генетических процессов в популяции крупного рогатого скота с использованием иммуногенетических маркеров// III съезд Всесоюз. о-ва генетиков и селекционеров им. Н.И.Вавилова: Тез.докл/ АН СССР. Всесоюз. о-во генет.и селекционеров им. Н.И.Вавилова. – Л., 1977. – С. 67.
12. Hart D. Stochastic selection of gametes and zygotes// Gamete competition in plants and animals: Ed. D. L. Mulcahy. Amsterdam, Oxford. – 1975. – P. 233-242.

### Резюме

Імуногенетичним аналізом генофондових популяцій великої рогатої худоби і свиней встановлена спрямованість мікроеволюційних процесів на відтворення гетерозиготних генотипів.

Иммуногенетическим анализом генофондовых популяций крупного рогатого скота и свиней установлено направление микроэволюционных процессов на воспроизводство гетерозиготных генотипов.

Immunogenetic analysis of cows and pigs gene pool populations has been used to establish that micro evolutionary processes are directed on reproduction of heterozygotic genotypes.

**ГОРДЕЕВА Н.В.<sup>1</sup>, АЛЕКСЕЕВ С.С.<sup>2</sup>, САМУСЕНКО В.П.<sup>3</sup>, МАТВЕЕВ А.Н.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,  
Россия, 119991, Москва, ул. Губкина, 3, e-mail: [ribka04@mail.ru](mailto:ribka04@mail.ru)

<sup>2</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,  
Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 26

<sup>3</sup> Россия, Иркутск, Иркутский государственный университет



## МЕХАНИЗМЫ СИМПАТРИЧЕСКОГО ВИДООБРАЗОВАНИЯ: ПРИМЕР ФОРМООБРАЗОВАНИЯ У АРКТИЧЕСКИХ ГОЛЬЦОВ *SALVELINUS ALPINUS* ЗАБАЙКАЛЬЯ

Симпатрическое видообразование, т.е. происхождение видов из единой популяции в отсутствие физической изоляции, всё ещё остаётся наиболее противоречивой концепцией эволюционной биологии. Хотя возможность этого способа видообразования доказана теоретически, эмпирические свидетельства весьма редки. Интересным объектом для исследования механизмов симпатрического видообразования служат экологические морфы у рыб. Гольцы рода *Salvelinus*, занимающие обширный циркумполярный ареал, отличаются широкой экологической пластичностью и быстрой скоростью эволюции. Популяции гольцов, как правило, экологически неоднородны и представлены двумя или более симпатрическими формами, между которыми прослеживаются различия в размерах и окраске, объектах питания, скорости роста и полового созревания, возрастной структуре, внешней морфологии и репродуктивном поведении [1]. В Забайкалье арктический голец населяет небольшие олиготрофные озёра в верховьях крупных притоков р. Лены и оз. Байкал. В большинстве исследованных забайкальских популяций найдены две или три симпатрические формы (экотипа): крупная, мелкая и карликовая [2]. В водоёме они осваивают различные биотопы: крупная и мелкая форма занимают нишу хищника и планктофага литоральной зоны, а карликовые, преимущественно, глубоководные планктофаги или бентофаги. Морфологическая дифференциация наиболее заметно выражена у более специализированной карликовой формы [2]. Симпатрическое происхождение этих форм не вызывает сомнений, если принять во внимание вероятную историю заселения гольцами озёр и недавнее исследование мтДНК [3]. В задачи нашего исследования входил анализ дивергенции симпатрических внутриозерных форм с помощью микросателлитных локусов. Использование микросателлитной ДНК обусловлено рядом её преимуществ перед другими маркерами, в частности, повышенной скорости мутирования и нейтральностью. Механизм эволюции микросателлитов хорошо известен, поэтому они зарекомендовали себя как хороший инструмент для прояснения филогенетических взаимоотношений между близкородственными популяциями и видами.

### Материалы и методы

Материал собран в 1995-2003 гг. на озёрах Светлинское (бассейн оз. Байкал), Б.Намаракит, Каларский Даватчан (Витим), Даватчан и Камканда (Олёкма). Сведения о биологии и морфологии гольцов опубликованы в ряде работ [2,4]. Амплифицировали восемь микросателлитных локусов. Генетическую изменчивость в выборках оценивали с помощью программы FSTAT 2.9.3.2. Тесты на соответствие генотипических распределений равновесию Харди-Вайнберга и оценки генетической дифференциации  $F_{ST}(\theta_{ST})$  и  $R_{ST}$  считали в программе GENEPOP 3.4. Иерархическое подразделение генетического разнообразия выполнено с помощью анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) в программе ARLEQUIN 3.1 (<http://lgb.unige.ch/arlequin>). Анализ популяционной структуры в каждом озере на основе общей матрицы мультилокусных генотипов и проводили в программе STRUCTURE 2.1 (<http://pritch.bsd.uchicago.edu>). Долю гибридов первого поколения оценивали в программе GENECLASS 2. Оценки генетически эффективной численности и величины миграции получали с помощью MIGRATE (<http://popgen.csit.fsu.edu/>). Тест на возможные отклонения от равновесия между миграцией и дрейфом, т.е. анализ демографической истории каждой популяции, проводили в программе BOTTLENECK.

### Результаты и обсуждение

Величины генетической изменчивости широко варьируют между выборками, при этом обнаружена достоверная корреляция оценок генетического разнообразия с размерами озёр и с жизненной стратегией: карлики из всех форм отличаются наиболь-

шим генетическим разнообразием. По всей видимости, это связано с различиями в эффективном размере популяций  $N_e$ , т.е. с численностью особей, передающих генофонд следующему поколению, который у карликов почти всегда больше, чем у других форм (варьирует в озёрах от 169 до 652 особи).

На различия между симпатрическими формами приходится значительная доля общей генетической изменчивости (15% в величинах  $F_{ST}$  и 21% в величинах  $R_{ST}$ ). Оценки дифференциации между формами в каждом из озёр оказались во всех случаях статистически значимы ( $\theta_{ST} = 0.030 - 0.285$ ,  $\rho_{ST} = 0.084 - 0.359$ ).

Кластеризация особей внутри каждого озера (задавалось от 2 до 4 кластеров) для объединённых выборок симпатричных форм проводилась в условиях модели, допускающей исходно смешанное происхождение особей и корреляцию частот между симпатрическими популяциями. В трёх озёрах продемонстрированы высокие оценки «родства» гольцов одной формы и их ограниченная гибридизация с другими симпатрическими формами. В оз. Светлинском и Б. Намаракит чёткая кластеризация наблюдалась только при использовании априорной информации о происхождении каждой особи.

Время дивергенции симпатрических форм в озёрах по нашим оценкам заняло 215 – 622 поколений при «быстрой» скорости мутации в исследуемых локусах и 1430 – 4150 при более вероятной «средней» скорости, или, если принять усреднённую по всем формам забайкальских гольцов длину поколения, равную восьми годам, 11500 – 33000 лет.

Оценки миграции между симпатрическими формами гольцов, вычисленные разными способами, в целом, схожи и их величина согласуется с долей обнаруженных гибридных особей. Поток генов между симпатрическими формами оказывается, как правило, несимметричным. Наиболее интенсивный обмен генетической информацией по нашим данным происходит в оз. Камканда между карликовой и крупной формами (оценка миграции  $m=0.033$ ) и между карликами и мелкими гольцами в оз. Светлинском ( $m=0.023$ ), а минимальной миграция оказывается между карликовой и мелкой формами из оз. Камканда (0.001). Часть особей, определённых как гибриды первого поколения, представлена незрелыми рыбами, для которых нельзя полностью исключить возможность ошибочной классификации при анализе внешней морфологии.

Как было показано, симпатрические формы занимают в забайкальских озёрах различные трофические ниши и различаются по размерам и форме тела, меристическим признакам, скорости роста и продолжительности жизни, срокам полового созревания, плодовитости и стратегии размножения. При этом степень фенотипических различий между симпатрическими формами варьирует от озера к озеру. Несомненно, что энергоёмкость объектов питания определяет скорость роста и связанные с ней параметры жизненного цикла. Оценки таксономических дистанций, вычисленные по комплексу 9-ти меристических признаков между симпатрическими формами обнаруживают корреляцию, положительную - с генетическими расстояниями и отрицательную - с долей обнаруженных гибридов. Очевидно, это указывает на связь между степенью специализации и репродуктивной изоляцией между формами.

Механизмы возникновения и эволюции репродуктивной изоляции между экологическими формами должны включать дивергенцию по функционально значимым признакам, связанным с адаптацией к различным нишам и трофической специализацией, направляемую дизруптивной формой отбора. Репродуктивная изоляция между маргинальными формами возникает и поддерживается из-за постепенного расхождения по срокам нереста, особенностям репродуктивного поведения и ассортативного скрещивания, а также, по мере всё большего расхождения форм, пониженной жизнеспособности и фертильности гибридов.

Интересно, что интенсивность процессов симпатрического формо- и видообразования у рыб связана с наличием разнообразия свободных трофических ниш, которые, очевидно, можно найти в озёрах вулканического, рифтового и кратерного происхожде-

ния, а также в озёрах, только что освободившиеся от ледника [обзор: 5]. В Забайкалье возникновение большинства горных озёр связано с гляциологическими и неотектоническими процессами в плейстоценовую эпоху (0,8-0,01 млн.лет). Характерная морфология озёрных котловин байкальского типа предоставила возможность адаптивной радиации в предковых популяциях гольцов и привела к образованию крайне специализированной глубоководной карликовой формы. Наши данные не дают основания утверждать, что в озёрах моренного происхождения процессы дивергенции у гольцов начались позже, чем в более древних тектонических. Понятно, что возраст современных популяций может и не совпадать с возрастом озёр, а наши оценки датируют не время колонизации, а начало дивергенции симпатрических форм, связанной с трофической специализацией и направленной на максимальное освоение ресурсов. Возможно, что подходящие условия для таких разнообразящих процессов отбора могли возникнуть в случае резкого обеднения ихтиофауны водоёма и его кормовой базы.

### **Выводы**

Можно заключить, что разнообразие экологических форм, которое демонстрируют популяции забайкальских гольцов представляет собой продукт параллельных процессов адаптивной радиации, направленной на освоение различных трофических ниш, что представляет начальные стадии симпатрического видообразования. Но достижение симпатрическими популяциями видового статуса, очевидно, возможно в стабильных биоценозах со множеством ниш, как, например, у рыб в некоторых африканских и южноамериканских озёрах, характеризующихся быстрым видообразованием и имеющих «букеты» видов. Показано, что отбор на репродуктивную изоляцию, и следовательно, симпатрическое видообразование успешнее идёт в процветающих популяциях, в то время как маленький эффективный размер популяции сам по себе препятствует процессам дивергенции [6]. В нашем примере с гольцами рода *Salvelinus*, небольшие малокормные водоёмы, по-видимому, позволяют существовать возникшим симпатрическим формам в состоянии устойчивого равновесия (в виде «гантелевидных структур»). При этом, достижение такого равновесия, очевидно, происходит при различной степени генетической изоляции.

### **Литература**

1. *Hindar K. and Jonsson B.* Ecological polymorphism in Arctic charr. // Biol. J. Linn. Soc. – 1993.- vol. 48. P.63–74.
2. *Alekseyev, S.S., Samusenok, V.P., Matveev, A.N., Pichugin, M.Yu.* Diversification, sympatric speciation, and trophic polymorphism of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* complex) in Transbaikalia // *Environmental Biol. Fish.* – 2002. – vol. 64, № 1-3). – P. 97-114.
3. *Alekseyev, S.S., Bajno, R., Gordeeva, N.V. et al.* Sympatric speciation and phylogeographic patterns in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* complex, from Transbaikalia revealed by mtDNA sequence analysis // 5<sup>th</sup> International Charr Symposium, 2-5 August 2006 – Reykjavik Iceland. 2006. - P. 12.
4. *Самусенок В.П., Алексеев С.С., Матвеев А.Н. и др.* Вторая в бассейне Байкала и самая высокогорная в России популяция арктического гольца *Salvelinus alpinus* complex (Salmoniformes, Salmonidae) // *Вопр. ихтиологии.* - 2006. - Т. 46, № 8. - С. 587 - 599.
5. *Smith T.B., Skúlason S.* Evolutionary significance of resource polymorphisms in fishes, amphibians and birds // *Ann. Rev. Ecol. Systematics* - 1996. – vol. 27. – P.111–133.
6. *Kondrashov A.S., Mina M.V.* Sympatric speciation: when is it possible? // *Biol. J. Linn. Soc.* -1986. – vol.27. – P.201-223.

### **Резюме**

Рассматриваются механизмы симпатрического формообразования в реликтовых популяциях арктических гольцов *Salvelinus* Забайкалья. С помощью анализа микросателлитной ДНК показаны время генетической дивергенции между симпатрическими

формами, величина генной миграции и её корреляция с различиями по эко-морфологическими признакам, связанным с трофической специализацией.

Розглядаються механізми симпатричного формоутворення в реліктових популяціях арктичних гольців *Salvelinus* Забайкалля. За допомогою аналізу мікросателітної ДНК оцінюються час генетичної дивергенції між симпатричними формами, величина генної міграції та її кореляція з различіями по еко-морфологічним ознакам, пов'язаним з трофічною спеціалізацією.

Mechanisms of sympatric speciation in relict populations of Transbaikalian Arctic charrs (genus *Salvelinus*) are considered. Analysis of microsatellite DNA helped to estimate the time of genetic divergence between sympatric forms, the size of gene migration and its correlation with differences in eco-morphological traits connected with trophic specialization.

**КАШИН А.С.<sup>1</sup>, ЦВЕТОВА М.И.<sup>2</sup>, ДЕМОЧКО Ю.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского  
Россия, 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83, e-mail: kashinas@sgu.ru,

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока РАСХН  
Россия, 410010 Саратов, ул. Тулайкова, 7, e-mail: ravichaf@mail.ru

## **ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОК ЗАРОДЫШЕВОГО ПУТИ И ПРОБЛЕМА ДЕТЕРМИНАЦИИ ГАМЕТОФИТНОГО АПОМИКСИСА**

У большинства изученных видов, как растений, так и животных, в ходе онтогенеза происходит полиплоидизация соматических клеток в процессе их дифференциации. Однако видовое число хромосом сохраняется неизменным в клетках зародышевого пути, что и обеспечивает генетическую стабильность вида [1].

Исключением преимущественно являются растения, являющиеся продуктом гибридизации и/или полиплоидии, у которых геномная изменчивость затрагивает не только дифференцирующиеся соматические клетки, но и апикальные меристемы. Гибридизация и полиплоидия нарушают хромосомный баланс. Это вызывает, - как одно из следствий, особенно в первых поколениях, - миксоплоидию и анеуплоидию. Известно, что значительная часть миксоплоидных форм – гибриды [2]. При этом спонтанная гибридизация и полиплоидия – явления, значительно распространенные среди высших растений [3, 4]. Считается, что эволюция растений осуществляется в значительной степени путем изменения уровней ploidy [5, 6] и гибридогенеза [7]. Считается, что от 50-60 [8] до 70% [9, 10] видов покрытосеменных имеют аллополиплоидную природу. При этом и амфиплоидия, и аллоплоидия у растений в природе осуществляется преимущественно с участием либо гаметофитного апомиксиса, либо апомейоза, как элемента всё того же апомиксиса [11].

Известно, что реализация гаметофитного апомиксиса зачастую сопровождается хромосомной нестабильностью [12-15] и ещё целым рядом явлений, которые обычно сопровождают полиплоидию и отдалённую гибридизацию: стерильность мужской генеративной сферы [13, 16, 17], сложный характер полиморфизма, во многом аналогичный расщеплению сложных гибридов [18] и т.п. Очевидна и тесная корреляция между полиплоидией, гибридогенезом и апомиксисом [11, 18, 19].

Принципиально важно понять характер отношений между всеми этими явлениями и установить причинно-следственные связи между ними, остающимися до сегодняшнего дня достаточно неопределёнными. В данной работе на примере растений *Pilosella officinarum* F. Schultz et Sch. Bip. и ряда других видов *Asteraceae* проанализи-

рованы степень и характер геномной изменчивости при гаметофитном апомиксисе и возможные причинно-следственные отношения между этими явлениями.

### **Материалы и методы**

Микроспорогенез изучали у растений двух популяций *Pilosella officinarum* ( $x=9$ ). Соцветия фиксировали ацетоалкоголем (1:3) и хранили в 75% спирте при  $t=6-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , окрашивали 2% ацетокармином после обработки 4% раствором железо-аммонийных квасцов при  $t=50\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 20 минут. Давленные препараты готовили в смеси 70% хлорал-гидрата и 45% уксусной кислоты, подкрашенной ацетокармином.

Кариотипическую изменчивость вегетирующих в популяциях растений и в потомстве тех же растений выявляли путём подсчёта числа хромосом в клетках корневых меристем или меристем надземных побегов на «давленных» препаратах. Материал фиксировали в ацетоалкоголе, окрашивали 4% ацетогематоксилином с предварительной обработкой 8-оксихинолином или бромнафталином [20].

### **Результаты и обсуждение**

В обеих популяциях *P. officinarum* в разные годы растений встречались растения 2-х типов: 1) с гермафродитными цветками; 2) с женскими цветками, у которых вместо пыльников присутствовали стаминодии. Количество последних в разные годы варьировало в интервале 41.17–100.00 %. В большинстве случаев у одного растения все цветки либо были гермафродитными, либо имели пестик и стаминодии. Лишь в единичных растениях в стаминодиях присутствовали участки генеративной ткани, содержащие микроспороциты на разных стадиях мейоза, либо пыльцевые зёрна, значительно варьирующие по форме и размеру.

У растений с гермафродитными цветками наблюдали значительные нарушения процессов микроспорогенеза. В диакинезе часть клеток наряду с бивалентами содержала неспаренные хромосомы, что явилось следствием нарушений конъюгации. Как в первом, так и во втором делениях мейоза, в метафазе часть хромосом не включалась в метафазную пластинку, а в ана-телофазе наблюдались многочисленные нарушения расхождения хромосом, в результате чего продукты деления (диады или микроспоры) содержали аномальное число ядер и/или микроядра. В некоторых цветках при эквационном делении часть материнских клеток микроспор (до 17,3%) содержала отдельные хроматиновые структуры, вытянутые от метафазной пластинки к полюсу веретена деления. Скорее всего, они возникли при хромосомных перестройках, в результате которых центромера оказалась на конце, а соответствующая хромосома начала движение к полюсу деления раньше других.

Наряду с аномалиями в расхождении хромосом во многих мейоцитах наблюдались аномалии в ориентации веретёна деления и заложении фрагмопласта. В некоторых цветках до 10% мейоцитов во втором делении мейоза содержали не перпендикулярно, а параллельно расположенные веретена деления. При этом имело место образование тетрад не тетраэдрической, а иной, не свойственной для *Asteraceae*, конфигурации. В некоторых мейоцитах в конце мейоза II был нарушен цитокинез или же фрагмопласт не формировался, в результате чего образовывались многоядерные монады или совершенно аномальные продукты микроспорогенеза. Спектр нарушений мейоза у изученных растений совпадал, но частота значительно варьировала как между растениями, так и в разных цветках одного растения. Частота иных (мосты, фрагментация хромосом и другие) аномалий была на уровне 0,1–4,0%, что не превышает естественного мутационного фона. У всех изученных растений часть клеток на разных стадиях микроспорогенеза дегенерировала, что вело к формированию стерильных пыльцевых зёрен (до 50-60 %).

В микроспорогенезе очень редко встречались явления, которые вели бы к существенному варьированию уровня пloidности пыльцы. Число отмеченных монад, имеющих реституционное ядро, после мейоза I составляло менее 1 % от числа возникших диад. Многочисленные отставания хромосом в ана-телофазах первого и второго делений, вероятнее всего, приводили к образованию анеуплоидии, но не сказывались на

уровне пloidности. В случаях, когда в ядрах микроспор было возможно подсчитать число хромосом, оно было близко гаплоидному числу хромосом. В цветках, в которых формировалась морфологически нормальная пыльца, пыльцевые зёрна имели очень близкие размеры, что также свидетельствовало об отсутствии варьирования уровня пloidности среди них.

При анализе потомства индивидуальных растений, полученного как при свободном цветении, так и при беспыльцевом режиме, в исследуемых популяциях выявлены, кроме ди- и триплоидов, ещё и тетра-, пента-, гекса- и гептаплоиды (Кашин, 2006). Отсутствие в пыльниках исследованных растений пыльцевых зёрен, пloidностью выше  $1x$ , указывают на то, что в цветках преимущественно в случае возможности формирования диплоидной спорогенной ткани в пыльниках, хотя и с большим процентом нарушений, но протекает мейоз и формируется пыльца. В иных случаях, вероятно, вместо пыльников формируются стаминодии с абсолютным или почти полным отсутствием спорогенной ткани. Цветки тех единичных растений, в стаминодиях которых отмечены участки генеративной ткани, содержали пыльцу, значительно варьирующую по форме и размеру, что обычно указывает на разную пloidность. Это является дополнительным свидетельством в пользу того, что растения с цветками, несущие вместо пыльников стаминодии, полиплоидны.

Таким образом, в популяциях *P. officinarum* микрогаметофит является относительно стабильным элементом системы размножения. Он несёт гаплоидный набор хромосом и формируется только у растений с диплоидной спорогенной тканью. Большое число аномалий при его формировании указывает на то, что даже такие растения имеют несбалансированный геном и большой процент анеуплоидов. Нормальное течение мейоза у них затруднено. При оплодотворении такой пыльцой уровень пloidности у потомков по отношению к родительским растениям мог увеличиваться лишь на  $1x$ . Однако отмечены многочисленные случаи того, что уровень пloidности потомков по отношению к вегетирующим в популяциях растениям возрастал более чем на  $1x$  (Кашин, 2006).

В ходе исследования показано, что для растений популяций, как апоспоровых (различные виды *Pilosella*, включая и указанные выше популяции *P. officinarum*), так и диплоспоровых (виды *Taraxacum* и *Chondrilla*) автономных апомиктов, свойственны явления анеу- и миксоплоидии. При этом в пределах одного апекса обнаружены клетки до 3-4 разных уровней пloidности, зачастую ещё и с числом хромосом, не кратным основному числу. Выявлено, что число лишних или недостающих хромосом при анеуплоидии даже в пределах одного апекса также существенно варьирует. Степень распространения анеу- и миксоплоидов столь высока (до 30 – 65 % от числа исследованных растений или их потомков), что нет оснований говорить о спонтанном, нерегулярном их возникновении. Подобное ранее было обнаружено лишь у некоторых псевдогамных апомиктов *Rosaea* (Мирошниченко, 1978), но, вероятно, свойственно большинству апомиктов. Скорее, речь идёт о закономерном сопровождении явлениями анеу- и миксоплоидии гаметофитного апомиксиса и о геномной нестабильности апомиктов, проявляющейся не только на уровне генеративных структур и протекающих в них процессов выбора пути репродукции (мейоз – апомейоз, зиготия – апозиготия), но и на уровне соматических клеток и самого хода митоза. Миксоплоидия, обнаруживаемая с высокой частотой в клетках апикальных меристем, указывает, в частности, на то, что у апомиктов уже в генезисе клеток зародышевого пути наблюдается неустойчивость протекания клеточного цикла, что приводит к реализации с высокой частотой, наряду с собственно митозом, редукционного митоза, реституционного митоза, эндомитоза и т.п.

Известная тесная корреляция между гаметофитным апомиксисом, гибридогенезом и полиплоидией может объяснить высокую долю анеу- и миксоплоидов у апомиктов. Однако и в этом случае остаётся открытым вопрос о том, эта корреляция является причиной или следствием реализации гаметофитного апомиксиса у растений.

Нестабильность генома в соматических клетках меристем, являющаяся результатом разбалансированного течения клеточного цикла, означает, что и при переходе к цветению, т.е. при трансформации апекса в генеративный, эта разбалансированность сохраняется. Поэтому причиной перехода растений к гаметофитному апомиксису может быть несбалансированность генома и нарушения нормального течения клеточного цикла, которые, в свою очередь, являются следствием полиплоидии или гибридогенеза. Часть из нарушений нормального течения клеточного цикла (не только при митозе, но и при мейозе) и провоцирует реализацию апомейоза (апоспории или диплоспории) и партеногенез. При этом имеет место рассогласованность действия факторов регуляции клеточного цикла, нарушение градиентов их активности вдоль продольной оси семязачатка и т.п.. При реализации диплоспории, например, нарушения в регуляции клеточного цикла в соответствующих клетках приводят либо к реализации вместо мейоза митоза (Tetrahymena-тип), либо к нарушениям аналогичным тем, что имеют место при реституционном митозе (Antennaria-тип), либо к нормальному его течению, но с предшествующим эндомитозом в клетке-предшественнице материнской клетки мегаспор (*Allium nutans*-тип). При апоспории факторы регуляции клеточного цикла «срабатывают не в том месте» и приводят к пролиферативной активности по пути мегагаметофитогенеза «не той клетки». При реализации партеногенеза эти нарушения в регуляции клеточного цикла приводят к пролиферативной активности яйцеклетки или других клеток мегагаметофита без оплодотворения.

Исходя из этого, механизмы реализации гаметофитного апомиксиса следует искать на уровне механизмов эпигенетической регуляции клеточного цикла, а варьирование частоты миксоплоидии и анеуплоидии у растений одних и тех же популяций по годам указывает на зависимость явления от факторов внешней среды, опосредованных изменениями на уровне всё тех же физиолого-биохимических механизмов регуляции.

Полученные результаты не только подтверждают заключение о том, что гаметофитный апомиксис является неустойчивой системой семенного размножения (Кашин, 2006), но и показывают, что эта неустойчивость охватывает не только стадии выбора пути семенной репродукции, но и все циклы и формы репродукции клеток в онтогенезе растений.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (проекты 05-04-49001, 08-04-00319).

#### Литература

1. Кунах В.А. Биотехнология лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – Киев. - 2005. - 730 с.
2. Чугункова Т.В., Шевцов И.А. Цитогенетика сахарной свёклы. - Киев. - 1992. - 176 с.
3. Ramsey Ju., Schemske D.W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants // Ann. Rev. Ecol. Syst. - 1998. - vol. 29, N 1. - P. 467-501.
4. Otto S. P., Whitton J. Polyploid incidence and evolution // Annu. Rev. Genet. - 2000. - vol. 34. - P. 401-437.
5. Зосимович В.П. Полиплоидия и её значение в эволюции и селекции покрытосеменных растений // Экспериментальная полиплоидия у культурных растений. - Киев. - 1974. - С. 5-12.
6. Soltis D.E., Soltis P.S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution // Trends Ecol. Evol. - 1999. - vol. 14, N 9. - P. 348-352.
7. Цвелёв Н.Н. О значении гибридизации в эволюции высших растений // Эмбриология цветковых растений (терминологии и концепции). – Санкт-Петербург. - 2000. - Т. 3. - С. 137-141.
8. Стеббинс Д.Л., Айала Ф.Х. Эволюция дарвинизма // В мире науки. - 1985. - № 9. - С. 13-39.
9. Averett J.E. Polyploidy in Plant taxa: Summary // Polyploidy in Plant, biological relevance. - New York. - 1980. - P. 269—273.

10. *Готшлак В.* Полиплоидия в эволюции высших растений // Современные достижения молекулярной биологии хромосом и клеток. - Алма-Ата. - 1989. - С. 7—45.
11. *Каушин А.С.* Гаметофитный апомиксис как неустойчивая система семенного размножения у цветковых. – Саратов. - 2006. - 309 с.
12. *Thomas P.T.* Reproductive versatility in *Rubus*. II. The chromosomes and development. // *J. Genet.* - 1940. - vol. 40, N 1-2. - P. 119-128.
13. *Gustafsson A.* Apomixis in higher plants. Pt. I-III // *Lunds. univ. Arsskrift.* - 1946. - bd. 42, - S. 1—68; 1947. - bd. 43. - S. 69—370.
14. *Хохлов С.С.* Полиплоидия и апомиксис у покрытосеменных растений // Полиплоидия и селекция. - Москва; Ленинград. - 1965. - С. 62—69.
15. *Nogler G.A.* Gametophytic apomixis // *Embryology of Angiosperms.* - Berlin e.a. - 1984. - P. 475-518.
16. *Rutishauser A.* Fortpflanzungsmodus und Meiose apomiktischer Blütenpflanzen // *Protoplasma.* - 1967. – vol. 1, N3. - P. 1-243.
17. *Хохлов С.С., Зайцева М.И., Куприянов П.Г.* Выявление апомиктических растений во флоре цветковых растений СССР. – Саратов. - 1978. - 224 с.
18. *Grant V.* Plant speciation. - New York. - 1981. - 563 p.
19. *Babcock E.B., Stebbins G.L.* The American species of *Crepis*. Their interrelationships and distribution as affected by polyploidy and apomixis. - Washington. - 1938. - 199 p.
20. *Абрамова Л.И.* Определение числа хромосом и описание их морфологии в меристеме и пыльцевых зёрнах культурных растений. – Ленинград. - 1988. - 61 с
21. *Мирошниченко Е.Я.* Факультативно-псевдогамный апомиксис и кариологический полиморфизм в роде *Poa* L. // Апомиксис у растений и животных. – Новосибирск. - 1978. - С 224-236.

### Резюме

На примере растений ряда автономных апомиктов Asteraceae рассмотрены цитогенетические особенности генезиса клеток зародышевого пути у апомиктов. Высказана гипотеза о том, что реализация гаметофитного апомиксиса в системе семенного размножения у цветковых обусловлена изменениями на уровне механизма регуляции клеточного цикла после актов гибридогенеза и/или полиплоидии.

На прикладі рослин ряду автономних апоміктів Asteraceae розглянуті цитогенетичні особливості генезису клітин зародкового шляху апоміктів. Запропонована гіпотеза про те, що реалізація гаметофітного апоміксису у системі насінневого розмноження у квіткових рослин зумовлена змінами на рівні механізму регуляції клітинного циклу після подій гібридогенезу і/або поліплоїдії.

Cytogenetic peculiarities of genesis of embryonic path cells in apomicts are under consideration with usage as example some autonomous apomicts from the *Asteraceae*. The hypothesis is stated that realization of gametophytic apomixis in the seed reproduction system of flowering plants is conditioned by changes at the level of the mechanism of cell cycle regulation following after acts of hybridogenesis and/or polyploidy.

**МАЛЕЦКИЙ С.И.**

*Институт цитологии и генетики СО РАН,*

*пр. акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 E-mail:*

*[stas@bionet.nsc.ru](mailto:stas@bionet.nsc.ru)*



## ПОЛИПЛОИДИЯ И АНАЛОГОВАЯ ФОРМА НАСЛЕДСТВЕННОСТИ У РАСТЕНИЙ

*Полиплоидия у растений.* Описания особенностей системы наследственности у полиплоидных видов и форм растений актуальны на протяжении последнего столетия. Полиплоидия встречается практически во всех систематических группах растений, а среди цветковых полиплоидные виды составляют более 70 %. Между тем современная лексика по общим вопросам наследственности пребывает, на наш взгляд, в состоянии перманентной «турбулентности» («хаоса»), что отчасти вызвано объективными причинами (бурное развитие новых исследований в биологии и появление большого числа терминов и понятий в XX в.). Примером семантической турбулентности в терминологии может служить понимание термина «полиплоидия»: «геномная мутация, состоящая в увеличении диплоидного числа хромосом путем спонтанного или вызванного экспериментально добавления целых хромосомных наборов» (Ригер, Михаэлис, 1967, С. 310). Как известно, при экспериментальном удвоении числа хромосом у диплоидных растений с помощью цитостатиков (колхицин, таксол и др.) никаких изменений в нуклеотидном составе ядерной или цитоплазматической ДНК не происходит. Цитостатики взаимодействуют исключительно с молекулами тубулина, из которых состоят микротрубочки цитоскелета и не взаимодействуют с молекулами ДНК. Нарушение свойств веретена деления под влиянием цитостатиков ведет к возникновению либо эндополиплоидии или многонитчатости хромосом (синтез хроматид не сопровождается их разделением), либо к автополиплоидии (в соматических клетках удваивается число хромосом). В итоге клеточные популяции меристем становятся миксоплоидными и в семенных потомствах таких растений можно выделить тетраплоиды. Подобную вариабельность клеточных популяций по структуре хромосом и клеточных ядер более корректно обозначать термином «эпигеномная изменчивость» (Оленов, 1970).

*Фенотипические эффекты полиплоидизации клеток.* Полиплоидизация клеток изменяет, например, многие репродуктивные признаки растений: а) систему перекрестного размножения (самонесовместимые растения становятся самосовместимыми); б) пол цветков (совершенные цветки заменяются однополыми); г) зиготический способ репродукции семян заменяется апозиготическим (связь полиплоидии и агамоспермии); в) меняется тип развития растений (однолетность сменяется на многолетность) и др. (Малецкий, 2005а). У полиплоидов, по сравнению с их диплоидными сородичами, меняются дозы геномов и генов в клетках, от которых зависит экспрессия многих репродуктивных признаков растений. Фенотипическая изменчивость при авто- и эндополиплоидии связана со свойствами микротрубочек, цитоскелета и веретена деления клеток. Микротрубочки и веретено деления «регулируют» структуру хромосом при десинхронизации процесса самоудвоения хроматид (формируются одно- или многохроматидные хромосомы).

Пути и способы кооперативного взаимодействия между структурами ядра и цитоскелета клеток на сегодня далеки от полной ясности. Между тем описание распределения продуктов мейоза (распределение типов спор, производимых в цветках) позволяет судить о строении хромосом в материнских клетках микро- и мегаспор. В норме хромосомы состоят из одной хроматиды, но известно множество примеров, когда хромосомы в клетках двуххроматидные или многохроматидные (политенные хромосомы). У многих видов растений в меристемах встречаются 2 и 4-хроматидные хромосомы (дуплохромосомы и квадруплохромосомы) (D'Amato, 1985). Существование клеток с многохроматидными хромосомами позволяет реализовываться процессу мейоза у гаплоидов. Считается, что мейоз у гаплоидных растений невозможен, что верно для клеток с монохроматидными хромосомами. Иная ситуация складывается для клеток с многохроматидными хромосомами. Гаплоидные ядра с дупло- и квадруплохромосомами мо-

гут претерпевать одно или два мейотических деления. Это можно наблюдать по частоте образования диад, триад и тетрад микроспор (и мегаспор) у гаплоидных растений. Созревание в цветках гаплоидов некоторого количества пыльцевых зерен и зародышевых мешков открывает возможность их семенной репродукции (Малецкая, Юданова, 2008).

**Наследственность.** Наследственность «состоит в том, что каждое растение или животное производит однородных себе потомков: причем эта однородность заключается не столько в повторении индивидуальных признаков, сколько в повторении < ... > общего строения. <...> Пшеница производит пшеницу, < ... > каждый развивающийся организм принимает форму, свойственную классу, порядку, роду и виду, от которого он происходит. < ... > В этом-то и проявляется, главным образом, наследственность» (Спенсер, 1870, С. 173). В настоящее время многими биологами понятия «наследственность» и «генетика» воспринимаются как синонимы в силу того, что термин «генетика» определяется через понятие «наследственность». В справочных изданиях генетика определяется как: «Наука о наследственности и изменчивости живых организмов ... . В ее основу легли закономерности наследственности, обнаруженные Г. Менделем при скрещивании различных сортов гороха (1865), а также мутационная теория Х. де Фриза (1901–1903). Рождение генетики принято относить к 1900 г., когда Х. де Фриз, К. Корренс и Э. Чермак вторично открыли законы Менделя. Термин «генетика» предложил в 1906 г. У. Бэтсон» (Биологический энциклопедический словарь, 1989, С. 123). Общепринятое определение предмета генетики с логической точки зрения, по меньшей мере, является некорректным (семантическая турбулентность). В этом определении предмет науки (генетики) вводится не через объект своего исследования (гены хромосом и цитоплазмы, молекулы ДНК и РНК и их свойства), а через трудноопределимые свойства биосистем различного уровня сложности, обозначаемые общим термином «наследственность». В настоящее время объектом исследований в генетике являются не столько наследственные свойства биосистем различного уровня, сколько свойства молекул нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), а также молекул белков, кодируемых этими молекулами. Поэтому, на наш взгляд, более корректным будет следующее определение генетики: «Генетика – это наука о генах ядра и цитоплазмы клеток, изучающая последовательности нуклеотидов в молекулах ДНК, пути и способы транскрипции, трансляции и регуляции синтеза нуклеиновых молекул в клетках, а также роль отдельных последовательностей ДНК (генов) в наследовании признаков клеток, целостных индивидуумов и популяций» (Малецкий, 2005б).

**Аналоговая форма наследственности.** В каждой клетке сосуществуют и действуют одновременно две «штаб-квартиры», управляющие наследственностью. Одна из них – ядро, где хранится ДНК, управляющая производством белков, из которых строится клетка. В ядре осуществляется самоудвоение молекул ДНК (цифровая форма наследственности) и хромосом. Одновременно с процессами самоудвоения ядро участвует в создании второго центра управления наследственными процессами в клетках – цитоскелета. Ядро контролирует синтез тубулинов, из которых образуются сначала микротрубочки, а потом цитоскелет, который контролирует движение молекул в клетках и ее пространственную организацию. Цитоскелет выполняет важнейшую функцию – распределяет удвоенные (однократно или многократно) хромосомы между дочерними ядрами, т. е. реализует процесс кариокинеза (митоз). Если митоз почему-то не состоялся и удвоенные хроматиды не разошлись, то возникает многоядерное или полиплоидное ядро. Эта информация о неразделившемся ядре не «стирается», а «запоминается», и клетка начинает новый цикл деления, но уже с измененной структурой хромосом и ядра. Цитоскелет и веретено деления – основа аналоговой формы наследственности клеток.

В конце XX века было установлено, что наследственными свойствами обладают молекулы не только нуклеиновых кислот, но и белков (Тер-Ованесян и др., 1998). С биоинформационной точки зрения, носителем информации может служить любая биологическая структура в аналоговой или цифровой форме. Химическая информация в

молекулах нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) представлена последовательностью нуклеотидов, которая подобна цифровым устройствам. «Хранение и считывание химической информации в цифровом виде встречается в нуклеиновых кислотах. Основой «операции оцифровки» является 2/3-процесс (2 против 3 водородных связей в парах оснований А:Т и Г:С, что соответствует обычной 0/1 коммутации в электронных компьютерах» (Лен, 1998, С. 231).

Аналоговая же форма информации «кодируется» особенностями структуры молекул или супермолекул (размер молекул, их форма, относительное расположение центров взаимодействия между молекулами и др.). Белки и белковые структуры – пример аналоговой формы хранения и передачи наследственной информации. Способ их взаимодействия с другими полимерными компонентами клетки реализуется по принципу «ключ-замок». В этом состоит коренное отличие пептидных полимеров клетки от полимеров нуклеиновых кислот (ДНК и РНК).

Среди множества внутриклеточных белков выделим *тубулины* (структурные белки), из которых сначала строятся микротрубочки, а из последних *цитоскелет* и *веретено деления*. Число молекул тубулина, синтезируемых клеткой, превышает  $10^7$ . В ядерной ДНК имеются два разных гена, содержащие информацию о последовательностях аминокислот  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулинов. После синтеза на рибосомах в цитоплазме молекулы  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулинов объединяются в димеры. Димеры тубулина могут присоединяться к плюс-концу микротрубочки – микротрубочка удлиняется. С минус-конца микротрубочки могут разбираться (отделяются димеры тубулина – микротрубочка укорачивается). Партнерские отношения между ядром и микротрубочками можно описать метафорически. Ядро – «собственник», микротрубочки цитоскелета – «менеджеры» в клетке. Отношение между ядром и микротрубочками (или цитоскелетом) напоминает отношения между собственником предприятия и нанятыми для его управления менеджерами. Менеджеры не владеют собственностью, но управляет производством, принадлежащим собственнику, а собственник не управляет производственным процессом, но является владельцем предприятия и нанимает управленцев.

Многие природные алкалоиды взаимодействуют с димерными молекулами тубулина микротрубочек, изменяя их свойства, что меняет наследственные свойства клеток. К этой группе веществ относятся, например, такие цитостатики (эпимутагены), как колхицин ( $C_{22}H_{25}O_6$ ) и таксол ( $C_{47}H_{51}O_{14}$ ). Веретено деления и цитоскелет – динамические структуры клетки. Колхицин нарушает реакцию полимеризации микротрубочек, а таксол нарушает реакцию деполимеризации микротрубочек веретена деления. Микротрубочки, цитоскелет и веретено деления, будучи белковыми структурами, представляют собой пример аналоговой формы наследственности в клетках, свойства которой отличны от цифровой (нуклеиновой) наследственности. Микротрубочковые структуры (цитоскелет, веретено деления) – важнейшие компоненты эпигенетической системы наследственности и управления формированием признаков и свойств растений в ходе индивидуального развития.

Белковая наследственность реализуется не только на уровне структур цитоскелета и веретена деления, но и на уровне отдельных белковых молекул (в этих случаях белки рассматривают как инфекционное начало) (Тер-Ованесян и др., 1998). Впервые феномен белковой наследственности был изучен на животных («коровье бешенство» связанное с конформационными свойствами белков-прионов). «На уровне белков работает механизм воспроизведения, но не аминокислотной последовательности, а конформации. ... Известен ряд клеточных процессов и структур, связанных с перестройкой белков или их комплексов. Среди них динамика цитоскелета – сборка и разборка микротрубочек, сборка и разборка ядерной оболочки в каждом митозе высших эукариот» (Инге-Вечтомов и др., 2004, с. 60-63). Таким образом, конформационные или аналоговые свойства белков – важнейшая компонента клеточной наследственной памяти, используемой при самосборке разнообразных внутриклеточных структур.

**Эпигенетическая наследственность у растений.** К эпигенетическим относят такие изменения в клетках, которые не затрагивают химический код нуклеиновых молекул. Предмет эпигенетики – наследуемые новообразования в идиоплазме клеток, возникающие в ходе онтогенеза и приводящие к наследуемым изменениям признаков на уровне целых растений. К эпигенетической форме изменчивости у растений можно отнести: а) автополиплоидию (кратное изменение числа хромосом в ядрах клеток); б) аллополиплоидию (объединение двух кариоплазм при отдаленных скрещиваниях); в) внутригеномные перестройки структуры хромосом (транслокации); г) перенос геномов из цитоплазмы одного вида в цитоплазму другого вида; д) «ротационная» изменчивость макропризнаков в популяциях, т. е. перепрограммирование онтогенеза и системных признаков особей на базе альтернативных программ развития; е) феномен белковой наследственности и др. Экспериментальные изменения в цитоскелете клеток под воздействием цитостатиков, наглядный пример аналоговой формы наследственности, на основе которой формируется эпигенетическая изменчивость и наследственность у полиплоидных форм растений.

Эпигенетическая парадигма наследственности вернула биологии системный стиль мышления, позволяя рассматривать наследственную изменчивость не только отдельных генов или блоков генов в популяциях, но и наследственную изменчивость целостных систем (например, репродуктивных признаков растений). Многие эффекты полиплоидии у растений связаны со свойствами цитоскелета и веретена деления клеток (аналоговая наследственность): числа хроматид в хромосомах, числа хромосомных наборов в ядрах клеток и др.

#### **Литература**

1. Биологический энциклопедический словарь. М.: Сов. энцикл., 1989. 864 с.
2. *Инге-Вечтомов С.Г., Борхсениус А.С., Задорская С.П.* Белковая наследственность: конформационные матрицы и эпигенетика // Информ. вестник ВОГиС, 2004. Т.8. №2. С.60–66.
3. *Лен Ж.М.* Супрамолекулярная химия: Концепции и перспективы. Новосибирск: Наука. Сиб. предприятие РАН.1998. 334 с.
4. *Малецкая Е.И., Юданова С.С.* Особенности цветения и микроспорогенеза у гаплоидных растений свеклы. 2008 (настоящий сборник). С. ? ??
5. *Малецкий С.И.* Иерархия единиц наследственности, изменчивость, наследование признаков и видообразование у растений // Эпигенетика растений. Новосибир. ИЦИГ СО РАН, 2005а. С. 7–53.
6. *Малецкий С.И.* Эволюционная биология. Словарь терминов. Новосибирск, ИЦИГ СО РАН, 2005б. 180 с.
7. *Оленов Ю. М.* Эпигеномная изменчивость // Онтогенез 1970. Т.1. №1. С. 10–16
8. Ригер Р., Михаэлис А. Генетический и цитогенетический словарь. М.: Колос, 1967. 607 с.
9. *Спенсер Г.* Наследственность // Основания биологии. С.-Петербург, 1870. Издание Н.П. Полякова. С. 173–187.
10. *Тер-Ованесян М.Д., Паушкин С.В., Кушниров Н.В.* Молекулярные механизмы белковой наследственности: прионы дрожжей // Молекулярная биология, 1998, т.32, №1, с. 32–42.
11. *D'Amato F.* Cytogenetics of plant cell and tissue culture and their regenerates // CRC Critical Reviews in Plant Sciences. 1985. V. 3. № 1. P. 73–112.

МИХЕЕВ А.Н.

**Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,**  
Украина, 03143, г. Киев, ул. акад. Заболотного, 148, ИКБГИ НАНУ, тел.: 257-82-44,

## О СООТНОШЕНИИ СЕЛЕКТОГЕНЕТИЧЕСКИХ И НОМОГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ФИЛОГЕНЕЗА

При исследовании биологических процессов исследователи стараются использовать максимально простые «модельные объекты». Примером успешности применения такого подхода является использование плодовой мушки в генетических исследованиях, кишечной палочки в радиобиологическом эксперименте и др. Очевидно, что «модельный объект» не обязательно должен иметь биологическую природу. Достаточно чтобы он соответствовал принципам и методам построения аналоговых моделей, особенностью которых является приемлемый уровень изоморфности с моделируемым объектом, что, в свою очередь, обеспечивает эвристичность таких моделей. Технологические процессы также могут быть аналогом процессов биологических и, в частности, эволюционных. Поскольку феноменологическим проявлением эволюции биологических систем является преобразование их структурно-функциональных параметров, то представляется возможным использовать в качестве ее модели технологию штамповки, которая имеет много общих формальных признаков с процессом эволюционных преобразований. По нашему мнению это поможет приблизиться к решению одной из самых важных проблем теории эволюции – определению соотношения селектогенетических и номогенетических механизмов.

В рассматриваемой технологии всегда присутствует преобразуемая заготовка-объект (ЗО) и форма-штамп (ФШ), действующая на заготовку и имеющая определенные физические характеристики. Вероятно, что аналогом ФШ является комплекс эволюционных факторов, придающих биологическому объекту определенные структурно-функциональные характеристики, оптимизирующие его взаимодействия с окружающей средой. Таким образом, заготовка в этом случае является аналогом эволюционирующего объекта, а ФШ – субстратным (вещественным) носителем своеобразного «плана строительства» биологического объекта, фактически «цели», к которой он «свободно» стремится. Вместе они (заготовка-объект и форма-штамп-план-цель) образуют систему, способную, подобно любой другой системе «работать», т.е. эволюционировать. Каким же образом «работает» такая система? Вернемся снова к модели. На заготовку давит форма-штамп, который выступает одновременно как внешний (экзогенный) фактор «изменчивости» ЗО и фактор отбора, поскольку, во-первых, он (ФШ) изменяет исходные характеристики ЗО, а, во-вторых, ФШ может разрушить («убить») ЗО. Фактически, наблюдается «селектогенетический» эффект «деятельности» ФШ (как аналога комплекса эволюционных факторов). И не просто селектогенетический, а его экзогенный компонент, который дополняется эндогенным («собственным») компонентом, сформировавшимся на этапе предыстории ЗО. Разумеется, в этой ситуации следует также учитывать экзогенный («принадлежащий» ФШ) и эндогенный («принадлежащий» ЗО) «номогенетический» аспекты «деятельности» такой системы. Например, комплекс факторов («ФШ») может просто «загонять» биологический объект («ЗО») в экологическую нишу, или же сам может быть достаточно сложным, чтобы преобразовывать биологические объекты, как это бывает в случае участия в эволюционном процессе собственно биологических факторов. Предшествующие характеристики ФШ, параметры которого существенны для данной технологии, и которые, в конечном счете, приобретает («отражает» в себе) ЗО и есть тот внутренний компонент номогенетического, направляющего фактора преобразования системы «ФШ – ЗО» в «лице» ЗО под влиянием внешнего ФШ-фактора.

В любой системе, образующие ее элементы, можно разделить на «элементы-формы» и «элементы-заготовки», т.е. на элементы направляющие (осуществляющие номогенетический процесс) и элементы направляемые, различие между которыми, разумеется, не абсолютное. При этом форма заготовки, которую в конечном итоге она приобретает, не обязательно должна соответствовать форме пресса. Так, например, в случае литья под давлением заготовка (металл) приобретает форму абсолютно не связанную с формой устройства, обеспечивающего лишь давление на расплавленный металл в определенном направлении. Иначе говоря, факторы-системы и элементы объекта-системы обладают как селектогенетическими, так и номогенетическими свойствами. Предшествующую форму (в общем случае исходные условия, состояние элементов объекта, их свойства) можно рассматривать как своеобразный план, проект (квазиплан), который при определенных внешних и внутренних условиях может реализоваться (актуализироваться) в виде соответственно преобразованного элемента-«заготовки».

Следует различать две «эволюциогенные» причины-факторы: во-первых, внешнюю причину-фактор с различными в разных случаях соотношениями селектогенетических (хаотически возникающих позитивных и негативных) и номогенетических (направленных позитивных и негативных) потенциалов и, во-вторых, внутреннюю причину-фактор с таким же различным в разных случаях соотношением селектогенетических и номогенетических потенциалов (от практического хаоса через квазиплан до собственно плана). Первая (внешняя) причина способствует не только реализации внутренних потенциалов (возможностей) системы, на которую она действует, но и оказывает определенное эмерджентное (новообразующее) действие, меняя параметры формы объекта. Другими словами, ФШ «может» изменить параметры предшествующей формы в объекте (ЗО) или даже создать ее, т.е. оставить «отпечаток», который может выступать в роли новой формы. Вторая, внутренняя причина (при рассмотрении ее номогенетического, преформистского компонента) канализирует, направляет действие внешнего фактора-причины, обеспечивая его «подвод» к соответствующей части объекта. Внешний фактор (внешняя причина) при этом «находит» специфическую (критическую), соответствующую точку приложения в объекте и «придает» ему ту форму, на которую он (объект) потенциально способен. В этом можно было бы усмотреть некое подобие целесообразности поведения объекта (системы-объекта – СО), поскольку его преобразование как бы «предначертаны» (заданы, предопределены) собственными свойствами. Однако, поскольку без внешнего фактора (системы фактора - СФ) эта реализация невозможна, то следует говорить лишь о квазицелесообразности.

Чем менее организованы внешние факторы (например, ионизирующая радиация, химические мутагены и т.п.), тем в меньшей степени они способны оказывать формообразующее действие на СО. Для таких факторов остается главным образом лишь функция разрушения. В лучшем случае они выполняют роль «шлифовальщиков» предшествующих форм СО (например, мутагенез под действием физических и/или химических факторов) или некоего подобия спусковых крючков, освобождающих потоки вещества, энергии и информации в СО, «протекающих» по предсуществующим формам. Для биологических факторов следует отметить наличие у них более выраженной способности к «штамповочной» роли, т.е. к передаче определенной информации СО. В общем случае внешние факторы могут изменить количество элементов СО, их качество и отношения между ними, но при этом характер этих изменений будет зависеть и от самой СО, число возможных состояний которой (в рамках ее индивидуальности) не бесконечно (Урманцев, 1988). Что касается внутренних факторов, то они представляют собой, фактически, все характеристики СО, включая ее способность реализовывать закономерные и случайно возникшие программы изменений (роста, развития, перемещения в пространстве и т.д.). Давление внешних факторов изменяет программы и квази-программы СО, делая их более или менее адаптированными к действующему фактору, который в данном случае выступает и в роли фактора отбора. Направленность измене-

ний СО определяется предсуществующим набором программ (квазипрограмм, свойств, параметров) системы.

Рассмотрим конкретный пример, который часто приводится в литературе по теории эволюции – происхождение рыбки-брызгуна. Что здесь могло выступать в роли «пресса», давящего на «бедного» предка этого вида? Иначе говоря, какой фактор преобразовал первоначальную морфофункциональную организацию далекого предка метко плюющей рыбки? Допустим, это был биологический фактор в виде добычи-корма, плавающей на поверхности воды. Этот фактор «вынуждал» определенную часть популяции (наиболее «удачливую») к рефлекторной деятельности в виде хватательно-глотательного рефлекса. Со временем действие фактора постепенно ужесточалось, т.е. становилось все труднее добывать насекомых, большая часть которых находилась над водой. Если бы уровень фактора оставался постоянным, то срабатывала бы обычная рефлекторная схема. Постепенно фенотипически (поведенчески, и не обязательно генетически) приспособленные особи начинают доминировать. Происходит это на первых порах путем подражания, т.е. миметического процесса (Докинз, 1993). Таким способом формируется новый стереотип поведения, подкрепленный в определенной степени морфофункциональными «приобретениями» и не обязательно закрепленными генетически. Однако, рано или поздно эти «приобретения» закрепляются генетически, поскольку физиолого-биохимическая активность в соответствующих тканях, обусловленная репрессией/дерепрессией соответствующих генов, в определенной степени сказывается на генетической активности генеративных тканей. В свою очередь, активность локусов делает их более мутабельными, что обеспечивает определенную степень направленности мутагенного процесса и, в конечном счете, позволяет генетически «закрепить» «благоприобретенные» признаки и навыки (Чайковский, 1990). В чем здесь проявилась «направленность» эволюции? Внешний фактор не задавал содержание преобразований. Он лишь «позволял» (создавал условия) для имманентного (внутреннего) процесса преобразования системы, которая была поставлена в условия, вынуждающие ее меняться. Однако меняться не вообще, а лишь в том направлении, в котором она могла измениться в силу своих внутренних «обстоятельств» (свойств, параметров и т.п.). Система не «стремится» эволюционировать, не стремится реализовывать свои «задумки». К этому ее вынуждают внешние обстоятельства (или внутренние в виде «свободной» эволюции, являющейся результатом суперпозиции предшествующих влияний). Даже если эволюция системы выглядит как «внешне беспричинная», то следует при этом иметь ввиду наличие определенной инерционности в реагировании систем на внешнее воздействие. Так, даже когда действие внешнего фактора закончилось, система продолжает, например, двигаться («реагировать»), создавая впечатление «свободно двигающейся» (свободно эволюционирующей) системы.

В отношении онтогенеза можно сказать нечто аналогичное. Внешние факторы (свет, температура, вода и др.) загоняют биосубстраты (составляющие, элементы биосистемы) в формы, которые «лепит» геном, выступающий в роли главного «преформиста». Эпигенетический компонент развития появляется (или проявляется) за счет того, что в процессе «лепки» геномом форм последние способны объединяться («самособираться», интегрироваться), образуя новые формы, «непредусмотренные» напрямую (непосредственно) геномом. Эти новые формы способны повлиять на работу самого генома, изменяя спектр его активности, т.е. формируя новый эпигенотип.

Все вышесказанное позволяет сделать метавывод о том, что в процессе онтогенеза идет формирование программ от генотипа до программ фенотипа, а в процессе филогенеза фенотипические (социальные, поведенческие, когнитивные, физиолого-биохимические и т.д.) программы, в конечном счете, закрепляются генетически, т.е. движение программ (по сравнению с онтогенезом) идет в обратную сторону – от фенотипических к генотипическим.

### **Литература**

1. Докинз Р. Эгоистичный ген. – М.: Мир, 1993. – 318 с.
2. Урманцев Ю.А. Общая теория систем: состояние, приложения и перспективы // Система. Симметрия. Гармония; Под ред. В.С. Тюхтина, Ю.А. Урманцева. – М.: Мысль, 1988. – С. 38–130.
3. Чайковский Ю.В. Элементы эволюционной диатроники. – М.: Наука, 1990. – 272 с.

### Резюме

Рассмотрено соотношение селектогенетических и номогенетических механизмов эволюции. С использованием аналоговой модели эволюционного процесса показано существование преформистского и эпигенетического компонентов экзогенных и эндогенных факторов эволюции. Высказаны предположения о возможном механизме наследования «благоприобретенных признаков».

Розглянуто співвідношення селектогенетичних і номогенетичних механізмів еволюції. З використанням аналогової моделі еволюційного процесу показано існування преформістського та епігенетичного компонентів екзогенних і ендогенних факторів еволюції. Висловлені припущення про можливий механізм успадкування «набутих позитивних ознак».

The correlation of selectogenetic and nomogenetic mechanisms of evolution is considered. With the use of analog model of evolutionary process existence of preformistic and epigenetics components of exogenous and endogenous factors of evolution is shown. Suppositions about the possible inheritance mechanism of «acquiring signs» are outspoken.

### СИВОЛАПОВ А.И.

Воронежская государственная лесотехническая академия,  
Россия, 394613, Воронеж, ул. Тимирязева, 8, e-mail: [lescul@vglta.vrn.ru](mailto:lescul@vglta.vrn.ru)

## РОЛЬ ИНТРОГРЕССИВНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ И ПОЛИПЛОИДИИ В ЭВОЛЮЦИИ РОДА *POPULUS*

Представления об эволюционной роли интрогрессивных гибридов древесных пород разноречивы. Дискуссионным является вопрос о значении гибридов в видообразовании. У хвойных пород примером такой гибридизации может служить лиственница Чекановского – гибрид лиственницы сибирской и Гмелина [6], что подтвердил В.Л. Семериков в 2007 г.; ель финская – гибрид ели европейской и сибирской (отметил Л.Ф. Правдин в 1975 г. и др.). Аналогичные закономерности интрогрессивной гибридизации наблюдаются среди тополей [1,2,8, 9, 10, 11].

У более 10 % всех покрытосеменных установлены хромосомные числа. Эволюция кариотипов покрытосеменных растений шла в основном двумя путями: изменение числа хромосом, без изменения их морфологии, и изменение морфологии хромосом с изменением или без изменения их числа.

### Материалы и методы.

Тополь относится к древнейшему роду покрытосеменных растений, встречается с верхнего мела и широко распространен в третичных отложениях [5]. Предполагается, что тополь возник в высоких широтах и распространился к югу.

Род *Populus*, входящий в семейство *Salicaceae*, включает в северном полушарии 110 видов тополей (Соколов, 1951). В бывшем СССР В.Л. Комаров (1934) выделяет 30 аутохтонных видов, которые объединяет в три подрода: Туранга (*Turanga Vge.*), Лейка (*Leuce Duby*) и Настоящие тополя (*Eurpopulus Dode*). Подрод *Turanga* и *Leuce* В.Л. Комаров разделяет на ряды, а Настоящие тополя – на секции. Эта система принята также в сводке «Деревья и кустарники СССР» (т. II, 1951). Французский систе-



матик Гинье (Güinier, 1956) предложил несколько другую схему классификации рода *Populus*, разделив ее на 5 секций: *Turanga Bge.*, *Leuce Duby*, *Aigeiros (Aegiri) Duby*, *Tacamahaca Spach*, *Leucoides Spach*. По Н.В. Старовой (1971), Турангу следует считать не подродом или секцией, а особым родом в семействе ивовых. Секция *Leuce* объединяет две подсекции *Albidae*, *Trepididae*. Классификация Гинье получила признание дендрологов и лесоводов как в отечественной, так и иностранной литературе (Щепотьев и др., 1962; Бессчетнов, 1969; Редько, 1975; Сиволапов [8] и др.). Г. Шёнбах относит род *Populus* к объекту, на котором впервые была доказана возможность применения селекции к лесным породам (Ромедер, Шёнбах, 1962).

Еще в 1805 году Смит описал тополь сереющий как вид. В дальнейшем другие исследователи рассматривали его как естественный гибрид, так Э. Регель (1871) выделил *P. hybrida* в самостоятельный вид. Ф.Л. Щепотьев и Ф.А. Павленко (1962) считают, что тополь гибридный, произрастающий на песчаных почвах европейской части СССР – экологическая форма тополя сереющего.

Эти исследования показывают, что тополь сереющий с эволюционной точки зрения – наиболее молодой вид по сравнению с исходными родительскими формами и показывает высокую индивидуальную изменчивость.

Материалом исследований явились естественные и искусственные насаждения тополя в Воронежской области, коллекция индуцированных мутантов тополя, сортоиспытательный участок полиплоидных тополей в Семилукском питомнике.

Методами исследований явились дендрометрический, цитогенетический, анатомо-гистологический, изоферментный анализ и др. [7,8].

#### **Результаты и обсуждение.**

В коллекциях ВГЛТА и НИИ лесной генетики и селекции насчитывают более 100 различных видов, гибридов и сортов тополя.

При изучении тополя сереющего (*Populus canescens*) на территории Воронежской области не выявлены изоляционные барьеры при скрещивании тополя белого и осины. Отмечено что этот гибридогенный вид имеет все переходные формы от тополя белого до осины. Причем у гибридов с преобладанием признаков тополя белого, по видимому, в качестве материнской особи был тополь белый, в качестве опылителя – осина. Если у гибрида преобладают признаки осины, то в качестве материнской особи была осина. Эти исследования подтверждаются на искусственных гибридах – тополь белый × осина, где показаны промежуточные формы похожие на естественные гибриды, произрастающие в Хоперском заповеднике. Однако, искусственные гибриды: осина × тополь белый полностью оказались матроклинные, то есть уклонились в мать (осина).

J. Erdešič [9] считает, что название *Populus canescens* является собирательным для всех форм, переходных между *Populus tremula* и *Populus alba*. У тополя сереющего он выделяет следующие формы: *f.hugarica*, *f.gyonensis*, *f.macrophylla*, *f.glaberrima*, *f.obtusata*, *n.f.elysia*, *n.f.rotundifolia*, *f.fraxinoides*, *n.f.pendula*. J. Erdešič у тополя дрожащего равнинного произрастания упоминает формы: *n.f.parvifolia*, *f.inaequidens*, *f.subdentata*, *f.sinuata*, *f.lepida*, *n.f. rhomboides*, *f.Lángii*, *f.subcordifolia*, *f.purpurea*, *n.f.scabrosa*, *f.pendula*, *n.f.ramosa*, *n.f. edentula*.

Исследования в поймах Хопра и Дона, где совместно произрастают тополь белый и осина, подтверждают возникновение спонтанно-гибридогенного вида который имеет все промежуточные переходные формы от тополя белого до осины и носит название тополь сереющий.

Нами выделены: исполинская, крупнолистная, осиноподобная, узкокронная и полуплакучая формы. Первые четыре представляют ценность для промышленного лесоразведения, последняя – для озеленения [8].

Исполинская форма отличается быстротой роста, превышает почти в три раза продуктивность рядом растущей осины в том же возрасте (в 40 лет запас составляет около 1200 м<sup>3</sup>/га). Плотность древесины – 646 кг/м<sup>3</sup>, длина либриформа достигает 1,54

мм. Определение числа хромосом в соматических клетках меристемы листьев показало, что преобладают клетки с тройным набором хромосом. Однако наблюдается онтогенетическая изменчивость кариотипов растений с измененными числами хромосом [8]. Через 20 лет по той же методике повторно проведен подсчет числа хромосом в листьях побегов материнских деревьев и их вегетативного потомства. У тополя сереющего исполинской формы число триплоидных клеток в листьях сократилось до 8 %.

Крупнолистная форма отличается крупными листьями, до 13 см в поперечнике листовой пластинки, на длинных (до 10 см) черешках. Среди них обнаружена триплоидная форма (число триплоидных клеток 74 %), отобранная в Хоперском заповеднике. Отмечена высокая экологическая лабильность тополя, т.е. этот тополь показывает хороший рост в широкой амплитуде экологических условий: приспосабливается и произрастает в определенных условиях среды за счет изменения числа клеток с триплоидным набором хромосом.

В Семилукском питомнике НИИЛГиС заложен экспериментальный сортоиспытательный участок из полиплоидных и диплоидных тополей. На участке представлено 6 сортообразцов, из них 4 аллотриплоида [8]. Среди них лучшие результаты показал спонтанно-гибридогенный вид - тополь сереющий крупнолистной формы. В 2000 г. аллотриплоидная форма тополя сереющего зарегистрирована Госкомиссией РФ по испытанию и охране селекционных достижений как сорт – тополь сереющий Хоперский-1. На сортоиспытательном участке этот тополь в 18 лет достигает запаса 634 м<sup>3</sup>/га. Искусственный аллотриплоид Э.С.-38 (автор М.М. Вересин) в этом возрасте достигает запаса 361 м<sup>3</sup>/га. Контроль представлен тополем бальзамическим, который достигает запаса в этом возрасте 269 м<sup>3</sup>/га.

Деревья узкокронной формы обнаружены в Богучарском лесхозе и отличаются прямизной ствола, тонкими сучьями отходящими под острым углом.

Полуплакучая форма характеризуется раскидистой кроной с повислыми ветвями.

Для того чтобы интрогрессивная гибридизация у Тополя между симпатрическими видами стала возможной, нужны три совместно действующих фактора: а) перекрытие ареалов, б) одновременность цветения, в) нарушение репродуктивной изоляции между видами.

Структура кариотипа а, следовательно, и его эволюция имеет большое значение для эволюции вида и эволюционного процесса в целом. В роде *Populus* естественно возникают триплоиды, тетраплоиды, анеуплоиды, гаплоиды [8]. Кроме того, получены индуцированные мутанты [3], полиплоиды (Машкина, 2000).

В центральной лесостепи России выявлены редкие генотипы, которые относят к числу геномных мутаций: это полиплоиды и миксоплоиды, которые характеризуются специфическими особенностями кариотипа и могут найти применение в лесном семеноводстве и лесной селекции.

Женский клон гигантской триплоидной осины отмечен С.П. Иванниковым в 1956 г. в Обоянском лесхозе Курской области. Позднее исполинская обоянская осина вошла во все учебники по селекции древесных растений как триплоидная. Однако анализ литературы оригинатора показал, что непосредственно кариологический анализ обоянской осины проведен не был. Известно, что полиплоиды с нечетным числом хромосом не могут давать качественное семенное потомство. Поведенные, спустя 40 лет, исследования показали, что обоянская исполинская осина (женский клон) диплоидная: в соматических клетках меристемы листьев число хромосом  $2n=38$ . Состояние 90-летнего осинника хорошее [8].

На питомнике Обоянского лесничества С.П. Иванниковым заложены культуры осины (мужской клон), их возраст 50 лет, бонитет Ia; надо полагать, что это клон

шарьинской исполинской осины. В соматических клетках меристемы листьев обнаружено 3,1% триплоидных клеток, 8,7% - анеуплоидные разного уровня, но превышающие двойной набор, остальные диплоидные.

Тополь Э.С.-38 «Воронежский гигант» получен М.М.Вересиным в 1952 г. от скрещивания тополя канадского смесью пыльцы тополя бальзамического, осины и тополя белого. Этот аллотриплоид (триплоидных клеток 78,4%) отличается быстрым ростом (в пойме Волги в первый год дает прирост 4-5 м за вегетационный период), пол мужской, хорошо черенкуется; нашел применение в промышленных посадках плантационных культур, озеленении и защитном лесоразведении.

Е.М. Гуляевой и др. в 1976 г. путем химического мутагенеза индуцирована автотетраплоидная форма тополя бальзамического из миксоплоидного растения путем расхимеривания. Тетраплоид отличается низкорослостью, утолщенными побегами, низкой жизнеспособностью.

О.С. Машкиной в 1985 г. синтезированы мейотические полиплоиды тополя белого путем искусственного получения диплоидной пыльцы с последующим использованием ее в гибридизации с диплоидными растениями.

### **Выводы**

Таким образом, интрогрессивная и индуцированная гибридизация и полиплоидизация тополя являются основными факторами эволюционных изменений, протекающих в лесных популяциях и искусственных посадках средней полосы России.

В естественных лесах поймы Хопра и Дона, где совместно произрастают микропопуляции тополя белого и осины противоположного пола не имеющие изоляционных барьеров для панмиксии, происходит интрогрессивная гибридизация и возникает гибридогенный вид – тополь сереющий, среди них возникают полиплоидные формы. Все это приводит к возникновению новых форм и видообразованию.

### **Литература**

1. *Бакулин В.Т.* Особенности цветения и плодоношения тетраплоидных форм тополя // Проблемы репродуктивной биологии растений: Тез. докл. симпозиума (Пермь, 4-6 июня 1996 г).- Пермь: Перм.ун-т, 1996. - С.49 - 50.
2. *Буторина А.К.* Факторы эволюции кариотипов древесных // Успехи современной биологии. М.: АН СССР, 1989 - Т.108, вып. 3 (6). – С. 342 - 357.
3. *Гуляева Е.М.* Изменчивость тополей индуцированная химическими мутагенами / Е.М. Гуляева, О.С. Машкина, А.И. Сиволапов // Генетика. – 1984. - № 4. - С. 628 - 638.
4. *Комаров В..Л.* Тополя СССР // Ботанический журнал СССР. – 1934. - № 5
5. *Криштофович А.Н.* Палеоботаника. – 2-е изд. – Л.-М.-Грозный-Новосибирск, 1934. – 495 с.
6. *Круклис М.В.* Кариологические особенности лиственницы Чекановского (*Larix czekanowskii* Sz.) // Изменчивость древесных растений Сибири. - Красноярск: Ин-т леса и древесины им. В.Н. Сукачева СО АН СССР, 1974. – С. 11 – 19.
7. *Сиволапов А.И.* Применение молекулярных маркеров в изучении происхождения тополя сереющего / А.И. Сиволапов, В.Л. Семериков // Селекция, генетические ресурсы и сохранение генофонда лесных древесных растений (Вавиловские чтения): Сб. научн. тр. Вып. 59. – Гомель: ИЛ НАН Беларуси, 2003. – С. 243 – 246.
8. *Сиволапов А.И.* Тополь сереющий: генетика, селекция, размножение. – Воронеж: ВГУ. – 2005. – 157 с.
9. *Erdesi Josip.* Nizinska jasika vojvodine I siva topola – *Populus tremula* L. et *Populus canescens* L. en plaine de la vojvodina // Topola broj. – Beograd, 1965. - № 52-53. – S. 8 – 28.
10. *Sivolapov A.I.* Theoretical basis of woody plants mixoploidy and its importance in

breeding // Genetics and breeding in forest service: Papers' Theses of International Scientific Practical Conference (June 28-29, 1996, Voronezh). - Voronezh, 1996. – S. 111.

11. *Sivolapov A.I.* Different levels of mixoploidy in hybrid poplars / A.I. Sivolapov, T.A. Blagodarova // Cytogenetic studies of forest trees and shrub species. IUFRO Cytogenetics symposium, 8-11. 09. 1993. – Croatian Forests, Inc., Zagreb, - 1997. – P. 311-316.

12. *Sivolapov A.I.* Changeability of Mixoploidy Level in Tree Species as Stability Regulation Mechanism for Extreme Environment Conditions // Assessment methods of Forest ecosystem status and sustainability. Workshop (August 8 – 13, 1999, Krasnoyarsk, Russia). Abstracts. - Krasnoyarsk: V.N. Sukachev Institute of Forest SB RAS, 1999. – S. 152 – 153.

### **Резюме**

Интрогрессивная гибридизация и полиплоидизация тополя являются основными факторами эволюционных процессов в роде Тополь. Спонтанная гибридизация тополя белого и осины в поймах рек Хопер и Дон приводит к появлению нового гибридогенного вида – тополя сереющего, отличающегося большим разнообразием форм.

Introgressive hybridization of poplars that are subgenus of *Leuce DUBY* and its significance in breeding. In this work there is a research of hybridized processes of *populus alba* and aspen in the flood plain of the rivers Hoper and Don. Among the hybridogene species of *populus canescens* Sm. valuable forms for breeding are marked.

### **СУХАРЛЕВ В.А.**

*Харьковская государственная зооветеринарная академия,  
Украина, 62341, Харьковская область, Дергачевский район, пос. Малая Даниловка,  
ХГЗВА, e-mail: zoovet@zoovet.kharkov.ua*

### **ДИВЕРГЕНЦИЯ – ВАЖНЫЙ ФАКТОР ЭВОЛЮЦИИ ОВЕЦ И ПОРОДООБРАЗОВАНИЯ В ОВЦЕВОДСТВЕ**

Чарльз Дарвин, в работе „Происхождение видов путем естественного отбора”, изучал не только особенности диких видов растений и животных, но и домашних, а также их пород. Так он писал: „Всякий, конечно, согласится, что выведение пород, настолько резко различающихся, как, не могло быть результатом накопления сходных изменений в длинном ряде последовательных накоплений. В применении к человеческой деятельности, мы видим проявление того, что можно назвать принципом дивергенции, вызывающим неизменный рост различий, вначале едва заметных, вследствие чего породы расходятся в своих признаках как между собой, так и со своим общим предком. Здесь обнаружит свое важное значение принцип полезности, выведенный из расхождения признаков; в силу этого принципа изменения наиболее расходящиеся сохраняются и будут накапливаться естественным отбором [1].

Эволюция живого мира носит дивергентный характер, когда один таксон может разветвляться на два или несколько дочерних таксонов. То есть часть особей изменяются в одинаковом направлении и их потомки таким образом образуют новый таксон [2].

В результате эволюционного видообразования постоянно происходило разделение групп животных на новые виды. Так, подсемейство овце-козы разделилось на 5-ть родов (козы, тары, нахуры, овцы, гривистые бараны).

Род овцы (за В.И. Цалкиным, 1951) образовали два вида: толстороги и горные бараны. В свою очередь виды овец имеют подвиды (расы). То есть, все эти массивы овец, согласно их систематике, сведены у схожие и в тоже время отличающиеся группы за конституциональными особенностями [3].

Домашние овцы, как вид, в зависимости от конкретных особенностей, делятся на породы. Порода, за определением Н.С. Марзанова и других (2007), - это отдельный подвид домашних животных. При этом около половины генетических различий внутри каждого вида домашних животных обусловлены на уровне породы [4].

Но и породы имеют свою структуру: породные типы, линии и семейства, стада. Кроме этого в породах и типах имеются конституционально-продуктивные типы животных.

Наведенные внутривидовые и породные подразделения являются результатом микроэволюции, то есть эволюционных изменений, которые идут внутри вида и приводят к его дифференцировке. На этом уровне происходит совершенствование приспособительных механизмов адаптация организмов к условиям внешней среды. При этом микро- и макроэволюцию необходимо рассматривать как две стороны единого эволюционного процесса [5].

Таким образом, породообразование, как отмечают Н.С. Марзанов и другие (2007), - это один из процессов внутривидовой дивергенции, то есть микроэволюции, и принцип эффективного хозяйственного использования сельскохозяйственных животных.

Эволюция организмов – это процесс постепенного изменения материальных тел и процессов, которая обеспечивается тремя фундаментальными законами биологии: изменчивостью, наследственностью, естественным отбором. При создании пород животных и их структурных составных важным является проводимый человеком искусственный отбор, а также взаимосвязь такого фактора, как генотип-среда [6].

Результатом реакции животных на особенности изменившейся внешней среды, при перемещении животных определенной породы в другую местность (погодные условия, кормление и содержание), а также изменение методов селекционной работы, является возникновение в стаде (типе, породе) животных разных конституционально-продуктивных типов.

Такие конституционально-продуктивные типы животных имеются в различных породах овец разного направления продуктивности.

Так Л.К. Гребень писал: „Особенно ценными являются указания академика М.Ф. Иванова о направлениях в овцеводстве, о влиянии окружающей среды на организм животных и на необходимость иметь в породе (стаде) животных разных типов конституции; относительно асканийской тонкорунной породы, то необходимо иметь овец не только желательного типа (малоскладчатого и безскладчатого типа), но и животных нежелательного (сильноскладчатого) типа, так как это будет содействовать повышению продуктивности в стаде-породе [7].

Из приведенного материала видно, что в целом породы овец не совсем консолидированные. Так Д.Г. Степанов указывал, что на Украине в породе прекос имеются овцы шерстно-мясного и мясо-шерстного направлений продуктивности (конституционально-продуктивных типов) [8].

Каракульская порода овец имеет четыре конституциональных (они же и продуктивные) типа: крепкий (по узбекски - гумазой), нежный (нозих), переразвитый (крик), грубый (ак-гуль). Морфологические особенности овец этой породы, в зависимости от конституциональных типов, изучали такие видные ученые как С. Боголюбский, И. Соколов, Е. Андреева и другие [9].

В романовской породе овец имеется три конституциональных типа: крепкий – наиболее гармоничный за плодовитостью и продуктивностью, грубый – самый круп-

ный со средней плодовитостью и нежный – животные недоразвитые со слабыми здоровьем и продуктивностью) [10].

Карачаевская грубошерстная порода овец состоит из трех основных внутривидовых конституциональных типов: тумак – мелкие животные с низкими убойными качествами, кара-мююз – средние за живой массой и мясной продуктивностью, кекбаш – крупные, скороспелые и с хорошей мясной продуктивностью; овцы этих разных типов имеют отличия в шерстной продуктивности и качестве шерсти [11].

Такие же данные имеются в литературе и относительно других пород овец.

#### **Материалы и методы.**

В ходе исследований, согласно методик ВИЖА, ВНИИОКа, УНИИЖ „Аскания-Нова” и др., изучались экстерьерные и продуктивные особенности, качество продукции разных конституционально-продуктивных типов овец породы прекос (тонкорунной мясо-шерстной). При этом использовались такие методы исследований, как взятие промеров и вычисление индексов телосложения, изучение шерстной продуктивности и физико-механических свойств шерсти, выявление интенсивности роста овец и убойных качеств молодняка, а также воспроизводительных особенностей овцематок. Материалы обработаны методом вариационной статистики.

#### **Результаты и обсуждения.**

Изучение особенностей конституции и характера продуктивности овец породы прекос в Сумской области позволило выявить два конституционально-продуктивных типа (мясо-шерстный „С-” и шерстно-мясной „С+”). При этом первый тип имел слабую складчатость или же бескладчатость (2-0 баллов), а второй был складчатым (3-5 баллов). Поэтому тонина шерсти первого типа была - 58-60 качества, а второго типа – 60-64. Это и определило продуктивность баранов разных конституционально-продуктивных типов. Так, первый тип овец имел живую массу выше второго - на 5,0-9,1%, а настриг невымытой шерсти был меньше - на 20,0-10,0%. Живая масса первого типа была выше, чем у второго, - на 9,0-8,3%. За настригом невымытой шерсти разница в пользу второго типа составила - 16,0-18,2%. Выход чистой шерсти был выше у первого типа овец - на 2,0-5,0%. Шерстный коэффициент мясо-шерстного типа составил - 45-47 у баранов и 41-45 у овцематок; шерстно-мясного соответственно – 50 и 45-48.

Убойный выход баранчиков мясо-шерстного типа достигает 52-54%, а шерстно-мясного – 50-51.

На наш взгляд, разнородность овец породы прекос (неулучшенного австралийскими мериносомами) - это результат того, что они были созданы при использовании грубошерстных маток и баранов-производителей породы прекос разных конституционально-продуктивных типов, в том числе и немецкого происхождения. О последних М.Ф. Иванов писал: „В Германии порода прекос была на момент утверждения представлена тремя производственными типами – 1) merino-wollfleisch (мелкие, шерстные с густой шерстью толщиной 64-70 качества); 2) merino-fleischukoll (мясо-шерстные, средние с толщиной шерсти 60-64 качества; 3) мясные (крупные, имеют хорошо выраженные мясные формы, с шерстью 58-56 качества) [12].

Большое влияние на образование в мясо-шерстной породе прекос шерстно-мясного конституционального типа оказала и слабая кормовая база колхозного производства Сумской области за период разведения в 20-м веке.

Как отмечают В.В. Абонеев и другие (2005), устойчивость наследственности при большой внутривидовой изменчивости, то есть необходимая константность породы, поддерживается системой взаимоотношений животных между собой, а также условиями внешней среды. Создается и поддерживается она человеком путем целенаправленного отбора и подбора в определенных условиях среды. При этом различные наследственные типы в пределах породы должны быть приведены в определенную систему. Благодаря этому порода имеет структуру и может, несмотря на некоторую наследственную неоднородность, оставаться относительно постоянной.

В тоже время неоднородность породы и необходимость ее поддерживать отмечается в работах Ч. Дарвина, Натузиуса, Е.А. Богданова, П.Н. Кулешова и других. По их мнению, в мире нет ни одной породы, которая была бы однородна. В каждой породе необходимо сохранять некоторую степень разнородности, необходимой для ее пластичности и перестройки, для поддержания ее здоровья и выносливости. Научные исследования, а также практика современного животноводства убеждают в том, что высокопродуктивные заводские породы не однороднее примитивных, а скорее, наоборот, им присуща повышенная изменчивость, благодаря чему они должны быть генетически разнороднее [13].

#### **Выводы**

1. Явление дивергенции – важный фактор пороодообразования и совершенствования структуры пород овец.

2. Порода прекос в условиях лесостепи Сумской области не является однородной. Она представлена двумя конституционально-продуктивными типами – мясошерстным и шерстно-мясным, которые имеют отличия в направлении продуктивности, количестве и качества продукции.

3. С учетом возросшего спроса на баранину, а также подорожания шерсти низких сортиментов (70 качества и тоньше) необходимо в хозяйствах проводить дифференцированное разведение конституционально-продуктивных типов овец в зависимости от конъюнктуры местного рынка.

#### **Литература**

1. *Дарвин Ч.* Происхождение видов путем естественного отбора. / Коммент. А.В. Яблокова, Б.М. Медникова. – М.: Просвещение, 1986. – С. 81-84.
2. *Бурень В.М.* Возникновение организмов и происхождение видов. - Санкт-Петербург: Профи-Информ, 2005. – С. 86.
3. *Боголюбский С.Н.* Происхождение и преобразование домашних животных. - М.: Госизд. "Сов. наука", 1959. – С. 242-251.
4. *Марзанов Н.С., Апишева Ф.К., Марзанова Л.К., Саморуков Ю.В., Кертиев Р.М.* Современная характеристика понятия „порода” // Сельскохозяйственная биология, 2007. - №6. – С. 16-23.
5. *Рубан Ю.Д.* Эволюция крупного рогатого скота в современной и будущей селекции. – К.: Аграрна наука, 2000. – С. 32.
6. *Жегунов Г.Ф.* Законы биологии (Природа жизни). – Харьков: Консум, 2006. – С. 191-193.
7. *Гребень Л.К.* Жизнь и деятельность академика М.Ф. Иванова // Овцеводство: Республиканский межведомственный тематический научный сборник. – В. 1. – К.: Урожай, 1966. – С. 6-13.
8. *Вівчарство* / За ред. Д.Г. Степанова. – К.: Урожай, 1980. – С. 16-20.
9. *Юдин В.М.* Смешанные породы овец. Овцеводство. / Под ред. П.А. Есаулова, Г.Р. Литовченко. – М.: Сельхозлит, 1963. – С.273.
10. *Арсеньев Д.Д., Арсеньева Т.В.* Селекция романовских овец. – М.: Россельхозиздат, 1985. – С. 16-17.
11. *Гаджиев З.К., Гочияев Х.Н., Селькин И.И.* Мясная продуктивность молодняка карачаевских овец разных генотипов // Матер. междунар. науч.- практ. конф.: Состояние, перспективы, стратегия развития и научного обеспечения овцеводства и козоводства Российской Федерации. - Ч. 1. - Ставрополь – СКНИИЖиК, 2007. – С. 38.
12. *Иванов М.Ф.* Новое направление в овцеводстве особенно выгодно // Собрание соч. - Т. 1 – М.: Колос, 1964. – С. 68-72.
13. *В.В. Абонеев, И.И. Селькин, Б.С. Кулаков.* О породной структуре тонкорунного и полутонкорунного овцеводства // Матер. междунар. науч.-практ. конф.: Проблемы и перспективы овцеводства и козоводства, Ч. 1. – Ставрополь - НИИЖК, 2005. – С. 16-20.

## Резюме

Наведены материалы о значении дивергенции для эволюции овец, образовании в породе прекос конституционально-продуктивных типов и их продуктивных особенностях. Предлагается дифференцированный способ разведения овец согласно конституционально-продуктивных типов.

Наведені матеріали про значення дивергенції для еволюції овець, утворення у породі прекос конституційно-продуктивних типів і їх продуктивних особливостей. Пропонується диференційний спосіб розведення овець згідно їх конституційно-продуктивних типів.

The data on importance of divergence for sheep evolution, the formation and productive types of sheep in precos breed their productive peculiarities have been given in the article. The differential method of sheer breeding the constitution and productive types.

**ТРУТ Л.Н.**

*Институт цитологии и генетики СО РАН Россия.*

*Россия, 630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10, e-mail: [trut@bionet.nsc.ru](mailto:trut@bionet.nsc.ru)*

## ДОМСТИЦИРУЕМЫЕ ЛИСИЦЫ КАК ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭВОЛЮЦИОННАЯ МОДЕЛЬ

Настоящее сообщение посвящено проблеме эволюции домашних животных. В нем на примере первого одомашненного вида каковым является домашняя собака (*Canis familiaris*) описываются в эволюционных терминах специфические особенности исторического процесса домостикации. Стержнем сообщения является изложение результатов многолетнего селекционного эксперимента по воспроизведению на серебристо-черной лисице (*Vulpes vulpes*) ранних этапов процесса; характеризуются изменения особенностей поведения, некоторых физиологических параметров и морфологических черт, возникшие у лисиц в ходе отбора на приручаемость и сходные с имеющимися у домашних собак. На основе данных эксперимента а также имеющихся в настоящее время литературных данных обсуждаются онтогенетические, генетические и молекулярные корреляты этих изменений.

В ходе обсуждения особенностей эволюционного существа домостикации животных, обсуждаются такие широкие теоретические рамки понимания фундаментального эволюционного вопроса – вопроса о взаимоотношении основных факторов эволюции – отбора и изменчивости. Совокупность данных, полученных в эксперименте по домостикации лисиц, а также литературных данных заставляет рассматривать сходный характер преобразования поведения и морфофизиологической трансформации у лисиц и собак, а также сходные изменения во временных параметрах развития как результат действия одного и того же вектора отбора на приручаемость. Иными словами, этот эксперимент показал, что многие особенности эволюционного пути собак, который они прошли в ходе их тысячелетней истории, можно воспроизвести за десятилетия сильнейшего пресса отбора, векторизованного на специфические свойства поведения, способствующие их домостикации.

Отбору по поведению и нейроспецифическим регуляторным генам, затрагиваемым этим отбором, отводится ключевая роль в эволюционных преобразованиях животных не только при домостикации, но также при других экстремальных средовых изменениях. В условиях таких изменений проходила вся эволюция человека. Проводятся параллели между специфическими эволюционными чертами домостикации и особенно-



стями антропогенеза. Предполагается, что отбор, векторизованный на поведение, играл также преобладающую роль в процессе эволюции человека.

Эксперимент с лисицами продемонстрировал большие эволюционные потенциалы отбора по поведению, на который происходит быстрый и интегрированный ответ популяции. Созданные таким отбором популяции ручных и агрессивных лисиц отличаются не только по поведению, но и по комплексу морфологических и физиологических признаков. Поэтому они служат уникальным ресурсным материалом для начатых нами совместно с американскими коллегами молекулярно-генетических исследований поведения и процессов, связанных с отбором. Основная перспективная цель этих исследований состоит в том, чтобы попытаться найти, какие главные гены и какие изменения в этих генах ответственны за эволюционную трансформацию домашних животных.

Доместицируемые лисицы могут быть использованы также как хорошая вновь созданная модель для изучения эволюции некоторых аспектов когнитивных способностей и вокального поведения. Более того, созданные отбором лисицы могут иметь отношение к здоровью человека и служить моделью для изучения некоторых аспектов такой социально значимой патологии поведения, как аутизм, в качестве главного компонента которого рассматривается отсутствие способности к социальным контактам.

### **ХОХЛОВ А.М., БАРАНОВСКИЙ Д.И.**

*Харьковская государственная зооветеринарная академия,  
62341, Украина, Харьковская обл. Дергачевский район, п/о Малая Даниловка, ул.  
Академическая 1., E-mail: [zoovet@zoovet.kharkov.ua](mailto:zoovet@zoovet.kharkov.ua)*

## **ОНТОГЕНЕЗ И МИКРОЭВОЛЮЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ У СВИНЕЙ**

Проблема изучения биологического разнообразия животного мира охватывает широкий спектр теоретических и практических вопросов, которые, учитывая их глобальный характер, преимущественно затрагивают видовой уровень. В этом плане изучение микроэволюционных процессов, происходящих при доместикации свиньи представляют научный и практический интерес.

Эволюционные изменения всегда начинаются с изменений генетических, которые, изменяя ход развития, реализуются в фенотипе. Затем, уже на уровне фенотипов вступает в действие отбор. Путь от гена к признаку – основная проблема биологии развития. Хотя уже давно понимали, что эволюционные изменения – это изменения онтогенеза [1-5].

В практике селекции и разведения животных учет признаков эмбрионального развития, можно рассматривать как один из критериев искусственного отбора животных по их природным наследственно обусловленным признакам, что, в общем, отображает главную роль эмбриогенеза в формировании продуктивных качеств животных.

### **Материалы и методы**

Морфогенетический период есть наиболее важным периодом онтогенеза, периодом наивысшей активности генов, которые обеспечивают фундаментальную закладку и развитие основных функциональных систем организма. Учитывая влияние генетических и экзогенных факторов в процессе микроэволюции на темпы возрастного роста и развития мы избрали для изучения доместикационных изменений животных крупной белой породы и дикого европейского кабана (*Sus scrofa ferus*).

Изучение поставленных вопросов проведено на 804 эмбрионах и плодах крупной белой породы и 152 эмбрионах разного возраста *Sus scrofa ferus*.

### **Результаты и обсуждения**

Рэфф Р., Кофман Т.[4] утверждают, что эволюцию нельзя понять, не поняв процесса развития, приводящие к становлению формы в онтогенезе. По утверждению этих авто-

ров ранние стадии развития более консервативны, так как их изменения ведут к слишком серьезным последствиям, которые редко выдерживают испытания естественным отбором. У свиней ранним этапом эмбриогенеза после процесса оплодотворения можно считать период ранней морулы. Установлено, что если количество клеток эмбриона (бластомеров) не превышает 16, то они еще не дифференцированы. Это позволяет использовать эти клетки для клонирования животных и получать генетически идентичных потомков. Имплантация эмбриона свиньи происходит на 11-13 день после оплодотворения. После имплантации резко улучшаются условия питания зародыша, что позволяет ему интенсивно расти. Можно считать, что с этого момента начинается активная реализация генотипа в фенотип через развертывание генетических программ заложенных в генотипе особи.

Основными признаками, которые характеризуют особенности морфогенетического периода онтогенеза, считают показатели живой массы, роста и развития телосложения, мышц и внутренних органов.

Исследования показали, что интенсивность нарастания живой массы у дикого европейского кабана и домашней свиньи в морфогенетическом периоде неодинакова, особенно к 20-ти дневному возрасту. В этот период эмбрионы дикой свиньи имели среднюю живую массу 0,160 г, в то время как эмбрионы крупной белой породы – 0,070 г или в 2,3 раза меньше. Однако к концу зародышевого периода прирост живой массы у кабана составил за 5 дней 540 мг, а у эмбрионов домашней свиньи – 786 мг или на 246 мг больше. Более наглядно можно определить напряженность роста через вычисление коэффициентов относительного прироста. Как установлено, с 20-ти дневного возраста и до конца зародышевого периода напряженность прироста живой массы эмбрионов кабана составила 129,6%, а у крупной белой породы 169,8% или на 40,2% выше. Кратность увеличения живой массы за этот период у зародышей европейского дикого кабана составила 4,68 раза, а у домашней свиньи – 12,23 раза. Следовательно, процесс domestikации затронул зародышевую стадию эмбрионального периода, когда наблюдается более высокая напряженность метаболических процессов у домашней свиньи. Подобная закономерность сохраняется и для длины тела зародышей. Так, к концу зародышевого периода средняя длина тела кабана 0,800 см, а крупной белой породы – 3,1 см или в 3,9 раза выше.

Для дикого кабана и крупной белой породы свиней продолжительность предплодного подпериода считается с 26 по 43 день внутриутробного развития. В этот период завершилось оформление всех органов.

Для сравнительного изучения роста и развития кабана и эмбрионов крупной белой породы были использованы, как показатели живой массы, так и промеров туловища. Исследования показали, что в 35-ти дневном возрасте средняя живая масса эмбрионов крупной белой породы – 5,26 г, а дикой европейской свиньи – 3,60 г или 1,66 г меньше ( $P < 0,001$ ). Несколько иная закономерность проявляется по длине тела, когда эмбрионы крупной белой породы имели суммарную длину туловища и головы – 5,66 см, а у диких – 5,98 см или разница незначительная. Следовательно по длине головы эмбрионы крупной белой породы уступали эмбрионам кабана на 0,84 см.

К 40-дневному возрасту эмбрионы крупной белой породы достигли живой массы 12,02 г, а дикой свиньи – 10,0 г. Подобная закономерность проявляется по длине туловища, когда эмбрионы домашних свиней имели превосходство над эмбрионами дикого европейского кабана на 0,4 см. По соотношению длины головы к длине туловища колебания были у домашних эмбрионов 0,46 до 0,43, а у диких эмбрионов от 0,54 до 0,44.

Плодная фаза – 43-120 дней. В этот период у дикого европейского кабана начинается интенсивный процесс формирования телосложения плода. Установлено, что 60-70 суточные плоды к концу периода по сравнению с 60-дневными увеличивались в массе в 3,5 раза, а в длине в 1,5 раза. К 80-суточному развитию плоды кабана в резуль-

тате значительного увеличения в массе и линейных размерах изменили телосложение, которое по форме напоминает новорожденных поросят.

К 90-суточному возрасту плоды кабана достигли 78% массы тела новорожденных поросят и существенно увеличены в линейных размерах. С 65-ти до 90-дневного возраста напряженность роста и развития у плодов дикого европейского кабана значительно выше, чем у домашней свиньи. Эта закономерность онтогенеза у дикого европейского кабана проявляется и по другим изучаемым признакам.

Однако с 90-дневного возраста наблюдается обратная закономерность – плоды крупной белой породы имели более высокую напряженность прироста живой массы и линейных промеров. Следовательно, процесс доместикации затронул зародышевую и познеплодную фазу роста и развития животных, когда формообразовательные процессы были более напряженными у одомашненных свиней крупной белой породы, которая может служить моделью доместикации и породообразовательного процесса.

За промежуток времени перед опоросом в организме самки плоды от 40-дневного возраста до новорожденности увеличивают живую массу у кабана в 77 раз, а у домашней свиньи в 107,7 раза, а за короткий срок перед опоросом с 80-дневного возраста и до новорожденности нарастает живая масса у кабана в 2,46 раза и домашней свиньи в 2,90 раза.

Изучение фазы новорожденности показало, что поросята дикого европейского кабана рождаются сравнительно зрелыми, как морфологически, так и физиологически, хотя момент новорожденности является важным этапом онтогенеза и в дальнейшем становлении отдельных функций организма. Масса тела – 950 г с колебаниями от 750 до 1050 г. Средняя длина туловища 25 см (22-27 см) и средняя высота в холке – 19 см (16,5-20 см).

Изучение возрастных изменений по живой массе может иметь научные и селекционные значения, если мы углубим исследование морфообразовательных процессов на уровне изменений в мышечной ткани в онтогенезе свиней

В связи с этим мы поставили задачу изучить возрастные изменения роста и развития отдельных групп мышц у плодов крупной белой породы и дикого европейского кабана в 50-ти и 70-ти дневном возрасте.

Исследования показали, что скорость роста отдельных мускулов у плодов домашних и диких животных различных групп мышц неодинакова. Рассмотрим возрастное развитие мускулов соединяющих грудную конечность с туловищем: широчайший мускул спины, трапецевидный и грудные мускулы (поверхностный и глубокий). Сопоставляя рост трапецевидного мускула необходимо отметить, что к 70-ти дневному возрасту у плодов диких свиней кратность увеличения этого мускула была 2,49, против 1,41 у крупной белой породы. Однако по развитию большого поясничного мускула наблюдается обратная зависимость. У плодов диких свиней коэффициент роста этого мускула 1,47, против 2,5 – у свиней крупной белой породы.

Особый интерес представляет развитие грудных мускулов (наружного, среднего и внутреннего), они намного превосходят в развитии у диких свиней ( $K_1=2,35$ ), против домашних свиней ( $K_1=1,69$ ). Объясняется это приспособлением диких форм в процессе эволюции, к жизни в дикой природе среди хищников и необходимости спастись бегством – имея хорошо развитыми мышцы, соединяющие передние конечности с туловищем (т.е. грудные).

Из мускулатуры позвоночного столба особое внимание представляет длиннейший мускул спины, который в этой группе занимает наибольший удельный вес, выполняющая основную роль в движении туловища. Анализ данных коэффициентов роста этого мускула указывает, что у домашних свиней коэффициент напряженности роста – 125,4, а у диких – 78,4%. Это вызвано длительной селекцией одомашненных свиней на повышение их мясности, т.е. более пышного развития всей мускулатуры в т.ч. длиннейшей мышцы спины.

Мускулатура задней конечности представляет в основном задний окорок, и занимает одно из основных мест при формировании мясных качеств у домашних свиней и отборе их по развитию этой группы мышц. Остановимся на изучении скорости роста у диких и домашних плодов следующих мускулов: двуглавый мускул бедра, ягодичные и четырехглавый мускул бедра. Исходя из анализа коэффициентов роста мускулов тазовой конечности видно, что у плодов крупной белой породы показатели скорости роста превышают темп роста соответствующих мускулов у диких свиней. Так, коэффициент роста четырехглавого мускула бедра у диких – 123,3%, а у домашних – 241,7%. Подобная закономерность сохраняется для двуглавого мускула бедра соответственно: 124,6 и 171,9%. Наши исследования подтверждают то, что человек создавая породы свиней путем многовековой селекции повышал их мясность, значительно изменил абсолютные размеры основных групп мышц, особенно мускулатуры тазовой конечности в сравнении с дикими формами. Следовательно, адаптация в развитии мышечной ткани выражается в том, что у диких форм в результате естественного отбора, а у домашних свиней в результате искусственного отбора, на каждом этапе онтогенеза более интенсивно развиваются те группы мышц или частей тела, которые обеспечивают сохранение жизни особи. Эти свойства возникли в процессе микроэволюции вида и закрепились наследственно.

В процессе эволюции свиньи как представители всеядных приобрели кишечно-желудочный тип пищеварения, при котором наибольшая функциональная нагрузка приходится на кишечник, печень и поджелудочную железу.

Формирование кишечно-желудочного типа пищеварения происходит в течение эмбрионального развития домашних и диких свиней. Что касается видовых или филогенетических различий более напряженно прирастает как кишечник, так и поджелудочная железа у плодов крупной белой породы по сравнению с диким европейским кабаном. Указанные изменения не являются действием искусственного отбора, а возникают в результате преобразования функций и взаимозависимости между ними в процессе доместикации животных.

### **Выводы**

Анализ динамики ростовых параметров у домашних и диких свиней дает возможность определять границы естественных периодов пренатальной жизни этих животных, показать дискретность возрастного развития, обусловленную сменой одного типа метаболизма другим при переходе животного от одного периода онтогенеза к другому.

Скорость роста – один из важнейших показателей онтогенеза, имеющий в известной степени самостоятельное значение в эволюции вида. Искусственный отбор внутри вида через селекцию «подхватывает» темпы роста как один из важнейших элементов своей микроэволюционной программы.

### **Литература**

1. *Аршавский И.А., Немец М.Г., Розанова В.Д.* К экспериментальному моделированию возможных механизмов морфологического преобразования диких животных при их одомашнивании // Морфология и генетика кабана. – М.: Наука, 1985. – С.73-87.
2. *Буркат В.П.* Генетико-селекційні аспекти онтогенезу сільськогосподарських тварин. – К.: Аграрна наука. – 2004. – 40 с.
3. *Давлетова Л.В.* Морфология и генетика кабана. – М.: Наука, 1985. – 280с.
4. *Рэфф Р., Кофман Т.* Эмбрионы, гены и эволюция. – М.: Мир, 1986. – 404с.
5. *Хохлов А.М.* Теоретическое обоснование процесса доместикации, селекционно-генетический мониторинг в свиноводстве. // Автореферат диссертации доктора сельскохозяйственных наук. – Курск, 2006. – 49 с

### **Резюме**

Рассматриваются вопросы доместикационных изменений в процессе микроэволюции свиньи.

Розглядаються питання доместикаційних змін в процесі мікроеволюції свині.

Aspects of domestication changes in the microevolutionary processes in swine have been studied.

**ЧАДОВ Б.Ф.**

*Институт цитологии и генетики СО РАН,*

*Россия, 630090, г.Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева 10, e-mail : chadov@bionet.nsc.ru*

### **КВАЗИЦИКЛ «ГЕН – ПРОГЕН» - ИММАНЕНТНОЕ СВОЙСТВО ЖИВОЙ СИСТЕМЫ**

Классическое понятие «ген» разделили на два понятия, дополняющих друг друга: «*ген*» и «*проген*». Прогенами назвали участки ДНК, а генами - информационные продукты, образующиеся на них. В акте наследования происходит наследование всего набора прогенов (прогенома) и ограниченного числа генов. Гены и прогены находятся в динамическом состоянии, названном *квазициклом*. Ген активизирует проген; последний, в свою очередь, производит ген. Онтогенез состоит из множества последовательных квазициклов. Квазицикл сохраняется и в ходе образования нового организма. Квазицикл – энергозахватный процесс. Он лежит в основе образования живой материи под действием устойчивого потока свободной энергии.

Эволюция живого – предмет эволюционной биологии, однако проблема эволюции вряд ли сможет быть решена в рамках одной дисциплины. В чем сущность жизни, каково её происхождение, какова организация индивидуума и системы живого в целом – вот вопросы, которые конкретно не рассматриваются эволюционной биологией, но без которых не решить проблемы эволюции. Не обойтись и без теории динамических систем, и термодинамики. В современной науке растёт понимание того, что для постижения сути биологической эволюции необходим «новый синтез» [1]. Сказанное означает, что подходы, предлагаемые биологами для решения проблемы эволюции вряд ли окажутся успешными, если они не будут нацелены на системные решения.

Нобелевский лауреат Манфред Эйген предложил считать, что в основе живого лежит циклическое взаимодействие нуклеиновой кислоты и белка [2, 3]. По мнению В.Н. Компаниченко, проведшего систематизацию определений жизни, идея автокатализа М. Ейгена - одна из самых представительных [4]. Автор данной статьи разделил понятие *ген* на два: *ген* и *проген* [5]. Разделение снимает ряд принципиальных трудностей внутри генетики. Кроме того, с помощью пары введенных понятий можно по новому формализовать живое. Сформулировать сущность живого – цель этой статьи.

Сущность живого предлагается свести к квазициклу «*ген-проген*». Квазицикл - циклическое взаимодействие между ДНК и информационными продуктами, образующимися на ней. Появление взаимодействия является моментом возникновения жизни. Формулировка заостряет внимание на фундаментальном отличии набора химических веществ, составляющих живую материю, от самой живой материи, в которой вещества находятся в постоянном энергетически целесообразном движении. Она позволяет осознать *работающую генетическую систему* конкретного организма одновременно как момент в мировом процессе биологической жизни, как момент онтогенеза конкретного вида и как момент филогенеза. В предложенной формулировке генетика выглядит связующим звеном между биологией, химией, синергетикой, информатикой и термодинамикой.

## **Четыре этапа в развитии представления об элементарной единице наследственности, или четыре этапа развития генетики**

*Первый этап* связан с именем Менделя и появлением идеи о существовании *дискретных материальных единиц наследственности, передающихся от родителей потомкам*. Идея базировалась на найденных правилах наследования признаков. Единица наследственности была названа Менделем *фактором*. Бэтсон и Иоганнсен дали ей название «ген». В термине «ген», происходящим от греческого слова «род», «происхождение», точно отражена сущность единицы наследственности – способности реализоваться в признак, «рождать» признак. Методически первый этап генетики представляет собой гибридологический анализ.

*Второй этап* в развитии генетики был попыткой «материализовать» ген. Согласно разработанной Морганом с сотрудниками хромосомной теории наследственности [6], *ген является участком хромосомы*. Методически второй этап можно назвать цитогенетическим (цитологическим изучением хромосом – носителей генетической информации).

*Третий этап* связан с открытием ДНК как химического вещества, ответственно за наследственность. Он характеризуется открытием структуры ДНК, генетического кода и многих других процессов, происходящих с молекулой ДНК. Этап заканчивается полной расшифровкой генов человека, значительного числа животных и растений. *На этом этапе ген отождествляется с участком ДНК* [7]. Генетика переходит на молекулярный химический уровень. Возникла обширная отрасль генетики, называемая молекулярной генетикой.

*Четвёртый этап*. Третий этап развития генетики, повидимому, заканчивается, и она вступает в четвертый. *На этом этапе в качестве генов будут фигурировать не ДНК и ее участки, а информационные продукты, образующиеся на ДНК*.

### **Молекулу ДНК и её участки можно считать веществом наследственности, но нельзя считать генами**

Исторический процесс поиска материального субстрата гена дважды заканчивался успехом. Первый раз с привязкой к хромосоме, второй раз – к ДНК. Сами по себе достижения были настолько значительны, что до разбора некоторых «неувязок и шероховатостей» дело не доходило. Но они существуют, причем, одни и те же в обоих случаях.

Генетическая доктрина называет генами (1) *дискретные материальные единицы*, (2) *передающиеся с гаметам от родителей потомку*. Доподлинно известно, что с гаметами передаются хромосомы и молекулы ДНК, но материально они едины и называть образования дискретными, строго говоря, нельзя. Безусловно, непрерывную молекулу ДНК можно разбить на участки, как впрочем и любое материальное тело, но это не позволяет считать дискретным ни ДНК, ни это тело.

В процессе реализации генетической информации на ДНК образуются информационные продукты, к примеру, иРНК. Это, действительно, дискретные единицы. Но они не удовлетворяют второй части определения гена: они не передаются от родителей потомку (исключения будут специально рассмотрены). Таким образом, проведенный процесс «материализации» гена не столь безупречен, как кажется. Позволительно считать, что как в случае с хромосомами, так и в случае с ДНК, мы только приблизились к пониманию того, что представляет из себя ген в материальном смысле. История возникновения понятия «ген» и его изменений в течение XX столетия подробно представлена В.А. Ратнером [7].

### **Молекулярная генетика создала все предпосылки для переосмысления представления о гене**

Непосредственными ингредиентами, из которых строится живой организм, являются органические вещества: белки (структурные и ферменты), жиры, углеводы, а также структурное образование – клетка. Органические вещества являются химическим

материалом организма, а с помощью ферментов осуществляются биохимические превращения веществ. Клетка является особым образованием. Она не синтезируется из элементов, как органическое вещество, но достраивается в процессе деления. Все, о чем сказано выше, строится в результате реализации генетической информации, полученной новым организмом от родителей.

Генетическая информация находится в родительской ДНК, но она не может быть реализована без посредников. Они образуют «информационный поток». Он начинается на ДНК, а кончается образованием конечных ингредиентов. Роль элементарных единиц, реализующих перенос информации, выполняют РНК, регуляторные белки и мобильная ДНК. Их объединяют три свойства: существование в виде отдельных материальных единиц, наличие информации, независимое поведение.

В полном смысле этого слова именно эти продукты являются *генами*. Они дискретны, содержат информацию, передают её для реализации. Исходную ДНК и отдельные её участки будем далее называть соответственно *прогеном* и *прогенами*. Слово-сочетание «вещество наследственности» также подойдет для этого. Итак, *наследственность передается в виде прогенов, а реализуется с помощью генов*. Проведенное переименование делает представление о единицах наследственности более точным.

Гены в новой терминологии делятся на три категории: РНК-гены, белковые гены и ДНК-гены. Категория РНК-генов включает иРНК, рРНК, микроРНК и тРНК. Категория белковых генов включает «регуляторные белки» и «транскрипционные факторы». К ДНК-генам отнесём ДНК мобильных элементов. Гены, в новой интерпретации не универсальны по структуре, как это было ранее. Теперь это - свойство прогенов

Современная молекулярная генетика показала, что на одном участке ДНК может быть построены десятки и сотни продуктов, различающихся по своей функциональной роли. Поскольку в генетике геном называется продукт с определенной функцией, ни вся молекула ДНК, ни её отрезки не подходят под название гена. В дополнение к доводу о не дискретности молекулы ДНК это - ещё один довод в пользу того, чтобы молекулу ДНК или её участки не считать генами.

#### **Квазицикл «- ген- проген- » и сущность живого**

*Процесс активизации геном прогена, который в свою очередь продуцирует ген, назовем квазициклом.* Циклом потому, что он начинается и кончается геном, а квазициклом («почти» циклом) потому, что гены в начале цикла и в конце цикла – разные. В процессе строго детерминированной последовательности квазициклов за время онтогенеза «развёртывается» вся генетическая информация, содержащаяся в геноме данного организма.

В квазицикле проген всегда ДНК. Роль генов, активирующих прогены играют белковые гены, известные как регуляторные белки и транскрипционные факторы. В настоящее время ясно, что генами, запускающими прогены, могут быть т.н. микроРНК [8]. Не исключена роль и других генов в этом процессе. Весь онтогенез организма можно представить в виде спирали, состоящей из витков «-ген-проген-».

В компетенции квазицикла находится продукция всех белков. О регуляторных белках (белковых генах, в нашей терминологии) было сказано выше. Образование структурных белков, необходимых для построения и функции организма, тоже предусмотрено [5]. Представленная схема развития в виде множества квазициклов не противоречит данным генетики развития, включая и данные о позиционной информации.

В предлагаемой модели главнейшими являются три момента. Первый – присутствие на каждом этапе жизни двух компонентов: гена и прогена. Второй – практически постоянное взаимодействие между ними. Третий – наделение одного из компонентов функцией носителя полной информации.

Наличие информации в одном из компонентов ( ДНК) делает удобным хранение и тиражирование информации, однако сам компонент, обладающий всей полнотой информации, свойством живого не обладает и жизни породить не может. Жизнь возникла

в момент образования автокаталитического цикла «-ген-проген-». После инициации в историческом прошлом акта автокатализа на любом отрезке жизни отдельного организма и жизни в целом существует положение, когда конкретный жизненный акт возможен только тогда, когда для его осуществления уже созданы биологические продукты в результате ранее состоявшихся актов всё той же живой материи. При всей важности и самой информации и ДНК, как её носителя, ни то, ни другое сами по себе жизни не определяют.

В модели квазицикла жизнь предстает в качестве формы материализации устойчивого потока энергии не высокой интенсивности. Можно заметить, что в модели воплощаются некоторые из существенных черт жизненного процесса, ранее отмеченные исследователями и вошедшие в определения жизни. Так к характерным чертам живого относят наличие управляющей генетической системы [7]. Предложенная модель целиком оперирует генетическими понятиями. Конвариантная редупликация как характерная черта живого [9] в модели квазицикла является одной из форм химического превращения. Идея «информации как основы жизни» [10] просматривается в квазиформе цикла, «развёртывающего» информацию, содержащуюся в прогеноме. Идея цикла воплощает широко распространенную среди биологов мысль об обмене веществ как характерной черте живого [4]. Модель энергозахватного квазицикла позволяет рассматривать жизненные процессы с позиций термодинамики, теории динамических систем и синергетики.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант 08-04-00094-а

#### **Литература**

1. *Sintonen M., S. Siren* (eds). Theory of evolution - in need of a new synthesis ? Fitty 50. Tampere. 1993.
2. *Эйген М.* Самоорганизация материи и эволюция биологических макромолекул. Москва: Мир, 1973. 216 с.
3. *Эйген М, Шустер П.* Гиперцикл, принципы самоорганизации макромолекул. Москва: Мир. 1982. 270 с.
4. *Kompanichenko V.* Systemic approach to the origin of life. Frontier Perspectives. 2004. vol. 13(1). P. 22-40.
5. *Чадов Б.Ф.* Новый этап в развитии генетики и термин “эпигенетика”. Генетика, 2006. Т.42. №9. С. 1261-1275.
6. *Morgan T.H., C.B.Bridges, A.H.Sturtevant.* The Genetics of Drosophila. Bibliographia Genetica II. ‘S-Gravenhage Martinus Nijhoff. 1925. 262 с.
7. *Ратнер В.А.* Генетика, молекулярная кибернетика: Личности и проблемы. Новосибирск: Наука, 2002. С.81-96.
8. *Гиббс У.* “Теневая” часть генома: сокровища на свалке // В мире науки. 2004. №2. С.21-27. №3. С.65 -71.
9. *Медников Б.М. Н.В. Тимофеев-Ресовский и аксиоматика теоретической биологии. Современные проблемы радиобиологии, радиоэкологии и эволюции. (под ред. В.И.Корогодина).* Дубна: ОИЯИ, 2001. С.297-312.
10. *Корогодин В.И., Корогодина В.Л.* Информация как основа жизни. Дубна: Феникс, 2000. 208 с.

#### **ЮДАКОВА О.И.**

*Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия*

*Россия, 410012, Саратов, ул.Астраханская., 83, e-mail: [yudakovaai@info.sgu.ru](mailto:yudakovaai@info.sgu.ru)*



## АДАПТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПОЛИВАРИАНТНОСТИ ЭМБРИОЛОГИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ У ФАКУЛЬТАТИВНО АПОМИКТИЧНЫХ ЗЛАКОВ

Одним из компонентов системы семенного размножения покрытосеменных растений является апомиксис. На протяжении более чем 100 летнего периода изучения апомиксиса, его эволюционная роль оценивалась неоднозначно: от представления об апомиксисе как «эволюционном тупике» (Darlington, 1937; Stebbins, 1941) до предположения возможности вытеснения апомиктами половых форм и наступления на Земле «эры апомиксиса» (Хохлов, 1970). В настоящее время все больше исследователей склоняются к мнению, что наиболее эффективными являются системы размножения, основанные на тесном взаимодействии апомиксиса и амфимиксиса (Asker, Jerling, 1992; Savidan, 1992; Shishkinskaya, 1991; Jankun, 1993; Koltunow, 1993; Cai et al., 1995 и др.). Сочетание разных способов репродукции позволяет, с одной стороны, сохранять исходные генотипы материнских растений, а с другой, за счет рекомбинации и оплодотворения создавать новые генетические комбинации. Проведенное нами популяционно-эмбриологическое исследование дикорастущих злаков показывает, что апомиктичные формы обладают лабильной поливариантной системой семенного размножения, которая дает возможность одновременно осуществлять амфи- и апомиксис в пределах одного растения.

### Материал и методы

Материалом исследования послужили видообразцы (не менее 10 растений одной популяции, отобранные случайным образом) дикорастущих злаков из 5 регионов России и ближнего зарубежья: Камчатки, Якутии, Приполярного Урала, Северного Кавказа (Абхазии) и Нижнего Поволжья (Саратовской обл.). Растения фиксировали смесью Чемберлена в период открытого цветения. Мегagamетофитогенез, структуру зрелых зародышевых мешков, процессы эмбрио- и эндоспермогенеза исследовали на препаратах, приготовленных с использованием классического микротомного метода, а также ускоренных методов цитоэмбриологического анализа: 1) просветления семязачатков (Negr, 1971) и 2) выделения зародышевых мешков с помощью ферментативной мацерации и последующей диссекции семязачатков (Куприянов, 1978). Всего было изучено 59 популяций 45 видов злаков.

### Результаты и обсуждение

В ходе проведенного анализа эмбриологические признаки апомиксиса были зарегистрированы у растений 31 популяции 20 видов, относящихся 4 родам: *Festuca djimilensis*, *F.drymeja*, *F.gigantea*, *F.rubra*, *F.ruprechtii*, *F.sulcata*, *F.valesiaca*, *Hierochloë glabra*, *Koeleria sabuletorum*, *Poa alpigena*, *P.angustifolia*, *P.badensis*, *P.chaixii*, *P.glauca*, *P.macrocalyx*, *P.malacantha*, *P.nemoralis*, *P.pratensis*, *P.radula*, *P.sublanata*.

Изученные популяции характеризовались общими особенностями проявления апомиксиса на эмбриологическом уровне. Апомиксис всегда носил факультативный характер. Однако факультативность проявлялась не в дифференциации особей популяции по способу репродукции, а в способности одного и того же растения успешно реализовывать половую и апомиктичную программу эмбриологического развития. Ключевыми элементами половой программы являются эуспория, сингамия и тройное слияние, апомиктичной программы – апомейоз, партеногенез и автономный эндоспермогенез.

У подавляющего большинства изученных популяций мегagamетофит с редуцированным числом хромосом формировался из соматической клетки семязачатка (апоархеспория), и только у *P.badensis* и *P.nemoralis* из клетки диады мегаспор (диплоспория). Детальные исследования процессов мегаспоро- и мегagamетофитогенеза, проведенные на видообразцах *P.badensis*, *P.chaixii*, *P.pratensis* и *F.rubra*, показали, что в каждом соцветии всегда присутствуют семязачатки, где образуется редуцированный

эуспорический зародышевый мешок. При апоархеспории параллельное развитие нередуцированного и редуцированного мегagamетофита возможно даже внутри одного семязачатка. Кроме того, у *P.pratensis* наряду с апоархеспорией и эуспорией зарегистрировано развитие нередуцированного зародышевого мешка из материнской клетки мегаспора (апоспория). Поливариантность путей мегаспорогенеза и мегagamетофитогенеза ранее была описана у ряда апомиктических форм. Так, сочетание апоархеспории и диплоспории обнаружено у *Paspalum minus* (Bonilla, Quarin, 1997) и *Pennisetum ciliare* (Czapik, 2000), апоспории и диплоспории – у *Tripsacum dactyloides* (Шишкинская, Горунова, 1971), *Alchemilla vulgaris*, *A.sarmatica*, *A.filicaulis*, *A.glaucescens* и *A.incisa* (Глазунова, 2000).

Партеногенетическое развитие зародыша у всех изученных видов образцов, как правило, начиналось в нераскрывшемся цветке до проникновения в зародышевый мешок пыльцевой трубки (преждевременная эмбриония). Эндосперм формировался только после оплодотворения центральной клетки (псевдогамия). К началу цветения большинство мегagamетофитов содержали партеногенетический проэмбрио и неслившиеся полярные ядра. В то же время на момент опыления в популяциях всегда оставалась часть зародышевых мешков с интактными яйцеклетками, которые сохраняли способность к оплодотворению. Случаи сингамии зарегистрированы во всех изученных апомиктических популяциях.

Система семенной репродукции апомиктических злаков достаточно лабильна и допускает переходы с апомиктической программы на половую и обратно на разных этапах эмбриологического развития. Например, после формирования нередуцированного зародышевого мешка апомиктический путь развития может сменяться половым: яйцеклетка оплодотворяется и дает начало гибриднему зародышу. Встречаются и обратные ситуации, когда в редуцированном зародышевом мешке яйцеклетка развивается партеногенетически. Переходы с одной программы эмбриологического развития на другую являются причиной гетерогенности потомства апомиктов по плоидности. Наряду с диплоидными проростками, которые составляют обычно подавляющее большинство в апомиктических популяциях, встречаются гаплоидные проростки – результат партеногенетического развития редуцированных яйцеклеток, и триплоидные – результат оплодотворения нередуцированных женских гамет.

Переход с одной программы развития на другую может осуществляться не только на стадии эмбриогенеза, но и на стадии формирования эндосперма. Как отмечалось выше, изученные апомиктические популяции злаков характеризовались псевдогамией. Однако, в некоторых из них (*H.glabra*, *P.pratensis*) наблюдали спорадическое образование автономного эндосперма.

Таким образом, у факультативных апомиктов все ключевые этапы эмбриологического развития поливариантны. Споро- и гаметофитогенез может осуществляться по пути формирования зародышевого мешка либо с редуцированным числом хромосом (эуспория), либо с нередуцированным (диплоспория, апоспория, апоархеспория). Яйцеклетка может развиваться в результате оплодотворения или партеногенетически, эндосперм – либо автономно, либо в результате оплодотворения центральной клетки.

Если у половых видов сбои в реализации программы эмбриологического развития единичны, то у апомиктов они происходят регулярно. Следствием таких сбоев является формирование зародышевых мешков с отклонениями от типичного строения (Шишкинская, Юдакова, Тырнов, 2004). У большинства апомиктических популяций около трети всех зародышевых мешков характеризовались гаметофитными аномалиями. Наиболее часто встречались мегagamетофиты с яйцеклеткоподобными синергидами, дополнительными яйцеклетками и полярными ядрами. Эмбрио-генетический эффект гаметофитных аномалий может быть достаточно ощутимым и разнообразным. Негативное влияние на репродуктивный процесс способно оказать отсутствие в зародышевом мешке таких жизненно важных элементов как яйцеклетка и полярные ядра. Однако

данные аномалии встречаются крайне редко: среди более чем 15000 проанализированных мегагаметофитов было зарегистрировано лишь несколько случаев образования зародышевого мешка без яйцеклетки или полярных ядер. Как правило, аномалии не только не снижают жизнеспособности женского гаметофита, но и могут способствовать увеличению семенной продуктивности популяции за счет полиэмбрионии, а также изменению генетической структуры популяций и возрастанию их эволюционного потенциала.

Предпосылками к полиэмбрионии являются формирование нескольких мегагаметофитов в одном семязачатке и нескольких яйцеклеток в одном зародышевом мешке (полигаметия). Учитывая высокую частоту их образования и возможность комбинации в одном семязачатке этих двух явлений, можно говорить о том, что апомиктичные популяции обладают достаточно большим потенциалом для увеличения семенной продуктивности. Например, у *P.pratensis* из 440 семязачатков было выделено 532 зародышевых мешка, из которых 502 содержали один зародыш, 29 – два и 1 – три. В случае реализации данных предпосылок к полиэмбрионии 440 семян способно дать 563 проростка ( $502 + 29 \times 2 + 1 \times 3$ ). Таким образом, количество потомков более чем на четверть (27,9%) может превысить количество семян.

Помимо создания предпосылок к полиэмбрионии образование множественных зародышевых мешков и полигаметия позволяют сочетать разные способы репродукции внутри одного семязачатка. В результате зрелое семя может содержать проростки разного уровня пloidности и разного происхождения. При этом создается ситуация, когда одно семя становится способным воспроизводить не единичное растение, а часть генетически гетерогенной популяции.

В то же время эти аномалии предоставляют дополнительный материал для отбора наиболее жизнеспособных гаметофитов и гамет, расширяя тем самым возможности клеточной селекции. Отмеченные у ряда апомиктичных популяций (*H. glabra*, *P.macrocalyx*, *P.pratensis*) случаи развития «синергидных» зародышей при интактных яйцеклетках могут указывать на то, что образование своего рода «запасных» структур (зародышевых мешков, яйцеклеток) является одним из механизмов страховки популяции от производства аберрантного потомства в случае, если «основная» структура несет какие-либо генетические дефекты. Все это может способствовать повышению жизнеспособности популяции.

Анализ популяций одного и того же вида из разных мест обитания показывает, что апомиксис характерен для вида в целом и не имеет строгой экологической приуроченности. Так, апомиктичными оказались популяции *P.angustifolia*, произрастающие в совершенно разных климатических зонах: на Камчатке, в Якутии, Приполярном Урале и Нижнем Поволжье. У *P.pratensis* и *P.nemoralis* эмбриологические признаки апомиксиса зарегистрированы в популяциях Камчатского полуострова и Саратовской области, у *F.gigantea* – Северного Кавказа и Нижнего Поволжья, у *F.rubra* – Якутии, Камчатки и Нижнего Поволжья. Апомиктичные популяции одного вида из разных мест обитания характеризовались одной формой апомиксиса. Все это свидетельствует против мнения некоторых авторов о том, что апомиксис обеспечивает лишь частную приспособленность видов к определенным условиям среды. Несомненно, что он играет более важную роль и служит механизмом оптимизации системы размножения вида по всему ареалу.

Широкое распространение факультативно апомиктичных видов злаков на территориях с различными эколого-географическими условиями может быть обусловлено как лабильностью их системы семенного размножения, позволяющей сочетать преимущества апомиксиса и амфимиксиса, так и успешной реализацией адаптивного потенциала гаметофитной изменчивости.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (Проект 08-04-00319).

**Литература**

1. Глазунова К.П. Род *Alchemilla* L. (*Rosaceae*) – классический объект для изучения факультативного апомиксиса // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции: В 3 т. – Санкт-Петербург. – 2000. – Т. 3. – С.206–214.
2. Куприянов П.Г. Ускоренные методы исследования зародышевого мешка // Выявление апомиктических форм во флоре цветковых растений СССР. – Саратов –1978. – С.155–163.
3. Хохлов С.С. Эволюционно-генетические проблемы апомиксиса у покрытосеменных растений // Апомиксис и селекция. – Москва. –1970. – С.7–21.
4. Шишкинская Н.А., Горюнова Н.В. Цитоэмбриологическое изучение *Tripsacum dactyloides* L. // Апомиксис и цитоэмбриология растений. – Саратов – 1971. – Вып. 2. – С. 109–113.
5. Шишкинская Н.А., Юдакова О.И., Тырнов В.С. Популяционная эмбриология и апомиксис у злаков. – Саратов. – 2004. – 145 с.
6. Asker S.E., Jerling L. Apomixis in plants. – Boca Raton. – 1992. – 298 p.
7. Bonilla J.R., Quarin C.L. Diplosporous and aposporous apomixis in a pentaploid race of *Paspalum* // Plant Sci. – 1997. – vol. 127, № 1. – P. 97–104.
8. Cai D., Wang R. R.C., Carman S.G. The promotive role of gametophytic apomixis in evolution // Harnessing Apomixis. A new Frontier in Plant Science. – USA. – 1995. – P.40.
9. Czapik R. Apomixis in monocotyledons // Grasses: systematic and evolution /eds. S.W.Jacobs and J.Everett. – Melbourne. – 2000. – P.316–320.
10. Darlington C.D. Recent advances in cytology. – London. – 1937. – 671 p.
11. Jankun I. Evolutionary significance of apomixis in *Sorbus intermedia* (*Rosaceae*) // Fragm. Flor. Geobot. – 1993. – № 36. – P.627.
12. Koltunow A. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules // The plant cell. – 1993. – vol. 5. – P.1425–1437.
13. Herr Jm. J. M. A new clearing-squash technique for study of ovule, development in angiosperms // Amer. J. Bot. – 1971. – vol. 20, № 8. – P.785–790.
14. Savidan Y. Apomixis and agamic complexes: from theory to practice // Species Complexes, Gene Flows and Plant Genetic Resources. – Paris. – 1992. – P.291–300.
15. Shishkinskaya N.A. Non-traditional view on apomixis // Apomixis Newsletter. – 1991. – № 3. – P.34–36.
16. Stebbins G.Z. Apomixis in the *Angiosperms* // Bot. Rev. – 1941. – vol. 7. – P.507–552.

### Резюме

В ходе цитоэмбриологического анализа факультативно-апомиктических популяций дикорастущих злаков установлена высокая частота гаметофитных аномалий и поливариантность ключевых этапов эмбриологического развития (формирования мегагаметофита, зародыша и эндосперма). Обсуждается адаптивный потенциал гаметофитной изменчивости и лабильности системы семенной репродукции апомиктических злаков.

У ходе цитоембриологічного аналізу факультативно-апоміктичних популяцій дикоростучих злаків встановлена висока частота гаметофитных аномалій і поливариантность основні етапів ембріологічного розвитку (формування жіночого гаметофіту, зародка и эндосперма). Розглянуто адаптивний потенціал гаметофітної мінливості і лабільності системи насінневого розмноження апоміктичних злаків.

High frequency of gametophytic anomalies and variability of the embryological development main stages (formation of megagametophyte, embryo and endosperm) in the facultative apomictic cereals have been observed. Adaptive potential of the gametophytic variability and lability of the seed reproduction system by facultative apomixis were discussed.

## ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМОВ В ПРИРОДЕ И ЭКСПЕРИМЕНТЕ

**БАТУРИН С.О.**

*Институт цитологии и генетики СО РАН,*

*Россия, 630090, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 10, e-mail: [baturin@bionet.nsc.ru](mailto:baturin@bionet.nsc.ru)*

### НЕРЕДУКЦИЯ ГАМЕТ У *FRAGARIA VESCA* L. В ПРИРОДЕ И ОПЫТЕ

В роде *Fragaria* четко прослеживается длинный естественный полиплоидный ряд:  $2n=14, 28, 42, 56$  при  $x=7$ . Его формирование проходило при самом непосредственном участии нередуцированных гамет в половом процессе (Bringhurst, Senanayake, 1966; Jones, 1966; Сухарева, 1980). Сведения об образовании нередуцированных (диплоидных) гамет у полиплоидных представителей рода *Fragaria* достаточно многочисленны. Нередукция гамет у земляники играет очень важную роль в эволюции рода, поскольку формирование полиплоидных видов достигается за счет функционирования нередуцированных гамет (Сухарева, 1984). Почти во всех работах, посвященных межвидовой гибридизации земляник, описаны случаи появления матроморфного (партеногенетического происхождения) потомства и N-гибридов, возникновение которых может быть объяснено участием одной или обеих гамет, обладающих диплоидным для родительских форм числом хромосом (Петров, Сухарева, 1983). Если для полиплоидных видов *Fragaria* формирование и функционирование нередуцированных гамет уже не вызывает сомнения, то для диплоидных видов такие случаи описаны единично (Федорова, 1935; Schiemann, 1937) и требуют дальнейшего изучения.

В природных популяциях диплоидного вида *Fragaria vesca* L. в благоприятных условиях опыления и оплодотворения у преимущественно реализуется половой (зиготический) способ развития семян посредством двойного оплодотворения (Фадеева, 1966; Батуринов, 2007). Сведения о развитии и участии в оплодотворении  $2n$  гамет приводятся лишь в работах по межвидовой гибридизации земляник с участием *F. vesca* в качестве материнского родителя. Так, в скрещиваниях *F. vesca* ( $2x$ )  $\times$  *F. moschata* ( $6x$ ) получены преимущественно пентаплоидные гибриды ( $5x$ ), которые могли возникнуть лишь при участии в оплодотворении нередуцированных женских гамет со стороны *F. vesca* (Федорова, 1935; Schiemann, 1937).

Наряду с зиготическим способом формирования семян (посредством двойного оплодотворения) у *F. vesca* имеет место апозиготический способ развития семян в форме диплоидного партеногенеза. Первые убедительные сведения о проявлении агамоспермии псевдогамного типа у *F. vesca* ( $2x$ ) приводятся в работе Е.М. East (1930). Им в гетероплоидном межвидовом скрещивании *F. vesca* ( $2x$ )  $\times$  *F. virginiana* ( $8x$ ) было получено 24 диплоидных растения матроморфного типа, происхождение которых он объяснил индуцированным партеногенезом гаплоидной яйцеклетки с последующим удвоением числа хромосом на первых этапах эмбриогенеза. S.H. Yarnell (1931) предположил возникновение диплоидных матроморфных сеянцев во внутривидовых аутбредных скрещиваниях *F. vesca* за счет функционирования одной из форм псевдогамии. Т.С. Фадеева (1966), склонна считать реализацию агамоспермии у *F. vesca* в форме индуцированного диплоидного партеногенеза, т. е. благодаря развитию нередуцированных женских гамет – яйцеклеток. Такого же мнения придерживается и автор данной статьи (Батуринов, 2007). Цель данного исследования – оценить проявление нередукции гамет в половом процессе диплоидного вида *F. vesca* в естественных популяциях, посредством анализа возникновения матроморфных сеянцев, а также N-гибридов.

#### **Материал и методы**

В качестве материала исследования были использованы образцы лесной земляники *Fragaria vesca* L. ( $2n=2x=14$ ), относящихся к евроазиатскому подвиду *F. vesca* ssp. *vesca*, из коллекции земляник лаборатории популяционной генетики растений

ИЦиГ СО РАН. Образцы, использованные в эксперименте, имели следующее происхождение: № 69-1 - дикорастущий образец, собранный в окрестностях г. Мукачево (Закарпатье); № 98-2 - образец взят из естественного фитоценоза ленточного соснового бора на берегу Бердского залива Искитимского района Новосибирской области; № 03/С-1-10 - выделен из семян, собранных в дикорастущей популяции в Маслянинском р-не, Новосибирской области, урочище Гы-Чи, юго-западный склон горы в пойме р. Бердь; № 01-10 – дикорастущий образец из поймы реки Суенга Маслянинского района Новосибирской области; № 97-1 - дикорастущий образец, собранный в Хакасии, Красноярского края; № 13 – сорт Белая альпийская; №№ 96-1, 96-2, 96-3, 96-4, 96-5, 96-6 - дикорастущие образцы, собранные на расстоянии не менее 500 м один от другого в окрестностях с. Барановка, Кемеровского района, Кемеровской области. Растения сорта "Александрия" выращены из семян, приобретенных в розничной торговле.

Для кастрации использовали цветки в состоянии нераскрытого бутона. Кастрацию производили пинцетом, соцветия изолировали пищевым целлофаном с прокладкой слоя ваты у основания цветоноса, что исключает возможность проникновения пыльцы извне благодаря насекомым-опылителям. Контролем качества изоляции служили неопыленные изолированные соцветия. Пыльцу для аутбредных скрещиваний выделяли из нераскрытого бутона, подсушивали при комнатной температуре без доступа прямых солнечных лучей. Опыление производили мягкой кисточкой однократно.

Индукцию агамоспермии проводили, используя чужеродное опыление кастрированных и изолированных цветков. В качестве пыльцевого партнера использовали пыльцу *Potentilla anserina* L., выделенную из раскрывшихся бутонов, подсушенную при температуре 20-22°C без доступа прямых солнечных лучей. Для идентификации сеянцев партеногенетического происхождения использовали цитологический и биоморфологический анализы потомства. Подсчет числа хромосом образцов проводили в клетках корневых меристем на «давленных» препаратах при помощи микроскопа «Axiostar plus» при увеличении 10×1.25×100. Перед фиксацией материал предварительно обрабатывали 0,1% раствором колхицина (2 часа), затем раствором 8-оксихинолина (3 часа), фиксировали ацетоалкоголем (3:1), окрашивали ацетокармином в течение суток в холодильнике (Bringham, Senanayake, 1966).

### **Результаты и обсуждение**

*Проявление нередукции гамет при апозиготическом способе семенной репродукции.*

Агамоспермия в виде диплоидного партеногенеза обусловлена формированием и развитием нередуцированных гамет. В нашем эксперименте по изучению проявления агамоспермии у *F. vesca* были использованы в качестве материнских растений рецессивные дигомозиготы по маркерным признакам «S - тип плодоношения» и «R - тип побегообразования» из семенного потомства сорта «Александрия». Этот сорт и подобные ему сорта ремонтантной диплоидной земляники выделены из альпийских популяций *F. vesca ssp. vesca* в результате длительного селекционного процесса. Хорошая скрещиваемость сорта Александрия с образцами *F. vesca* сибирского происхождения указывает на их таксономическую близость и принадлежность к одному виду.

Предварительно кастрированные и изолированные цветки растений сорта «Александрия» были опылены различными образцами *F. vesca* сибирского происхождения – доминантными гомозиготами. Их доминантное состояние по маркерным признакам предварительно было подтверждено в результате анализа их потомства от самоопыления. Результаты таких аутбредных скрещиваний (*ssrr* × *SSRR*) представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Проявление агамоспермии у *F. vesca* при аутбридинге

Комбинация скрещивания	Распределение фенотипов в семенном потомстве		
	"длинностолонный, неремонтантный"* (генотип <i>SsRr</i> )	"короткостолонный, ремонтантный"** (генотип <i>ssrr</i> )	партеногенетических семян, %
Александрия × № 69-1	117	13	10,0
Александрия × № 96-1	41	5	10,9
Александрия × № 97-1	15	4	21,0

Примечание: \* - ожидаемый фенотип (гибрид); \*\* - материнский фенотип (партеногенетический потомок).

В семенном потомстве, полученном от таких скрещиваний, мы ожидали получить 100% семян гибридного фенотипа, исходя из менделеевских закономерностей моногенного наследования маркерных признаков, т.е. все семена ( $F_1$ ) должны быть неремонтантными и формирующими длинные наземные столоны-усы (генотип *SsRr*). Однако в семьях, наряду с ожидаемыми семенами гибридного фенотипа, зарегистрированы матроморфные семена с  $2n=14$  (до 21,0%), сохранившие материнский фенотип - ремонтантный и короткостолонный (часто называемый «безусый»).

Поскольку появление матроморфных семян отмечено в аутбредном потомстве рецессивных гомозигот *F. vesca* культурного происхождения, в данном случае сорта "Александрия", была предпринята попытка оценить возможность проявления агамоспермии среди дикорастущих образцов из сибирского региона при помощи индуцированного партеногенеза (табл. 2).

Таблица 2.

Результаты индукции агамоспермии при помощи чужеродного опыления у дикорастущих образцов *F. vesca* сибирского происхождения

Материнская форма	Высажено семян, шт.	Получено ПС*	Среднее число ПС на 100 семян
№ 96-1	923	41	4,4
№ 96-2	9	2	2,2
№ 96-3	154	18	11,7
№ 96-4	50	3	6,0
№ 96-5	51	2	3,9
№ 96-6	130	6	4,6
№ 97-1	745	24	3,2

Примечание: ПС\* - партеногенетический сеянец.

Все полученные матроморфные семена имели число хромосом свойственное материнскому ( $2n=14$ ) и сохраняли основные признаки материнского фенотипа. Опыт показал, что образцы *F. vesca* сибирского происхождения, как и растения сорта «Александрия», также могут формировать матроморфные семена путем партеногенетического развития нередуцированных женских гамет - яйцеклеток. Причем тенденция к партеногенетическому развитию нередуцированных женских

гамет проявляется различно среди образцов, варьируя от 2,2 до 11,7 партеногенетических семян на 100 развившихся семян.

#### *Участие нередуцированных гамет в двойном оплодотворении*

Об участии нередуцированных гамет в процессе сингамии у *F. vesca* судили по возникновению семян с триплоидным числом хромосом ( $2n=3x=21$ ). Среди 130 дикорастущих образцов *F. vesca*, собранных в сибирском регионе в местах естественного произрастания, обнаружен лишь один образец (№ 98-2) с триплоидным числом хромосом. Растения произрастали на обочине лесной дороги в ленточном сосновом бору и занимали площадь около 8 м<sup>2</sup>. У растений данного образца, произраставших в естественном фитоценозе, плодов с семенами на засохших цветоносах мы не обнаружили, тогда как при его культивировании на экспериментальном участке, развивались единичные семечки на недоразвитых плодах. Еще один триплоидный образец *F. vesca* № 03/С-1-10 выращен из семян, собранных на юго-западном склоне горы в пойме реки Бердь в Маслянинском р-не, Новосибирской области. У этого образца также развиваются единичные семена в условиях культивирования на экспериментальном участке. Обсуждая происхождение этих двух образцов, невозможно однозначно утверждать, какие именно нередуцированные гаметы приняли участие в оплодотворении – женские или мужские. Исходя из данных опыта по индукции агамоспермии при помощи чужеродного опыления, можно предположить, что именно яйцеклетки – гаметы с нередуцированным числом хромосом, которые в дальнейшем были оплодотворены гаплоидными спермиями.

#### **Выводы**

1. Среди популяций *Fragaria vesca*, произрастающих в сибирском регионе, обнаружен клон с триплоидным числом хромосом – результат участия в сингамии нередуцированной гаметы.

2. Проращивание семян, развившихся в условиях естественного произрастания популяции, выявило сеянец с триплоидным числом хромосом.

3. Возникновение партеногенетических семян (до 21,0%) с диплоидным числом хромосом в благоприятных условиях опыления и оплодотворения (внутривидовые скрещивания) свидетельствует о регулярном формировании в семяпочках нередуцированных женских гамет.

4. Эволюционное значение нередукции женских гамет для *F. vesca* состоит как в образовании N-гибридов (триплоидов) – проявлении геномной изменчивости, так и в способности в неблагоприятных условиях опыления поддерживать семенную продуктивность за счет диплоидного партеногенеза.

#### **Литература**

1. Батуринов С.О. Индукция диплоидного партеногенеза у *Fragaria vesca* L. // Сибирский экологический журнал. – 2007. - № 6. - С. 987-991.
2. Петров Д.Ф., Сухарева Н.Б. Отдаленная гибридизация и апомиксис в роде *Fragaria* и их значение для селекции земляники в Сибири // Сельскохозяйственная биология. - 1983. – № 2. – С. 59–65.
3. Сухарева Н.Б. Эволюционное значение нередукции гамет у *Fragaria* / В кн.: Индуцированный мутагенез и апомиксис. - Новосибирск. - 1980. - С. 204-210.
4. Фадеева Т.С. Проблемы сравнительной генетики растений. Сообщение I. Принципы геномного анализа (на примере рода *Fragaria*) // Генетика. - 1966. - Т.2. - № 1. - С. 12-28.
5. Федорова Н.Я. Межвидовая и внутривидовая гибридизация земляники и ее значение для селекции // Социалистическое растениеводство. – 1935. - № 15. – С. 101-110.
6. Bringham R.S., Senanayake Y.D.A. The evolutionary significance of natural *Fragaria chiloensis* × *F.vesca* hybrids resulting from unreduced gametes // Amer. J. Bot. - 1966. - Vol. 53. - P. 1000-1006.



7. East E. M. The production of homozygotes through induced parthenogenesis. // Science. - 1930. - V. 72. - № 1858. - P. 148-149.
8. Schieman E. Artkreuzungen bei *Fragaria*.-Z. f. Induct. Abstammungs und Vererbungslehre. – 1937. - Bd 73. - H 2. - S. 375-390.
9. Yarnell S.H. Genetics and cytological studies on *Fragaria* // Genetics. - 1931. - № 16. - P. 422- 454.

### **Резюме**

В сибирских дикорастущих популяциях *Fragaria vesca* регулярно формируются нередуцированные женские гаметы. В результате участия в половом процессе таких гамет либо возникают N-гибриды (триплоиды), либо диплоидные потомки партеногенетического происхождения. Эволюционное значение нередукции женских гамет состоит в формировании геномной изменчивости, а также реализации страховочного механизма семяобразования.

Unreduced female gametes regularly develops in Siberian wild populations of *Fragaria vesca*. Participation of such gametes at sexual reproduction leads to development of N-hybrids – double fertilization, or to development of parthenogenetic diploid seedlings (single fertilization - pseudogamy). An evolution significance of unreduced female gametes consists in formation of genomic variety, and at the same time at additional mechanism of seed formation.

### **ВЕРГОЛЯС М. Р., ГОНЧАРУК В. В.**

*Інститут колоїдної хімії і хімії води ім.А.В.Думанського НАН України,  
Україна, 03680, Київ, бульв. акад. Вернадського, 42e-mail: [vergolyas@meta.ua](mailto:vergolyas@meta.ua)*

## **ВИКОРИСТАННЯ ЦИТОЛОГІЧНИХ БІОМАРКЕРІВ НА РИБАХ ДЛЯ ОЦІНКИ АНТРОПОГЕННОГО ЗАБРУДНЕННЯ МОРСЬКИХ ПРІСНИХ ВОД**

Виявлення забруднення морських та прісних вод у результаті антропогенної дії, що посилюється, є одним з актуальних завдань нашого часу. Риби є одним з найбільш зручних об'єктів для дослідження впливу антропогенних забруднювачів водного середовища, оскільки вони зазвичай реагують на токсиканти подібно до вищих хребетних, і можуть бути використані для виявлення речовин, що потенційно викликають токсичний або канцерогенний ефекти у людини. Окрім вивчення загального токсичного впливу на біоту, риби можуть стати модельним об'єктом для виявлення потенційного генотоксичного впливу шкідливих речовин, присутніх у водному середовищі.

Для виконання поставлених завдань використовували стандартизовані методи дослідження токсичності, модифікований метод дослідження генотоксичності - мікроядерний тест. Мікроядерний тест на клітинах риб успішно використовується як метод дослідження генотоксичності водних розчинів різних класів сполук *in vivo*, так і для моніторингу хімічного забруднення води *in situ* [2].

Збільшення числа клітин з мікроядрами та з патологіями поділу, як правило, супроводжується пригніченням мітотичної активності. Це може бути зумовлено зниженою життєздатністю клітин з мікроядрами [1, 3]. Так, було показано, що при високих концентраціях токсичних сполук порушується лінійний характер залежності кількості мікроядер від дози мутагену. Токсичні дози можуть призвести до інгібування поділу клітин та їх загибелі поряд із зменшенням кількості клітин з мікроядрами [4].

Проведене дослідження впливу антропогенного забруднення морських та прісних водних об'єктів на цитологічні показники риб *Mugil cephalus* та *Carassius auratus*, одержані на репрезентативних станціях у затоці Саронікос, поблизу м. Афіни (Греція), з високим і низьким рівнями антропогенного забруднення моря, та з рік Десна та Дніпро, поблизу м. Київ (Україна). Було отримано зразки тканин крові і зябер. Кров і зябра використовувалися для приготування цитологічних препаратів, на яких проводилось визначення частоти появи клітин з мікроядрами і подвійними ядрами, що відображає рівень генотоксичної дії присутніх у воді речовин.

Метою даної роботи було вивчення на рибах цитологічних біомаркерів генотоксичності у відповідь на антропогенне забруднення в морських і прісних водах, для подальшого застосування цих тестів у моніторингу відповідних водних об'єктів.

#### **Матеріали і методи.**

Матеріалом для роботи були 32 екземпляра *Carassius auratus gibelio* та 30 екземплярів *Mugil cephalus*. Риби *Carassius auratus gibelio* були отримані в дослідному рибному господарстві в Київській області. Адаптація риб до умов утримання в лабораторії тривала 30 діб. Морські риби *Mugil cephalus* були піймани під час експерименту на репрезентативних станціях у затоці Саронікос, поблизу м. Афіни (Греція), з високим і низьким рівнями антропогенного забруднення моря.

Риби *Carassius auratus gibelio* вагою 15-20 г, довжиною 80-100 мм вміщували у судини із зразками річкової води та із контрольною водою. Воду постійно насичували повітрям, щоб уникнути явища гіпоксії. Після 4 діб інкубації отримували зразки тканин для цитологічного аналізу. Для визначення дії природних вод на кількості клітин з наявністю порушень геному від кожної особини відбирали зразки тканин зябер і крові. Кров відбирали з хвостової вени, приготовані мазки фіксували в 96 % етанолі протягом 30 хв і забарвлювали за Романовським-Гімза. Фрагменти зябер фіксували сумішшю гліцерину, оцетової кислоти і води (1:1:10). Одержані відбитки тканин забарвлювали за Романовським-Гімза. Визначали наявність клітин з мікроядрами та подвійними ядрами. Препарати аналізували під світловим мікроскопом при загальному збільшенні  $\times 1000$ . На кожному препараті вивчали не менш 6000 клітин. Статистичну обробку даних проводили з використанням t-критерію Стьюдента,  $p < 0,05$  вважали статистично значущим.

#### **Результати та обговорення**

Одержані результати свідчать про наявність впливу антропогенного забруднення річкової води на частоту появи клітин крові з порушенням генетичного апарату. Кількість таких клітин у порівнянні із контролем зростає на порядок (1,75 проти 0,17 мікроядер на 1000 клітин, відповідно для крові риб, яких інкубували у зразках води з р. Дніпро та у лабораторній воді,  $p < 0,01$ ,  $n = 14$ ). Таке ж явище мало місце для кількості клітин крові з подвійними ядрами (0,33 проти 3,63 на 1000 клітин відповідно для риб, яких інкубували у лабораторній та дніпровській воді,  $p < 0,01$ ,  $n = 14$ ). Після інкубації у річковій воді суттєво збільшувалась кількість мікроядер у клітинах зябер карасів (0,33 проти 4,5 на 1000 клітин відповідно для контролю та групи риб, яких інкубували у дніпровській воді,  $p < 0,01$ ,  $n = 14$ ). Зростала також кількість клітин зябер з подвійними ядрами у риб, яких інкубували 4 доби у дніпровській воді (відповідно 0,167 проти 1,63,  $p < 0,05$ ,  $n = 14$ ), проте статистична похибка при вимірюванні цього показника на тканині зябер виявилась дуже значною.

Результати цитологічного аналізу тканин морських риб *Mugil cephalus*, визначення кількості клітин з наявністю мікроядер та подвійних ядер на тканинах зябер та крові дозволило виявити вплив антропогенного забруднення морської води на рівень порушень геному у досліджуваних тканинах риб. Співставлення кількості клітин крові з мікроядрами для риб, виловлених на станціях Перама та Анавісос, вказує та вірогідне збільшення таких клітин у районі Перама з наявністю забруднюючих факторів (2 проти 0,75 мікроядра на 1000 клітин, відповідно для районів

Перама та Анавісос,  $p < 0,05$ ,  $p = 15$ ). Ще більш вираженою ця різниця була для частоти клітин з подвійними ядрами (1,67 проти 0,38 на 1000 клітин відповідно для районів Перама та Анавісос,  $p < 0,01$ ,  $p = 14$ ). Така ж сама тенденція мала місце у випадку зябрової тканини, але знайдена різниця між рибами обох груп була статистично невірною. Так, кількість клітин з мікроядрами у зразках зябер становила 3,13 проти 2 на 1000 клітин, відповідно для Перама та Анавісос ( $p > 0,05$ ,  $p = 16$ ). Кількість клітин з подвійними ядрами становила 1,5 проти 0,75 на 1000 клітин відповідно для Перама та Анавісос ( $p > 0,05$ ,  $p = 16$ ).

### Висновки

Таким чином, наявність факторів антропогенного забруднення річкової та морської води призводить до активації процесів біотрансформації ксенобіотиків, з іншого боку, збільшенню кількості генетичних порушень в клітинах крові і зябрової тканини прісноводних риб. Ці результати з виявлення змін у генетичному апараті гідробіонтів під впливом полутантів прісної води, можуть бути екстрапольовані, певною мірою, на здоров'я людини, враховуючи той факт, що річкова вода є одним з основних джерел постачання питної води для населення України та інших країн Європи. Відносно прості та швидкі методи цитологічного аналізу тканин риб дозволяють проводити оцінку токсикологічного ризику присутності антропогенних забруднювачів прісної води.

### Література

1. *Архипчук В.В., Гончарук В.В.* Биотестирование качества воды на клеточном уровне // *Химия и технология водм*, 2001, т.23, №5. - С.531 -544.
2. *Al-Sabti K, Metcalfe CD.* 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res.* 343, 121-135.
3. *Cavas T., Ergene- Gozukara S.* 2005. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environ. Mol. Mutagen.* 46, 64-70.
4. *Lowe DM., Moore M.N., Evans B.M.* Contaminant impact on interactions of molecular probes with lisosomes in living hepatocytes from lab Limanda // *Acjuatie Toxicol.*, 1995, v.33. - P. 101-126.

### Резюме

Был проведен анализ частоты появления клеток с микроядрами и двойными ядрами в различных тканях пресноводных рыб *Carassius auratus gibelio*, морских рыб *Mugil cephalus* из загрязненного и чистого природного водоема. Загрязненная природная вода вызывала многократное увеличение ядерных нарушений после четырех дней инкубации.

The analysis of frequency of cells with micronuclei and double nuclei in various tissues of *Carassius auratus gibelio* and seas fishes *Mugil cephalus* from the polluted and clean natural reservoir has been performed. Polluted natural water caused the multiple increase of nuclear failures after four days of incubation.

**ВОЛЫНКИН В.А., ПОЛУЛЯХ А.А.**

*Национальный институт винограда и вина «Магарач» УААН  
Украина, 98600, Крым, г. Ялта, ул. Кирова, 31, e-mail: select\_magarach@ukr.net*

## РЕЛИКТОВЫЕ ЭНДЕМИЧНЫЕ ФОРМЫ ВИНОГРАДА КРЫМА ОТОБРАЖАЮЩИЕ ЭВОЛЮЦИОННУЮ ИЗМЕНЧИВОСТЬ КУЛЬТУРЫ

Согласно общему мнению всякое культурное растение произошло от дикого предка. По диким предкам можно судить о месте происхождения культурного растения и об его эволюции. Виноград чрезвычайно пластичное растение, и дикие сородичи культурного винограда относящегося к виду *Vitis vinifera L.* занимают большой ареал Евразии. Считается, что эволюция культурного винограда шла очень сложными путями. В каждом регионе под влиянием местных условий складывался свой сортимент аборигенных сортов или путем отбора из диких лоз, или завозом сортов, которые быстро скрещивались с местными ранее отобранными сортами. К местному сортименту каждого древнего региона впоследствии примешивались новые сорта более позднего происхождения и завозимые из отдаленных мест. Исследования, проведенные многими авторами, указывают на происхождение культурного винограда *Vitis vinifera ssp. sativa DC.* от форм дикого винограда *Vitis vinifera ssp. silvestris Gmel.* Негруль А.М. выделяет основные очаги формообразования этого культурного винограда: Западная Европа, страны бассейна Черного моря, Средняя и Передняя Азия, Ближний Восток и выделил три эколого-географические группы: западноевропейская - *Vitis vinifera sativa convar. occidentalis Negr.*, бассейна Черного моря – *Vitis vinifera sativa convar. pontica Negr.* и восточная – *Vitis vinifera sativa convar. orientalis Negr.*

Поскольку Крым входит в один из признанных очагов первичного происхождения винограда выявление и изучение форм дикого винограда и аборигенных сортов очень важно для выяснения вопросов происхождения винограда, формирования местного сортимента региона и эволюции культуры в целом.

### Материалы и методы

Объектами исследований являлись 84 аборигенных сорта винограда Крыма и 166 форм дикого винограда *Vitis vinifera ssp. silvestris Gmel.* популяций Ялта и Алушта, собранных в горном Крыму на высотах до 700 метров над уровнем моря и идентифицированных по ампелографическим признакам.

Описание сортов по комплексу ампелографических признаков проводили по методике МОВВ «Код описательных признаков сортов и видов *Vitis L.*» [1] и методике ампелографического описания и агробиологической оценки винограда [2]. Статистический анализ полученных данных проводили на IBM PC по программам, составленным Ю.К.Федоровым (НИВиВ «Магарач») и с использованием стандартных программ Microsoft Office. Программа кластерного анализа адаптирована для изучения признаков винограда Адибековым О.В. Для проведения дифференциации крымских сортов винограда были отобраны 84 признака, которые ранее были определены таксономически значимыми [3]. Дифференциация форм дикого винограда *Vitis vinifera ssp. silvestris Gmel.* проведена по комплексу 22 признаков взрослого листа [2].

### Результаты и обсуждение

В рамках выполнения программы международного проекта, проводимого под эгидой IPGRI, найдено 166 форм дикого винограда в районе долины реки Учан-Су (г. Ялта) и в бассейне водосбора реки Улу-Узень (г. Алушта), представляющего правый берег Алуштинской долины, которые были идентифицированы как относящиеся к *Vitis vinifera ssp. silvestris Gmel.* В результате описания этих растений по признакам взрослого листа, они были разделены на группы, которые соответствуют разновидностям *Vitis vinifera ssp. silvestris Gmel.*, выделенным ранее рядом исследователей [4-6], а также ранее не описанные:

1. *Vitis vinifera silvestris var. aberrans* Negr. Лист среднерассеченный или сильнорассеченный, пяти - семилопастный. Черешковая выемка открытая. Не опушенный или щетинистое опушение по нижней стороне листа или по жилкам.

2. *Vitis vinifera silvestris var. tipica* Negr. Лист слабо рассеченный, почти цельный, трех - реже – пятилопастный. Черешковая выемка открытая. Не опушенный, или паутинистое опушение по жилкам.

3. *Vitis vinifera silvestris var. tipica с рассеченными листьями.* Лист среднерассеченный или сильнорассеченный, пяти - семилопастный. Черешковая выемка открытая. Опушение паутинистое слабое по листу и по жилкам.

4. *Vitis vinifera silvestris var. taurica.* Лист слабо рассеченный, почти цельный, трехлопастный. Черешковая выемка открытая. Лист не опушенный, или имеется слабое щетинистое опушение по жилкам.

В популяциях дикого винограда выявлены формы, которые можно отнести к *Vitis vinifera silvestris var. taurica*. В дополнение к растениям с признаками этой группы в популяции Ялта выделены растения с цельным, трехлопастным листом, нижняя поверхность которого голая, или имеется слабое щетинистое опушение по жилкам. Выявленные отличия дают основание предполагать в перспективе выделение дополнительной разновидности *var. taurica*. Но наиболее ценным можно считать, что в Крыму найдены разновидности дикого винограда присущего только этому региону, что дает основание предполагать возможность выделения этого региона в самостоятельный субочаг происхождения культуры винограда.

Дискуссия о происхождении крымских аборигенных сортов винограда продолжается и в настоящее время. Эти сорта были выделены из старых насаждений Крыма – района Ялты, Алушты, Севастополя, и большая часть сортов была выделена из старых виноградников Судакского района (более 60 сортов). Выполненные нами исследования позволили выполнить дифференциацию 84 аборигенных сортов, как относящиеся к различным эколого-географическим группам: бассейна Черного моря – *Vitis vinifera sativa convar. pontica* Negr., западноевропейской - *Vitis vinifera sativa convar. occidentalis* Negr. и восточной - *Vitis vinifera sativa convar. orientalis* Negr. Установлено, что около половины (45%) составляют сорта восточной эколого-географической группы, 38% составляют сорта эколого-географической группы бассейна Черного моря, и 17% - сорта западноевропейской эколого-географической группы.

Кластерный анализ изученных и трёх контрольных сортов по 84 ампелографическим признакам, построенный на основании матрицы расстояний Махаланобиса, показал их распределение на три кластера: А, В и С.

В кластер А входят сорта, которые по морфобиологическим признакам сходны с сортами эколого-географической группы бассейна Черного моря. Для группы этих сортов характерны следующие признаки: коронка и молодые листочки опушены и имеют пепельный или белый оттенок; листья имеют сильное смешанное опушение на нижней поверхности, края листьев отгибаются неопределённо; грозди – средние, плотные, реже рыхлые (у столовых сортов), ягоды средние или мелкие, круглой, реже – овальной формы, с сочной мякотью; семена мелкие и среднего размера. В пределах кластера А сорта распределяются по типу опушения на два подкластера: а1, в котором объединяются 7 винных сортов с сильным паутинисто-щетинистым опушением нижней поверхности листа; и а2, в который объединяются столово-винный сорт Каганын изюм и столовый сорт Дардаган с сильным паутинистым опушением нижней поверхности листа. В свою очередь в пределах подкластера а1 отдельно объединяются сорта с черной ягодой СД 666 и Морской 19.

В кластер В входят сорта сходные по ряду морфобиологических признаков с сортами восточной эколого-географической-группы. Для них характерны следующие признаки: коронка и молодые листочки голые, блестящие; листья с отгибающимися

вверх краями не опушены, или имеют щетинистое опушение; грозди средние, рыхлые, часто ветвистые; ягоды в большинстве случаев овальной, яйцевидной или удлинённой формы, средние и крупные с мясисто-сочной или хрустящей мякотью; большинство сортов с белыми ягодами; семена средние и крупные с длинным носиком. В пределах кластера В чётко выражена дифференциация сортов по типу опушения на два подкластера: b1 и b2. В подкластер b1 входят сорта Морской-94 и Кона, имеющие густое щетинистое опушение на нижней поверхности. Подкластер b2 составляют сорта с неопушенным листом, которые в свою очередь в пределах этого подкластера распределяются на две группы по окраске ягоды: Кефесия, Асма, СД 58, Шабаш черный, Кутлакский черный – сорта с черной ягодой, и Шабаш крупноягодный, СД 40, СД41, Солнечнодолинский - сорта с белой ягодой.

В кластер С входят сорта, которые по морфобиологическим признакам сходны с сортами западноевропейской эколого-географической группы. Они отличаются следующими признаками: коронка и молодые листочки опушены слабо; листья с отгибающимися вниз краями, имеют паутинистое опушение; грозди небольшие, плотные; ягоды круглые, реже – овальные, мелкие и среднего размера, с сочной мякотью; семена мелкие с небольшим носиком; сорта в основном винного направления. В пределах кластера С сорта распределяются по цвету ягоды на два подкластера: с1 – сорта с черной ягодой, и с2 – сорта с белой ягодой.

Таким образом, есть основание предполагать возможность уточнения и совершенствования классификации сортов винограда в пределах эколого-географических групп.

Ряд авторов считает [9-11], что почти все местные сорта Крыма завезены из Европы и Закавказья. Тем не менее, известно, что виноградарство в Крыму берет начало с древних времен. Ещё до основания греческих колоний тавры готовили вино, возможно из местного дикого винограда. С нашествием гуннов, хазар, печенегов, половцев и татар край подвергся разорению, и виноградарство приходило в упадок. Возможно, в периоды упадка виноградарства в Крыму терялись культивируемые до этого сорта винограда, а со сменой господствующих культур завозились новые сорта, которые на месте приобретали новые названия. Однако сорт Манжил ал, по свидетельству старожилов, введен в культуру из зарослей дикорастущего винограда, сохранившегося до сих пор на склонах горы Манжил [12]. По мнению ряда исследователей, доказательством местного происхождения некоторых сортов винограда является сходство по ряду морфологических признаков культурных сортов с диким виноградом, произрастающим в этом регионе [4,13]. В частности сорт Херсонесский по ряду морфологических признаков похож на дикий виноград и распространен в ограниченном ареале, охватывающем район, прилегающий к Севастополю [14].

### **Выводы**

Поскольку Крым относится к бассейну Черного моря, следовало бы предполагать, что все аборигенные сорта винограда должны относиться к данной эколого-географической группе. Однако наличие сортов, относящихся к другим группам, говорит, что часть из них была когда-то завезена в Крым. Тем не менее, также есть основание предполагать, что первичное формирование аборигенных сортов винограда происходило на основе отбора от дикого винограда Крыма, но позднее эти сорта либо были замещены ввезенными, либо скрестились с ними. Выполненный же кластерный анализ позволяет говорить о перспективе уточнения классификации винограда в пределах эколого-географических групп. Существование в настоящее время в Крыму реликтовых эндемичных форм дикого винограда *Vitis vinifera ssp. silvestris Gmel.* позволяет предположить возможность выделения этого региона в самостоятельный субочаг происхождения культуры винограда, что ценно для изучения эволюции культуры.

## Литература

1. *Code des caracteres descriptifs des varietes et especes de Vitis*. - Paris: Office international de la vigne et du vin (OIV), 1983. – 56 p.
2. Мелконян М.В., Волькин В.А. Методика ампелографического описания и агробиологической оценки винограда.- Ялта: ИВиВ «Магарач», 2002.- 27 с.
3. Полулях А.А. Характеристика сортов *Vitis vinifera pontica balcanica Negr.* по комплексу ампелографических признаков и спектрам изоферментов. – Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук. – Ялта, 1998.- 16 с.
4. Негруль А.М. Происхождение культурного винограда и его классификация // Ампелография СССР / под ред. проф. Фролова-Багреева А.М. - М.: Пищепромиздат, 1946. - Т. 1. - С. 159-216.
5. Маликов В.М. Дикорастущий виноград на древних и средневековых поселениях Крыма как исходный материал для селекции и пополнения сортового фонда // Автореферат на соиск. уч.ст. канд. с.-х.н., Кишинев, -1968. – 21 с.
6. Янушевич З.В., Пелях М.А. Дикорастущий виноград Молдавии – Кишинев: Редакционно-издательский отдел Академии наук Молдавской ССР. – 1971. – 107 с.
7. Рамшвили Р.М. Дикорастущий виноград Закавказья // Тбилиси: «Ганатлеба». – 1988. – 124 с.
8. Трошин Л.П. Ампелография и селекция винограда. – Краснодар: «Вольные мастера», 1999. – 106 с.
9. Коржинский С.И. Ампелография Крыма. – С.-Петербург: Типография Главного Управления Уделов, 1904. – 201 с.
10. Иванов А.А. Крымские аборигенные сорта винограда.- Симферополь: Крымиздат, 1947.- 79 с.
11. Негруль А.М. Археологические находки семян винограда // Советская археология.- 1960.- № 1.- С. 111-119.
12. Мищенко И.Л. Сорт Манжил ал. Ампелография СССР. Малораспространенные сорта винограда. Т. II.- М.: «Пищевая промышленность», 1966. - С. 311-312.
13. Негруль А.М., Иванов И.К., Катеров К.И., Дончев А.А. Дикорастущий виноград Болгарии / Под ред. Катерова К.И. – М.: Колос, 1965. – 77 с.
14. Дашкевич А.В. Сорт Херсонесский. Ампелография СССР. Малораспространенные сорта винограда. Т. III.- М.: «Пищевая промышленность», 1966. - С. 338-339.

## Резюме

Отмечено существование связи между диким виноградом Крыма, относящимся к *Vitis vinifera ssp. silvestris Gmel.* и аборигенными сортами Крыма, относящимися к *Vitis vinifera ssp. sativa DC.* Выявлена возможность совершенствования классификации винограда в пределах эколого-географических групп. Реликтовый эндемичный виноград Крыма указывает, что этот регион является субочагом происхождения культуры.

Відмічено існування зв'язку між диким виноградом Криму, що відноситься до *Vitis vinifera ssp. silvestris Gmel.* і аборигенними сортами Криму, що відносяться до *Vitis vinifera ssp. sativa DC.* Виявлена можливість вдосконалення класифікації винограду в межах еколого-географічних груп. Реліктовий ендемічний виноград Криму указує, що цей регіон є субрегіоном походження культури.

Existence of connection is marked between the wild grapevines of Crimea, related to *Vitis vinifera ssp. silvestris Gmel.* and by the autochthonous varieties of Crimea, related to *Vitis vinifera ssp. sativa DC.* Possibility of perfection of classification of grapevine is exposed

within the limits of ecology-geographical groups. The relict endemic grapevine of Crimea specifies that this region is the sub region of culture origin.

**ГОРДЕЙ И. А., БЕЛЬКО Н. Б., ЛЮСИКОВ О. М.**

*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси*

*Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: I.Gordej@igc.bas-net.by*

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ФОРМИРОВАНИЯ ГЕНОМА СЕКАЛОТРИТИКУМ

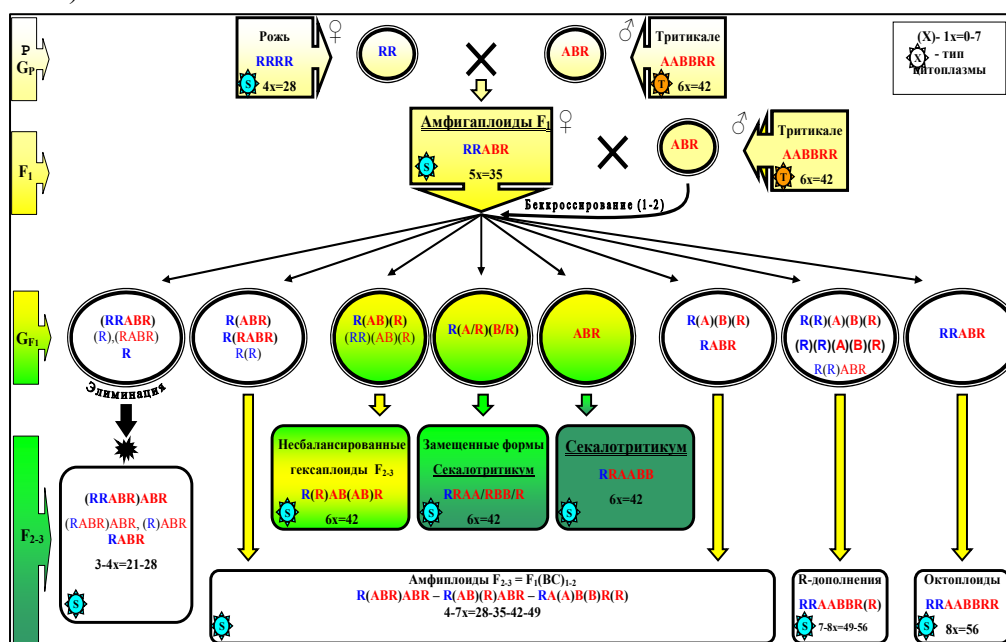
Полиплоидия является важнейшим фактором эволюции культурных злаков. Об этом свидетельствуют *естественные* полиплоидные ряды у пшеницы, овса, ячменя и других родов. Виды с наибольшим числом хромосом имеют наиболее широкий ареал распространения и использования в сельскохозяйственном производстве: например, гексаплоидные ( $2n = 42$ ) и тетраплоидные ( $2n = 28$ ) виды пшеницы, гексаплоидные виды тритикале и овса. По образному выражению П. М. Жуковского, «человечество питается в основном продуктами растительной полиплоидии» [1].

С целью усиления экспрессии генома ржи и повышения адаптивного потенциала тритикале к почвенно-климатическим условиям Беларуси нами проводятся исследования по созданию принципиально нового типа ржано-пшеничных амфидиплоидов с цитоплазмой ржи – секалотритикум. Создание секалотритикум направлено на решение следующих проблем:

- усиление экспрессии генома ржи и повышение адаптивного потенциала тритикале;
- расширение генофонда и увеличение генотипической изменчивости пшенично-ржаных амфидиплоидов;
- повышение зимостойкости, устойчивости к болезням и экологической адаптивности;
- расширение ареала распространения тритикале.

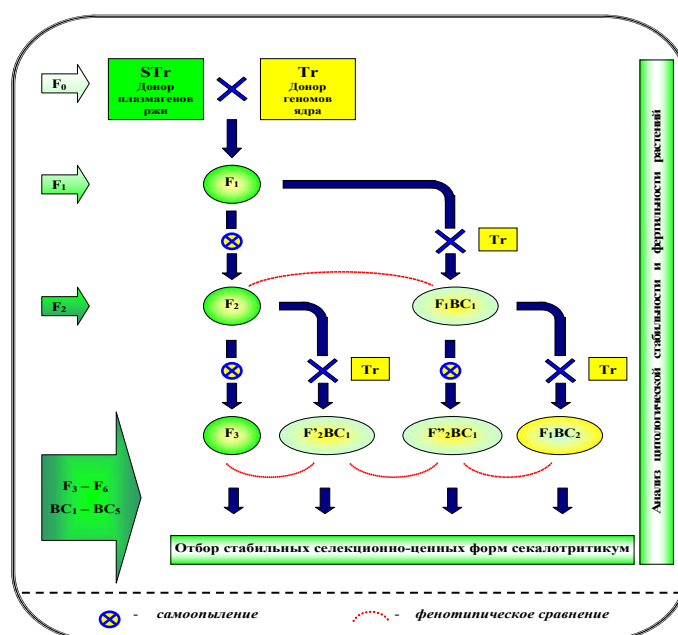
### Материалы и методы

Методика синтеза секалотритикум основана на использовании в качестве источников ржаного генома современных высокоурожайных сортов тетраплоидной ржи (RRRR,  $4x=28$ ), а пшеничных геномов – гексаплоидных тритикале (AABBRR,  $6x=42$ ):





**Рисунок 1.** Схема создания ржано-пшеничных амфидиплоидов – секалотритикум (А.с. 1734602) [2, 3].



**Рисунок 2.** Схема рекомбинационного синтеза вторичных секалотритикум

### Результаты и обсуждение

Для ускорения процесса создания селекционно-ценных форм секалотритикум и формирования их полигенома исследовали эффективность новых подходов и генетических факторов:

- использование в качестве источников ржаного генома современных высокоурожайных сортов тетраплоидной ржи (RRRR,  $4x=28$ ), а пшеничных геномов – гексаплоидных тритикале (AABBRR,  $6x=42$ );
- использование вида-посредника («bridge species») – тритикале для преодоления прогамной односторонней несовместимости ржи с пшеницей путем ингибирования S-РНКаз ржи;
- использование 1-2-кратного беккрасса и создание гетерогенности между ржаными геномами от ржи и тритикале;
- диплоидное состояние генома ржи (RR) в составе полигенома ржано-тритикальных гибридов  $F_1$  (RRABR,  $5x=35$ );
- промоторный эффект тройной дозы генома ржи на гомеологичную конъюгацию хромосом у гибридов  $F_1$ ;
- редукционное и эквационное деление унивалентов в  $A1$ , образование микроядер и их последующая элиминация у гибридов  $F_1$ , частичная мейотическая нередукция;
- разнообразие жизнеспособных гамет и потомств ржано-тритикальных гибридов  $F_1$  и амфидиплоидов  $F_1 BC_1$ ;
- утилизация несбалансированных по хромосомному составу ржано-тритикальных амфидиплоидов  $F_1 BC_1$ ;
- гетероплазматический эффект – более полная экспрессия генома ржи в своей цитоплазме;
- интрогрессивная гибридизация секалотритикум с тритикале.

Прямые скрещивания ржи с пшеницей (RR x AABBDD, RRRR x AABBDD) оказались безрезультатными вследствие сильной реакции односторонней

несовместимости. Молекулярно-биохимические исследования показали, что самонесовместимые (СН) виды, к которым относится рожь (*Secale cereale* L.), содержат S-специфические РНКазы, которые деградируют РНК пыльцы самосовместимых (СС) видов, в данном случае пшеницы (*Triticum aestivum* L.), что вызывает ингибирование и остановку роста пыльцевых трубок, которые не достигают завязи, и не проходит оплодотворение яйцеклеток [4].

Для преодоления односторонней несовместимости ржи с пшеницей нами использован вид-посредник ("bridge species"). Наиболее близким видом-посредником для гибридизации ржи с пшеницей являются тритикале, содержащие в своем полигеноме геномы пшеницы (АВ) и ржи (R), что позволило существенно снизить прогамную несовместимость тетраплоидной ржи (RRRR,  $4x=28$ ) с гексаплоидными тритикале (AABBRR,  $6x=42$ ). Данный эффект обусловлен наличием в пыльце тритикале ингибиторов S-РНКазы ржи, состоящих из специфических доменов. Один домен S-аллельспецифичен и обеспечивает сохранение активности соответствующих S-РНКаз ржи. Второй домен – видоспецифичен и способен связывать и ингибировать пестичные РНКазы того вида, что и пыльца, т.е. РНКазы ржи.

Цитологический анализ показал, что ключевым этапом процесса формирования генома секалотритикум является геномный состав ржано-тритикальных пентаплоидов  $F_1$  (RRABR,  $5x=35$ ), специфичность их мейоза и хромосомный состав жизнеспособных гамет [5].

Установлено, что тройная доза генома ржи (Edu - генов на хромосомах 5R, 6R и 7R) у пентаплоидов  $F_1$  (RRABR) - обуславливает промоторный эффект на гомеологичную конъюгацию хромосом и эквационное деление унивалентов в А1. При этом число закрытых и открытых бивалентов достигает 14 вместо теоретически ожидаемых 7. Наличие наряду с редукционным эквационного деления унивалентов у ржано-тритикальных пентаплоидов  $F_1$  (RRABR) разделение унивалентов на хроматиды в А1, приводит к формированию микроядер (1-17 на тетраду), которые не вовлекаются в дальнейший цикл деления и элиминируют.

Специфичность мейоза у ржано-тритикальных пентаплоидов  $F_1$  (RRABR) обуславливает формирование жизнеспособных женских гамет с различным числом хромосом (14-21) и широкий диапазон распределения растений по числу хромосом у гибридов  $F_1$  (BC<sub>1</sub>) с варьированием в пределах 35-49 [4]. Регулярное деление хромосом базового диплоидного RR-генома ржи обеспечивает относительно высокую функциональность (жизнеспособность и фертильность) формирующихся гамет гибридов. Фертильность пыльцы и колоса ржано-тритикальных гибридов  $F_1$  составляла в среднем 10,5% и 5,7% соответственно. Гексаплоидные растения  $F_1$ (BC)<sub>1</sub> выщеплялись с частотой не менее 11-17%. Из них 15 – 20 % были гексаплоидными высокофертильными геномно сбалансированными формами секалотритикум [6].

Специфичность мейоза у ржано-тритикальных пентаплоидов  $F_1$  (RRABR,  $5x=35$ ) и особенности спорогенеза являются основой для использования их в синтезе новых форм секалотритикум, хромосомной реконструкции и создания хромосомно-замещенных форм, а также для получения рекомбинантных форм секалотритикум и тетраплоидной ржи.

С целью достижения амфидиплоидного уровня у секалотритикум, проводили 1-2-кратный беккросс ржано-тритикальных пентаплоидов  $F_1$  (RRABR,  $5x=35$ ) на тритикале. В результате также достигали гетерогенности между ржаными геномами от тетраплоидной ржи и гексаплоидных тритикале.

Явление элиминации отдельных хромосом у ржано-тритикальных гибридов  $F_1$  открывает широкие возможности для реконструкции генома секалотритикум путем замещения элиминированных хромосом А, В и R геномов на гомеологичные хромосомы D-генома пшеницы, ответственные за хлебопекарные свойства. На основе этого явления разработан метод создания ржано-пшеничных хромосомно-замещенных форм

секалотритикум. По данной схеме A/B/D/R-ржано-пшеничные гексаплоидные хромосомно-замещенные формы секалотритикум (RRAABB,  $2n=6x=42$ ) создаются на основе гибридизации тетраплоидной ржи (RRRR,  $2n=4x=28$ ) с гексаплоидными тритикале (AABBRR,  $2n=6x=42$ ) с последующим скрещиванием ржано-тритикальных гибридов  $F_1$  (RRABR,  $5x=35$ ) в качестве материнской формы с мягкой пшеницей (AABBDD,  $2n=6x=42$ ). Идентификация хромосомно-замещенных форм осуществляется с применением методов дифференциального окрашивания хромосом.

Результаты селекционно-генетического анализа показывают, что создание новых форм секалотритикум не приводит к быстрому успеху. Первичные секало-тритикумы нуждаются в рекомбинационной селекции для получения рекомбинантных генотипов. Наиболее результативными в селекции секалотритикум могут быть рекомбинации на гексаплоидном уровне путем различных типов скрещиваний первичных секалотритикум и тритикале между собой (рис. 2).

### **Выводы**

1. Использование тритикале в качестве вида-посредника («bridge species») позволило преодолеть прогамную несовместимость тетраплоидной ржи с гексаплоидными тритикале и получить ржано-тритикальные гибриды.
2. Применение 1-2-кратного беккрасса ржано-тритикальных пентаплоидов  $F_1$  (RRABR,  $5x=35$ ) на тритикале позволяет достигать амфидиплоидного уровня секалотритикум и создавать гетерогенность между ржаными геномами от тетраплоидной ржи и гексаплоидных тритикале.
3. Наличие базового диплоидного генома ржи (RR) у ржано-тритикальных гибридов  $F_1$  обеспечивает относительно высокую функциональность (жизнеспособность и фертильность) и способствует разнообразию формирующихся у них гамет.
4. Выявлена более полная экспрессия ядерного генома ржи в своей цитоплазме по степени проявления признаков, характеризующих зимостойкость и устойчивость к биотическим и абиотическим факторам среды.
5. Явление элиминации отдельных хромосом у ржано-тритикальных гибридов  $F_1$  позволило экспериментально обосновать метод хромосомной реконструкции генома секалотритикум путем замещения элиминированных хромосом A, B и R геномов на гомеологичные хромосомы D-генома пшеницы, ответственные за хлебопекарные свойства.
6. Использование в качестве источника ржаного генома современных высокоурожайных сортов тетраплоидной ржи (RRRR,  $2n=4x=28$ ), а пшеничных геномов – гексаплоидных тритикале (AABBRR,  $2n=6x=42$ ), позволило создать и включить в селекционный процесс новый генофонд ржано-пшеничных амфидиплоидов с цитоплазмой ржи - секалотритикум.
7. Для создания селекционно-ценных форм секалотритикум наиболее эффективным подходом является рекомбинация на гексаплоидном уровне путем различных типов скрещиваний первичных секалотритикум и тритикале между собой.

### **Литература**

1. Жуковский П.М. Эволюция культурных растений на основе полиплоидии / В кн. «Полиплоидия и селекция». Москва-Ленинград, 1963. – с. 5 – 17.
2. Гордей И.А., Гордей Г.М., Новикова Л.В. Создание ржано-пшеничных амфидиплоидов (секалотритикум) // Генетика. 1996. Т.32. № 6, С. 783-787.
3. Гордей Г. М., Гордей И. А., Новикова Л. В., Клименко Е. П. Способ получения секалотритикум. А. с. 1734602. 1992.
4. Ермишин А.П. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2001. № 3. С. 105–118.
5. Гордей И.А. Новые генетические подходы и методы селекции тритикале (учебное пособие) / Мн.: 2000. НАНБ, 25 с.
6. Люсиков О.М., Белько Н. Б., Щетько И. С., Гордей И.А. Создание ржано-пшеничных амфидиплоидов с цитоплазмой ржи – секалотритикум (RRAABB,  $2n=42$ ):

особенности мейоза у ржано-тритикальных гибридов F<sub>1</sub> (RRABR, 5x=35) // Генетика. 2005. Т. 41. № 7. С. 902 - 909.

### **Резюме**

В статье изложены результаты исследований новых подходов и генетических факторов формирования аллоплоидного генома ржано-пшеничных амфидиплоидов с цитоплазмой ржи – секалотритикум. Представлено экспериментальное обоснование хромосомной реконструкции генома ржано-пшеничных амфидиплоидов в связи с селекцией на продуктивность, хлебопекарные свойства и устойчивость к биотическим и абиотическим факторам.

The article presents the results of studying new approaches and genetic factors of allopolyploid genome formation in rye-wheat amphidiploids with rye cytoplasm – secalotriticum. Chromosome reconstruction of rye-wheat amphidiploid genome is experimentally substantiated in view of breeding for productivity, baking properties and resistance to biotic and abiotic factors.

**ДЕНИСЮК П.В.**

*Институт свиноводства им. А.В.Квасницкого УААН  
Украина, 36006, Полтава, Шведская Могила*

## **ОСЦИЛЛЯТОРНАЯ ГИПОТЕЗА ГЕТЕРОЗИСА**

Гетерозис – мощное развитие гибридов в сравнении с родительскими формами [13]. Глубже познав природу гетерозиса мы сможем повысить с его помощью (ре)продуктивный потенциал гибридных животных. Существующие теории объясняют гетерозис ещё не полно. Поэтому и прогнозирование комбинационной способности животных сочетаемых специализируемых линий остаётся актуальной проблемой. Выдвижение теорий, объясняющих гетерозис, продолжается [2, 3, 14]. Нерешённым остаётся и вопрос, правомерна ли гипотеза физиологического гетерозиса [25]. Хотя исследователи гетерозиса признают, что он определяется не только генетическими, но и негенетическими факторами, представления о влиянии среды на выраженность этого явления остаются самыми общими: животных необходимо хорошо кормить, их необходимо содержать в хороших условиях. Изложенные проблемы, анализ данных собственных экспериментов и литературы определили цель настоящей статьи: развить новую – осцилляторную - гипотезу гетерозиса, обратив при этом особое внимание на взаимодействие генетических и негенетических факторов в его проявлении.

### **Материалы и методы**

Материал исследования – собственные и литературные данные. Основной метод данного исследования – аналитико-синтетический.

### **Результаты и обсуждение**

Ещё [30] считал, что стимуляция развития гибридов „является чисто физиологическим феноменом“. „Проявление гетерозиса связано, - писал [23], - в большинстве случаев с признаками, выраженность которых сильно зависит от условий внешней среды“. По [21], в основе гетерозиса по количественным признакам нет прямых генетических механизмов. Гетерозис может обуславливаться взаимодействием генотипа и среды [31]. В изменчивости репродуктивных признаков гибридного молодняка свиней доля влияния генотипа составляет от 9,4 до 19% [18].

К развитию представлений о важной роли среды в проявлении гетерозиса мы пришли, обнаружив, что культивирование эмбрионов свиньи при осциллирующем (изменяющемся синусоидально) рН питательной среды значительно улучшает их

развитие по сравнению с культивированием их при стабильном рН [6]. На основании этих и литературных данных был сделан вывод о том, что лучше содержать животных в осциллирующих условиях [7] и кормить их осцилляторно [9, 10], - так, чтобы количество скармливаемого в день корма изменялось от одного дня к другому синусоидально. И были предложены [8] основы осцилляторной гипотезы гетерозиса.

Исходя из того, что всё состоит из противоположностей (см. [11]), что „ритм есть универсальной особенностью движения материи“ [1], что ритмически изменяются величины практически любого признака организма [12] и любого параметра среды, что эти ритмические изменения протекают и волнообразно [4, 15, 22, 24], мы приняли, что любые изменения происходят одновременно и незакономерно, или флуктуационно, и закономерно, или осцилляторно.

Гипотезам, объясняющим гетерозис с генетических позиций, противопоставляется гипотеза, объясняющая его с физиологических позиций. Считается, что эти взаимопротивоположные объяснения несовместимы. На самом же деле совмещение любых противоположностей может реализовываться непрерывно путём их взаимоперехода в пространстве и времени [26], который осуществляется, с нашей точки зрения, одновременно и осцилляторно и флуктуационно. Например, так осуществляется непрерывный взаимопереход между максимальной и минимальной величинами температуры среды. Следовательно, противоположные гипотезы могут дополнять друг друга. Активность генетических и активность негенетических (средовых) факторов, определяющих гетерозис, могут взаимопереходить так же, как и любые другие противоположности, одновременно и флуктуационно, и осцилляторно. Ведь ритмично изменяется не только активность среды, но и активность ядра [17], и экспрессия генов [28].

Активность генома и активность среды не только взаимопереходят друг в друга, но и активность генома может определяться активностью внешней среды. В настоящее время считается доказанным, что гетерозис, проявляется в основном по признакам с низким коэффициентом наследуемости, а воспроизводительные качества обладают низкой наследственной детерминацией, и эффект гетерозиса по ним наиболее реален [16]. Считаем, что можно утверждать, что чем больше выраженность гетерозиса за каким-либо признаком организма, тем больше экспрессия генов, влияющих на данное качество организма, определяется условиями внешней среды.

Благодаря взаимопереходу активности генома и активности среды и благодаря тому, что экспрессия гена может определяться условиями внешней среды, на выраженность гетерозиса можно повлиять и её изменениями. Мы предполагаем, что по мере перехода условий среды из одного их противоположного состояния в другое через условное положение равновесия, вокруг которого условия среды осциллируют-флуктуируют, всё больше усиливается экспрессия одной генетической противоположности и всё больше ослабляется экспрессия другой генетической противоположности. При движении условий среды в обратную сторону всё происходит наоборот. Мы считаем, что гетерозис может возникать за счёт повышения соответствия или генотипа существующим условиям среды, или условий среды существующему генотипу. Первое возможно в случае сочетания организмов – генетических противоположностей. Второе возможно в случае, если условия среды организма подвергаются биоритмической осцилляции-флуктуации или не подвергаются избыточной стабилизации, как в случае холодного содержания животных. Именно биоритмическая осцилляция-флуктуация условий среды, то есть чередование противоположных её состояний, создаёт поочередно условия для проявления то одних, то других генетических противоположностей гибрида. Генетической основой возможности получения генетического-физиологического гетерозиса могут быть различные генетические противоположности: аллели одного гена гетерозиготы, два

разных гена [27, 29, 32], два множества генов или полигенов [3, 20], которые детерминируют взаимопротивоположные структуры-функции организма.

Доминантность альтернирующая, доминирование обратимое (см. [5]), указывают на то, что доминантность и рецессивность могут взаимопереходить друг в друга при взаимопереходе противоположных (состояний) условий среды. Осцилляция-флуктуация условий среды может разводит продукты экспрессии генетических противоположностей в пространстве-времени, уменьшая нейтрализацию одного продукта другим, позволяя им взаимодействовать друг с другом не доминантно-рецессивно, а кодоминантно и даже наддоминантно, - то есть истинно гетерозисно.

Осциллирующая-флуктуирующая величина параметра среды изменяется наиболее медленно в окрестностях максимума и минимума, - здесь условия среды наиболее стабильны. По нашему мнению, эти противоположности среды позволяют образовываться организмам, являющимся противоположностями за их фенотипом-генотипом и позволяют человеку создавать, в результате селекции, противоположные друг другу, и при этом сочетаемые, специализированные линии животных.

Нормальное распределение животных группы по величине гетерозисного признака показывает, что преобладающее большинство животных может образовать такую гетерозисную пару, в пределах которой генетический контраст мал и требует, соответственно, такого же малого контраста условий среды. Нормальное распределение параметра среды, например, температуры, на протяжении года, показывает, что такой малый размах изменений температуры тоже преобладает. Откуда, чем больший генетический контраст между животными гетерозисной пары, тем относительно меньше существует таких животных, из которых можно сформировать гетерозисную пару, и тем реже встречаются условия среды с относительно большой величиной контраста, необходимой для полной реализации генетического контраста. Вот почему большой гетерозис случается в природе редко и, причём, тем реже, чем он больше.

„Приспосабливать животных к условиям современных технологий селекцией, писали [19], – трудоёмкий, очень дорогой и достаточно длительный процесс. Ожидать существенных изменений в генетически закодированных приспособлениях животных в течение ближайших десятилетий – бесполезное дело. Более коротким и продуктивным ... есть путь максимального удовлетворения унаследованных потребностей организма. (Необходимо) ... приближать условия среды относительно вековых приспособлений животных к ним“. Мы считаем, что создание биоритмически осциллирующих-флуктуирующих условий среды содержания и кормления животных не только повысит их (ре)продуктивный потенциал, но и может стать мощным фактором экспериментальной эволюции организмов.

**Выводы.** Именно биоритмическая осцилляция-флуктуация условий среды, или синусоидальный взаимопереход между максимальной и минимальной величиной её параметра, или чередование её (среды) противоположностей, создаёт поочередно условия для проявления то одних, то других генетических противоположностей гибрида и порождает, таким образом, гетерозис.

#### **Литература**

1. Алякринский Б.С., Степанова С.И. По закону ритма. – М.: Наука, 1985. - 275 с.
2. Бекенев В.А. Селекция свиней. - Новосибирск, 1997. – 184 с.
3. Близнюченко А.Г. Генетика гетерозиса // Вісн. Полт. держ. аграрн. акад. - 2004. - № 4. - С. 75 - 80.
4. Бьюнинг Э. Биологические часы. - В кн.: Биологические часы. - М.: Мир, 1964. - С. 11 - 26.
5. Глазко В.И., Глазко Г.В. Русско-англо-украинский толковый словарь по прикладной генетике, ДНК-технологии и биоинформатике. Киев: КВІЦ, 2001. – 588 с.
6. Денисюк П.В. Вплив рН середовища на розвиток in vitro доімплантаційних ембріонів свині // Автореф. дис. ... к.б.н. - Харків, 1997. - 25с.

7. Денисюк П.В., Чирков О.Г. Теоретичні та експериментальні основи осциляторного способу утримання птахів і свавців // Наук. Вісн. Львів. нац. акад. вет. мед. ім. С.З.Гжицького. – 2004. – Т. 6. - № 3. – Ч. 3. – С. 42 – 52.
8. Денисюк П.В. Основи фізіологічного підвищення продуктивності тварин // Вісн. Полт. держ. аграрн. акад. – 2005. – № 3. - С. 43 – 46.
9. Денисюк П.В. Основи осциляторної годівлі // Свинарство. – Полтава, 2007. – С. 101 – 106.
10. Денисюк П.В., Мартиненко Н.А., Лобченко В.О. та ін. Спосіб ритмічної годівлі тварин. – Патент України на винахід. - № 78254. – МПК (2006), А01К 67/00, А23К 1/00, А61D 99/00. - 2007, Бюл. № 3.
11. Донцов А.И., Баксанский О.Е. Схемы понимания и объяснения физической реальности // Вопр. философии. – 1998. - № 11. – С. 75 – 90.
12. Доскин В.А., Лаврентьева Н.А. Ритмы жизни. - М.: Медицина. - 1991. – 172 с.
13. Дубинин Н.П. Теоретические основы и методы работ И.В. Мичурина. – М.: Просвещение, 1966. – 184 с.
14. Коваленко В.П. Проблеми отримання багатократного гетерозису в тваринництві // Наук. вісн. Львів. держ. акад. вет. мед. ім. С.З. Гжицького. – 2000. – Т. 2. - № 2. – Ч. 3. – С. 52 – 54.
15. Малиновский Ю.М. Недра – летопись биосферы. – М.: Недра, 1990. – 159 с.
16. Михайлов Н.В., Мамонтов Н.Т. Проблемы селекции и гибридизации свиней. – В сб. науч. тр. XIV междунар. н.-п. конф. по свиноводству. – Ульяновск, 2007. – Т. 1. – С. 265 – 273.
17. Нейхаф А.А. Использование метода радиационной инактивации ядер для исследования их функции в раннем развитии рыб // Журн. общ. биол. – 1959. – Т. 20. – Вып. 3. – С. 202 – 213.
18. Рябко В.М. О приоритетах селекции свиней. В сб. VIII междунар. н.-п. конф. 05 – 07.09.2001. – Москва – Быково. – 2001. – С. 185 – 186.
19. Савчук Д.І., Полупан Ю.П., Сохацький П.С., Гаєвий В.В. Реакція великої рогатої худоби на деякі фактори середовища // Біологія тварин. – 2001. – Т. 3. - № 1. – С. 41 – 52.
20. Струнников В.А. Новая гипотеза гетерозиса: её научное и практическое значение // Вестн. сельскохоз. науки. – 1983. - № 1. – С. 34 – 40.
21. Струнников В.А. Третья изменчивость // Природа. – 1989. - № 2. – С. 17.
22. Фёдоров В.И. Рост, развитие и продуктивность животных. М.: Колос, 1973. - 272 с.
23. Хаджинов М.И. Теоретические основы селекции растений. – М., Л.: Сельхозгиз. – 1935. – Т. 1. – С. 435 – 462.
24. Чижевский А.Л. Земля в объятиях Солнца. – М.: Эксмо, 2004. – 928 с.
25. Шахбазов В.Г., Чешко В.Ф., Шерешевская Ц.М. Механизмы гетерозиса. – Харьков: Основа, 1990. – 120 с.
26. Югай Г.А. Философские проблемы теоретической биологии. – М.: Мысль, 1976. – 247 с.
27. Arunachalam V. Heterosis for characters governed by two genes // J. Genet. – 1977. – V. 63. – P. 15 – 24.
28. Kennaway D.J., Varcoe T.J., Mau V.J. Rhythmic expression of clock and clock-controlled genes in the rat oviduct // Mol. Hum. Reprod. – 2003. – V. 9. – N. 9. – P 503 – 507.
29. Omholt S.W., Plahte E., Oyehaug L., Xiang K Gene Regulatory Networks Generating the Phenomena of Additivity, Dominance and Epistasis // Genetics. – 2000. - V. 155. – P. 969-980.
30. Shull G.H. Duplicate genes for capsule form in Bursa bursapastoris // Zeitschr. Abstamm. und Vererbungst. – 1914. – Bd. 12. – S. 97 – 149.

31. Xu Z.C., Zxu J. An approach for predicting heterosis based on an additive, dominance and additive - additive model with environment interaction // *Heredity*. – 1999. – V. 82. – Pt. 5. – P 510 – 517.
32. Yu S.B., Li J.X., Xu C.G. et al. Importance of epistasis as the genetic basis of heterosis in an elite rice hybrid // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1997. – V. 94. – P. 9226 – 9231.

#### **Резюме**

*Изложена осцилляторная гипотеза гетерозиса, согласно которой взаимопереход противоположных состояний осциллирующей-флуктуирующей среды создаёт поочередно условия для выражения то одних, то других генетических противоположностей гибрида и порождает таким путём гетерозис.*

*Викладена осциляторна гіпотеза гетерозису, за якою взаємоперехід протилежних станів осцилюючого-флуктуючого середовища створює почергово умови для прояву то одних, то других генетичних протилежностей гібриду і породжує у такий спосіб гетерозис.*

*It is described oscillatory hypothesis of heterosis by which mutual transition between opposite states of oscillating-fluctuating environment creates alternately conditions for manifestation of one and second genetic opposites of hybrid and originates in this way heterosis.*

**ДУБОВЕЦ Н.И., СЫЧЕВА Е.А., СОЛОВЕЙ Л.А., ШТЫК Т.И., БОНДАРЕВИЧ Е.Б.**

*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,*

*Беларусь, 220027, Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: N.Dubovets@igc.bas-net.by*

## **КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ГЕНОМА ТЕТРАПЛОИДНЫХ ТРИТИКАЛЕ**

Исследования последних лет, проведенные на различных растительных системах как естественного, так и искусственного происхождения с применением молекулярных технологий, показали, что генезис аллополиплоидных форм сопровождается кардинальными геномными преобразованиями и модификациями. Часть этих изменений происходит на ранних стадиях формирования аллополиплоида и обеспечивает его цитологическую и генетическую диплоидизацию [1]. Другие изменения возникают спорадически на протяжении длительного периода жизни полиплоидных видов, и их роль сводится к повышению генетической изменчивости, пластичности и адаптивности таксона. К числу последних относится уникальная способность аллополиплоидных видов скрещиваться между собой с образованием рекомбинантных геномов [2, 3]. Закономерности формирования таких геномов на хромосомном уровне были изучены нами на примере тетраплоидных пшенично-ржаных амфидиплоидов и изложены в предыдущей публикации [4]. Было показано, что в ходе стабилизации хромосомного состава тетраформ межгеномные рекомбинации возникают на двух уровнях: на уровне целых хромосом и уровне их сегментов. Данная статья посвящена результатам исследования клеточных механизмов, обеспечивающих образование межгеномных рекомбинаций.

#### **Материалы и методы**

Материалом для исследования послужили озимые тетраплоидные пшенично-ржаные амфидиплоиды F<sub>1</sub> (ABRR, 2n=4x=28), синтезированные на основе скрещивания гексаплоидных



тритикале (AABBRR,  $2n=6x=42$ ) с диплоидной аллоплазматической рожью *S. cereale* L. ( $2n=2x=14$ ).

Идентификацию индивидуальных хромосом пшеницы и ржи в мейозе осуществляли с использованием разработанной нами модификации С-бэндинга [5]. На стадии метафазы I анализировалось не менее 30 клеток для каждой гибридной формы, на стадии анафазы I – 60 клеток в целом на популяцию гибридов F<sub>1</sub>.

Для выявления взаимосвязи поведения гомеологичных хромосом в мейозе с частотой трансмиссии их через гаметы и последующего включения в кариотип тетраплоидных тритикале было проведено кариотипирование потомства F<sub>10</sub> данных гибридных форм.

### Результаты и обсуждение

Кариотип тетраплоидных пшенично-ржаных гибридов F<sub>1</sub> содержит диплоидный набор хромосом ржи (RR) и два гаплоидных набора (A и B) хромосом пшеницы. Предполагая у них только гомологичную конъюгацию хромосом, в метафазе I мейоза следует ожидать образования 7 бивалентов (7RR) и 14 унивалентов (7IA + 7IB). Однако у всех включенных в эксперимент растений фактический уровень бивалентного спаривания хромосом превосходил теоретически ожидаемый. В образовании гетероморфных бивалентов с различной частотой принимали участие хромосомы всех гомеологичных групп пшеничного компонента кариотипа (табл.1). В первый год эксперимента самой высокой частотой спаривания характеризовались гомеологи 1 группы, на втором месте по частоте спаривания находились гомеологи 6-й группы, затем - гомеологи 2 и 3-й групп.

В подавляющем большинстве случаев гетероморфные биваленты у исследованных гибридов были открытого типа, и лишь небольшое количество МКП содержали закрытые биваленты, сформированные гомеологами 2 и 3-й гомеологичных групп. Помимо гомеологичного спаривания хромосом пшеницы в материале второго года вегетации зарегистрировано два случая (0,56 % от общего числа проанализированных МКП) образования пшенично-ржаных открытых бивалентов.

Таким образом, характерной особенностью процесса формирования гамет AABBRR гибридов на стадии метафазы I является наличие спаривания гомеологов A и B геномов пшеницы. При этом гетероморфные биваленты формируют хромосомы всех гомеологичных групп, однако частота их встречаемости зависит от структурного сходства гомеологов. Об этом свидетельствует тот факт, что наиболее низкий уровень спаривания отмечен для гомеологов 4, 5 и 7-й групп, синтения которых в ходе эволюции пшениц была нарушена образованием видоспецифической циклической транслокации между хромосомами 4A, 5B и 7B [6].

Наблюдаемое у AABBRR гибридов спаривание гомеологичных хромосом пшеницы обеспечивает правильную их сегрегацию во время деления клетки и увеличивает тем самым вероятность образования функциональных гамет. Не включенные в состав бивалентов гомеологи на стадии анафазы I могут отходить к одному из полюсов клетки (редукционный тип деления унивалентов) и включаться в одно из дочерних ядер, либо расщепляться на хроматиды (эквационный тип), что, по мнению ряда авторов [7], приводит к их элиминации. В исследованном нами материале среди хромосом пшеницы наиболее часто по эквационному типу расходились 1B (46,43%), 7B (32,14%), 5B (25,00%) и 4A (21,43%). Унивалентные 3B, 4B и 6B хромосомы расщеплялись на хроматиды с одинаково низкой частотой (3,57%). Исходя из этих данных, можно ожидать, что в ходе формирования рекомбинантного генома тетраформ элиминации из кариотипа в первую очередь будут подвержены хромосомы 4A, 5B и 7B, которые наряду с высокой частотой эквационного деления крайне редко образуют биваленты.

Таблица 2.

**Соотношение конфигураций, образуемых хромосомами А и В геномов пшеницы, в метафазе I мейоза  
ABRR гибридов F<sub>1</sub> (%)**

Гибрид	Количество клеток с гомеологичной конъюгацией хромосом, %														
	всего	в том числе с гетероморфным бивалентом													
		1A/1B		2A/2B		3A/3B		4A/4B		5A/5B		6A/6B		7A/7B	
		о/б	з/б	о/б	з/б	о/б	з/б	о/б	з/б	о/б	з/б	о/б	з/б	о/б	з/б
<b>2005 год</b>															
№14	62,50	41,51	-	24,53	-	15,09	3,77	1,89	-	7,55	-	35,85	-	11,32	-
№73	56,77	51,28	-	17,95	2,56	23,08	2,56	2,56	-	2,56	-	33,33	-	10,26	-
№75	42,86	50,00	-	21,43	-	7,14	-	-	-	7,14	-	14,29	-	-	-
№81	62,00	47,46	-	18,64	3,39	18,64	1,70	5,09	-	5,09	-	27,12	-	11,86	-
№82	76,90	37,04	-	18,52	-	14,82	-	3,70	-	3,70	-	37,04	-	11,11	-
<b>2006 год</b>															
№16	80,00	34,88	-	23,26	-	13,95	-	2,33	-	-	-	23,26	-	2,33	-
№20	88,46	41,43	-	21,43	4,29	10,00	4,29	2,86	-	-	-	18,57	-	-	-
№23	82,14	40,00	-	12,00	4,00	12,00	4,00	-	-	-	-	28,00	-	-	-
№35	91,84	31,43	-	18,57	7,14	8,57	4,29	7,14	-	-	-	21,43	-	1,43	-
№49	90,00	46,67	-	28,89	4,44	11,11	-	-	-	-	-	8,89	-	-	-
№57	50,00	45,00	-	20,00	2,50	5,00	-	-	-	2,50	-	25,00	-	-	-
№60	76,92	34,09	-	20,45	4,55	18,18	6,82	2,27	-	-	-	13,64	-	-	-
№61	50,00	38,89	-	16,67	5,56	13,89	-	-	-	-	-	25,00	-	-	-
№78	76,67	30,30	-	30,30	3,03	15,15	-	3,03	-	-	-	18,18	-	-	-
№80	70,97	36,36	-	33,33	-	16,67	-	-	-	-	-	19,44	-	-	-

Анализ хромосомного состава потомства ABRR гибридов показал, что в F10 полностью завершилась стабилизация хромосомного состава почти всех гомеологичных групп, за исключением 1 и 6-й, причем 4 и 7-я группы, как это и ожидалось, были представлены парами 4В и 7А хромосом, в то время как 5-я – парой 5В. Из этого следует, что частота трансмиссии унивалентных хромосом через гаметы может определяться иными, не исследованными в данной работе факторами. Что касается 1 и 6-й гомеологичных групп, характеризующихся низкой скоростью стабилизации, то в исследованном материале они были представлены как парами гомологов А и В геномов, так и гетерологичными парами. Особо следует отметить наличие в кариотипах растений реципрокной транслокации между гомеологами 1-ой группы, суть которой сводится к взаимному обмену дистальными участками длинных плеч 1А и 1В хромосом (1AS.1AL-1BL).

#### **Выводы**

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что для тетраплоидных тритикале характерна высокая частота спаривания гомеологичных хромосом пшеницы, что создает предпосылки для образования межгеномных рекомбинаций на уровне сегментов хромосом. С наибольшей вероятностью эти предпосылки реализуются в гомеологичных группах с низкой скоростью стабилизации хромосомного состава, где длительное время сохраняются гетерологичные пары хромосом. В группах с высокой скоростью стабилизации хромосомного состава межгеномные рекомбинации осуществляются на уровне целых хромосом, причем их направление может, в частности, определяться типом деления унивалентных хромосом в анафазе I мейоза.

#### **Література**

1. *Feldman M., Liu B., Segal G., Abbo S., Levy A.A., Vega J.M.* Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploidy wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes // *Genetics*. – 1997. – Vol. 147, №3. – P. 1381-1387.
2. *Levy A. A., Feldman M.* The impact of polyploidy on grass genome evolution // *Plant Physiology*. – 2002. - Vol. 130, № 4. - P. 1587-1593.
3. *Feldman M., Levy A.A.* Allopolyploidy – a shaping force in the evolution of wheat genomes / M. Feldman, // *Cytogenet. Genome Res.* – 2005. – Vol. 109, № 1-3. – P. 250-258.
4. *Дубовец Н.И., Сычева Е.А., Соловей Л.А., Штык Т.И., Бондаревич Е.Б.* Рекомбинантный геном как источник внутривидовой дивергенции и видообразования у полиплоидных злаков // *Факториї експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр./ Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова; редкол.: М.В.Роїка [и др.].* – К.: Логос, 2006. – Т. 3. – С.22-27.
5. *Сычева Е.А.* Методика дифференциального окрашивания мейотических хромосом злаков // *Весці Акад. Навук Беларусі, Сер. Біял. Навук.* – 2000. - №2. – С. 44-46.
6. *Maestra B., Naranjo T.* Structural chromosome differentiation between *Triticum timopheevii* and *T. turgidum* and *T. aestivum* // *Theor. Appl. Genet.* – 1999. – Vol.98, №5. – P. 744-750.
7. *Щапова А.И., Кравцова Л.А., Потапова Т.А., Силкова О.Г.* Роль хромосом ржи в генетическом контроле эквационного деления унивалентов у пшенично-ржаных ди-моносомиков // *Генетика.* – 1998. – Т. 34, №8. – С. 1168-1170.

#### **Резюме**

Экспериментально доказано, что в ходе формирования рекомбинантного генома тетраплоидных тритикале основным механизмом образования межгеномных рекомбинаций на уровне сегментов хромосом являются кроссоверные обмены между гомеологами. Показано, что частота спаривания гомеологичных хромосом находится в прямой зависимости от их структурного сходства. Установлено, что частота трансмиссии через гаметы унивалентных хромосом пшеницы и, соответственно, типы

межгеномных рекомбинаций на уровне целых хромосом могут определяться (наряду с прочими факторами) типом деления унивалентов в анафазе I мейоза.

It was experimentally proved that crossover exchanges between homeologues are a major mechanism of forming intergenomic recombinations at the chromosome segment level during formation of recombinant genome in tetraploid triticale. The pairing frequency of homeologous chromosomes was shown to depend directly on their structural similarity. It was revealed that the transmission frequency via gametes of univalent wheat chromosomes and, accordingly, types of intergenomic recombinations at the level of entire chromosomes can be determined (along with other factors) by the type of univalent division during anaphase I of meiosis.

### **КИРПИЧЁВА И.В.**

Луганский национальный аграрный университет,  
Украина, 91008, г. Луганск, ЛНАУ, кафедра биологии растений,  
e-mail: [kirinopsis@rambler.ru](mailto:kirinopsis@rambler.ru)

## **ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ *angustifolia (an3-1)* НА СТРОЕНИЕ ЛИСТЬЕВ У *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH.**

В современных генетических исследованиях *A. thaliana* является самым популярным и удобным растительным объектом. Однако несмотря на огромное собрание морфологических мутантов, только некоторые из них использованы для генетических исследований развития листа.

Листья – это ключевые органы для понимания морфогенеза у растений [6]. Изучение листьев *A. thaliana* позволяет понять фундаментальные механизмы контроля развития листа, а также изучить эволюцию развития листа [9]. Лист обладает особенно высокой пластичностью. Изменчивость листьев наблюдается не только у разных видов, но и у одного и того же растения. Она обусловлена совокупностью внешних и внутренних факторов, определяющих его развитие [5].

Гены *ANGUSTIFOLIA (AN)* считаются ключевыми в регулировании полярности клеток и ширины листовой пластинки. Сейчас известны различные гены *AN*, определяющие формирование узких листьев, но за счет разных механизмов [8]. Настоящая работа посвящена морфологической характеристике строения листьев у мутанта *an3-1* в сравнении с диким типом.

### **Материалы и методы**

Семена экотипа Landsberg (La0) и мутантной линии *an3-1* (N241) получены из Ноттингемского центра образцов арабидопсиса (NASC) [7]. В соответствии с едиными правилами генетической номенклатуры в тексте использовано следующее сокращение названия мутации: *an* – *angustifolia* (в пер. с лат. узкие листья) [1]. Растения выращивали в почвенной культуре в лаборатории светокультуры на кафедре биологии растений Луганского НАУ по известной методике [4]. Все наблюдения и измерения проводили в период начала цветения. Для измерений с каждого растения брали самый крупный розеточный лист и самый крупный стеблевой лист.

### **Результаты и обсуждение**

В большинстве случаев по форме листьев между растениями разных экотипов принципиального различия нет. Среди множества образцов *A. thaliana* экотип Landsberg широко известен и часто используется в различных генетических исследованиях. В настоящей работе экотип Landsberg использован в качестве дикого (нормального) типа (WT), стандарта, с которым сравнивалась мутантная линия *an3-1*.

Для растений дикого типа свойственна гетерофиллия (изменение формы листьев в пределах одного и того же растения). Длинночерешковые округлые листья

постепенно сменяются овальными короткочерешковыми. Верхушки розеточных листьев тупые. Верхушки первых по счету стеблевых листьев тупые, а последующих обычно острые. Основания первых розеточных листьев могут быть округлыми или клиновидными, у последующих – клиновидными. Форма основания стеблевых листьев близка к клиновидной. В ходе онтогенеза происходит вначале увеличение каждого последующего листа, а затем их уменьшение (каждый последующий стеблевой лист меньше предыдущего) (рис. 1 а).

Листовая пластинка (далее л. пластинка) является наиболее характерной частью листа. По классификации Жуковского П.М. [2] форма л. пластинки определяется с учетом отношения длины листовой пластики к её наибольшей ширине, а также того, в какой части л. пластинки (верхней, средней или нижней) ширина наибольшая.



**Рис. 1.** Листья растений двух разных линий *A. thaliana*

а – листья растения экотипа Landsberg (1-7 розеточные листья, 8-10 стеблевые листья); б – листья мутанта *an3-1* (1-14 розеточные листья, 15-18 стеблевые листья). Пояснение: деления на шкале через 0.5 мм.

На основе результатов измерений, необходимых для установления формы листа, вычисляли элементарные статистики. Отношение длины л. пластинки к её ширине у розеточных листьев экотипа La0 составляет в среднем 2.18, у стеблевых 2.19, а наибольшая ширина л. пластинки находится в средней её части. Форму таких листьев мы относим к овальной, так как полученные значения ближе к тем, при которых лист может считаться овальным.

Самым изменчивым признаком у розеточных листьев является "длина черешка" ( $25\% < cv$ ); у остальных признаков изменчивость средняя ( $10\% < cv < 25\%$ ). Изменчивость по большинству количественных признаков стеблевых листьев средняя, по признаку "ширина л. пластинки" сильная [3].

Молекулярно-генетические исследования зарубежных ученых показали, что поляризация листа может контролироваться двумя способами: размерами клеток (например, у мутанта *an1-1*) и числом клеток (например, у мутантов *an3*; *cro4-1*). У мутанта *an3* узкие листовые пластинки нормальной длины. Клетки этого мутанта

нормального размера, но число их в л. пластинке уменьшено вдоль центральной оси (жилки) [6].

Форма л. пластинок мутантной линии *an3-1* иная, чем у дикого типа (рис. 1 б). У многих листьев самая широкая часть л. пластинки находится ближе к верхушке. Как именно будет называться форма таких листьев (обратноширокояйцевидная, обратнояйцевидная или обратноланцетная) зависит от отношения длины л. пластинки к её ширине.

Длина черешка у первых розеточных листьев мутантной линии *an3-1* примерно равна длине л. пластинки. У последующих листьев длина черешка постепенно уменьшается. В результате последний розеточный лист часто безчерешковый. Иногда на растении безчерешковыми являются несколько последних листьев (не более 3). Стеблевые листья всегда безчерешковые.

Отношение длины к ширине у розеточных листьев составляет 3.31. У примерно 77% взятых для измерений листьев (30 шт. из 39) форма л. пластинок является обратноланцетной (наибольшая ширина л. пластинок ближе к верхушке). У остальных розеточных листьев самой широкой была средняя часть, поэтому форма л. пластинок считается продолговатой. У стеблевых листьев форма продолговатая (отношение длины к ширине 3.51; наибольшая ширина в средней части).

Изменчивость у розеточных листьев по признаку "длина черешка" сильная, по остальным признакам средняя. У стеблевых листьев по всем признакам изменчивость средняя.

Мутантный аллель *an3-1* максимально значимо влияет почти на все количественные признаки розеточных и стеблевых листьев (табл. 1).

Таблица 1

**Сравнение количественных признаков мутантной линии *an3-1* и дикого типа (Landsberg) по t-критерию Стьюдента**

Показатели	Признаки				
	длина листа	длина л. пластинки	ширина л. пластинки	отношение длины л. пластинки к её ширине	длина черешка
<b>Р о з е т о ч н ы е л и с т ь я</b>					
Среднее значение <i>an3-1</i>	2.35±0.04	1.98±0.05	0.60±0.01	3.31±0.07	0.37±0.02
Среднее значение Landsberg	2.77±0.06	2.35±0.05	1.08±0.02	2.18±0.04	0.49±0.04
Разность	-0.41±0.07	-0.37±0.07	-0.48±0.02	1.13±0.08	-0.12±0.04
Разность, %	-15.1	-15.8	-44.5	51.6	-24.9
t-критерий Стьюдента	5.71***	5.20***	23.34***	13.75***	2.86**
<b>С т е б л е в ы е л и с т ь я</b>					
Среднее значение <i>an3-1</i>	-	1.31±0.04	0.38±0.01	3.51±0.09	-
Среднее значение Landsberg	-	1.36±0.04	0.64±0.03	2.19±0.05	-
Разность	-	-0.05±0.06	-0.26±0.03	1.32±0.1	-
Разность, %	-	-3.8	-40.8	60.1	-
t-критерий Стьюдента	-	0.89	8.48***	12.65***	-

Сильнее всего у мутантной линии уменьшается ширина л. пластинки розеточных листьев (на 44.5%). Однако мутация *an3-1* уменьшает значения и ряда других признаков. Примерно одинаково уменьшаются длина розеточного листа и длина л. пластинки (на ~ 15%). Значительно уменьшается длина черешка (на 25%) (табл. 1). На ширину стеблевых листьев мутантный аллель *an3-1* влияет так же сильно (уменьшает на 40.8%), как и на розеточные. На длину стеблевых листьев *an3-1* почти не влияет (уменьшает незначимо на 3.8%). В результате сильного уменьшения ширины розеточных и стеблевых листьев изменяется отношение длины л. пластинки к её ширине. В данном случае это значение больше, чем у дикого типа; как у розеточных, так и стеблевых листьев оно превышает таковое у дикого типа более чем на 50%.

#### **Выводы**

1. Мутация *an3-1* сильнее всего влияет на ширину розеточных и стеблевых листьев. Примерно в равной степени уменьшается ширина как розеточных листьев (на 44.5%), так и стеблевых (на 40.8%).

2. Под влиянием мутации *an3-1* длина листа и длина л. пластинки розеточных листьев уменьшаются на ~ 15%.

3. Листовые пластинки розеточных листьев обратноланцетной (77% изученных листьев) и продолговатой (23%) формы, тогда как у дикого типа листья овальной формы.

4. Под влиянием мутантного аллеля *an3-1* длина черешка розеточных листьев значительно уменьшается (в среднем на ~ 25%).

5. Листовые пластинки стеблевых листьев растений линии *an3-1* продолговатой формы, в отличие от овальной формы у дикого типа. Такая форма стеблевых листьев обусловлена уменьшением ширины л. пластинок, в то время как длина л. пластинок почти не уменьшается (на 3.8%) по сравнению с диким типом.

#### **Литература**

1. *Ежова Г.А., Лебедева О.В., Огаркова О.А.* и др. *Arabidopsis thaliana* – модельный объект генетики растений. – М.: МАКС Пресс, 2003. – 220 с.
2. *Жуковский П. М.* Ботаника. – М.: Колос, 1982. – 623 с.
3. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
4. *Соколов І.Д., Шеліхов П.В., Соколова Т.І.* та інші. Генетика. Практикум. – Київ: Арістей, 2003. – 176 с.
5. *Федоров Ал. А., Курпичников М.Э., Артюшенко З.Т.* Атлас по описательной морфологии высших растений: Лист. – М. – Л.: Изд-во АН СССР, 1956. – 302 с.
6. *Kim G., Shoda K., Tsuge T., Cho K., Uchimiya H., Yokoyama R., Nishitani K., Tsukaya H.* The *ANGUSTIFOLIA* gene of *Arabidopsis*, a plant CtBP gene, regulates leaf-cell expansion, the arrangement of cortical microtubules in leaf cells and expression of a gene involved in cell-wall formation // *The EMBO journal*. – 2002. – P. 1267-1279.
7. *Seed List.* The Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre. – Nottingham: The University of Nottingham, 1994. – 147 p.
8. *Tsuge T., Tsukaya H., Uchimiya H.* Two independent and polarized processes of cell elongation regulate leaf blade expansion in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // *Development*. – 1996. – Vol. 122. – P. 1589-1600.
9. *Tsukaya H.* Leaf Development // *Doi*. – 2002. – 10.1199/0072.

#### **Резюме**

Установлено, что листовые пластинки розеточных листьев у мутанта *an3-1* обычно обратноланцетной, реже продолговатой формы, тогда как у дикого типа листья овальной формы. Форма стеблевых листьев растений линии *an3-1* продолговатой формы, в отличие от овальной формы у дикого типа.

Вплив мутації *angustifolia (an3-1)* на будову листя у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Встановлено, що листові пластинки розеткового листя у мутанта *an3-1*

звичайно обернено-ланцетної, рідше довгастої форми, тоді як у дикого типа листя овальної форми. Форма стеблового листя рослин лінії *an3-1* довгастої форми, на відміну від овальної форми у дикого типа.

Influence of mutation *angustifolia (an3-1)* on the structure of leaves *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. It was stated, that sheet plates rosette leaves of a mutant *an3-1* back-lanceolate, rarer oblong form, while a wild type leaves of oval form. Form of stem leaves of plants line *an3-1* oblong form, unlike an oval form a wild type.

## **КОЗАЧЕНКО М.Р.**

*Інститут рослинництва ім. В.Я.Юр'єва УААН*

*Україна, 61060, Харків, проспект Московський, 142, E-mail: ppi@kharkov.ukrtel.net*

### **Експериментальне вдосконалення форм ярого ячменю з новими та рідкісними ознаками**

Вирощувані зараз культурні рослини пройшли процеси природних і штучних перетворень внаслідок мутацій, гібридизації, добору, зокрема селекції [1].

Різні систематичні групи рослин виникли в результаті різних мутацій, що закріплювались через добір. Дослідженнями багатьох авторів [2-4] і нашими [5] показано можливість індукування відомих і втрачених в природі нових ознак в межах виду, роду, родини.

З використанням методів радіаційного і хімічного мутагенезу нами одержано різноманітні мутації різних частин рослин ярого ячменю: соломини, колоса, квітки, квіткової луски, колоскової луски, остюка, зерна. Деякі з морфологічних мутацій мають інші ознаки, ніж у вихідних різновидностей, а окремі – навіть у виді культурного ячменю чи в роді ячмінь [5], що узгоджується із законом паралельної мінливості і гомологічної мінливості близьких видів і родів М.І.Вавилова [6] і вказує на спорідненість їх в минулих етапах еволюції.

У зв'язку з загальною проблемою розширення генетичного різноманіття вихідного матеріалу для створення нового покоління сортів рослин, важливо дослідити можливість залучення системних мутацій і рідкісних різновидностей в селекційний процес, який, за висловом М.І.Вавилова, є еволюцією, що направляється людьми [1].

Цікавими в цьому відношенні є мутації з волосоподібними, дуже короткими остюками, індуковані нами [7], і рідкісні безості форми ярого ячменю.

Важливо дослідити можливість експериментального вдосконалення в господарському відношенні форм з такими ознаками.

#### **Матеріали і методи**

Вихідний матеріал: двохрядні мутанти з волосоподібними і ніжними та короткими остюками 83-47-6, 92-18-3 і 87-30-7; двохрядні безості сортозразки Гранал, Гранал 447 і Sicagri 7 з можливими рудиментами щетиноподібних і грубих остюків; багаторядний зразок з короткими та грубими остюками; двохрядні довгоості сорти Бадьорий, Галактик, Гама, Danuta, Джерело, Jersey, Екзотик, Ефект, Звершення, Зоряний, Nevada, Одеський 115, Стрункий, Терен, Фенікс, Харківський 84, Харківський 91, Цезар, Celinka; багаторядні довгоості сорти Вакула, Залік, Палідум 107; "трюхостий" мутант (з розвитком остюка у двох колоскових лусок); короткоостий багаторядний зразок IR 35664.

Діалельні і прості схрещування проводили в 1999-2006 рр., F<sub>1</sub> одержали в 2000-2007 рр. і F<sub>2</sub> – в 2001-2007 рр., добори біотипів F<sub>3</sub> провели в 2003-2007 рр., оцінку ліній – на всіх етапах генетико-селекційного процесу в 2004-2007 рр.

Статистичний аналіз розщеплення F<sub>2</sub>, генотипових особливостей і успадкування робили за Б.А.Доспеховим [8] і М.А.Фединым и др. [9].



## Результати та обговорення

Внаслідок проведених досліджень спочатку було встановлено закономірності фенотипового прояву, успадкування, генотипові особливості, а потім на їх основі визначено можливість генетико-селекційного поліпшення елементів продуктивності у форм з індукованою новою ознакою волосоподібності дуже коротких остюків та рідкісною ознакою безостості зовнішніх квіткових лусок колосків ярого ячменю.

У зв'язку з низькою врожайністю та недостатньою стійкістю проти вилягання вихідних безостих і короткоостих форм необхідно дослідити можливість перекомбінації цих ознак з ознаками елементів продуктивності рослин.

Оригінальна як для виду культурного ячменю *H. vulgare* L. Ssensu lato, так і для всього роду *Hordeum* L. ознака волосоподібності дуже коротких і нижніх остюків, виявлена у індукованих нами мутантів 83-47-6, 92-18-3 і 87-30-6, відсутня серед відомих 18 повністю безостих і 18 короткоостих різновидностей ячменю, які мають, до того ж, щетиноподібні і грубі короткі остюки або їх рудименти. Це є підставою рекомендувати нові різновидності культурного ячменю з дуже короткими волосоподібними остюками: *capillacea* Kozacz. – забуленими, *levicapillacea* Kozacz. – незабуленими.

За проявом в  $F_1$  та розщепленням в  $F_2$  діалельних гібридів встановлено рецесивність і аallelність короткоостюковості індукованих нами мутантів 83-47-6, 92-18-3 і 87-30-6. Показано неповне домінування короткоостості (близьке до проміжного успадкування) короткоостого багаторядного зразка IR 35664 в схрещуваннях з короткоостими мутантами, але рецесивність по відношенню до безостості. Показано повне, як правило, домінування безостості форм Гранал, Гранал 447 і Sicarpі 7 по відношенню до короткоостості та довгоостості (розщеплення в  $F_2$  на безості і короткоості та безості і довгоості біотипи відповідало співвідношенню 3 : 1).

На основі розщеплення гібридів за фенотипом і генотипом встановлено дигенну природу спадковості характеру остюків : розщеплення  $F_2$  гібридів між безостими і короткоостими формами відповідало співвідношенню 12:3:1 (безості : довгоості : короткоості),  $F_2$  між багаторядними довгоостими і двохрядними короткоостими формами – 9:3:3:1 з перекомбінацією ознак (двохрядні довгоості : багаторядні довгоості : двохрядні короткоості : багаторядні короткоості), а  $F_2$  між безостими двохрядними і довгоостими багаторядними – 3 лише двохрядних безостих : 1 лише багаторядних довгоостих (без перекомбінації при знаходженні генів в одній групі зчеплення).

Внаслідок цього встановлено генотип безостості як  $LrLr$   $Ag_1Ag_1$  на основі домінантного гена безостості  $Lr$  (епістатичного до гена  $Ag_1$  довгоостості), генотип довгоостості як  $lrlr$   $Ag_1Ag_1$  (домінантний ген  $Ag_1$  подавляє дію рецесивного гена  $lr$ ), а генотип короткоостості досліджених мутантів – як  $lrlr$   $ag_1ag_1$  (комбінація рецесивних неалельних генів  $lr$  і  $ag_1$ ), що необхідно враховувати в селекції на ці ознаки.

Важливим для вибору методів і напрямів оцінок і добору поліпшеного селекційного матеріалу було встановлення рівня і співвідношення загальної (ЗКЗ) і специфічної (СКЗ) комбінаційної здатності (найбільш цінними для перекомбінації є форми з низькою або високою ЗКЗ, особливо безості зразки, при середній СКЗ всіх форм майже за всіма кількісними ознаками), а також прогнозне підтвердження закономірностей прояву в  $F_1$  і успадкування в  $F_2$  ознак завдяки визначенню неадитивності (домінантності) ефектів майже всіх генів ознак, так як успадковуваність в широкому розумінні ( $H^2$ ) у них значно більша успадковуваності у вузькому розумінні ( $h^2$ ), що підтверджується і переважаючим співвідношенням компонентів  $H_1$  і  $H_2$  домінантних (неадитивних) ефектів генів над компонентою  $D$  сумарного адитивного ефекту їх, зокрема ознаки безостості. Навпаки, за ознакою довжини остюка показники  $H^2$  (0,98) і  $h^2$  (0,76) більш близькі, що може вказувати на значний і адитивний ефект генів короткоостості, коли добір рецесивних короткоостих форм є ефективним.

В подальших дослідженнях показано, що встановлені вказані вище закономірності прояву в F<sub>1</sub>, успадкування в F<sub>2</sub> та підтверджуючі їх морфо-біологічні і генетико-селекційні особливості дають можливість прогнозувати перспективність поліпшення форм з домінантною безостістю і рецесивною короткоостістю різних груп зчеплення генів, що узгоджується з позитивною перекомбінацією цінних ознак.

В 2005, 2006 і 2007 рр. дібрано поліпшені цінні безості і короткоості лінії на різних етапах генетико-селекційного процесу: в селекційному розсаднику першого (відповідно за роками 152, 935 і 888) і другого (87, 393 і 262) років, в контрольному розсаднику (30, 26 і 67), попередньому (7, 10 і 15) і конкурсному (–, 5 і 11) сортовипробуванні.

За характеристикою цінних ознак колоса і рослини в сортовипробуванні 2006-2007 рр. як за продуктивністю колоса і рослини, так і за параметрами колоса і продуктивною кущистістю рослини виділено поліпшені, кращі за стандарт Галактик і вихідний безостий сорт Гранал, безості лінії ярого ячменю: в гібридній комбінації від схрещування Гама/Гранал лінія 02-58/99-7 (1,8 г зерна з рослини в 2006 р. і 1,5 г в 2007 р. при відповідно 1,5 г і 1,3 г у стандарту та 1,4 г і 1,2 г у Етикета), в гібридній комбінації Бадьорий/Гранал лінія 02-64/99-4 (відповідно за роками 1,5 г і 1,9 г) і лінія 02-64/99-6 (відповідно 1,5 г і 1,5 г). Це вказує на поліпшення ознак продуктивності у безостих ліній, одержаний шляхом гібридизації.

В сортовипробуванні за 2006-2007 рр. серед комбінацій схрещування 1999 р. виділено кращі безості лінії (табл. 1): 02-58/99-7 (Гама/Гранал) з урожайністю 5,20 т/га (+8% до стандарту Галактик), 02-58/99-9 (Гама/Гранал) – 5,16 т/га (+7%), 02-77/99-4 (Гранал/Фенікс) – 5,03 т/га (+5%), 02-64/99-4, 02-64/99-6 і 02-64/99-11 (Бадьорий/Гранал) – 5,12, 5,10 і 5,02 т/га (+7, +6, +5%). Ці лінії мали також високу стійкість проти вилягання (8,3-8,8 балів при 7,5-8,0 балів у стандарту).

**Таблиця 1**

**Характеристика поліпшених ліній ярого ячменю за ознакою безостості в сортовипробуванні, 2006-2007 рр.**

Лінія	Урожайність		Стійкість проти вилягання, бал
	т/га	+ % до стандарту	
02-58/99-7	5,20	8	8,3
02-58/99-9	5,16	7	8,5
02-64/99-4	5,12	7	8,3
02-64/99-6	5,10	6	8,5
02-64/99-11	5,02	5	8,5
02-77/99-4	5,03	5	8,8

В 2007 р. в сортовипробуванні виділено нові лінії гібридів 1999-2000 рр. схрещувань: 03-119/00-20 (Ефект/Гранал), 03-62/99-1 (Ефект/Гранал), 03-50/00-7 (Екзотик/Гранал), 03-135/00-2 (Бадьорий/Гранал), 03-63/00-13 (Джерело/Гранал), 03-58/99-1 (Гама/Гранал).

В селекційних і контрольному розсадниках за більшістю позитивних ознак виділено нові цінні безості і короткоості лінії від більш пізніх схрещувань 2000-2003 рр., які мають поліпшені господарсько цінні ознаки.

В 2005 і 2006 рр. кращі лінії (відповідно 5 і 25) використано в селекції методом гібридизації для подальшого поліпшення практично цінних ознак шляхом їх перекомбінацій, і в 2007 р. одержано покоління F<sub>1</sub> по 25 і F<sub>2</sub> по 15 гібридних комбінаціях.

## Висновки

1. Показано рецесивну природу ознаки короткоості мутантів з індукованою новою ознакою волосоподібності остюків та домінантну природу неалельної безостості.

2. Встановлено дигенну природу спадковості ознак різного розвитку остюковості та безостості.

3. Встановлено генотипи безостості як LrLr AriAri, довгоостості – як lrlr AriAri, короткоостості – як lrlr ariari.

4. Для поліпшення безостих і короткоостих форм за господарсько цінними ознаками необхідно враховувати встановлені особливості прояву і успадкування та прогнозного їх підтвердження за рівнем і співвідношенням ЗКЗ і СКЗ, а також компонентами генетичної дисперсії.

5. Прискорено вдосконалення безостих і короткоостих форм шляхом перекомбінації ознак шляхом гібридизації, на основі чого створено з указаними ознаками цінні лінії, що мають високі врожайність та стійкість проти вилягання, чого не було у вихідних форм.

## ЛІТЕРАТУРА

1. *Вавилов Н.И.* Селекция как наука // Теоретические основы селекции. – М.-Л. – 1935. – Т. 1. – С. 1–14.
2. *Тарасенко Н.Д.* Индуцированные мутации и устойчивость сельскохозяйственных культур к заболеваниям // Вестн. АН СССР. – 1978. – № 2. – С. 93–96.
3. *Батыгин Н.Ф.* Морфогенез растений. – М.: МГУ, 1961. – Т. 2. – С. 37.
4. *Hagberg A., Akerberg E.* Mutation in plant breeding. – Stockholm. – 1962. – 156 p.
5. *Козаченко М.Р.* Получение видовых и родовых радиационных и химических мутаций ячменя и их значение для исследований по эволюции и систематике растений // Цитология и генетика. – 1973. – Т. 7, № 4. – С. 329–333.
6. *Вавилов Н.И.* Закон гомологичных рядов в наследственной изменчивости // Классики советской генетики. – Л.: Наука, 1968. – С. 9–50.
7. *Козаченко М.Р., Иванова Н.В., Васько Н.І.* Мутантні форми культурного ячменю з новими різновидностними ознаками волосоподібності остюків // Генетичні ресурси рослин (науковий журнал). – Харків: ІР ім. В.Я.Юр'єва УААН, НЦГРРУ, 2007. – № 4. – С. 57–63.
8. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
9. *Федин М.А., Силис Л.Я., Смиряев А.В.* Статистические методы генетического анализа. – М.: Колос, 1980. – 207 с.

## Резюме

Показано ефективність експериментального вдосконалення форм ярого ячменю з новою індукованою ознакою волосоподібності короткоостості та рідкісною ознакою безостості.

Показано эффективность экспериментального усовершенствования форм ярового ячменя с новым индуцированным признаком волосовидности короткоостости и редкостным признаком безостости.

The effectiveness of experimental improvement in spring barley forms with a new induced trait of hair-likeness shortawnedness and a rare trait of awnlessness has been shown.

**КОНДРАТЕНКО С.І.**

**Інститут овочівництва і баштанництва УААН**

Україна, 62478, п/в Селекційне, Харківської обл., вул. Інститутська, 1

E-mail: ovoch-iob &online.ua

## **РОЗРОБКА ЕЛЕМЕНТІВ МЕТОДИКИ ІНДУКЦІЇ НЕРЕГУЛЯРНОГО АПОМІКСИСУ У КАПУСТИ ГОЛОВЧАСТОЇ**

Нерегулярний апоміксис – природне явище, що полягає в розвитку зародка з яйцеклітини або іншої клітини зародкового мішку за відсутності запилення. Такий тип апоміксису називається партеногенезом або апогамією і зустрічається в природі з досить низькою частотою прояву ( $10^{-6}$ ) [1-3]. Останнім часом дослідниками здійснюються спроби для індукції нерегулярного апоміксису у найважливіших сільськогосподарських рослин. На жаль, у більшості з них майже цілком відсутня здатність до апогамії. Відомі випадки одержання апогамного насіння у м'якої пшениці, гречки і кукурудзи [4]. На капусті головчастій метод індукції нерегулярного апоміксису застосовувався різними дослідниками, при цьому позитивних результатів вдалося досягнути в разі використання екзогенної обробки незапліднених зав'язей фітогормонами, або їх синтетичними аналогами для стимуляції мітотичного поділу і подвоєння числа хромосом у яйцеклітин під час їх партеногенетичного розвитку [4, 5]. Цими ж авторами було показано, що на фенотипічний прояв партеногенезу в значній мірі має вплив генотип рослини, фаза розвитку зародкового мішку, фітогормональний статус регуляторів росту, вагові співвідношення регуляторів в апоміктичному агенті та норми витрати агенту на одну незапліднену яйцеклітину.

### **Матеріали і методи**

Для розробки елементів методики індукції нерегулярного апоміксису першочергового були випробувані експериментальні підходи, запропоновані в літературних джерелах [4-6]. Зокрема, використовувалася загальноприйнята для капусти білоголової процедура кастрації нативних бутонів [7] з послідуною їх обробкою модифікованими варіантами апоміктичного агенту, в основі якого була обов'язкова присутність водної суміші регуляторів – гібереліну (ГК<sub>3</sub>) та цитокініну (БАП) у різних вагових співвідношеннях у відповідності до рекомендацій, наданих в роботах [4-6]. Для кастрації використовувалися бутони із повністю сформованою квіткою за 2-3 доби до її розкриття. Перед їх обробкою апоміктичним агентом приймочки і стовпчики обробляли 96% водним розчином етилового спирту для усунення імовірного попадання на їх поверхню фертильного пилку. Потім за допомогою мікропіпетки на стовпчики наносили 10-30 мкл апоміктичного агенту. Оброблені, таким чином, репродуктивні гілки із кастрованими бутонами ізолювали від решти гілок маточників капусти пергаментними ізоляторами на 4 доби. Після зняття ізоляторів проводили фенологічні спостереження за ростом стручків і насінневих зародків до повного завершення репродуктивної фази росту маточників капусти. Як об'єкти досліджень було використано рослини капусти білоголової сортів Лазурна, Ліка, Білосніжка, Яна, Харківська зимова (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) та капусти червоноголової сорту Палета (*Brassica capitata* Litzg. var. *rubra*) селекції Інституту овочівництва і баштанництва УААН. Дослідження проводилися протягом 2006-2007 рр.

### **Результати і обговорення**

У 2006 році були проведені дослідження, які передбачали обробку кастрованих бутонів водною сумішшю регуляторів росту (гібереліну (ГК<sub>3</sub>) та цитокініну (БАП)), згідно роботи [4]. Такий спосіб обробки стимулював у всіх досліджених сортових генотипів капусти виключно партекарпічний ріст стручків без розвитку насінневих зародків. В

експериментальній роботі 2007 року використовувалися наступні модифікації компонентного складу апоміктичного агенту (АА) та способи обробки кастрованих бутонів. Зокрема, було проведено 4 варіанти обробки:

1) АА №1 (водна суміш гіберелової кислоти і цитокінінового регулятора БАП (ГК<sub>3</sub> + БАП));

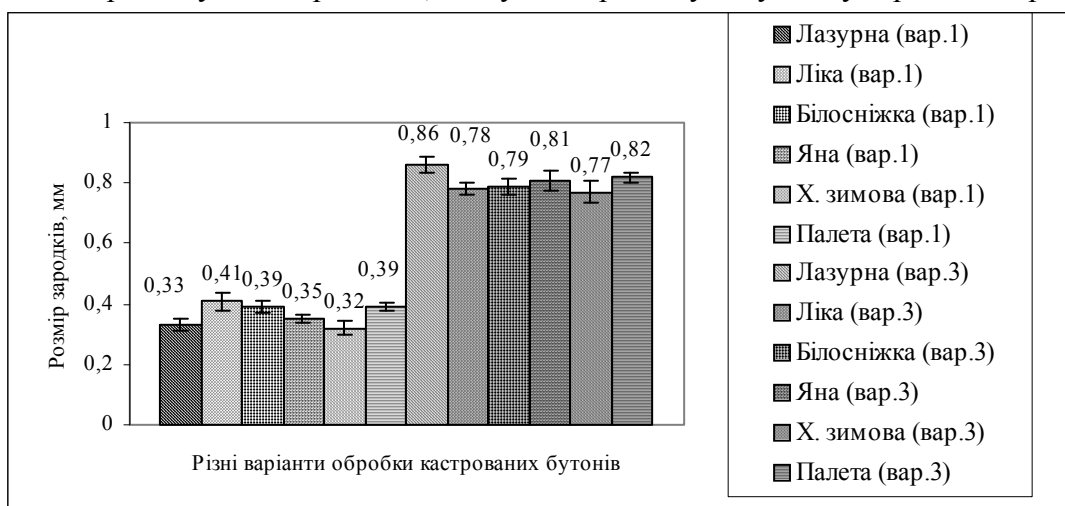
2) АА №2 (водна суміш гіберелової кислоти, цитокінінового регулятора та препарату Марс-ЕІ (ГК<sub>3</sub> + БАП + Марс-ЕІ));

3) композиція АА №1 з додатковим одночасним нанесенням на приймочку чужорідного пилку несумісних з капустою головчастою видів рослин родини хрестоквітних;

4) композиція АА №2 з додатковим одночасним нанесенням на приймочку чужорідного пилку несумісних з капустою головчастою видів рослин родини хрестоквітних.

Препарат Марс-ЕІ є регулятором не фітогормональної дії, який випробувався у досліді, як біологічно-активна речовина, яка забезпечувала кращу закріпленість та збереженість, внаслідок випаровування, водної суміші регуляторів росту на кастрованих бутонах.

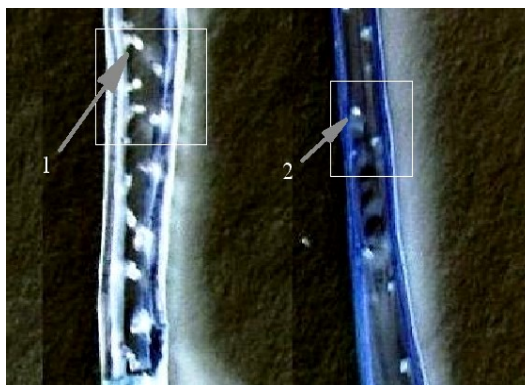
За результатами проведених досліджень були виділені, як найбільш результативні для подальшої роботи, 3-й і 4-й варіанти обробки, при застосуванні яких нами був виявлений ефект короткочасного росту апоміктичних зародків у стручках на репродуктивних пагонах усіх задіяних в експерименті сортових генотипів капусти. При цьому, після емпіричного перебору були виявлені види рослин родини *Brassicaceae* – редька дика (*Raphanus raphanistrum* L.) та редька сорту Трояндова (підвид китайської редьки Лоба (*Convar lobo Sazon*) виду *Raphanus sativus* L.), пилки яких забезпечував вищевказаний приріст. Як приклад, на рис. 1 відображено стовпчикові діаграми довжини зародків генотипів капусти головчастої, які були задіяні у 1-му і 3-му варіантах досліді по індукції нерегульованого апоміксису. На рис. 2 відображено фотографії сформованих стручків з недорозвинутими зародками, які було одержано у 2-му і 4-му варіантах обробки.



**Рис. 1.** Результати біометричного обміру (в світловому полі бінокюляра) довжини 10 рандомізовано відібраних апоміктичних зародків капусти головчастої різних сортових генотипів, проведені наприкінці періоду визрівання маточників капусти головчастої.

Загалом, якщо обробку проводили тільки АА №1 або АА №2 (1-й і 2-й варіанти), то при цьому спостерігався виключно партенокарпічний ріст стручків. Таким чином, для оптимізації росту апоміктичних зародків у наступних дослідженнях планується розширити пошукові роботи по екзогенній стимуляції цього процесу. Зокрема, для цієї мети будуть використані можливості біотехнологічних методів по дорощуванню *in vitro* рослинних об'єктів на штучних живильних середовищах з вмістом

фітогормональних регуляторів і ін. біологічно-активних компонентів. Визначення факторів індукції нерегулярного апоміксису та росту апоміктичних зародків капусти головчастої також проводитиметься за допомогою цитологічних та молекулярно-генетичних методів (пошук системи ДНК маркерів для ідентифікації генетичного явища диплоїдної гомозиготизації).



**Рис. 2.** Тимчасова стимуляція росту апоміктичних зародків у 4-му варіанті та її відсутність у 2-му варіанті досліду по індукції нерегульованого апоміксису (рослини репродуктивної фази розвитку сорту капусти червоноголової Палета):

1. 4-й варіант обробки (використання АА №2 і пилку редьки дикої);
2. 2-й варіант обробки (використання АА №2).

#### **Висновки**

Проведено пошукові дослідження по визначенню факторів, що визначають індукцію росту незапліднених зародків капусти головчастої 6 сортових генотипів капусти головчастої. Встановлено експериментальну можливість тимчасового росту апоміктичних насінневих зародків капусти головчастої за рахунок синергічної дії водної суміші регуляторів росту та запилення приймочок кастрованих бутонів чужорідним пилом несумісних видів рослин родини *Brassicaceae* – редьки дикої (*Raphanus raphanistrum* L.) та редьки сорту Трояндова (підвид китайської редьки Лоба (*Convar lobo Sazon*) виду *Raphanus sativus* L.).

#### **Література**

1. *Нукифоров Ю.Л., Шевченко С.В.* Цитологический анализ развития пыльцевых зерен некоторых цветковых растений (в связи с проблемой гаплоидии) // Апомиксис и цитозембриология растений – 1979, Вып.4. – С. 85-86.
2. *Yudin B. F. and Sokolov V. A.* Towards regular apomixis in maize, achieved by experiment // Genetic Manipulation in Plants – 1989, V.5. – P. 36-40.
3. *Кашин А. С.* Гаметофитный апомиксис: анализ причин и последствий реализации у цветковых :На примере популяций некоторых видов Asteraceae // Дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.05. – Саратов, 2004. – 390 с.
4. *Способ* получения гомозиготных диплоидов сельскохозяйственных культур: Патент. Российская Федерация. А01Н 1/04, А 01Н 43/40, 61/00 / В.Г. Курбатов – № 2035134; Заявл. 23.01.91; Опубл. 20.05.95, Бюл. № 14.
5. *Eenink A.H.* Matromorphy in *Brassica oleracea* L. III. The influence of temperature, delayed prickle pollination and growth regulation on the number of matromorphic seeds formed // Euphytica – 1974. – V. 23. – P. 711-718.
6. *Eenink A.H.* Matromorphy in *Brassica oleracea* L. IV. Formation of homozygous and heterozygous diploid products of gametogenesis and qualitative genetical research on matromorphic plants // Euphytica – 1974. – V. 23. – P. 719-724.
7. *Жук О.Я., Чернищенко Т.В., Ярчук Н.І., Хареба В.В., Яковенко К.І.* Методика селекції овочевих рослин родини капустяних (*Brassicaceae* (Burnett)) // Сучасні методи селекції овочевих і баштанних культур. – Харків: Вид-во Інституту овочівництва і баштанництва УААН, 2001. – С. 189-205.

### **Резюме**

Проведено пошукові дослідження по визначенню факторів, які індукують ріст незапліднених зародків 6 сортових генотипів капусти головчастої. Встановлено експериментальну можливість тимчасового росту апоміктичних насінневих зародків капусти за рахунок синергічної дії водної суміші регуляторів та запилення оброблених бутонів чужорідним пилом несумісних видів рослин родини *Brassicaceae* – редьки дикої (*Raphanus raphanistrum* L.) та китайської редьки Лоба ((*Convar lobo Sazon*) виду *Raphanus sativus* L.).

Проведены поисковые опыты по определению факторов, индуцирующих рост неоплодотворенных зародышей 6 сортовых генотипов капусты белокочанной. Установлена экспериментальная возможность временного роста апомиктических семенных зародышей капусты в результате синергического действия водной смеси регуляторов и опыления обработанных бутонів пылью несовместимых видов растений семейства *Brassicaceae* – редьки дикої (*Raphanus raphanistrum* L.) и китайской редьки Лоба ((*Convar lobo Sazon*) вида *Raphanus sativus* L.).

Are carried out research experiences as to determining of inductive factors of the growth of matromorphic seeds of 6 varieties cabbage genotypes. Is established the experimental possibility of the temporary growth of matromorphic seeds of cabbage as a result of double influence on the treated buds of the aqueous mixture of regulators and pollination by means a pollen of the incompatible types of the plants *Brassicaceae* family – *Raphanus raphanistrum* L. and *Convar lobo Sazon* of type *Raphanus sativus* L.

**КОНОВАЛОВ В.С., КОПЫЛОВА Е.В., КОВАЛЕНКО Г.С, БИРЮКОВА. О.Д.,  
СТАРОДУБ Л.Ф., ШЕЛЕВ А.В.**

*Институт разведения и генетики животных УААН,*

*Украина. Научно-методический центр УААН .e-mail: konovalov\_vs@ukr.net*

### **ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ СКРЫТОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ МЕТОДАМИ ЦИТО-ФЕНО-ДНК- МАРКЕРНОГО МОНИТОРИНГА**

Развитие мирового скотоводства характеризуется не только селекционными достижениями, но проблемами, связанными с ростом нестабильности генома домашних животных. Нестабильностью обусловленной интенсивными породообразовательными процессами, экологическими и иммиграционными причинами. Основываясь на законе Украины "О племенном деле в животноводстве" и требованиях "Положения о порядке проведения генетической экспертизы происхождения и аномалий племенных животных"

Сотрудники отдела генетики института разведения и генетики УААН - проводят мониторинговую оценку тенденций накопления на пороге 21 столетия негативной (летальные и полуметалельные мутации) и позитивной (ассоциированной с хозяйственно-полезными признаками генов) скрытой генетической изменчивости- изменчивости формируемой в генофонде пород крупного рогатого скота, свиней и лошадей и других видов домашних животных Украины.

Для решения поставленной задачи используется комплексное применение современных методов просеивающей цито-фено-ДНК-маркерной диагностики. Результаты скрининговых исследований обрабатываются различными методами статистического анализа.

#### **Цито-маркеры**

На основании выборочных мониторинговых исследований 2000-2007г.г. получены следующие результаты: 1) сравнительный цитогенетический контроль по

спектру хромосомных aberrаций более 600 голов племенных животных различных пород: (крупного рогатого скота) быков-производителей импортированной голштинской, украинской черно- и красно-пестрой, красной степной и симментальской, шароле, абердин-ангус и лимузин, серой украинской породы (аборигенной); 4-х пород свиней (крупная белая, красно-поясная, ландрас, миргородская), а также 2 породы лошадей (украинская верховая и российский тяжеловоз) показал, что исследованные породы имеют кариотипическую изменчивость в диапазоне селекционно допустимой. Среди исследуемых видов домашних животных породы крупного рогатого скота имеют наиболее выраженную изменчивость хромосом, верхние границы которой характерны для мясных пород и аборигенной серой украинской породы [1]. Наблюдаемые тенденции с изменчивостью кариотипа КРС объяснимы, ведь именно кариотипы пород крупного рогатого подвергаются наиболее значительным доместикационным изменениям.

### **ДНК-маркеры**

1. Среди синдромов с выраженным летальным исходом (в гомозиготном состоянии) привлекает рецессивная точечная мутация в кодирующей части аутосомного гена CD приводящая к развитию у телят - дефицита адгезивности лейкоцитов (BLAD - Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency).

В связи с тем, что на племпредприятиях Украины использовалось более 3 тыс. импортных производителей голштинской породы, методом рестрикционного анализа ПЦР-амплифицированного продукта различными авторами было проанализированных 210 гол. Было показано, что в отличие от 15% быков-носителей (BLAD) в США, в Украине генетический груз по данному заболеванию составил 5-7 %. Оценка целесообразности проведения мониторингового контроля за летальной мутацией (BLAD) были выполнены ориентировочные расчеты экономических потерь: США (5 млн. \$) и Германия (2 млн. \$), Украина (0,1 млн. \$) и Россия (0,4 млн. \$) [2]. Высокая экономическая эффективность ДНК-контроля стимулирует ряд стран на проведение тотального контроля за летальными мутациями распространяемыми импортируемыми быками-производителями. В настоящее время селекционные службы не проводят тотального контроля за рецессивными болезнями молекулярного уровня. В институте, на основании генеалогического анализа на протяжении 5 поколений родословной быка-носителя мутации (BLAD) О.Айвенго 1189870 и его внуков, К.М.А.Белл 1667366 и П.С.Шейк 1617421, проанализированы пути миграции мутации в генофонд украинских пород КРС. Просеивающий генеалогический анализ родословных 953 быков-производителей голштинской породы, допущенных Министерством аграрной политики Украины, для осеменения маточного поголовья в 2007 году позволил сформировать «группу риска» в составе 43 потенциальных носителей мутации. Считаем, что использование в селекционном процессе этих производителей нецелесообразно. Наличие на племпредприятиях Украины спермы быков-производителей «группы риска» составляет 600,3 тыс. доз. В связи с нарастающей актуальностью проблемы в институте проводится работа по созданию Всеукраинского каталога генетического груза в популяциях домашних животных.

2. Очередными задачами отдела генетики является расширение возможностей генетической экспертизы происхождения животных с более широким спектром применения ДНК-маркерных технологий в соответствии рекомендациям International Society of Animal Genetics (ISAG/FAO 2004). Методологической предпосылкой их применения является высокая эффективность и точность полученных результатов. На данном этапе организации службы ДНК-маркерного контроля сотрудниками отдела генетики выполняются исследования по определению методами ПЦР и ПДРФ частот встречаемости генов, ассоциируемых с показателями продуктивности каппа-казеина (CSN3), бета-лактоглобулина (BLG), гормон роста (GH), лептина (LEP), миостатина (MSTN) у различных пород крупного рогатого скота. Идентифицированные более чем



у 500 голов результаты свидетельствуют о межпородных особенностях генетической структуры животных в распределении исследуемых аллельных вариантов, что и обуславливает их избирательное селекционно-генетическое накопление [3].

### **Фено-маркеры**

#### **1. «red» - мигрирующий колор-маркерный зонд**

Исходя из основных положений теории гена, считаем, что рецессивные мутации летального действия, которые не обладают выраженным отрицательным влиянием в гетерозиготной форме, по частотам своего накопления в генофонде пород сходны с рецессивными мутациями нейтрального действия. В этой связи, рецессивные нейтральные мутации в гомозиготном состоянии могут являться генеологическими зондами, которые показывают свой иммиграционный путь перехода из генофонда высокопродуктивной голштинской породы. Поэтому необходимо найти гены, продукты действия которого поддаются визуальной оценке. К таковым относится колор-маркер красной окраски в виде мутации «ред», наличие которой регистрируется в племзаписях животных. Для оценки давления гена «ред» быков производителей голштинской породы на генофонд маточного поголовья Украины использовали каталоги быков-производителей молочных и молочно-мясных пород используемых для осеменения коров [4]. Результаты показали, что из 456 голштинских производителей - 120, которые являются потомками выдающихся голштинских родоначальников черно-пестрой масти, в скрытой форме несут красную рецессивную масть (т.е. порядка 30 % от всего поголовья). Проанализировав более 500 гол. оцененных по потомству и происхождению быков-производителей 6 западных стран и более чем 20 линий голштинской породы установили, что за исследуемый период (1991-2001г) генетическая структура популяции голштинских быков-производителей по признаку скрытого носительства мутации «ред» не претерпела значительных изменений. Доля гетерозигот в популяции быков- производителей украинской черно-пестрой породы значительно возросла за счет иммиграции генетического материала из популяции быков производителей голштинской породы. Расчеты показали, что интенсивность миграции составляет  $m=0,13$ . При условии сохранения темпов иммиграции голштинского генетического материала в популяцию украинской черно-пестрой молочной породы, можно прогнозировать возрастание частоты гена «ред» в улучшаемой популяции с 0,045 до 0,068. Характерно, что частота встречаемости быков-носителей нейтрально-рецессивной мутации «ред» на Украине составляет порядка 7%, что весьма сходно с частотой встречаемости летального гена BLAD. Полученные результаты в определенной степени подтверждают ранее высказываемую нами точку зрения о сходстве иммиграции летальных и нейтральных генов.

#### **2. аллели spotting-локуса S – пример генно-средовых взаимодействий.**

Основываясь на постулате - пластичность адаптации пород обусловлена эффективностью взаимодействия структурных и регуляторных генов считаем, что колор-маркерами характеризующими специфику формирования генно-средовых взаимодействий голштинских и украинских черно-пестрых пород являются аллели spotting-локуса S. Рецессивное состояние аллелей-ss обуславливает недостаточность биосинтеза в волосяными фолликулами предшественников меланин-катехоламинового обмена. Недостаточность биосинтеза порождает разносторонний плейотропный эффект отражающийся на снижении жизнеспособности, плодовитости и молочной продуктивности высокопродуктивных животных. Сравнительная оценка частот встречаемости различных аллельных состояний SS : Ss : ss у более чем 500 быков-производителей 1000 коров черно-пестрых голштинской и украинской пород различных племзаводов Украины показала, что биохимическая недостаточность биосинтеза меланин-катехоламинов у рецессивных гомозигот снижает реализацию их высокого генетического потенциала, отражающегося не только на сроках их пожизненной эксплуатации, но даже элиминации женских плодов (ss) еще на ранней

стадии эмбриогенеза. Число негативных тенденций мирового молочного скотоводства следует отнести «антиселекционные» тенденции на демеланизацию копытного рога, что в значительной степени способствует развитию заболеваемости опорно-двигательного аппарата и снижению продуктивности больных животных на 20-40 %.

Итак, на основании мониторинговых исследований с помощью перечисленных маркерных тест-систем очевидно: 1) в отличие от генофонда высокопродуктивных пород западных стран генофонд племенного животноводства менее насыщен вредными мутациями и пока еще имеет достаточную буферность. Это значит, что при соблюдении современных зооветеринарных технологий разведения и эксплуатации животных они способны на достаточно высокую продуктивность; 2) проводимый просеивающий мониторинг позволяет объективно оценивать тенденции формирования в генофонде домашних животных скрытой генетической изменчивости.

### **Литература**

1.Дзіцюк В.,Коновалов В.,Шельов.,Войтенко С. Селекційні завдання генетиків у тваринництві.//Тваринництво України.-2007.№2 с.61-64

2.Буркат В.П.,Коновалов В.С.,Єфіменко М.Я, Бірюкова О.Д.Коваленко Г.С. Рекомендації з генетичного контролю розповсюдженості мутації BLAD у великої рогатої худоби.-Чубинське.2005.-24с.

3.Копилова Е.В. Поліморфізм генів.асоційованих з господарсько-цінними ознаками великої рогатої худоби. /автореферат канд.дисертації/ Київ-2006р.с-18с.

4.Каталог бугаїв молочних і молочно-м'ясних порід для відтворення маточного поголів'я в 2001році Національного об'єднання з племінної справи у тваринництві / Колектив авторів. – К.: 2001.- 120с.

5.Коновалов В.С., Бірюкова О.Д. Динаміка зміни генетичної структури популяції бугаїв-плідників чорно-рябої худоби за геном «red» // Вісник Білоцерківського держ. аграр. ун-ту / М-во аграр. політики Укр. Білоцерк. держ. аграр. ун-т. – Біла Церква, 2002. – Вип. 22: Заг. і спец. зоотехнія. Біол. основи ведення тваринництва. Агробіол. основи землеробства. – С. 79-84.

### **Резюме**

Проводимый просеивающий мониторинг позволяет объективно оценивать тенденции формирования в генофонде домашних животных скрытой генетической изменчивости

Просіюючий моніторинг, що проводиться, дозволяє об'єктивно оцінювати тенденції формування в генофонді домашніх тварин прихованої генетичної мінливості.

The conducted sifting monitoring allows to estimate the tendencies of forming in the gene pool of domestic animals of the hidden genetic changeability objectively

### **КОРШИКОВ И.И.**

*Донецкий ботанический сад НАН Украины*

*Украина, 83059, Донецк, пр. Ильича, 110, e-mail: herb@herb. dn.ua*

### **ПОДДЕРЖАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ВИДОВ СЕМЕЙСТВА *PINACEAE* LINDL. В ЗАРОДЫШАХ ИХ СЕМЯН**

Концептуальные основы иерархического постоянства общего объема генного разнообразия популяций при многократной естественной смене их поколений разработаны, хотя конкретные механизмы поддержания структуры популяционного

генофонда в разных демографических элементах активно исследуются. В частности в популяциях древесных растений, особенно у хвойных, изучается динамика гетерозиготности растений в связи с их возрастом и онтогенетическими стадиями развития. Новые поколения в сомкнутых древостоях гибнут на стадии проростка из-за светового голода, а полноценное возобновление и развитие возможно лишь “в окнах”, возникающих в результате гибели большого дерева, их группы, на месте пожарищ и ветроломов. Из-за отсутствия в чистых моновидовых древостоях структурированности по возрастным категориям не всегда удается выяснить временные особенности генетической структуры популяций, а поэтому в таких исследованиях часто сравнивают растения и зародыши их семян. На ранней онтогенетической стадии (зародыши семян) у хвойных нередко обнаруживают в популяциях разных видов дефицит гетерозигот, что связывают, в первую очередь, с самоопылением растений, а также близкородственным скрещиванием. На границах природного распространения вида, где фрагментация ареала гораздо более выражена, в небольших популяциях может меняться доля само- и перекрестного опыления, что будет отражаться на уровне инбредности семенного потомства [1-3, 7, 8]. Так как для подавляющего большинства видов хвойных в Украине проходят границы их естественного распространения, то можно ожидать массовости явления инбридинга у зародышей семян.

Цель работы – анализ в популяциях шести аборигенных видов хвойных Украины генетического полиморфизма зародышей семян.

#### **Материалы и методы**

Объектами исследований служили реликтовые популяции сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и сосны меловой (*Pinus sylvestris* L. var. *cretacea* Kalenicz. ex Kom.) соответственно в Кременецком холмогорье Тернопольской обл. и в национальном парке “Святые горы” в Донецкой области, а также популяции на заповедных территориях Крыма – сосны крымской (*Pinus pallasiana* D. Don) и Украинских Карпат – ели европейской (*Picea abies* L.), пихты белой (*Abies alba* Mill.) и сосны кедровой европейской (*Pinus cembra* L.). Объем выборок наиболее возрастных растений (70-150 лет) из исследуемых популяций составлял 24-92 особи, а зародышей их семян – 178-736. В качестве молекулярно-генетических маркеров использовали изоферменты 5-6 ферментов, которые экстрагировали из эндоспермов и зародышей 6-8 семян отдельно у каждого из изучаемых растений. Условия экстракции ферментов, их электрофоретического разделения и гистохимического окрашивания, идентификация аллельных вариантов подробно описаны ранее в опубликованных работах [1-3, 7, 8]. В анализе генетического полиморфизма использовались только те изоферменты, которые можно было однозначно интерпретировать на гелевых пластинках. Для *P. sylvestris* var. *cretacea* и *P. pallasiana* – это локусы глутаматдегидрогеназы (GDH), аспаратаминотрансферазы (GOT), супероксиддисмутазы (SOD), малатдегидрогеназы (MDH), кислой фосфатазы (ACP) и лейцинаминопептидазы (LAP), для *P. sylvestris* – локусы тех же ферментов за исключением SOD. В анализе *P. abies* были применены локусы GDH, MDH и фосфоглюконатдегидрогеназы (6-PGD); *P. cembra* – GDH, MDH, формиатдегидрогеназы (FDH), алкогольдегидрогеназы (ADH), фосфоглюкомутазы (PGM); *A. alba* – GOT, ADH, ACP и эстеразы (EST).

#### **Результаты и обсуждение**

В популяционных выборках трех видов семейства *Pinaceae* среднее количество аллелей, приходящихся на один локус, несколько больше у зародышей, чем у материнских растений (таблица). У двух горных видов – *P. pallasiana* и *P. abies* отмечена обратная тенденция. У четырех видов, для которых анализировалось генотипическое разнообразие, у зародышей количество генотипов на локус всегда больше, чем у растений, что, в общем, может быть следствием неравночисленности выборок зародышей и деревьев. В популяциях шести исследуемых видов разных родов

семейства *Pinaceae* обнаружен существенно меньший уровень наблюдаемой гетерозиготности в сравнении с материнскими растениями. Только в популяции *P. cembra*, расположенной на г. Яйко в Украинских Карпатах, эти различия были недостоверны по исследуемым шести локусам. Значимых отличий в ожидаемой гетерозиготности между растениями и зародышами их семян не обнаружено. У зародышей наблюдаемая гетерозиготность была достоверно ниже ожидаемой, за исключением одной популяции *P. cembra* (г. Яйко), а индекс фиксации Райта (F) имел всегда положительное, как правило, высокое значение. Это подтверждение явления инбридинга у зародышей всех изучаемых видов. У генеративно развитых деревьев значения индекса F были заметно меньше, чем у зародышей, а в популяциях трех видов даже отмечен некоторый избыток гетерозигот.

В популяциях растений всех шести изучаемых видов хвойных фактическое распределение генотипов соответствовало теоретически ожидаемому согласно закону Харди-Вайнберга, за исключением единичных случаев. У зародышей семян, наоборот, по большинству локусов выявлено существенное несоответствие фактического от теоретически ожидаемого распределения генотипов. Так, например, у зародышей *P. pallasiana* таких локусов было 7 из 10 и у 6 локусов с неравновесным распределением генотипов согласно значениям внутривидового коэффициента инбридинга  $F_{IS}$  отмечен существенный избыток гомозигот. У зародышей *P. sylvestris* таких локусов было 7, а у *P. sylvestris* var. *cretacea* – 5 локусов и по всем этим локусам установлен явный дефицит гетерозигот. Зародыши *P. abies* имели 4 таких локуса из 6 анализируемых, а зародыши *P. cembra* в двух популяциях – 2-4 таких локуса также из 6 исследуемых. По всем этим локусам также выявлен избыток гомозигот. В популяциях *A. alba* обнаружено 7 локусов со значительным отклонением наблюдаемого от теоретически ожидаемого распределения генотипов в пользу гомозигот. Таким образом, в выборках зародышей из природных популяций шести основных лесобразующих видов хвойных Украины наблюдаются систематические отклонения от равновесия Харди-Вайнберга в сторону избытка гомозигот, в то время как у репродуктивно активных растений этих видов этот эффект отсутствует. Дефицит гетерозигот у зародышей семян можно объяснить высокой долей самоопыления и близкородственного скрещивания в популяциях изучаемых видов хвойных [1-3, 7, 8]. Следовательно, факт наличия инбредных семян в любой их партии из природных популяций необходимо учитывать при планировании селекционных мероприятий и создании лесосеменных плантаций. Наши исследования показывают, что растения в природных популяциях хвойных характеризуются высокой изменчивостью по показателю гетерозиготности зародышей семян. В популяциях разных видов встречаются деревья, отличающиеся стабильной продуктивностью высокогетерозиготного семенного потомства. Нами для *P. pallasiana*, *P. sylvestris* var. *cretacea* и *A. alba* определены маркерные локусы, позволяющие выделять такие деревья в популяциях и насаждениях этих видов [4-6]. Использование этих растений позволит снизить процент инбредных семян, используемых в практике для лесоразведения.

Таким образом, в популяциях шести основных лесобразующих видов хвойных Украины обнаружен существенный дефицит гетерозигот у зародышей семян, что указывает на явление массовости инбридинга в потомстве этих видов.

**Значения основных показателей генетического полиморфизма материнских растений и зародышей их семян природных популяций шести видов семейства *Pinaceae* Lindl. в Украине**

Вид растений	Объект исследования	Объем выборки, ед.	Локусы		Среднее число на локус		Средняя гетерозиготность		Индекс фиксации Райта (F)
			количество	доля полиморфных (P <sub>99</sub> )	аллелей	генотипов	ожидаемая (H <sub>E</sub> )	наблюдаемая (H <sub>o</sub> )	
Сосна обыкновенная ( <i>Pinus sylvestris</i> L.)	растения	29	10	0,900	2,400	2,900	0,266±0,023	0,266±0,023	0
	зародыши	232	10	0,800	2,500	3,700	0,259±0,008	0,151±0,007	0,417
Сосна меловая ( <i>P. sylvestris</i> L. var. <i>cretacea</i> Kalenicz. ex Kom.)	растения	72	10	0,900	3,000	4,600	0,297±0,016	0,281±0,015	0,054
	зародыши	608	10	0,900	3,400	5,600	0,284±0,006	0,197±0,005	0,307
Сосна крымская ( <i>P. pallasiana</i> D. Don)	растения	92	10	0,800	2,900	3,400	0,193±0,013	0,203±0,012	-0,051
	зародыши	736	10	0,700	2,300	4,100	0,179±0,004	0,125±0,004	0,302
Сосна кедровая европейская ( <i>P. cembra</i> L.)	растения	24 (Горганы)	6	0,800	1,60	-	0,184±0,019	0,215±0,020	-0,168
		27 (Яйко)	6	1,000	1,60	-	0,223±0,018	0,204±0,016	0,085
	зародыши	1966(Горганы)	6	0,833	-	-	0,175±0,008	0,158±0,008	0,097
		2126(Яйко)	6	1,000	-	-	0,235±0,007	0,179±0,007	0,238
Ель европейская ( <i>Picea abies</i> (L.) Karst.)	растения	30	7	0,714	2,143	-	0,189±0,022	0,205±0,022	-0,084
	зародыши	178	7	0,714	1,857	-	0,181±0,009	0,136±0,009	0,249
Пихта белая ( <i>Abies alba</i> Mill.)	растения	147	10	0,847	2,690	3,600	0,281±0,011	0,271±0,011	0,036
	зародыши	725	10	0,828	2,810	4,790	0,280±0,005	0,189±0,004	0,325

## Литература

1. Коршиков И.И., Мудрик Е.А. Временная генетическая гетерогенность семенного потомства в изолированной популяции *Pinus sylvestris* var. *cretacea* Kalenicz. ex Kom. в Донбассе // Цитология и генетика. – 2006. – Т.40, №3. – С. 17–23.
2. Коршиков И.И., Мудрик Е.А. Генетическая изменчивость растений и зародышей семян *Pinus pallasiana* D. Дон в высотных поясах популяции горного Крыма // Экология. – 2006. – № 2. – С. 89 – 94.
3. Коршиков И.И., Мудрик О.А., Лісничук А.М., Великоридько Т.І. Аналіз генетичної спорідненості реліктових популяцій *Pinus sylvestris* L. і *Pinus sylvestris* var. *cretacea* Kalenicz. ex Kom. в Україні // Укр. бот. ж. – 2006. – Т.63, № 6. – С. 845–851.
4. Патент 15153 А UA, МПК А01Н 01/04, А01G23/00. Спосіб генетичного маркування і відбору дерев з великою кількістю гетерозиготного насіння у природних популяціях сосни крейдяної: Деклараційний патент на корисну модель. – І.І. Коршиков, О.А. Мудрик.
5. Патент 15154 А UA, МПК А01Н 01/04, А01G23/00. Спосіб генетичного маркування і відбору дерев з великою кількістю гетерозиготного насіння у природних популяціях сосни кримської: Деклараційний патент на корисну модель. – І.І. Коршиков, О.А. Мудрик.
6. Патент 16545 А UA, МПК А01Н 01/04, А01G23/00. Спосіб генетичного маркування і відбору дерев з великою кількістю гетерозиготного насіння у природних популяціях ялиці білої: Деклараційний патент на корисну модель. – І.І. Коршиков, Н.М. Пірко.–№2006 01489; Заявл. 13.02.06; Опубл. 15.08.06.–Бюл. 8.–8с.
7. Политов Д.В., Пірко Н.Н., Пірко Я.В., Мудрик Е.А., Белоконь М.М., Коршиков И.И. Система скрещивания и возрастная динамика уровней инбридинга в популяциях *Pinus cembra* L. Украинских Карпат // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету. Серія: Біологія, 2007.– №3(33).–С.80–85.
8. Korshikov I.I., Pirko N.N., Mudrik E.A., Pirko Ya.V. Maintenance of Genetic Structure in Progenies of Marginal Mountainous and Steppe Populations of Three Species of *Pinaceae* Lindl. Family in Ukraine // *Silvae Genetica*. – 2007.– Vol. 56, №1. – P. 1–10.

## Резюме

В популяционных выборках зародышей семян шести видов семейства *Pinaceae* Lindl. в Украине, в отличие от растений, установлен существенный недостаток гетерозигот, повышенная встречаемость нарушений равновесного распределения генотипов и высокие значения внутривидового коэффициента инбридинга ( $F_{IS}$ ) по большинству из 6-10 анализируемых полиморфных аллозимных локусов.

В популяционных выборках зародков насіння шести видів родини *Pinaceae* Lindl. в Україні на відміну від рослин встановлено значний недолік гетерозигот, підвищене трапляння порушень рівномірного розподілу генотипів та високі показники внутрішньопопуляційного коефіцієнту інбридингу ( $F_{IS}$ ) за більшістю з 6-10 поліморфних аллозимних локусів, що аналізувалися.

Population samples of seed embryos for 6 species from Ukrainian *Pinaceae* Lindl. family were analysed. In contrast to plants considerable lack of heterozygotes, high occurrence of disturbed balance of genotype distribution, and high values of intrapopulation inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ) on the most of analysed polymorphic allozyme loci from 6-10 ones have been revealed.

**КРАВЕЦ Е.А.**

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАНУ,  
Украина, 03680, Киев, ГСП-22, ул. акад.Заболотного, 148, e-mail: elkraev@online.ua*

## **КЛЕТОЧНАЯ КОНКУРЕНЦИЯ В ВЕГЕТАТИВНЫХ И ГЕНЕРАТИВНЫХ МЕРИСТЕМАХ И ЕЕ РОЛЬ В МЕХАНИЗМАХ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПРИ ДЕЙСТВИИ ОБЛУЧЕНИЯ**

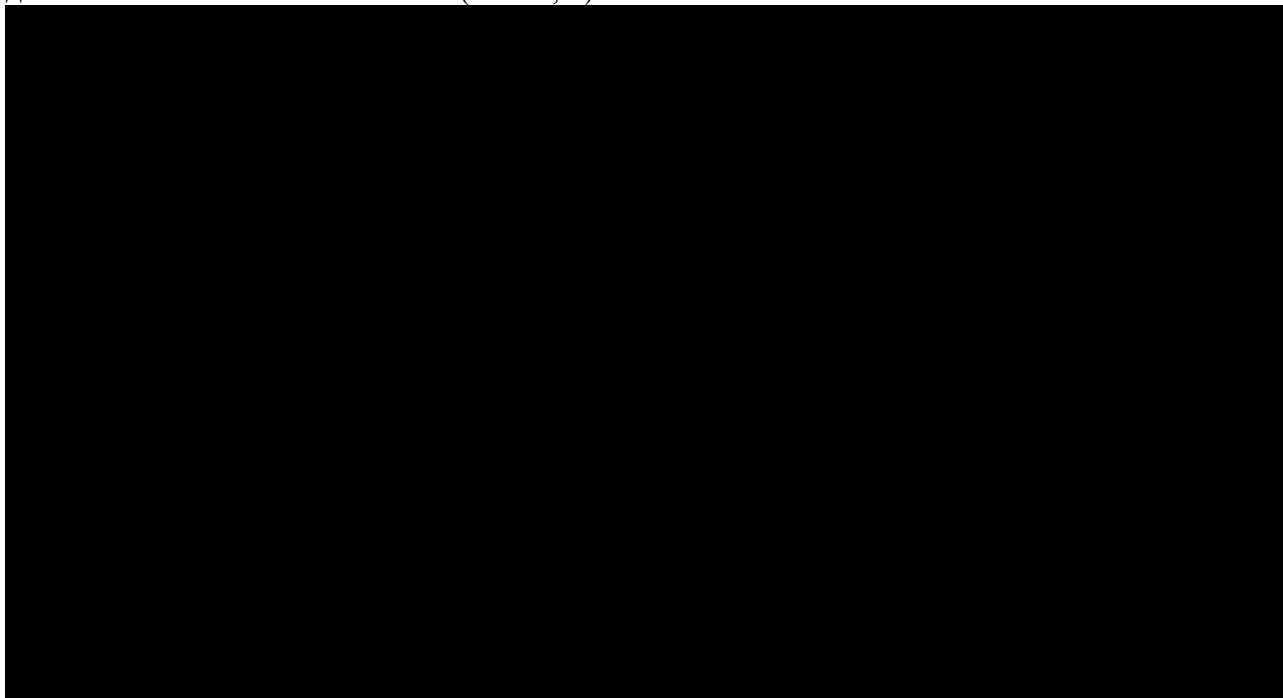
Феномен «клеточной конкуренции», когда клетки разных метаболических путей конкурируют друг с другом, был открыт на дрозофилле (*Drosophila melanogaster*) три десятилетия тому назад, а также был описан в контексте соматических мутаций и апоптозной элиминации (Moreno & Basler, 2004; Díaz & Moreno, 2005; Li & Baker, 2007). Клеточную конкуренцию, наряду с морфогенетическим апоптозом, стали рассматривать как тип клеточной гибели, который имеет решающее значение для обеспечения нормального развития и поддержания здорового состояния различных органов (Díaz & Moreno, 2005; Peter Gallant, 2005). Реализация клеточной конкуренции осуществляется через, так называемый автономный апоптоз, который индуцируется снижением рецепции экстрацеллюлярного фактора *Dpp* (Yamada & O'Connor, 2004). В настоящее время считают, что клеточная конкуренция является одним из механизмов гомеостаза, благодаря которому определяются численность клеток и размеры растущей ткани, в том числе и при повреждениях, стабилизируется дифференциация клеток, элиминируются мутации (Li and Baker, 2007; Tyler et al., 2007). У растений механизмы автономного апоптоза не исследованы. Что касается клеточной конкуренции (или отбора), то, по мнению некоторых исследователей, она играет важную роль в процессах тканевой дифференцировки и адаптации растительного организма (Кунах 2005). В основе клеточной конкуренции могут лежать такие факторы как гетерогенность и избыточность клеточной популяции, а также дефицит ресурсов (Лекавичюс, 1986). Клеточная конкуренция может иметь место в восстановительных процессах в случае воздействия мутагенного фактора. В качестве одного из интереснейших примеров клеточной конкуренции у растений, мы полагаем, можно рассматривать активацию «меристемы ожидания» после индуцирующего воздействия, когда клетки вегетативного апекса замещаются активно пролиферирующими клеточными клонами генеративной меристемы. Примерами клеточной конкуренции у растений может быть элиминация мутантных клеток, образующихся вследствие спонтанного или индуцированного мутагенеза. Цель нашего исследования состояла в выяснении механизмов восстановления генома ячменя в ходе онтогенеза после воздействия ионизирующего и УФ-Б- излучения и роли в этом процессе клеточной конкуренции.

### **Материал и методы**

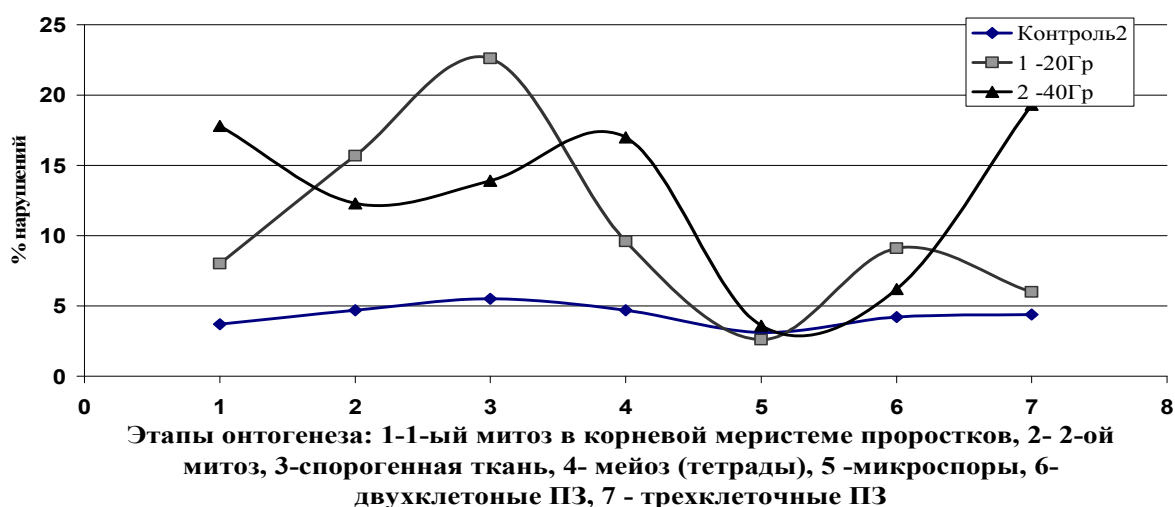
Объект исследования – ячмень (*Hordeum distichum* L., 2n=14), сорт Скарлет. С целью определения эффективных доз гамма-облучения сухие семена ячменя облучали в дозах 10, 20, 30 и 40 Гр., проращивали и проростки тестировали по ростовым и цитогенетическим параметрам. В дальнейшей работе использовали лишь две дозы острого облучения – 20 и 40 Гр. С той же целью 2-ухсуточные проростки облучали УФ-Б радиацией в дозах 0,5; 2,2 и 4,3 кдж/м<sup>2</sup>. После облучения одну часть растений доращивали и фиксировали в течение нескольких суток, другую - высаживали в грунт для оценки воздействия облучения на последующий онтогенез. В дальнейшем был проведен цитогенетический анализ корневой меристемы по экспериментам в 3-кратной повторности. Для оценки состояния репродуктивной системы изучали формирование спорогенной ткани, микроспорогенез и микрогаметогенез. Использовали давленные препараты, окрашенные ацетоорсеином (корневая меристема) и ацетокармином (содержимое пыльников), изготовленные согласно общепринятой

цитологической методике (Паушева,1974). **Результаты исследования и их обсуждение**

**Эффекты последствия УФ-Б- и острого облучения на корневую меристему проростков.** Эффективными в отношении генотоксического действия оказались все использованные дозы острого и УФ-Б- облучения: в корневой меристеме проростков формировались хромосомные aberrации. Повышение дозы облучения приводило к возрастанию числа хромосомных aberrаций, микроядер и полиплоидных клеток, однако в диапазоне высоких доз число хромосомных aberrаций, как правило, снижалось. Уровень спонтанного мутагенеза коррелировал с числом полиплоидных клеток, сохранивших способность к пролиферации. В первом митозе число хромосомных aberrаций было пропорционально дозе облучения, во втором митозе дозовая зависимость изменялась (Рис. 1, 2).



**Рис.2. Динамика цитогенетических нарушений в онтогенезе растений ячменя при воздействии острого облучения**



При максимальной экспозиции ультрафиолета и дозе острого облучения в 40 Гр число aberrаций снижалось параллельно с возрастанием количества дегенерирующих клеток. Элиминация клеток проходит по типу апоптоза, морфологически



проявляющегося через фрагментацию ядра или пикноз хроматина. Итак, с увеличением дозы острого и УФ-Б- облучения число aberrаций в первом митозе повышалось, а во втором снижалось, т.е. динамика образования хромосомных aberrаций при разных дозах облучения обнаруживала обратную зависимость от дозы. Это может достигаться за счет клеточного отбора, что подтверждается активизацией апоптоза.

**Влияние ультрафиолетового и острого облучения на репродуктивную систему.** Основным типом аномалий, характеризующих генезис микроспороцитов, является деструктивный цитомиксис. При остром облучении и в опыте с максимальной экспозицией УФ деструктивный цитомиксис охватывает от 14 до 23% микроспороцитов. В ходе микроспорогенеза обнаруживались цитогенетические аномалий, связанные с формированием хромосомных aberrаций и последствиями деструктивного цитомиксиса. Со стороны мужского гаметофита реакция на облучение проявлялась в возрастании полиморфизма, спектра и числа цитопатологий пыльцевых зерен. Характер индуцированных нарушений является, по-видимому, неспецифическим; он свойственен, в частности тетраплоидным генотипам ржи при спонтанном и индуцированном мутагенезе (Кравец, 2007). В количественном отношении между показателями стерильности пыльцы и дозой ультрафиолета прослеживается обратная зависимость. В вариантах с острым облучением зависимость оказывается прямой (Рис.1, 2). В диапазоне малых доз ультрафиолета индуцированные повреждения сохраняются в течение всего онтогенеза и не устраняются ни репарацией, ни клеточным отбором. В результате количество нарушений на протяжении онтогенеза возрастает. Следует обратить внимание на положительную зависимость между степенью деструктивного цитомиксиса и числом нарушений в ходе последующего формирования пыльцевого зерна (Рис.1, 2). Очевидно, что степень деструктивного цитомиксиса определяет качество и фертильность пыльцевых зерен. В диапазоне больших доз гамма-облучения обнаруживается «эффект насыщения» - эффективность клеточного отбора снижается и число нарушений остается значительным (Рис.2).

Основным механизмом клеточной конкуренции является цитомиксис, в ходе которого осуществляется своеобразная информационная «сверка» и подготовка микроспороцитов к мейозу, а также освобождение клеток от избыточного хроматина. Действительно, благодаря цитоплазматическим контактам, клеточная популяция микроспороцитов синхронизируется, а те из клеток, которые не охватываются сетью контактов, как правило, задерживаются в поздней профазе-метафазе первого деления мейоза и элиминируются. Клеточная конкуренция зависит от генотипа растения и влияния стрессовых факторов. У гомозиготных самоопылителей, таких как ячмень и пшеница, цитомиксис выражен сильнее, чем у перекрестников, например, ржи (Гродзинский и др., 1996; Кравец и др., 2006; Кравец, 2007). В связи с этим, интересна точка зрения Шнайдер Т.М. (1988), полагавшей, что цитомиксис увеличивает генетическое разнообразие. Стрессовые факторы – облучение, гибридизация, как правило, усиливают деструктивный характер цитомиксиса.

Следовательно, селекция клеточной популяции микроспороцитов осуществляются через автономный апоптоз. В отличие от морфогенетического апоптоза, микроспороцитов. Хотя между этими двумя типами клеточной гибели, возможно, и нет четких разграничений.

#### Выводы

1. Острое и УФ-Б облучение проростков индуцировало увеличение числа хромосомных aberrаций в вегетативной меристеме и цитопатологий в ходе микроспорогенеза и развития пыльцевого зерна. Динамика образования хромосомных aberrаций в корневой меристеме при разных дозах облучения обнаруживала обратную зависимость от дозы.
2. Со стороны мужской генеративной сферы реакция на облучение заключалась в усилении цитомиксиса, увеличении числа цитогенетических аномалий в ходе

микроспорогенеза, возрастании полиморфизма, спектра и числа цитопатологии пыльцевых зерен.

3. В диапазоне малых доз ультрафиолета индуцированные повреждения сохранялись в течение всего онтогенеза растений. С увеличением дозы облучения наблюдалась активизация цитолитических процессов (апоптоза) и снижение числа aberrаций, что может достигаться за счет клеточного отбора. Степень деструктивного цитомиксиса положительно коррелировала с качеством и фертильностью пыльцы.

4. Предполагается, что основным механизмом клеточной конкуренции в корневой меристеме и спорогенной ткани является автономный апоптоз, который индуцируется внутри самой клеточной популяции в ответ на воздействие мутагенного и, возможно, других внутренних и внешних факторов. Клеточная конкуренция в этих условиях способствует восстановлению и сохранению гомеостаза.

#### *Литература*

1. Гродзинский Д.М., Кравец Е.А., Хведынич О.А., Коломиец О.Д., Банникова В.П. Формирование репродуктивной системы растений, подвергшихся воздействию хронического облучения // Цитология и генетика.- 1996.- т.30, №3. С.36-45.
2. Лекавичюс Э. Элементы общей теории адаптации. Вильнюс:Мокслас.- 1986. – 273 с.
3. Кравец Е.А. Роль гаплонтного отбора в механизмах стабилизации ди- и тетраплоидных генотипов ржи под воздействием гамма-облучения.- В сб. Фактори експериментальної еволюції організмів. - Т. 1. - Київ: ЛОГОС.- 2007.
4. Кравец Е.А., Коломиец О.Д., Фалинская Т.П., Гродзинский Д.М. Цитомиксис и программируемая клеточная гибель в микроспорогенезе у мягкой пшеницы. В сб. Фактори експериментальної еволюції організмів. - Т. 1. - Київ: ЛОГОС.- 2006.
5. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. –Київ:Логос.- 2005.-723с.
6. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. -М.:Колос.-1974.-245 с.
7. Шнайдер Т.М. Особенности мейоза у отдаленных гибридов пшеницы, полученных с участием мутанта *ph* // Цитология и генетика.-1988.-т.22, N3. С.18-22.
8. Díaz, B., Moreno. E. The competitive nature of cells.// Exp. cell res.- 2005. – v.306.- P.317-322.
9. Gallant Peter. Myc, Cell Competition and Compensatory Proliferation// Cancer Research.- 2005.- v.65.- P. 6485-6487.
10. Li Wei and Baker Nicholas E. Engulfment Is Required for Cell Competition//Cell.- 2007.-v. 129.- P. 1215-1225 .
11. Moreno, E., Basler, K. dMyc transforms cells into super-competitors.//Cell.- 2004.-v. 117.- P.117-129.
12. Tyler David M. , Li Wei, Zhuo Ning , Pellock Brett and Baker Nicholas E. Genes Affecting Cell Competition in Drosophila// Genetics. 2007.V. 175.-P. 643-657.
13. Yamada Takashi Adachi and O'Connor Michael B. Mechanisms for Removal of Developmentally Abnormal Cells: Cell Competition and Morphogenetic Apoptosis// J. Biochem. -2004.- v. 136, No. 1.-P. 13-17.

#### **Резюме**

Возрастание дозы ионизирующего и УФ-Б облучения приводит в вегетативных и генеративных меристемах ячменя к активизации апоптоза и снижению числа aberrаций, что может достигаться за счет клеточной конкуренции.

Збільшення дози гамма- і УФ-Б опромінення викликає у кореневій меристемі та репродуктивних органах ячменя активізацію апоптозу та зменшення кількості ушкоджень, що може досягатися за рахунок клітинної конкуренції.

Increasing the ionizing and UV-B irradiation effected on vegetative and generative meristems causes of apoptosis activation and decreasing of aberration number. This may be resulted by the cell competition.

**ЛЮСИКОВ О. М., ГОРДЕЙ И. А.**

*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,*

*Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: O.Lyusikov@igc.bas-net.by*

## **ХРОМОСОМНАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ ГЕНОМА РЖАНО-ПШЕНИЧНЫХ АМФИДИПЛОИДОВ СЕКАЛОТРИТИКУМ ( $\times$ SECALOTRITICUM)**

Наибольшее биоразнообразие достигается при интрогрессии нового генетического материала в больших объемах – отдаленной гибридизации, аллополиплоидии, хромосомной и геномной реконструкции видов. Отдаленная гибридизация служит пусковым механизмом активации молекулярно-цитогенетических коадаптивных процессов, у аллополиплоидов и хромосомно-замещенных форм создается дополнительный резерв генетической изменчивости видов за счет увеличения полиморфизма собственных хромосом и множественных межгеномных рекомбинаций и хромосомных перестроек. Поэтому особое значение имеют эволюционные, цитогенетические и молекулярные исследования закономерностей реконструкции гибридных геномов с целью разработки эффективных способов ускорения их коадаптивных генетических модификаций.

### **Материал и методы**

Материалом для исследований служили сорта тетраплоидной озимой ржи, гексаплоидных озимых тритикале, озимой мягкой пшеницы и созданные на их основе формы гексаплоидных ржано-пшеничных амфидиплоидов - секалотритикум и ржано-пшеничные хромосомно-замещенные линии.

Результаты изучения признаков морфотипа и морфобиологических параметров продуктивности (кустистость и высота растения, длина, число колосков, количество и масса зерен главного колоса, урожайность) статистически оценивали соответственно анализом вариации по качественным и количественным признакам; достоверность средних определяли по критерию Стьюдента ( $t$ ), влияние отдельных факторов на анализируемые признаки - по критерию Фишера ( $F$ ) [1].

Цитологический анализ мейоза проводили на окрашенных ацетокармином давленных препаратах пыльников. Кариотипический анализ проводили с применением С-метода дифференциальной окраски хромосом [2]. Препараты анализировали на микроскопе Leica DM RXA2 с оптикой Leica PlanAPO.

### **Результаты и обсуждение**

Формы секалотритикум создавали путем гибридизации тетраплоидной ржи (RRRR,  $2n=28$ ) с гексаплоидными тритикале (AABBRR,  $2n=42$ ) и последующим 1-2-кратным беккроссированием полученных ржано-тритикальных пентаплоидных гибридов  $F_1$  (RRABR,  $5x=35$ ) на исходные тритикале [3, 4]. Использование тритикале как вида-посредника в качестве источника геномов пшеницы позволило преодолеть барьер односторонней прогамной несовместимости, препятствующей ржано-пшеничной гибридизации. Ржано-тритикальные скрещивания с участием тетраплоидной ржи характеризовались более высокой прогамной (~1,5%, до 12%) и постамной (~80%) совместимостью, чем с участием диплоидной (~0,7%, до 3,5% нежизнеспособных семян).

Мейоз ржано-пшеничных амфиплоидов  $F_1 - F_1BC_{1-2}$  в условиях ржаной цитоплазмы характеризовался различными уровнями гомеологической конъюгации

хромосом в диакинезе, наличием асинаптических униввалентов и псевдоуниввалентов десинаптического происхождения, соответственно, различными типами их деления в АI мейоза и процессами элиминации хромосом. Выход ржано-пшеничных 42-хромосомных форм достигал 12-24% с возрастанием к более поздним поколениям беккрасса, среди них фертильные гексаплоидные ржано-пшеничные амфидиплоиды секалотритикум составляли 1-5%.

Теоретически в результате применения данного способа предполагали возможность возникновения А,В/R-замещенных форм секалотритикум, однако в эксперименте они не были обнаружены. Секалотритикум в F<sub>1</sub>-F<sub>3</sub> достигали цитологической стабильности процессов мейоза, сравнимой с исходными тритикале и превышающей цитостабильность тетраплоидной ржи, а к F<sub>5-7</sub> превосходили исходные формы, имели всего ~3-8% аномальных мейотических клеток и более 90% фертильной пыльцы.

Кариотипический анализ с использованием С-метода дифференциальной окраски хромосом показал, что все выделенные стабильные формы секалотритикум являлись геномно-сбалансированными гексаплоидами и не имели замещений хромосом. Однако у ряда форм были отмечены новые мелкие интеркалярные С-блоки, которые могли быть отражением хромосомных перестроек (транслокаций), происходивших вследствие межгеномной рекомбинации хромосом или в результате гибридогенной активации миграций мобильных генетических элементов. Характерной особенностью модификаций генома секалотритикум первых поколений был полиморфизм гетерохроматиновых блоков, выражающийся в уменьшении их числа и размера в первую очередь у хромосом ржаного происхождения. Интенсивность и значительность таких перестроек между поколениями уменьшалась от F<sub>1</sub> к F<sub>7</sub>, однако в целом R-геном секалотритикум, вероятно, имеет тенденцию сохранять более выраженные гетерохроматиновые участки, чем тритикале. Этим объясняется отмеченная в ряде случаев у ржано-пшеничных амфидиплоидов гетероморфность структуры R-хромосом, вероятно, ржаного и тритикального происхождения.

Изучение признаков морфологии и продуктивности созданных секалотритикум показало наличие у них интенсивного формообразовательного процесса, положительное влияние ржаной цитоплазмы на жизнеспособность растений, сроки колошения и цветения, образование фертильной пыльцы [5], устойчивость к грибным болезням, зимостойкость. Секалотритикум в среднем были более высокорослы (на ~10 - 15 см), чем тритикале и имели более длинный колос при одинаковом среднем количестве колосков (рис. 1). По урожайности более половины созданных форм секалотритикум превосходили по урожайности исходные тритикале, а 15% форм превосходили контрольный сорт-стандарт Мiхась.

С целью увеличения генетического разнообразия созданного генофонда ржано-пшеничных амфидиплоидов применяли рекомбинационный синтез вторичных секалотритикум на основе скрещиваний секалотритикум с тритикале, позволяющий увеличить интенсивность рекомбинационных процессов и ускорить коадаптивную перестройку гибридного полигенома. Однако изучение секалотритикум-тритикальных рекомбинантов показало, что их изменчивость не выходила за рамки морфотипического разнообразия исходных форм секалотритикум. Поэтому для достижения наибольшего разнообразия генофонда и интрогрессии хозяйственно-ценных признаков качества зерна мягкой пшеницы нами была проведена хромосомная реконструкция генома секалотритикум путем создания ржано-пшеничных хромосомно-замещенных форм.



*Рисунок 1. Колос тритикале Мiхась (а) и секалотритикум типичного морфотипа (б)*

Ржано-пшеничные D/R-хромосомно-замещенные формы получали путем интрогрессивной гибридизации секалотритикум (RRAABB, 2n=42) с мягкой пшеницей (AABBDD, 2n=42) с последующим 1-2-кратным беккроссом (рис. 2) [6]. Для выделения линий производили отбор и самоопыление морфотипически стабильных фертильных форм F<sub>3-6</sub>BC<sub>1-2</sub>. Было показано, что для получения хромосомно-замещенных форм наиболее эффективен однократный беккросс секалотритикум-пшеничных гибридов на пшеницу или тритикале - последующие насыщающие скрещивания значительно уменьшали выход замещенных форм и способствовали цитологической стабилизации гибридов в геномно-сбалансированных вариантах секалотритикум или аллопшениц, не несущих хромосомных замещений. Относительно стабильные замещенные линии выщеплялись начиная с F<sub>3-5</sub>-поколений, а наибольшей фенотипической стабильности достигали к F<sub>8-9</sub>. Однако и после 1-3-кратного строгого самоопыления их цитологическая стабильность была значительно ниже исходных форм и 15-30% семей константно показывали фенотипическое расщепление. Отдельные D/R-хромосомно-замещенные сохраняли повышенную болезнеустойчивость исходных секалотритикум, но по продуктивности только одна из них была сравнима с тритикале Мiхась.

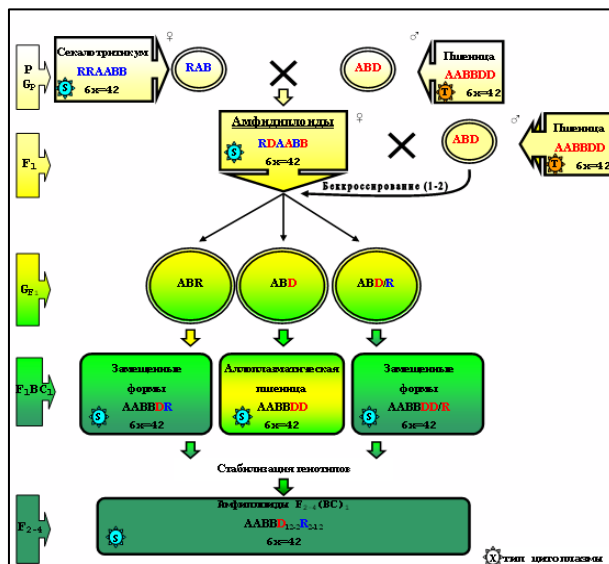


Рисунок 2. Синтез D/R-хромосомно-замещенных форм секалотритикум

С целью расширения спектра получаемых замещений хромосом нами был разработан новый метод создания A/B/D/R-ржано-пшеничных хромосомно-замещенных форм. Метод включает гибридизацию ржано-тритикальных пентаплоидных гибридов F<sub>1</sub> (RRABR, 5x=35) с мягкой пшеницей (AABBDD, 2n=42) с последующим 1-2-кратным беккроссом и основан на уникальной цитогенетической особенности ржано-тритикальных гибридов F<sub>1</sub> продуцировать широкий спектр функциональных гамет различного геномного и хромосомного состава (рис. 3).

С применением данного метода был получен широкий спектр A'/B'/D'/R'-промежуточных форм и выделены хромосомно-замещенные линии (1D/1A, 6D/6A, 1D/1R, 3D/3R, 4D/4R, 7D/7R, 1B/1R, гетерологичная 1A/7R линия).

Полученные формы характеризовались значительным фенотипическим разнообразием и высокой интенсивностью геномных и хромосомных перестроек. Цитологическая стабилизация хромосомно-замещенных форм была затруднена и в F<sub>9</sub> не достигала уровня исходных форм. Была выявлена тесная взаимосвязь степени аномальности АП мейоза

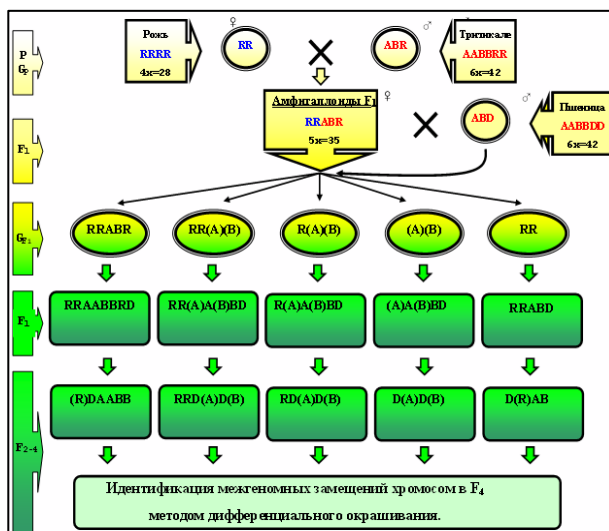


Рисунок 3. Синтез A/B/D/R-хромосомно-замещенных форм секалотритикум

(цитологической нестабильности мейоза) со стерильностью пыльцы ( $r=0,97$ ) и колоса ( $r=0,81$ ).

Фенотипически семьи ржано-пшеничных хромосомно-замещенных форм расщеплялись в  $F_{1-8}$ -поколениях. Среди большого многообразия полученных растений по морфологическим признакам колоса было выделено 6 основных морфотипов (рис. 4), среди каждого из которых встречались остистые и безостые формы.

Предложенный способ создания A/B/D/R-хромосомно-замещенных форм секалотритикум позволил значительно расширить спектр получаемых замещений. Однако было установлено, что по признаку межвидовой совместимости скрещивания ржано-тритикальных гибридов  $F_1$  с пшеницей, как и прямые ржано-пшеничные скрещивания, характеризовались односторонней прогамной несовместимостью (завязываемость  $\sim 0,1-0,01\%$ ), которая выступала основным лимитирующим фактором эффективности метода и поэтому необходим поиск способов ее преодоления.



Рисунок 4. Морфотипы колосаржано-пшеничных хромосомно-замещенных форм: спельтоидный (а), тритикальный (б), секалотритикум (в), верхнеостистый (г), растопыренный (д), пшеничный (е).

### Выводы

Таким образом, при создании методом отдаленной интрогрессивной гибридизации и аллополиплоидии ржано-пшеничных амфидиплоидов и ржано-пшеничных хромосомно-замещенных форм реконструкция генома секалотритикум происходит путем рекомбинаций, внутри- и межгеномных хромосомных перестроек и межгеномных гомеологичных и гетерологичных замещений хромосом. Эти процессы активируются актом отдаленной гибридизации и их интенсивность постепенно снижается в ряду поколений - до  $F_8$  у эуплоидных секалотритикум, но остается еще относительно высокой в  $F_9$  у хромосомно-замещенных линий. Уровень структурного полиморфизма хромосом полигенома повышался в ряду: стабильные секалотритикум - исходные формы тритикале и ржи - первичные секалотритикум - хромосомно-замещенные линии - фенотипически и цитологически нестабильные формы ржано-пшеничных амфидиплоидов.

Работа финансировалась БРФФИ №Б06-013 и ГНТП "Промышленные биотехнологии".

### Литература

1. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. Мн., Вышэйш. школа, 1973. 319 с.
2. Iordansky A. B., Zurabishvili T. G., Badaev N. S. Linear differentiation of cereal chromosome // Theor. Appl. Genet.. - 1978. - V.51: № 1. - P. 145-152; № 2. - P. 281-288.
3. Люсигов О.М., Белько Н. Б., Щетько И.С., Гордей И.А. Создание ржано-пшеничных амфидиплоидов с цитоплазмой ржи - секалотритикум (RRAABB,  $2n=42$ ): особенности мейоза у ржано-тритикальных гибридов  $F_1$  (RRABR,  $5x=35$ ) // Генетика. 2005. Т. 41. № 7. С. 902 - 909.
4. Люсигов О.М., Гордей И.А., Быченко А.П., Белько Н.Б., Щетько И.С. Цитогенетический анализ формирования генома секалотритикум (xSecalotriticum) // III Международная научная конференция "Факторы экспериментальной эволюции организмов", г. Алушта, 25-28 сентября 2006 г. Київ, ЛОГОС, 2006. Т.3, с. 28-34.



5. Белько Н.Б., Гордей И.А., Хохлова С.А., Люсиков О.М. Морфобиологические особенности ржано-тритикальных амфигаплоидов F<sub>1</sub> // Весці Нац. Акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. 2000. № 3. С. 60-63.
6. Гордей И.А., Белько Н.Б., Хохлова С.А., Люсиков О.М., Галалюк Н.Ф. Цитогенетический анализ формирования и реконструкции кариотипа секалотритикум // Международная конференция по молекулярной генетике и биотехнологии: Мат. Междунар. конф. "Молекулярная генетика и биотехнология" – Беларусь, Минск. Апрель 6 – 8. 1998. С. 161 – 163.

#### **Резюме**

Обсуждаются пути и результаты изучения цитогенетических процессов формирования и реконструкции генома ржано-пшеничных амфидиплоидов с цитоплазмой ржи – секалотритикум в связи с повышением изменчивости, расширением генофонда, созданием ржано-пшеничных хромосомно-замещенных форм и межвидовой интродукцией хозяйственно-ценных признаков.

Ways and results of studying cytogenetic processes in formation and reconstruction of rye-wheat amphidiploid genome with rye cytoplasm – secalotriticum are discussed in view of increasing variability, broadening gene pool and developing rye-wheat chromosome-substitution forms and interspecific introgression of agronomic traits.

#### **РУБАН Ю.Д.**

*Харьковская государственная зооветеринарная академия,  
Украина, 62341, п/о Малая Даниловка, Харьковская обл., ул.Академическая 7/9*

### **ЭВОЛЮЦИЯ ПОРОД ЖИВОТНЫХ В СИСТЕМЕ ПЛЕМЕННОЙ РАБОТЫ**

Слова Н.И. Вавилова о том, что «сама селекция домашних животных, так же как и растений, по существу представляет собой экспериментальную эволюцию, но для того, чтобы управлять эволюцией, необходимо историческое понимание действия эволюции» [1, С.9] не потеряли своей актуальности и сегодня. Особое значение они имеют для животноводства, когда методы селекции должны глубже учитывать направление эволюционного процесса, знать происхождение изменения в типе пород животных. Макро- и микроэволюционные процессы дают возможность учесть такие изменения.

#### **Материалы и методы**

Материалом послужил для изучения макроэволюционных процессов вид собственного крупного рогатого скота за 220 млн.лет на основе данных палеонтологии, для изучения микроэволюционных процессов – основные породы скота за всю историю их существования. Методом исследования стал исторический, который был обоснован в биологии К.А. Тимирязевым в конце XIX в. и впервые опубликован в 1933 г. уже после смерти ученого [2].

#### **Результаты и обсуждение**

В результате макроэволюционных процессов у полорогих возникла хорошая способность к добыванию и возможно более полному использованию корма, а также защиты от хищников. Возможность хорошей защиты от хищников была связана со значительным ростом и применением в качестве орудия защиты рогов, а полное использование имеющегося корма – с развитием жвачки и рубцового пищеварения.

Развитие в процессе эволюции у жвачных четырехкамерного желудка позволило им использовать труднопереваримые объемистые корма и способствовало формированию желудочно-кишечного типа пищеварения, при котором основная часть

пищеварительных процессов осуществляется в отделах желудка, 70-85% переваримого сухого вещества рациона используется в рубце.

Вот почему в современной селекции учитываются показатели рубцового пищеварения и течение жвачного процесса у животных.

Микроэволюция связана с практической селекцией. Поэтому возникла проблема установления объема рубца при жизни животного косвенным способом. Была установлена площадь желудка при сегментальном разрезе: на уровне XI, XIII грудных позвонков и I поясничного позвонка наибольшую площадь тела занимает желудок. Ориентировочно взят XIII грудной позвонок и предложены специальные промеры: обхват брюха, глубина брюха, ширина и длина брюха. Определены специальные индексы. Определение коэффициентов корреляции между обхватом брюха, живой массой и высотой в холке у животного дал возможность вести отбор коров по прижизненному установлению объема рубца, пользуясь специальным индексом.

Тип животных существенное влияние на потребление и использование питательных веществ корма. Было установлено, что у голштинских помесей интенсивность конверсии корма происходит на более ранней стадии лактации, конверсия протеина корма в протеин молока происходит более эффективно у широкотелого плотного нежного типа.

С.И. Штейман был одним из первых, кто обратил внимание и осуществил на практике отбор скота на потребление и использование питательных веществ корма на молокообразование еще в 30-е годы XX в. [4]. Указанный признак в XXI в., наряду с другими он позволяет вести работу в прогрессивном направлении.

Поэтому выбор признаков для оценки селекционного процесса и его направленности должен включать определение нормы организма, высоких продуктивности и качество продукции, большую продолжительность хозяйственного использования животных, технологические признаки, имеющие важное значение в современной и будущей селекции, высокую адаптационную импортных пород к условиям среды, устойчивость к различным заболеваниям, сохранение отечественных пород и типов животных.

Комплекс указанных факторов дает возможность в условиях глобального эволюционизма осуществлять селекцию животных.

Фундаментальные работы В.И. Вернадского заложили основы рассмотрения глобального эволюционизма, превращения биосферы в ноосферу [3], среди селекционных методов и приемов важное значение приобрела конверсионная способность животных с высокой эффективностью превращать питательные вещества корма в продукцию.

#### **Выводы**

1. Эволюция пород в системе племенной работы имеет большое значение.
2. Для научного определения направления прогресса в селекционном процессе необходимо учитывать макро- и микроэволюцию видов и пород домашних животных.
3. Глобальный эволюционизм связан как с положительными, так и негативными факторами в селекционном процессе, которые надо учитывать в работе.

#### **Литература**

1. *Вавилов Н.И.* Роль советской науки в изучении проблемы происхождения доиашних животных // Труды лаб.генетики: Проблемы происхождения домашних животных. Вып 1. - Л.: Изд-во АН СССР, 1933. – С. 5-12.
2. Климент Аркадьевич Тимирязев: Сочинения. Том VI: Исторический метод в биологии. Десять общедоступных чтений. – М.: Сельхозгиз, 1939. – 237 с.
3. *Рубан Ю.Д.* Биология и эволюция в селекции животных и технологии производства. - К.: Аграрная наука, 2005. - 224 с.
4. *Рубан Ю.Д.* Приоритет отечественных ученых в развитии зооинженерной науки. - К.: Аграрная наука, 2004. - 292 с.



## **Резюме**

Рассматривается эволюция (макро- и микроэволюция, глобальный эволюционизм) в системе племенной работы. Обращается внимание на конверсионную способность животных превращать питательные вещества в продукцию.

Розглядається еволюція (макро- і мікроеволюція), глобальний еволюціонізм) у системі племінної роботи. Звертається увага на конверсійну здатність тварин перетворювати поживні речовини корму в продукцію.

The evolution (macro-and-micro evolution, global evolutionism) in the system of pedigree breeding has been considered. The conversion ability of animals, i.e. the ability to convert nutritive substance of feeds into the products, has been paid much attention to.

**САМАТАДЗЕ Т.Е., ЗЕЛЕНИН А.В., МУРАВЕНКО О.В.**

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН*

*Россия, 119991, Москва, ул. Вавилова 32, e-mail:tsamatadze@gmail.com*

## **СРАВНИТЕЛЬНОЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНОМОВ СОРТОВ И ЛИНИЙ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM L.*)**

По своему значению для мирового растениеводства бобовые культуры занимают особое место среди сельскохозяйственных культур. К наиболее ценным и широко районированным бобовым культурам относят горох, фасоль, люпин, люцерна и они широко используются в качестве модельных объектов для исследований. Однако, даже у классического объекта исследований - гороха посевного до недавнего времени не было полной цитологической идентификации хромосом в геноме и отсутствовало соответствие генетической и цитологической классификаций хромосом (*Blixt, 1958; Neumann et al., 2001; 2002; Саматадзе и др., 2002, 2005*). Только с помощью высокоразрешающего дифференциального окрашивания хромосом гороха удалось их полностью идентифицировать и даже точно локализовать расположение генов 5S рРНК, а также точки разрывов хромосом в некоторых транслокационных линиях (*Саматадзе и др., 2005*). В настоящее время точная идентификация хромосом гороха, а также соответствие цитологической и генетической номенклатур его хромосом подтверждено с помощью FISH с различными тандемными повторами (*Macas et al., 2007*). Эти примеры показывают, насколько важно и информативно использование большого числа хромосомных маркеров для глубокого изучения и точного физического картирования хромосом в геномах бобовых культур.

Целью данного исследования явилось сравнительное цитогенетического исследование сортов и линий гороха посевного с использованием C-/Ag-ЯОР-дифференциального окрашивания, а также флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

### **Материалы и методы**

Материалом для исследования послужили сорта и линии гороха посевного, полученные из коллекции ВНИИСХМ г. Санкт-Петербурга. Три сорта зернового гороха: Frisson, Sparkle, Rondo и один сорт овощного гороха- Finale, а также 2 линии: Sprint-2 и SGE. Исследование дифференциальных рисунков митотических хромосом гороха (C-/Ag-ЯОР-окраска), двухцветный FISH проводили по описанным ранее методикам (*Саматадзе, 2002, 2005*). Анализ метафазных пластинок и регистрацию изображений проводили с помощью черно-белой ПЗС камеры CoolSnap (Roper Scientific, США), установленной на флуоресцентном микроскопе Leitz Wetzlar.

Измерения хромосом и построение идиограмм проводили с помощью программы анализа изображения Карио 1.5 (ВидеоТест, Санкт-Петербург). Для каждого образца анализировали не менее 15-30 полных метафазных пластинок.

### **Результаты и обсуждения**

Сравнительное исследование рисунков С-дифференциально окрашенных хромосом изучаемых сортов и линий гороха показало сходство их рисунков. На хромосомах выявлялось небольшое количество гетерохроматина, в основном прицентромерной локализации. Установлено, что в кариотипах сортов и линий гороха наблюдается хромосомный полиморфизм по размеру бэндов на спутничных хромосомах. У всех сортов зернового гороха был выявлен крупный С-бэнд на 4 хромосоме и среднего размера блок гетерохроматина, локализованный на спутнике и в районе приспутничной нити на 7 хромосоме. У линий и у сорта овощного гороха Finale на этих же хромосомах С-блоки были меньшей интенсивности окраски и практически сходного размера. Распределение С-бэндов по хромосомам в кариотипах сортов и линий гороха позволило определить все семь гомологичных пар. По морфологии и рисунку С-бэндинга были идентифицированы хромосомы с 1 по 7 в соответствие со стандартной номенклатурой Бликста и разработанной нами ранее номенклатурой (Саматадзе и др., 2002).

FISH-анализ с пробой рТа 71 выявил наличие двух сайтов 45S рДНК в районах вторичных перетяжек на спутничных хромосомах 4 и 7. В случаях, когда спутничная нить четко выражена, можно обнаружить, что сигнал гибридизации на хромосоме 4 локализуется в районе спутничной нити и в спутнике, а на хромосоме 7 – в спутничной нити и проксимальнее ее в районе приспутничного гетерохроматина. Как было показано ранее, хромосомы 4 и 7 различаются морфологически и по размеру спутника, который обладает большими размерами на хромосоме 7. Размеры гибридизационных сигналов 45S рДНК на хромосоме 4 были меньше, чем на хромосоме 7 в кариотипах всех изучаемых сортов. У линий гороха сайты 45S рДНК на обеих спутничных хромосомах были схожими с размером сигнала на хромосоме 4 у других изученных сортов. Таким образом, наблюдается межсортовой полиморфизм у гороха по размерам сайтов рибосомных генов на 4 и 7 хромосомах, что подтверждается в предыдущих исследованиях (Саматадзе и др., 2005). Размеры сайтов 45S рДНК на обеих спутничных хромосомах у сортов и линий могут быть приблизительно одинаковыми, однако, в некоторых случаях, на хромосоме 7 выявляется более крупный сайт у сортов, в то время, как у линий гороха сайты 45S в основном одинакового размера.

Транскрипционную активность генов 45S рРНК выявляли с помощью метода окрашивания азотнокислым серебром (Ag-ЯОР). Анализ рисунка Ag-ЯОР-окрашивания у всех образцов гороха выявил наличие Ag-положительных районов в области вторичных перетяжек на спутничных хромосомах 4 и 7. На хромосоме 7 всегда наблюдался более крупный Ag-ЯОР. Поскольку ранее было показано, что размеры Ag-ЯОР коррелируют с функциональной активностью, расположенных в этом районе рибосомных генов, то можно предположить большую функциональную активность ЯОР хромосомы 7 по сравнению с ЯОР хромосомы 4. В интерфазных ядрах изученных образцов гороха при этом наблюдалось также не более четырех Ag-окрашенных ядрышек.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) с пробой рТа 794 показала три сайта 5S рРНК генов. Один сайт локализован в субтеломерном районе 4.3 короткого плеча хромосомы 1, второй - в медианном районе 4 короткого плеча хромосомы 3 и третий - в проксимальном районе 2 короткого плеча хромосомы 5. Общая картина распределения сигналов по их интенсивности на 1, 3 и 5 хромосомах сохраняется во всех изученных сортах и согласуется с результатами других исследователей, которые на хромосомах гороха картировали три сайта 5S генов (Ellis et al 1988; Hall et al., 1997a; Neumann et al., 2001; Саматадзе и др., 2005). Было показано, что наиболее

крупный сайт 5S генов располагается на хромосоме 5, а сайты меньшего размера локализованы в дистальной части метацентрической хромосомы 1 и на хромосоме 3 либо в медианной (Hall et al., 1997a), либо в прителомерной части (Ellis et al., 1988; Neumann et al., 2001; Саматадзе и др., 2005).

#### **Выводы**

1. Проведено сравнительное цитогенетическое изучение кариотипов 4 сортов и 2 линий гороха посевного с использованием C-/Ag-ЯОР- дифференциального окрашивания и флуоресцентной гибридизации *in situ*.
2. Выявлены различия рисунков C-окраски на спутничных хромосом в кариотипах сортов разного направления селекции.
3. Уточнена локализация сайтов гибридизации 5S и 45S рДНК и установлен межсортовой полиморфизм по размерам сайтов рибосомных генов на 4 и 7 хромосоме.
4. Показана возможность применения методов хромосомного анализа для паспортизации линий и сортов гороха.

Работа поддерживалась грантом РФФИ 07-04-13553.

#### **Литература**

1. Blixt S. Cytology of Pisum II. The normal karyotype. // Agric. Hort. Genet. -1958. vol. 16.- P. 221-237.
2. Neumann P., Nouzova M., Macas J. Molecular and cytogenetic analysis of repetitive DNA in pea (*Pisum sativum* L.). // Genome. 2001. vol. 44.- P. 716-728.
3. Neumann P., Pozarkova D, Vrana J, Dolezel J, Macas J. Chromosome sorting and PCR-based physical mapping in pea (*Pisum sativum* L.). // Chrom. Res. 2002. vol.10, P. 63-71.
4. Саматадзе Т.Е., Муравенко О.В., Зеленин А.В., Гостимский С.А. Идентификация хромосом генома гороха (*Pisum sativum* L.) по рисунку C-окраски. // Доклады Академии Наук. -2002.- т. 387. N 5.- С.714-717.
5. Саматадзе Т.Е., Муравенко О.В., Большева Н.Л., Амосова А.В., Гостимский С.А., Зеленин А.В. Изучение хромосом сортов и транслокационных линий гороха посевного (*Pisum sativum* L.) с использованием FISH, Ag-ЯОР и DAPI- дифференциального окрашивания. // Генетика.-2005.- N 12.- С. 1665 – 1673.
6. Macas J., Neumann P., Navratilova A. Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) genome: comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Medicago truncatula*. // BMC Genomics.- 2007. vol. 8, N 427.- p. 1-16.
7. Ellis T.H.N., Lee D., Thomas C.M., Simpson P.R., Cleary W.G., Newman M.A., Burcham K.W.G. 5 S Ribosomal RNA genes in *Pisum* – sequence, long-range and chromosomal organization. // Mol. Gen. Genet. -1988.- vol. 214, P. 333-342.
8. Hall K.J., Parker J.D., Ellis T.H.N. The relationship between genetic and cytogenetic maps of pea. I. Standard and translocation karyotypes. // Genome.- 1997.- vol. 40.-P. 744-754.

#### **Резюме**

С помощью C-/Ag-ЯОР-дифференциального окрашивания и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) проведено изучение кариотипов 4 сортов и 2 линий гороха посевного. Показана перспективность использования данных методов цитогенетического анализа для разработки методических подходов и принципов составления хромосомных паспортов.

C- and Ag-NOR-staining techniques and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) were used to study karyotypes of four varieties and two lines of pea. It was shown that these comparative cytogenetic analysis methods were rather perspective for the development of methodical approaches and principles of making chromosome passports.

## ГЕННЫЕ МУТАЦИИ И РЕКОМБИНАЦИИ КАК ФАКТОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ: ПОЛУЧЕНИЕ МУЛЬТИМУТАНТНЫХ ЛИНИЙ АРАБИДОПСИСА С ПРИЗНАКАМИ, ВЫХОДЯЩИМИ ЗА РАМКИ СЕМЕЙСТВЕННОСПЕЦИФИЧЕСКИХ

По Н.И.Вавилову [1, с. 10] «монотипные виды существуют обычно только до того времени, как они изучаются в гербарии». Типологической (монотипической) концепции вида Н.И. Вавилов [2] противопоставлял свои представления о виде как системе, включающей нередко огромное количество наследственно различающихся форм, и эти представления согласуются с современной биологической (политипической) концепцией вида. Для вскрытия генетического полиморфизма видов он предлагал использовать исследование естественных популяций, мутагенез, для растений-перекресников также инцухт (инбридинг). Для широко используемого в генетических исследованиях модельного объекта арабидопсиса Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh.), как естественно инбредного вида, эффективными методами выявления генетического полиморфизма являются поиски необычных форм в природных популяциях и индуцированный мутагенез. Для этой же цели пригоден и метод гибридизации мутантных линий с последующим отбором в расщепляющихся популяциях. Так можно получить мультимутантные растения, которые по нескольким признакам выходят за рамки родо- и семейственносцифических. Их получение расширяет наши представления о генетической изменчивости живых организмов, ставя задачу определенной ревизии систематики растений.

### Материалы и методы

Для исследований использованы гомозиготные мутантные линии по рецессивным генам *apl-1*, *bp-1*, *clv1-1* и *gll-1*. Семена этих линий получены нами из Ноттингемского центра образцов арабидопсиса (NASC, (UK)) [3]. В качестве материала для создания мультимутантной линии генотипа *apl-1apl-1bp-1bp-1clv1-1clv1-1gll-1gll-1* были использованы тройные мутанты по рецессивным генам *bp-1*, *clv1-1*, *gll-1* и *apl-1*, *bp-1*, *gll-1*, полученные ранее в Луганском НАУ ассистентом кафедры биологии растений Сигидиненко Л.И. и аспирантом Медведь О.М. соответственно [4, 5]. Описанные здесь мутации являются генными. Заметим, что три- и тетрамутантные линии, строго говоря, являются тетра- и пентамутантными – все они несут также в гомозиготном состоянии рецессивный аллель *er*. Исходные мономутанты гомозиготны по этому аллелю, поскольку все получены на генетической основе линии *Landsberg erecta* (генотип *erer*). Растения выращивали в почвенной культуре в лаборатории светокультуры на кафедре биологии растений Луганского НАУ. Путем скрещивания тройных мутантов и последующего отбора в F<sub>3</sub> была получена мультимутантная линия, которая объединила в себе мутантные признаки родительских форм. Изображения получали с помощью цифрового фотоаппарата Canon A630.

### Результаты и обсуждение

Для получения тетрамутантной линии *apl-1, bp-1, clv1-1, gll-1* в качестве родительских форм были использованы тройные рецесивы *Brevipedicellus, Clavata, Glabra* (генотип *bp-1bp-1clv1-1clv1-1gll-1gll-1*) и *Apetala, Brevipedicellus, Glabra* (генотип *apl-1apl-1bp-1bp-1gll-1gll-1*). Ради компактности генетических формул далее вместо символа аллели *apl-1* будем использовать мнемоническое обозначение *apl*, вместо *gll-1* просто *gll*, вместо *clv1-1* просто *clv1* и взамен *bp-1* просто *bp*. Генотип P<sub>1</sub> – *Ap1Ap1bpbpclv1clv1gllgll*, генотип P<sub>2</sub> – *aplapl1bpbpClv1Clv1gllgll*. Генотип F<sub>1</sub> от скрещивания родительских линий –

*Ap1ap1bpbpClv1clv1gllgll*. В F<sub>1</sub> наблюдается полное доминирование признаков дикого типа (*ap1*<*Ap1*, *clv1*<*Clv1*): цветки растений с лепестками обычного белого цвета; плоды – стручки. Цветки и плоды почти без цветоножек и плодоножек, стручки повернуты вниз; волоски на листьях и стеблях отсутствуют, поскольку родители гомозиготны по рецессивным аллелям *bp* и *gll*.

Ген *API* расположен локусе 99 первой хромосомы. Ген *CLV1* расположен в первой хромосоме, локус 110 [6]. Расстояние между этими генами составляет 11 сМ, то есть процент кроссинговера равен ~ 11. Если расстояние между генами значительно меньше 50 сМ, гены считаются сцепленными (локализованными в одной хромосоме) [7]. Таким образом, гены *API* и *CLV1* сцеплены. По этой причине в F<sub>2</sub> будет наблюдаться отклонение от независимого распределения. Гены *BPI* и *GLI* расположены в разных хромосомах, а именно *BPI* в локусе 15 четвертой хромосомы, *GLI* в локусе 46 третьей хромосомы. По этой причине в F<sub>2</sub> наблюдалось их независимое распределение [6]. Далее расщепление рассматривается без участия генов *BPI* и *GLI*. Для выяснения ожидаемой частоты встречаемости растений генотипа *ap1ap1clv1clv1* провели теоретические расчеты. Ожидаемая частота встречаемости растений фенотипа «цветки без лепестков, плоды – коробочки» в F<sub>2</sub> приведена в табл.

Таблица

Расщепление по фенотипу в F<sub>2</sub>

цветки с лепестками, плоды – стручки	цветки с лепестками, плоды – коробочки	цветки без лепестков, плоды – стручки	цветки без лепестков, плоды – коробочки
0.198+0.024+0.198+0.024+0.024+0.024+0.003+0.003+0.003=0.501 50.1%	0.198+0.024+0.024=0.246 24.6%	0.198+0.024+0.024=0.246 24.6%	0.003 0.3%

Ожидаемая частота встречаемости растений генотипа *ap1ap1clv1clv1* в F<sub>2</sub> составляет 0.3% (3 растения из 1000) (табл.). На практике это означает, что для выделения растений с таким генотипом необходимо высадить минимум 5 ящиков, что очень обременительно. Для упрощения выделения растений с генотипом *ap1ap1clv1clv1* можно пойти другим путем, а именно выделить интересующий нас генотип и фенотип в F<sub>3</sub>. Среди особей с лепестками и коробочками (*API-clv1-lclv1-l*) около 20% (0.048/0.246) такие, что в F<sub>3</sub> будут расщепляться (лепестки – без лепестков). Среди особей без лепестков и со стручками (*ap1-lap1-lCLV1-l*) тоже около 20% (0.048/0.246) таких, что в F<sub>3</sub> будут расщепляться (стручки – коробочки).

В ящике, где выращивали F<sub>2</sub>, собрали семена с 14 растений фенотипа «цветки с лепестками, плоды – коробочки» и с 14 растений фенотипа «цветки без лепестков, плоды – стручки». Семена растений с разными фенотипами высадили в два отдельных ящика. В ящике 14 рядов по 14 посадочных мест в ряду (всего 196 растений). В F<sub>3</sub> из 14 семей (рядов) расщепление ожидается в ~ 3 семьях (рядах). Из 28 семей (рядов) расщепление ожидается в ~ 6 семьях. Фактически в семье *ap1-l* расщепление было обнаружено в 2-х семьях с числом особей в них равным 6 (фенотип – «цветок без лепестков, плод – коробочка»). В семье *clv1-l* расщепление было обнаружено в 3-х семьях с числом особей в них равным 5 с аналогичным фенотипом.

Таким путём в результате скрещивания и последующего отбора был получен новый тетрамутантный рекомбинант генотипа *ap1-lap1-lbp-lbp-lclv1-lclv1-lgll-lgll-l*. Новая линия имеет такой фенотип: растения без лепестков; короткие цветоножки и плодоножки, плоды повернуты вниз; плод – четырёхгнездная коробочка; волоски на розеточных листьях и стеблях отсутствуют (рис.).



**Рис.** Тетрамутантная линия *apl-1, bp-1, clv1-1, gl1-1*

*а* – розеточные листья голые; *б* – цветки без лепестков, почти без цветоножек, стебель слабо развит; *в* – соплодие состоит из сближенных плодов почти без плодоножек, плоды по-разному ориентированы в пространстве; *г* – вскрывшийся плод, представляющий собой коробочку; *д* – поперечный срез сформировавшегося плода в его верхней части. Пояснения: 1) одно деление шкалы на рис. *г* соответствует 0.5 мм.

Созданная нами новая мультимутантная линия имеет теоретический и практический интерес. Она пригодна для генетико-селекционных исследований. Получение новой линии способствует решению задач по картированию генов. Тетрамутантная линия может быть объектом для изучения совместного плейотропного действия мутантных аллелей на количественные признаки. Наконец, она может быть использована для облегчения поддержания коллекции мутантных аллелей. Одну линию легче поддерживать, чем четыре исходные линии.

Особый интерес привлекают выходящие за рамки семейственно-специфических изменения признаков, вызываемые влиянием аллелей *apl-1* и *clv1-1*. У представителей сем. *Brassicaceae* плоды стручки или стучочки, редко орешки [8, 9]. У растений *A. thaliana* линии *apl-1, bp-1, clv1-1, gl1-1* в результате действия аллеля *clv1-1* плоды четырёхгнездные или реже трёхгнездные коробочки, не отмечавшиеся до сих пор ботаниками в сем. *Brassicaceae*. Цветки в сем. *Brassicaceae* принимаются за четырёхчленные (чашелистиков 4, лепестков 4) [9], а в цветках линии генотипа *apl-1apl-1bp-1bp-1clv1-1clv1-1gl1-1gl1-1* под действием аллеля *apl-1* количество чашелистиков варьирует от 1 до 4, а лепестков в подавляющем большинстве цветков вообще нет. Наконец, под влиянием аллеля *apl-1* у нашей линии *A. thaliana* формируется соцветие тирс, тогда как считалось, что у *A. thaliana*, в целом в роде *Arabidopsis* и во всем сем. *Brassicaceae* соцветие простая или сложная кисть (последняя называется также метелкой) [8, 9].

Полученная мультимутантная линия *A. thaliana* генотипа *apl-1apl-1bp-1bp-1clv1-1clv1-1gl1-1gl1-1* имеет такую совокупность признаков, которая не позволяет уверенно отнести её к виду *A. thaliana*, роду *Arabidopsis* и сем. *Brassicaceae*. Совершенствование системы классификации сем. *Brassicaceae* требует поиска

признаков, которые действительно являются видо-, родо- и семейственноспецифическими. Оно невозможно без широкого использования основного, генетического критерия вида, по которому рекомбинант *apl-1apl-1bp-1bp-1clv1-1clv1-1gll-1gll-1* несомненно относится к *A. thaliana* [10].

#### Выводы

1. Путем скрещивания тройных мутантов, последующего отбора в F<sub>3</sub> и размножения была получена мультимутантная линия генотипа *apl-1apl-1bp-1bp-1clv1-1clv1-1gll-1gll-1*, которая объединила в себе мутантные признаки родительских форм.
2. Синтезированная новая тетрамутантная линия пригодна для исследований в различных областях современной генетики, в том числе для решения задач по картированию генов.
3. Тетрарецессив *apl-1, bp-1, clv1-1, gll-1* облегчает работу по сохранению генофонда (мутантных аллелей) *A. thaliana*.
4. Морфологические признаки мультимутантной линии генотипа *apl-1apl-1bp-1bp-1clv1-1clv1-1gll-1gll-1* входят в противоречия с описаниями *A. thaliana* во флорах, определителях, атласах.
5. Мутационные изменения у тетрамутантного рекомбинанта *apl-1, bp-1, clv1-1, gll-1* определенно выходят за рамки диагностических (видо-, родо- и семейственноспецифических) признаков.

#### Литература

1. Вавилов Н.И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. – В кн. Н.И.Вавилов. Избранные произведения в двух томах. Т. 1. – Л.: Наука, 1967. – С. 7-61.
2. Вавилов Н.И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. Линнеевский вид как система – Л.: Наука, 1967. – С. 91.
3. *Seed List*. The Nottingham Arabidopsis Stock Centre. – Nottingham: The University of Nottingham, 1994. – 147p.
4. Сигидиненко Л.И., Шелихов П.В. Синтез тримутантных линий арабидопсиса *bp-1, ch5-1, gll-1; bp-1, clv1-1, gll-1; ch5-1, clv1-1, gll-1* // Збірник наукових праць Луганського НАУ. – 2004. – №39 (51). – С. 18-20.
5. Медведь О.М., Соколов И.Д. Морфологические особенности тримутанта *apl-1, bp-1, gll-1 Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. (в печати).
6. Ежова Т.А., Лебедева О.В., Огаркова О.А. и др. *Arabidopsis thaliana* – модельный объект генетики растений. – М.: МАКС Пресс, 2003. – 220 с.
7. Соколов И.Д., Шелихов П.В., Соколова Т.И. *та інші*. Генетика. Практикум. – Київ: Арістей, 2003. – 176с.
8. Тахтаджян А.Л. Жизнь растений. В 6-ти т. – М.: Просвещение, 1980. – Т. 5. Ч. 1. – 430 с.
9. Тахтаджян А.Л. Система и филогения цветковых растений. – М. – Л.: Наука, – 1966. – 611с.
10. Соколов И.Д., Сыч Е.И., Медведь О.М. Морфологическая генотипическая изменчивость *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. в связи с типологической концепцией вида. – Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. – К.: Логос, 2006. – Т.3. – С. 53-57.

#### Резюме

Мутационные изменения у тетрамутантного рекомбинанта *apl-1, bp-1, clv1-1, gll-1* определенно выходят за рамки диагностических (видо-, родо- и семейственноспецифических) признаков.

Мутаційні зміни у тетрамутантного рекомбінанту *apl-1, bp-1, clv1-1, gll-1* безумовно виходять за рамки діагностичних (видо-, родо- і родинноспецифічних) ознак.



Tetramutant rekombinant of *ap1-1, bp-1, clv1-1, gl1-1* certainly have mutational changes beyond diagnostic (species-, genera- and familyspesific) attributes.

**ЦВЕТОВА М.И.<sup>1</sup>, ЭЛЬКОНИН Л.А.<sup>1</sup>, ИШИН А.С.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>ГНУ НИИ сельского хозяйства Юго-Востока Россельхозакадемии,  
Россия, 410010, Саратов, ул. Тулайкова, 7, e-mail: [elkonin@mail.saratov.ru](mailto:elkonin@mail.saratov.ru)

<sup>2</sup>ФГНУ Российский научно-исследовательский и проектно-технологический институт сорго и кукурузы, 410010 Саратов, пос. Зональный; e-mail: [rossorgo@yandex.ru](mailto:rossorgo@yandex.ru)

## **ГЕНОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ АУТОТЕТРАПЛОИДОВ СОРГО, ИНДУЦИРОВАННЫХ КОЛХИЦИНОМ**

У большинства изученных видов растений в зиготе содержится диплоидный, а в гаметах гаплоидный набор хромосом и соответствующее им количество ДНК. Постоянство числа хромосом – один из фундаментальных признаков вида, обеспечивающих сохранение генетической информации в ряду поколений, по крайней мере, у амфимиктичных видов растений.

В то же время многочисленными исследованиями показано, что у многих видов растений в ходе онтогенеза возникает миксоплоидия - наличие клеток с различающимися числами хромосом [1]. В данной работе речь идёт об изменении чисел хромосом в клетках апикальных меристем, из которых в процессе онтогенеза формируются генеративные органы и гаметы. Это явление отлично от мультипликации или редукции генома или частей генома, связанных с клеточной дифференциацией.

Результаты многочисленных исследований указывают на то, что возникновение миксоплоидии связано с нарушениями клеточного цикла у растительных форм, произошедших в результате гибридогенеза и полиплоидизации [1,2]. Мы наблюдали нестабильность числа хромосом в потомстве аутотетраплоидов, индуцированных колхицином у константного отселектированного сортообразца сорго и полустерильной линии, полученной с использованием культуры *in vitro*.

### **Материал и методы**

Исследованы аутотетраплоиды линий Н-3366/2-тетра, полученной на основе сортообразца Негритянское кремово-бурое к-3366/2 и АС-1-30, которая является потомством одного растения из линии АС-1, происходящей из каллуса, полученного от метёлки полностью стерильного растения из F<sub>2</sub> гибрида [А1]Саратовское-3/С-752 [3]. Тетраплоиды индуцированы путём колхицинирования апикальных меристем проростков [4].

В скрещиваниях использованы линии со стабильной цитоплазматической мужской стерильностью: [А2]КВВ-181, [9Е]Желтозёрное-10, [А4]Желтозёрное-10 и [А3] Фетерита-14. Метелки растений до начала цветения тщательно изолировали пергаментными изоляторами.

Пыльцу анализировали на временных препаратах, окрашенных раствором йодистого калия; диаметры пыльцевых зёрен (ПЗ) измеряли с помощью окуляр-микрометра. Подсчёт хромосом проводили в корневых меристемах, зафиксированных в ацето-алкоголе (1:3) после предобработки в растворе α-монобромнафталина и окрашенных ацето-гематоксилином.

### **Результаты и обсуждение**

В поколении С<sub>5</sub> среди аутотетраплоидов линии Н-3366/2-тетра, которые отличаются уменьшенной по сравнению с исходной линией высотой, крупными колосковыми чешуями и низкой озёрнёностью метёлок, было выделено растение НТ-12, которое отчётливо выделялось высотой и полностью озёрнённой метёлкой.



Цитологический анализ подтвердил его диплоидную конституцию, что позволяет считать его полигаплоидом.

147 растений из его потомства было изучено в поле. Среди них в период цветения по морфологии выделено 8 тетраплоидов, а также 2 растения, у которых, разные побеги по морфологическим признакам были диплоидными, либо тетраплоидными. При этом различались по плоидности не только различные побеги кущения, но и некоторые боковые метёлки второго порядка отличались по плоидности от несущего их побега первого порядка.

У выделенных растений был проведён анализ пыльцы. Ранее было показано, что диаметр абсолютного большинства пыльцевых зёрен (ПЗ) у исходного сортообразца лежит в пределах от 41,7 до 54,3 мкм, причём ПЗ, диаметр которых равен или превышает большее из этих значений, встречаются у диплоидов редко. При этом, между размерами гаплоидных и диплоидных ПЗ у сорго отсутствует четко выраженная граница, и их диаметры совпадают в пределах 50,1-54,3 мкм [4].

В исследуемом материале в пыльце метёлок, определённых как диплоидные, с низкой частотой встречались ПЗ с диаметром 50,1 мкм, что является нижней границей диаметра ПЗ фенотипически тетраплоидных метёлок. Однако в некоторых случаях (метёлки №№ 2, 3 и 7 растения НСТ-8) пыльца представляла собой смесь «нормальных» и крупных ПЗ (табл.1).

Таблица 1

**Распределение пыльцевых зёрен в зависимости от диаметра в пыльце некоторых соцветий у растения НСТ-8 из потомства полигаплоида негритянского сорго**

№ метёлки	Плоидность по фенотипу	Частота пыльцевых зёрен с диаметром* (%)							
		4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
		37,5	41,7	45,9	50,1	54,3	58,5	62,7	66,8
8-1	2n	6,0	40,0	48,0	4,0	2,0	-	-	-
8-3	2n	-	1,0	6,0	31,0	26,0	33,0	2,0	1,0
8-2	4n	-	18,0	12,0	34,0	28,0	8,0	-	-
8-4	4n	-	-	-	13,9	23,3	46,5	11,6	4,6
8-7	4n	-	-	20,0	40,0	26,0	14,0	-	-

\* Верхняя строка-диаметр пыльцевых зёрен в делениях окуляр-микрометра, цена деления – 8,35 мкм; нижняя строка – диаметр пыльцевых зёрен в микронах

Однако очевидно, что анеуплоидные ПЗ, образующиеся в результате нарушений мейоза у тетраплоидов, могут иметь размер, характерный для гаплоидных ПЗ. Поэтому различия в уровне плоидности ПЗ у тетраплоида могут быть доказаны только в результате цитологического анализа потомства. При подсчёте числа хромосом в потомстве растения НСТ-8 было показано, что в четырёх семьях (семья – потомство одной метёлки) все растения были диплоидными, тогда как в трёх семьях выявлены только тетраплоиды. Эти данные подтверждают, что различные метёлки растения НСТ-8 имели разную плоидность. У растения НСТ-41 также имело место расщепление по числу хромосом в потомстве одной метёлки. Почти в каждой семье (потомстве одной метёлки) выявлены экземпляры как с диплоидным, так и с тетраплоидным набором хромосом.

Известно, что генетически различающиеся побеги образуются при возникновении мутаций на I - II этапах органогенеза. Мутационные события на более поздних стадиях онтогенеза ведут к возникновению более мелких секторов мутантных тканей в пределах побега, соцветия, пыльника [5].

В нашем материале у растений НСТ-8 и НСТ-41 по плоидности различались побеги. В то же время выявлена миксоплоидность и в пределах отдельных метёлок, т.е.

нарушения в работе митотического аппарата клеток происходили на разных этапах онтогенеза.

В последующих поколениях случаи расщепления по плоидности потомства, как отдельных растений, так и отдельных соцветий, не были обнаружены. Однако у большинства изученных тетраплоидных растений были выявлены ПЗ, диаметр которых не превышал 45,9 мкм (0,50-25,0%). Тетраплоидные растения с повышенной частотой таких ПЗ были вовлечены в скрещивания со стабильными линиями с ЦМС, не завязывающими семян в отсутствие чужой пыльцы.

49 метёлок стерильных линий опылили пылью индивидуальных соцветий, либо смесью пыльцы исследуемых тетраплоидных растений. Как правило, в скрещиваниях диплоидов с тетраплоидами образуются зерновки с триплоидным зародышем и щуплым тетраплоидным эндоспермом. В данном материале наряду с щуплыми зерновками на 14 метёлках получены выполненные зерновки, причём на шести метёлках от 15 до нескольких десятков семян. Развившиеся из выполненных зерновок растения были диплоидами, что подтверждено цитологическим анализом.

Пять из этих растений оказались гибридами, что безусловно доказывает наличие гаплоидных ПЗ у исследуемых тетраплоидов. Низкий уровень завязываемости гибридных зерновок в данных скрещиваниях, возможно, объясняется тем, что в разряд ПЗ с диаметром ниже 50,1 мкм могли попасть анеудиплоидные ПЗ, отличающиеся сниженной жизнеспособностью. Остальные растения в этих семьях не отличались по фенотипу от растений материнской линии. Они, очевидно, возникли в результате развития семян на базе диплоидного зародышевого мешка за счёт псевдогамной формы апомиксиса, когда зародыш возникает путем партеногенетического развития яйцеклетки, а эндосперм – в результате оплодотворения ядер центральной клетки зародышевого мешка.

Ранее с помощью аналогичного подхода было продемонстрировано существование гаплоидных гамет у ауотетраплоидной линии сорго с вариабельной мужской фертильностью, АС-1-30-тетра. Было сделано предположение, что самым вероятным механизмом их образования является соматическая редукция на разных этапах органогенеза [6]. Так как у этой линии частота образования гаплоидных пыльцевых зёрен выше, чем у Н-3366/2-тетра, мы исследовали микроспорогенез с целью уточнения механизмов их образования.

В МІ и ПІ отмечено по одной клетке с нарушениями мейоза, которые могли бы привести к образованию микроспор с уменьшенным числом хромосом, а именно мейоциты с двумя веретёнами деления (0,35% и 0,07%, соответственно). В ПІ отмечены клетки с несколькими отстающими хромосомами и с неразделившимися бивалентами, задержавшимися на экваторе (18,6% и 13,8%, соответственно). Однако число отстающих хромосом и бивалентов не было достаточным для возникновения гаплоидных клеток, и могло обеспечить лишь образование анеуплоидных ПЗ.

В то же время в диакинезе и в МІ у шести из девяти исследованных растений отмечено от 0,6 до 5,7 % клеток с 10 бивалентами. Таким образом, было подтверждено, что редукция числа хромосом произошла в премейотический период. Подобная миксоплоидность, спонтанно возникающая в соматических тканях, либо в пыльниках в ходе премейотических делений, описана у ряда видов растений [1]. При этом клетки, отличающиеся по уровню плоидности от основного, чаще всего имели тетра- или полиплоидное число хромосом. Гораздо меньше сообщений о возникновении у растений соматических клеток или тканей с редуцированным набором хромосом. У сорго наблюдали диплоидизацию конусов нарастания тетраплоидных проростков после воздействия колхицином, и именно воздействием этого вещества объясняли имеющую место соматическую редукцию, так как в необработанных растениях из исследованных семей это явление обнаружено не было [7].

В нашем материале редукция числа хромосом происходила спонтанно и наблюдалась у линий сорго до  $S_{20}$ . Можно предположить, что она обусловлена нарушением клеточного цикла, аналогично тому, которое имеет место у апомиктов и гибридов [1,2], тем более что для сорго свойственен апомиксис в его факультативном проявлении.

#### **Выводы**

1. Геномная нестабильность в потомстве индуцированного колхицином аутотетраплоида сорго проявляется в формировании миксоплоидных растений ( $2n - 4n$ ).
2. Образование гаплоидных гамет у аутотетраплоидов сорго является результатом соматической редукции, которая происходит на разных этапах онтогенеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 06-04-49119, 08-04-00319).

#### **Литература**

1. Кунах В.А. Биотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. - К. - 2005. - 730 с.
2. Каушин А.С. Гаметофитный апомиксис как неустойчивая система семенного размножения у цветковых. – Саратов. – 2006 - 309 с.
3. Elkonin L.A., Enaleeva N.Kh., Tsvetova M.I., Belyaeva E.V., Ishin A.G. Partially fertile line with apospory obtained from tissue culture of male sterile plant of Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) // Ann. Botany - 1995. - vol. 76. - P.359-364.
4. Цветова М.И. Изучение закономерностей экспериментальной полиплоидии у сорго: дисс...канд. биол.наук. – Санкт-Петербург. - 1997. – 162 с
5. Шевченко В.В., Гриних Л.И. Химерность у растений. – М. - 1981. - 212 с.
6. Цветова М.И., Эльконин Л.А. Нестабильность уровня ploidy у аутотетраплоидов линии сорго с варибельной мужской фертильностью // Генетика. - 2002. – т.38, № 5. – С. 641-646.
7. Chen C.H., Ross J.G. Colchicine-induced somatic chromosome reduction in Sorghum. V. Diploidization of the stem apex after treatment of tetraploid seedlings // Can. J. Gen. Cytol. – 1965. – vol.7, № 1. - P. 21-30.

#### **Резюме**

Обнаружена нестабильность уровня ploidy в потомстве индуцированных колхицином аутотетраплоидов сорго. Предполагается, что возможным механизмом образования гаплоидных гамет у аутотетраплоидов является соматическая редукция хромосом на разных этапах онтогенеза.

Виявлена нестабільність рівня ploidy у нащадків індукованих колхіцином аутотетраплоїдів сорго. Вважається, що можливим механізмом утворення гаплоїдних гамет у аутотетраплоїдів є соматична редукція хромосом на різних стадіях онтогенезу.

Instability of ploidy level has been discovered in the offspring of the sorghum autotetraploids induced by colchicine. It is supposed that a possible mechanism of haploid gamete formation in autotetraploids is somatic reduction of chromosome number at different stages of ontogenesis.

## МОЛЕКУЛЯРНА СТРУКТУРА ТА ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНОМІВ

БЕЛАЯ Е. В., МИХАЙЛОВА М.Е., ВОЛЧОК Н.М., КАМЫШ Н.А.

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,  
Республика Беларусь, 220027, г. Минск, ул. Академическая, 27  
e-mail: L.Belaya@jgc.bas-net.by

### ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА ГОРМОНА РОСТА, АССОЦИИРОВАННОГО С МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ И ДНК-ДИАГНОСТИКА МУТАЦИИ VLAD В БЕЛОРУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ КРС

В условиях современной селекции, особую актуальность приобретают, как вопросы комплексной оценки генотипов и генофонда стад в целом, так и контроль за распространением скрытых генетических аномалий в популяциях сельскохозяйственных животных. Новейшее направление в селекции, а именно, маркер-сопутствующая селекция (MAS – marker assisted selection)» позволяет наряду с отбором по фенотипу вести селекцию по выявлению предпочтительных вариантов генов хозяйственно-полезных признаков животных.

Примером такого гена-маркера является ген, протяженностью примерно 1800 пар оснований, состоящий из пяти экзонов, ассоциированный с участком хромосомы 19q26-qter и отвечающий за синтез структурного белка гормона роста GH. Известно, что ген гормона роста (GH), контролирует уровень метаболизма белков, связанных с мясной и молочной продуктивностью крупного рогатого скота. Продукт его экспрессии — гормон роста является представителем семейства белковых гормонов, участвующих в инициации и поддержании лактации у млекопитающих. Пептид состоит из 190-191 аминокислот.

В гене GH было идентифицировано несколько различных мутаций [1]. Но влияние на продуктивные признаки было наиболее изучено для одной из них, описанной Lусу и соавт. [2], находящейся в пятом экзоне. Данная мутация представляет собой C→G трансверсию в нуклеотидной последовательности 2141, приводящую к замене аминокислоты лейцин (L) на валин (V) в 127 позиции полипептида. Этот одиночный нуклеотидный полиморфизм приводит к двум аллелям: L-GHI и V-GHI.

Данные по влиянию V-аллеля на фенотипическое проявление количественных признаков продуктивности различны и в некоторых случаях противоречивы Zwerzchowski et. al.[3], Pawar. et. al.[4].

С точки зрения контроля за распространением наследственных заболеваний, пристальное внимание вызывает такое наследственное заболевание, как VLAD (бычий дефицит лейкоцитарной адгезии) — синдром, встречающийся в породах чернопестрого корня благодаря широкому использованию выдающегося голштинского быка Осборндейла Айвенго, имевшего эту мутацию в скрытом виде.

Молекулярной основой VLAD является точечная замена (аденин-гуанин) в положении 383 кДНК CD18 (VLAD), что приводит к аминокислотной замене в последовательности соответствующей белковой молекулы гликопротеида В-интегрин и потере данным белком способности к участию в формировании иммунного ответа. Следствием этого является гибель гомозиготных по данному признаку животных в первые недели постнатального периода развития от различных инфекций.

Целью нашего исследования было:

— выяснить влияние полиморфных вариантов гена гормона роста GH-I на такие признаки, как общий удой молока за 305 суток, содержание жира и белка в молоке в % у КРС и проанализировать частоту предпочтительных генотипов для выявления наиболее перспективных из них для маркер-сопутствующей селекции у представителей разных линий белорусской популяции.

— проанализировать частоту встречаемости мутации BLAD у представителей этих линий для предотвращения дальнейшего распространения мутации в популяции крупного рогатого скота в Беларуси.

#### Материалы и методы

Объектом исследования были быки-производители Госплемпредприятий Гомельской, Витебской и Минской областей Республики Беларусь. ДНК из образцов свежзамороженной спермы выделяли методом солевой экстракции.

ДНК-типирование полиморфных вариантов гена гормона роста *GH1* проводили методом амплификации с дальнейшим анализом полиморфизма длин рестриктных фрагментов. Для амплификации использовали праймеры:

G-GH S: 3- ttc ggc ctc tct gtc tct ccc t-5 G-GH R: 3-agg cgg cgg cac ttc atg ac-5

Длина амплифицированного фрагмента составляет 208 пн. Рестрикция проводилась с использованием рестриктазы *Alu I*. Продукты рестрикции разделяли в 2% агарозном геле. Результаты генотипирования хорошо видны на электрофореграмме (Рис.1а).

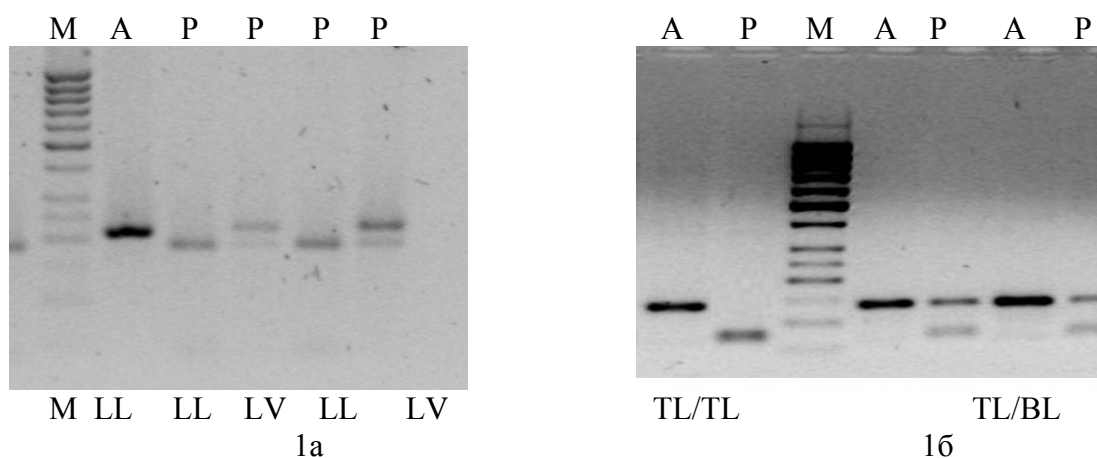


Рисунок 1 — Электрофореграммы результатов генотипирования.

1а. Электрофореграмма продуктов амплификации и рестрикции локусов гормона роста (*GH1*) в 2% агарозном геле. Условные обозначения: маркер 50 br DNA Lader (Fermentas); А–продукты амплификации, Р–продукты рестрикции, LL-, LV-, LL – генотипы.

1б. электрофореграмма продуктов амплификации и рестрикции в 2% агарозном геле по гену *CD18* (BLAD). Условные обозначения: маркер 50 br DNA Lader (Fermentas); А–продукты амплификации, Р–продукты рестрикции, – TL/TL , TL/BL генотипы.

Для амплификации фрагмента гена *CD18* (BLAD) использовали праймеры [5]:

BL-1: 5'- tga gac cag gtc agg cat tgc gtt ca-3', BL-2: 5'-ccc cca gct tct tga cgt tga cga cga ggt-3.

Длина амплифицированного фрагмента составляет 132 пн. В норме он расщепляется рестриктазой *TagI* на два фрагмента длиной 71 и 61 пн. (гомозиготный генотип TL/TL). Мутация, в данном случае, сопровождается исчезновением сайта узнавания для рестриктазы, и на электрофореграмме визуализируется одна яркая полоса длиной 132 пн, (гомозиготный генотип BL/BL). У особи с гетерозиготным генотипом TL/BL присутствуют два аллеля — нормальный (N аллель) и мутантный (B аллель) и на электрофореграмме гетерозигота TL/BL имеет три полосы длиной 132, 71 и 61 пн (Рис. 1 б).

Для выяснения ассоциации полиморфных вариантов гена *GH-1* с продуктивными признаками КРС, нами были определены генотипы животных, проведена теоретическая оценка животных по данным признакам на основании племенных карт. Теоретическая оценка представляла собой математический расчет племенной ценности по женским линиям предков по трем показателям: «Общий удой за 305 сут.» (в дальнейшем удой), «Содержание жира в молоке», «Содержание белка в молоке». Для этого, на основании

информации, содержащейся в племенных картах животных, средний показатель данного признака в пределах линий рассчитывался по формуле:

$$\text{СПЖ} = (2\text{М} + \text{ММ} + \text{МО} + \text{МММ} + \text{МММ} + \text{МММ} + \text{МММ}) / 8$$

Полученные результаты были проанализированы и сопоставлены. Достоверность полученных результатов была проверена с помощью статистических методов оценки достоверности.

#### Результаты и обсуждение

Нами были определены генотипы 181 животного, линий Аннас Адема (Ан. Ад), Вис Айдиала 933122 (В.Айд), Монтвик Чифтейна 95679 (Мон. Чиф), Пабст Говернера 882933 (П. Говернера), Рефлексн Соверинга 198998 (Р. Сов.), Рутьес Эдуарда 31646 (Рут. Эд.), Силинг Трайджун Рокит 252803 (С. Т. Р.), Хильтьес Адема 37910 (Хил.Ад.).

Методом ДНК-типирования было выявлено 130 животных с генотипом LL, 43 LV и 8 VV (табл. 1).

Таблица 1

Связь аллельных вариантов гена *GH1* с молочной продуктивностью (удой молока) крупного рогатого скота голштинского и черно-пестрого корня

Линия / порода	Выборка, (n)	удой за 305 сут.	Частота генотипа <i>GH1</i> (%)			Частота аллелей <i>GH1</i> (%)		
			n LL	n LV	n VV	%L	%V	
Ан. Ад. 30587	8	8202,37	87,5	0	12,5	87,5	12,5	
В.Айд	голшт	13	11951,97	76,9	23,1	0	88,46	11,53
	ч.-п.	26	9414,81	57,7	38,46	3,84	76,92	23,07
Мон. Чиф	голшт	4	11092,78	100	0	0	100	0
	ч.-п.	37	9731,43	70,27	29,73	0	85,13	14,86
П. Говернера	16	9014,05	62,5	37,5	0	81,25	18,75	
Р. Сов.	голшт	12	12008,15	83,3	16,7	0	91,66	8,33
	ч.-п.	34	9968,45	82,35	17,65	0	91,17	8,8
Рут. Эд. 31646	10	8059,32	50	20	30	60	40	
С. Т. Р. 252803	11	8366,88	72,72	18,18	9,1	81,81	18,18	
Хил.Ад.37910	10	8424,73	70	10	20	75	25	

Для каждой группы генотипов было рассчитано среднее значение таких показателей, как «Удой», «Содержание жира в молоке», «Содержание белка в молоке». Было определено, что статистически достоверными являются различия в показателях общего удоя между генотипом VV и генотипами LL и LV. Причем, различия генотипов LL и LV между собой, статистически не достоверны. Статистически достоверных различий между генотипами LL, LV и VV по показателям содержания в молоке жира и общего белка выявлено не было.

Для межлинейного анализа средние значения удоя были рассчитаны отдельно для представителей каждой породы в пределах этих линий (табл.1) и сопоставлены с данными по среднему показателю удоя для каждой линии. Отмечено, что наибольший показатель удоя определен для линий, у которых низкая частота аллеля V. Причем, линии, представленные животными голштинского и черно-пестрого корня при совокупном и раздельном анализе показывают самые высокие показатели по удою, так же как и линии голштинского корня. В линиях черно-пестрой породы показатели по удою молока более низкие.

ДНК-диагностика популяции быков-производителей выявил троих носителей мутации VLAD. Все они являются представителями линии Монтвик Чифтейна, что несомненно следует учитывать при закреплении этих животных за селекционным стадом.

## Выводы

Полиморфные варианты гена гормона роста *GH-1* статистически достоверно влияют на общий удой молока за 305 суток. Наиболее высокий показатель по данному признаку демонстрируют животные с генотипами LL и LV. Присутствие аллеля V в генотипе в гомозиготном состоянии снижает показатель общего удоя молока. Достоверных различий по данному параметру между обладателями генотипов LL и LV не выявлено, что позволяет предположить его рецессивный характер по отношению к L аллели. Наши данные согласуются с таковыми Renek P., Kmet I et.al. [6], Przadec J et.al. [7], Sirotkin A.V. et.al. [8] и др.

Из исследованных селекционных линий КРС, наиболее низкая частота нежелательного аллеля V и самые высокие показатели общего удоя характерны для линий голштинского корня Рефлекшн Соверинга 198998, Монтвик Чифтейна 95679 и Вис Айдиала 933122. Из линий черно-пестрого корня несомненное лидерство принадлежит линии Рефлекшн Соверинга 198998, затем можно выделить линии Аннас Адема, Пабст Говернера 882933 и Силинг Трайджун Рокит 252803.

Наличие носителей мутации BLAD среди представителей линии Монтвик Чифтейна 95679 должно быть учтено при разработке схем скрещиваний для предотвращения дальнейшего распространения мутации в популяции.

## Литература

- 1 *Jianbo Yao, Samuel E. Aggrey, David Zadworny, J. Flan Hayes and Urs Kuhnlein* Sequence Variations in the Bovine Growth Hormone Gene Characterized by Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis and Their Association with Milk Production Traits in Holsteins //Genetics- 2004.-144: 1809-1816.
- 2 *Lucy M.C., Hauser S.D., Eppard P.J., Krivi G.G., Clark J.H., Bauman D.E.,* Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production.// Domestic Animal Endocrinology -1993- 10, 325-333.
- 3 *Zwierzchowski L., Dymnis E., Dzierzbicki P.,* An association of growth hormone,  $\kappa$ -casein, p-lactoglobulin, leptin and Pit-I loci polymorphism with growth rate and carcass traits in beef cattle. //Animal Science Papers and Reports- 2001 -19, 65-78.
- 4 *Pawar R. S. Joshi C. G., Rank D. N.,* Growth hormone gene polymorphism and its association with lactation yield in dairy cattle.//Indian Journal of Animal Sciences 2007-11 (9): 884--888, September.
- 5 *Anderson, D. C, and T. A. Springer.* Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and pi50,95 glycoproteins.//Annu. Rev. Med.1987.-38:175-194.
- 6 *Renek P., Kmet I, Sacowski T., Vasicek T., Huba I, Chrenec I,* Relationships of growth hormone genotype with meat production traits of Slovak Pied bulls.//Czech Journal of Animal Science -1998 - 43, 541-544.
- 7 *Przadec J., Dymniski E., Zierzchowski L., Lukashevich M.,* The effect of growth hormone (GH),  $\kappa$ -casein (CASK) and b-lactoglobulin (BLG) genotype on carcass traits in Friesian bulls. //Animal Science Papers and Reports-1999 - 17, 85-92.
- 8 *Sirotkin A.V., Chrenec P., Makarevich A.V., Bulla J.,* Interrelationships between breed, growth hormone genotype, plasma IGF-I level and meat performance in bulls of different ages.// Archives of Animal Breeding-2000 - 43, 591-596.

## Резюме

Изучена ассоциация полиморфных вариантов гена гормона роста *GHI* с признаками молочной продуктивности КРС. Показана ассоциация генотипа с показателями общего удоя. Определена частота L и V аллелей гена *GHI*, а так же частота носительства мутации BLAD в различных линиях голштинского и черно-пестрого КРС в белорусской популяции быков-производителей.

Association of polymorphic variants of growth hormone gene *GHI* with traits of cattle milk productivity was studied. Genotype association with total milk productivity was shown. The frequency of L and V alleles of *GHI* gene as well as the frequency of BLAD mutation was determined in different lines of Holstein and black-and white cattle in Belarusian sires population.

**ЖАРИКОВА Н.В., КОРОБОВ В.В., АНИСИМОВА Л.Г., ЯСАКОВ Т.Р.,  
ЖУРЕНКО Е.Ю., МАРКУШЕВА Т.В.**

*Институт биологии УНЦ РАН,*

*Россия, 450054, Уфа, ул. Проспект Октября, 61, e-mail: tvmark@anrb.ru*

## **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ НОВОЙ ПЛАЗМИДЫ ДЕГРАДАЦИИ ХЛОРФЕНОКСИУКСУСНЫХ КИСЛОТ**

Известно, что в биоценозах, подвергающихся длительному воздействию синтетических химических соединений, формируются микроорганизмы, способные использовать молекулы ксенобиотиков в качестве источников питания и энергии. Генетические детерминанты, контролирующие катаболизм таких соединений часто располагаются на автономно реплицирующихся элементах (плазмидах), которые способны передаваться различным членам популяции, обеспечивая перестройку генофонда консорциума в целом. Генетический обмен между организмами может потенциально увеличивать способность популяции к выживанию и адаптации к техногенным факторам окружающей среды (Cohan, 1996).

Плазмиды согласно способности к переносу делятся на конъюгативные (самотрансмиссибельные) и мобилизуемые (трансмиссибельные в присутствии дополнительных конъюгационных факторов). Конъюгативные плазмиды - это, как правило, плазмиды большого размера, несущие набор генов (*tra*), кодирующих систему переноса и специфический сайт *oriT*, с которого начинается трансфер. Проблема переноса неконъюгативных плазмид, не обладающих набором *tra* генов, решается посредством генетических систем мобилизации. Перенос плазмид небольших размеров обеспечивается специфическими белками мобилизации, кодируемыми областью мобилизации (*mob*) и областью начала переноса (*oriT*). Как оказалось, именно мобилизуемые плазмиды имеют огромное значение в процессах поддержания и распространения экофизиологических признаков, в частности, способности к деградации современных ксенобиотиков.

Вместе с тем следует отметить, что анализ разнородности и разнообразия мобилизуемых плазмид проведен в меньшей степени, чем это сделано для конъюгативных плазмид. Поэтому исследования особенностей строения мобилизуемых плазмид, включая области репликации, становятся особенно актуальным. Изучение молекулярных структур мобилизуемых плазмид позволяет раскрыть особенности эволюции и установить филогенетические отношения среди членов различных таксонов штаммов-деструкторов. Привлечение ресурсов современных баз данных для изучения структурных особенностей генов мобилизации позволяет предложить их классификацию в семействах и подсемействах, а описание генетической организации каждого семейства, их характерных черт и отношений среди кодируемых ими белков определяет подход к характеристике глобального генного пула мобилизуемых плазмид.

### **Материалы и методы**

Объектом исследования служила плазида рАН 36-4CPA штамма *Citrobacter hydrophyla* IBRB-36 4CPA, выделенного из образцов почв промзоны г. Уфы.

Плазмидную ДНК выделяли щелочным лизисом по методу Бирнбойма-Доли (Birnboim & Doly, 1979). Выделение и очистку плазмидной ДНК проводили с



использованием легкоплавкой агарозы и агаразы AgarACE («Promega», США) согласно рекомендациям производителя. PDRF- анализ препаратов ДНК выполняли электрофорезом в 1% агарозном геле, содержащем бромистый этидий. В качестве маркеров использовали 1kb DNA ladder, 100bp DNA ladder («СибЭнзим», Россия), вектор pGEM-3Zf(+) (Promega, США). Документации результатов электрофоретического разделения препаратов ДНК осуществляли на системе BioDoc Analyze («Biometra», Германия).

Kzo9I -, RsaI - и AluI - рестрикционные фрагменты плазмиды pАН 36-4CPA были клонированы в сайтах BamHI и HindII полилинкера вектора pGEM-3Zf(+) («Promega», США). Для получения рекомбинантов использовали компетентные клетки *Escherichia coli* штамма DH5α. Плазмидную ДНК рекомбинантов выделяли с использованием набора Wizard MaxiPreps («Promega», США), согласно рекомендациям производителя.

Автоматическое секвенирование последовательностей клонированных фрагментов плазмиды pАН 36-4CPA выполняли с помощью набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США), на приборе DNA Analyzes 3730, («Applied Biosystems», США) согласно рекомендациям производителя. Секвенирование выполнялось с применением универсальных плазмидных праймеров M13(F), M13(R).

Нуклеотидные последовательности клонированных фрагментов плазмиды pАН 36-4CPA редактировались с помощью программы BioEdit и выравнивались с использованием программы CLUSTALW v 1.75. [<http://www.genebee.msu.su/clustal>]. Скрининг сходства секвенированных последовательностей по базе данных GenBank проводили в программе BLASTA [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]

#### **Результаты и обсуждения.**

**Анализ плазмиды pАН 36-4CPA.** Из клеток природного штамма *Citrobacter hydrophila* IBRB-36-4CPA была изолирована плазида деградации хлорфеноксисукусных кислот, обозначенная нами pАН 36-4CPA. Составлена рестрикционная карта плазмиды по BamHI-, HincII- и PvuII-сайтам и определен ее размер.

С целью определения последовательности нуклеотидов pАН 36-4CPA была создана библиотека перекрывающихся рестрикционных фрагментов плазмиды. Для клонирования были выбраны эндонуклеазы: *RsaI*, *AluI* и *Kzo9I* и векторная плазида pGEM-3Zf(+).

По результатам рестрикционного анализа библиотеки *Kzo9I* было получено 18 рекомбинантных клонов, при этом клоны разделились на десять групп, содержащих соответственно: 5, 2, 2, 1, 1, 2, 1, 1, 1 и 2 клона.

Рестрикционный анализ *RsaI* – библиотеки выявил 12 клонов, которые составили шесть групп из 4, 1, 2, 1, 2 и 1 клона, соответственно.

Третья *AluI* – библиотека образовалась из 23 клонов, после рестрикции разделившихся на 9 групп из 4, 6, 1, 1, 3, 2, 1, 4 и 1 клона, соответственно.

Далее было проведено частичное секвенирование полученных клонов с внутренних плазмидных праймеров M13(F), M13(R), что позволило прочитать нуклеотидные последовательности вставок. В результате анализа полученных данных по трем библиотекам были выявлены 11 групп клонов с идентичными сиквенс-типами. Остальные 14 клонов представляли собой химерные артефакты и были исключены из дальнейшего рассмотрения.

Кроме того, в ходе дальнейшей работы секвенирование полученных клонов сочеталось с синтезом оригинальных праймеров с целью получения перекрывающихся последовательностей плазмидной ДНК. Для автосеквенирования в двух направлениях синтезировались как прямые, так и обратные праймеры.

**Характеристика структуры плазмиды рАН 36-4СРА.** Выравнивание полученных перекрывающихся нуклеотидных последовательностей позволило установить полную последовательность нуклеотидов плазмиды рАН 36-4СРА, размер которой составил 5217 п.н. и установить ее G+C состав - 50,74%.

**Анализ области репликации плазмиды рАН 36-4СРА.** Сравнение нуклеотидной последовательности плазмиды рАН 36-4СРА с последовательностями, представленными в базе данных GenBank, позволило идентифицировать регион плазмиды рАН 36-4СРА с 142 по 875 п.н. как гомологичный областям репликации плазмид р26807, штамма *Yersinia enterocolitica* (AJ132618), р15А (V00309) и рColE1 (J01566), *E. coli*. Сходство нуклеотидной последовательности рАН 36-4СРА с р15А составило 84%, а с ColE1 - 71%. Наибольший уровень гомологии наблюдался с репликационным регионом плазмиды р26807 штамма *Yersinia enterocolitica* - 91%.

Все три плазмиды относятся к ColE1-типу плазмид, что дало возможность отнести рАН 36-4СРА к этому типу. Выявленная гомология позволила идентифицировать элементы, участвующие в репликации плазмиды рАН 36-4СРА. Установлено, что исследуемая плазида обладает репликационной системой, содержащей праймер РНК II (204-725 п.н.) и комплементарную праймеру регуляторную последовательность - РНК I (207-310). РНК II и РНК I определяют тип несовместимости плазмиды и ее копияность. Промоторы в регионах -35 и -10 для РНК I были полностью идентичны с промоторами плазмид р26807, р15А и рColE1, в то время как для РНК II наблюдалось некоторые отличия: в области -35 замена двух нуклеотидов и вставка одного, в позиции -10 замена трех нуклеотидов.

Точка начала репликации *oriV* исследуемой плазмиды локализована в позиции 726 п.н. и оказалась на 100% идентичной последовательностям *oriV* р26807, р15А и рColE1.

Ранее было показано, что плазида ColE1 обладает еще одним фактором, участвующим в контроле репликации - ROM белком (Chan et al., 1985). На основе анализа последовательности рАН 36-4СРА был сделан вывод, что ROM белок плазмидой рАН 36-4СРА не кодируется.

**Регион мобилизации плазмиды рАН 36-4СРА.** Предварительный скрининг нуклеотидных последовательностей секвенированной плазмиды рАН 36-4СРА по базе данных GenBank выявил принадлежность фрагмента последовательности (1139-2948 п.н.) к семейству генов *mob* (кластер генов мобилизации).

Была выявлена высокая гомология *mob* - региона плазмиды рАН 36-4СРА, длина которого составила 1809 п.н., с плазмидами рECO1 *Enterobacter cloacae* - 99%, рАН3680 *Aeromonas hydrophila* - 99%, рEC278 *Escherichia coli* 278В - 98%, рK *Salmonella enteritidis* - 90%, рBERT *Salmonella berta* - 90%.

Сравнение последовательностей показало, что область мобилизации плазмид рАН 36-4СРА и рECO1 имеют сходную структуру и объединяет 4 гена *mobA*, *mobB*, *mobC* и *mobD*. Анализ расположения последовательностей открытых рамок считывания позволил установить, что размер гена *mobA* рАН 36-4СРА составляет 1497 п.н., *mobB* - 489 п.н., *mobD* - 216 п.н., *mobC* - 324 п.н. Два гена (*mobB* и *mobD*) полностью перекрываются последовательностью гена *mobA*, в то время как ген *mobC* перекрывается геном *mobA* только частично (11 п.н.).

#### **Выводы**

Определена последовательность нуклеотидов плазмиды рАН 36-4СРА.

Выявлена гомология исследуемой плазмиды с репликационными регионами плазмид р26807, р15А и рColE1, что позволила отнести рАН 36-4СРА к ColE1-типу плазмид. Идентифицированы элементы, участвующие в репликации плазмиды рАН 36-4СРА, а именно: РНК II, РНК I, *oriV*, отсутствие *rom* гена.

Установлена гомология нуклеотидной последовательности плазмиды рАН 36-4СРА с кластером *mob* генов плазмиды рECO1 штамма *Enterobacter cloacae*. Выявлено, что

гены *mobB* и *mobD* полностью перекрываются с последовательностью гена *mobA*, в то время как ген *mobC* перекрывается геном *mobA* только частично (11 п.н.). Определены размеры генов мобилизации плазмиды рАН 36-4СРА: *mobA* рАН 36-4СРА составляет 1497 п.н., *mobB* - 489 п.н., *mobD* - 216 п.н., *mobC* – 324 п.н.

#### Литература

1. Cohan F.M. The role of genetic exchange in bacterial evolution // ASM News. - 1996.- vol. 62. - P. 631-636.
2. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acids. Res. - 1979. - vol. 7. - P. 1513-1523.
3. Chan P.T, Ohmori H., Tomizawa J., Lebowitz J. Nucleotide sequence and gene organization of ColE1 DNA // The Journal of Biological Chemistry. - 1985. - vol. 260. - P.8925-8935.

#### Резюме

Новая плазида деградації ксенобіотиків, була виділена із штамма *Citrobacter hydrophila* IBRB-36-4СРА. Довжина плазмиди становить 5217 п.н. Репликаційний регіон плазмиди рАН 36-4СРА гомологічний репліконам ColE1-типу і кодує послідовності РНКІ і РНКІІ. Плазида містить чотири гени мобілізації *mobCABD*. Послідовності генів *mobB* і *mobD* перекриваються геном *mobA*.

A new D-plasmid рАН 36-4СРА with a size of 5217 bp had been isolated from the *Citrobacter hydrophila* strain IBRB-36-4СРА. The origin of replication of рАН 36-4СРА homologous to ColE1-type plasmid. The replication region of the plasmid encodes a primer RNAI and countertranscript RNAII. The plasmid рАН 36-4СРА consists of four mobilization genes, *mobCABD*. The *mobB* and *mobD* genes entirely overlap with the *mobA* gene.

**ЗЛАЦЬКА А.В., КОРОЛЬ Л.В., ШИТІКОВА Ю.В., ШЕРЕПІТКО Д.В.**

Український інститут експертизи сортів рослин,

Україна, 03041 Київ, вул. Генерала Родимцева 15, e-mail: zlatska@hotmail.com

### ПЕРЕВІРКА ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ ISSR-МАРКЕРІВ У ВИВЧЕННІ ГЕНОМУ БУРЯКА ЦУКРОВОГО

Цукровий буряк – є однією з найбільш поширених сільськогосподарських культур, основними напрямками використання якої є виробництво цукру та спирту, в зв'язку з чим, врожайність (врожай коренеплодів), якість (вміст сахарози і чистота соку) та стійкість до хвороб є основними господарсько цінними ознаками, на які в першу чергу звертає увагу селекціонер при створенні нових ліній та гібридів, оскільки саме вони формують економічний внесок у ефективність виробництва цукру та продуктів його переробки [1]. Сучасний рівень ефективною та інтенсивною селекції будь-якої сільськогосподарської культури не можливо уявити без залучення молекулярно-генетичних методів, а особливо молекулярно-генетичних маркерів, оскільки вони, на відміну від морфологічних ознак-маркерів, перекривають весь геном рослини, а їх прояв не залежить від впливу на рослину умов оточуючого середовища в процесі її росту та розвитку.

Проведений аналіз літературних джерел свідчить про відносно невелику кількість статей, присвячених питанню використання молекулярно-генетичних маркерів (як білкових, так і ДНК-маркерів) в аналізі геному буряка цукрового в порівнянні з іншими сільськогосподарськими культурами: ячмінь, пшениця, кукурудза, соя тощо. Усі ці напрямки зводилися до наступних:

а) маркування певних генів господарсько-цінних ознак: генів стійкості до нематод [2-3], генів формування коренеплодів [4], генів стійкості до різоманії тощо [5-6]; б) ідентифікація чужинного генетичного матеріалу в геномі ліній та гібридів буряка цукрового, що передано в його геном від споріднених диких видів *B.procumbens*, *B.webbiana*, *B.patellaris*, *B.nana* [3, 7]; в) побудова карт зчеплення [8-10]; г) встановлення філогенетичних зв'язків між дикими, культурними видами та видами бур'янів, що належать до роду *Beta* [11]; д) аналіз міжлінійного, внутрішньо лінійного та міжсортового поліморфізму буряка цукрового та дикоростучих співродичів цієї культури (RAPD методом [12]; AFLP [1, 13]; SSR-ПЛР [14-16]).

Крім того, цікавим виявився той факт, що в жодній з проаналізованих робіт щодо аналізу рослинного матеріалу буряка цукрового не використовували метод ISSR-ПЛР, що дозволяє аналізувати міжмікросателітні послідовності, оскільки праймери, що використовуються у цьому методі, складаються з тандемних коротких нуклеотидних повторів та одного (або більше) селективного нуклеотиду на 3'-кінці праймера. Мікросателітні послідовності оточують багато генів та можуть бути використані як лінкерні послідовності до них. ISSR-маркери не потребують попередньої інформації про послідовність, що планується ампліфікувати, мають високу точність і відтворюваність результатів та характеризуються домінантним типом успадкування. В зв'язку з цим, метою даної роботи було з'ясувати можливість використання методу ISSR-ПЛР для аналізу геному буряка цукрового.

#### Матеріали і методи

Матеріалом для аналізу слугували рослини гібридів (В<sub>II</sub> 360, В<sub>II</sub> 824, В<sub>II</sub> 302) з колекції Верхняцької ДСС, 20-30 з яких брали для проведення аналізу. Екстракцію ДНК проводили з проростків буряка цукрового за допомогою СТАВ методу [17]. ПЛР аналіз ISSR маркерів проводили по методиці ампліфікації SSR маркерів з температурою обпалення 50°C [18]. Розділення продуктів ампліфікації проводили у 2% агарозному гелі з наступною візуалізацією продуктів ампліфікації в ультрафіолетовому світлі з використанням бромистого етидію. Для проведення роботи було відібрано довільно 34 ISSR праймери (таблиця 1), що показали ефективність їх застосування при аналізі злакових культур [19].

#### Результати і обговорення.

Проведена робота складалася з двох основних етапів. На першому етапі досліджувалася можливість ідентифікації міжгібридного та внутрішньо гібридного молекулярно-генетичного поліморфізму у досліджених рослин за допомогою ISSR-ПЛР методу. На наступному етапі, в разі якщо такий поліморфізм було ідентифіковано, перевіряли стабільність прояву певних ампліконів, шляхом кількаретового повторення ампліфікації з цим же праймером та на цьому ж рослинному матеріалі.

Таблиця 1.

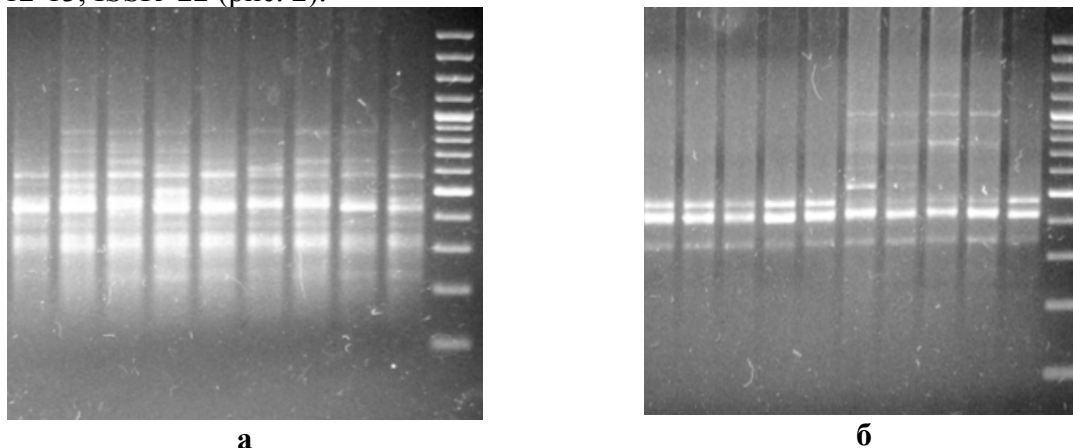
#### Перелік послідовностей ISSR праймерів, що було використано в дослідженні

назва	послідовність	назва	послідовність
ISSR 1	GA GA GA GA GA GA GA GA C	ISSR 18	GA GA GA GA GA GA GA T
ISSR 2	GGA GAG GAG AGG AGA	ISSR 19	AG AG AG AG AG AG AG G
ISSR 3	GAC AGA CAG ACA GAC A	ISSR 20	AG AG AG AG AG AG AG T
ISSR 4	GA GA GA GA GA GA GA	ISSR 21	AG AG AG AG AG AG AG CT
ISSR 5	TG TG TG TG TG TG TG G	ISSR 22	AG AG AG AG AG AG AG TA
ISSR 6	AC AC AC AC AC AC AC T	ISSR 23	G AG AG AG AG AG AG ATC
ISSR 7	TC TC TC TC TC TC TC G	ISSR 24	AG AG AG AG AG AG AG YC
ISSR 8	TC TC TC TC TC TC TC C	ISSR 25	CA CA CA CA CA CA CA RG
ISSR 9	AG AG AG AG AG AG AG C	ISSR 26	GT GT GT GT GT GT GT YA
ISSR 10	GGG TG GGG TG GGG TG	ISSR 27	AC AC AC AC AC AC AC YT
ISSR 11	GA GA GA GA GA GA GA CC	ISSR 28	AC AC AC AC AC AC AC YA
ISSR 12	AG AG AG AG AG AG AG TC	ISSR 29	CT CT CT CT CT CT CT G

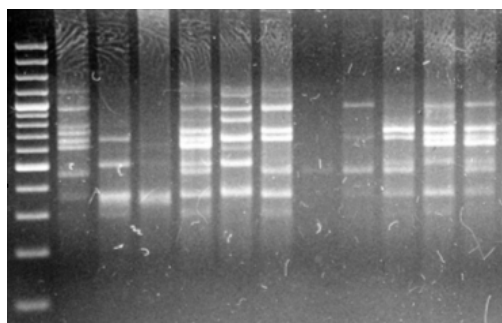
ISSR 13	TG TG TG TG TG TG TG TG A	ISSR 30	AGC AGC AGC AGC AGC AGC T
ISSR 14	AC AC AC AC AC AC AC AC G	ISSR 31	CTC CTC CTC CTC CTC CTC A
ISSR 15	AC AC AC AC AC AC AC AC C	ISSR 32	GAG GAG GAG GAG GAG GAG C
ISSR 16	GT GT GT GT GT GT GT GT C	ISSR 33	ACC ACC ACC ACC ACC ACC G
ISSR 17	GA GA GA GA GA GA GA GA C	ISSR 34	AGC AGC AGC AGC AGC AGC G

В результаті проведеної роботи було відібрано 19 праймерів, що характеризувалися стабільним проявом ампліконів, отриманих в наслідок ПЛП: ISSR 1-3, ISSR 5-6, ISSR 8-9, ISSR 11-15, ISSR 19-22, ISSR 25, ISSR 28, ISSR 31. В цей список потрапили 6 з 7 праймерів, що мали в своєму складі динуклеотидний повтор (AG)<sub>n</sub> ISSR 9, ISSR 12, ISSR 19-22, при чому ISSR 24, що не показав чітких стабільних ампліконів, мав в якості якірної послідовності модифікований нуклеотид, що може пояснити його неефективність при аналізі геному буряка цукрового. Ефективними виявилися 4 з 5 ISSR праймерів (ISSR 6, ISSR 14-15, ISSR 28) з динуклетидним повтором (AC)<sub>n</sub>, неефективність ISSR27 можна пояснити тими ж причинами, що і ISSR 24. Два праймери з (TG)<sub>n</sub> повторами ISSR 5 і ISSR 13 виявилися більш придатними для аналізу геному буряка цукрового, ніж два праймери з (GT)<sub>n</sub> повторами ISSR 16 і ISSR 26. З шести праймерів, що були носіями динуклетидного повтору (GA)<sub>n</sub> лише два праймери ISSR 1 і ISSR 11 виявилися ефективними, загальною їх характеристикою була наявність селективного нуклеотидів на 3'-кінці –C і –CC відповідно. Серед вивчених 8 праймерів з три- та тетрануклеотидними послідовностями лише 3 показали свою ефективність: ISSR 2 (GGA)<sub>n</sub>, ISSR 3 (GACA)<sub>n</sub> та ISSR 31 (TCC)<sub>n</sub>.

Серед проаналізованих маркерів були високополіморфні (на приклад ISSR 14-15 та ISSR 19), що давали можливість виявити в електрофоретичному спектрі продуктів ампліфікації більш ніж 20 ампліконів (рис. 1), низькополіморфні (ISSR 5-6, ISSR 8-9), що мали 6 ампліконів і менше (рис. 1), а також маркери з середнім рівнем поліморфізму ISSR 12-13, ISSR 22 (рис. 2).



**Рис. 1.** Приклад високополіморфного (а, ISSR 19) та низькополіморфного (б, ISSR 5) спектру продуктів ампліфікації



**Рис. 2.** Приклад ISSR праймеру з середнім рівнем поліморфізму (ISSR 13)

В цілому проведена робота показала придатність використання методу ISSR-ПЛП для аналізу геному буряка цукрового, але цьому аналізу має передувати велика попередня робота з підбору відповідних праймерів, оскільки в нашому дослідженні лише 56% проаналізованих праймерів виявилися придатними для подальшого використання в молекулярно-генетичному аналізі геному буряка цукрового з метою

паспортизації гібридів та ліній цієї культури, маркування та ідентифікації певних генів тощо. Найбільш ефективними виявилися праймери з динуклеотидними повторами (AG)<sub>n</sub>, (AC)<sub>n</sub> та (TG)<sub>n</sub>, меншу ступінь ефективності мали праймери з три та тетрануклеотидними повторами.

### Література

1. De Riek J., Calsyn E., Everaert I., Van Bockstaele E. AFLP based alternatives for the assessment of Distinctness, Uniformity and Stability of sugar beet varieties // *Theor. and Appl. Genet.* – 2001. – vol. 103. – P.1254-1265.
2. Jung C., Wehling P., Loptien H. Electrophoretic investigation on Nematode Resistant Sugar beet // *Plant Breeding* – 1986. – 97, Issue 1. – P. 39-45.
3. Jung C., Wricke G. Selection of Diploid Nematode-Resistant Sugar Beet from Monosomic Addition lines // *Plant Breeding* – 1987. – 98, Issue 3. – P. 205-214.
4. Abe J., Guan G.-P., Shimamoto Y. A marker-assisted analysis of bolting tendency in sugar beet (*Beta vulgaris* L.)//*Euphytica* – 1997. – 94, №2. – P. 137-144.
5. Gidner S., Lennefors B.-L., Nilsson N.-O., Bensefelt J., Johansson E., Gyllenspetz U., Kraft T. QTL mapping of BNYVV resistance from the WB41 source in sugar beet // *Genome.* – 2005. – 48. – P. 279-285.
6. Grimmer M.K., Trybush S., Hanley S., Francis S.A., Karp A., Asher J.C. An anchored linkage map for sugar beet based on AFLP, SNP and RAPD markers and QTL mapping of a new source of resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* // *Theor. and Appl. Genet.*- 2007.- vol. 114, № 7.- P.1151-1160.
7. Jung C., Herrmann R.G. A DNA probe for rapid screening of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) carrying extra chromosomes from wild beet of the *Procumbentes* section // *Plant Breeding* – 1991. – 107, Issue 4. – P. 275-279.
8. Uphoff, H., Wricke G. A genetic map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) based on RAPD markers// *Plant Breeding* - 1995. - V. 114. - P. 355-357.
9. Pillen K., Steinrucken G., Wricke G., Herrmann R. G., Jung C. A linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // *Theor. and Appl. Genet.* – 1992 - V. 84., № 1-2. - P. 129-135.
10. Pillen K., Steinrucken G., Herrmann R. G., Jung C. An extended linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) including nine putative lethal genes and the restorer gene X // *Plant Breeding.* – 1993 - V. 111.- P. 265-272.
11. Bartsch D., Ellstrand N.C. Genetic evidence for the origin of Californian wild beets (genus *Beta*) // *Theor. and Applied Genet.* – 1999. – 99, № 7-8. – P. 1120-1130.
12. McGrath J.M., Derrico C.A., Yu Y. Genetic diversity in selected, historical US sugar beet germplasm and *Beta vulgaris* ssp. *maritime* // *Theor. and Appl. Genet.* - 1999. - vol 98, № 6-7. - P. 968-976.
13. Hansen M., Kraft T., Christiansson M., Nilsson N.-O. Evaluation of AFLP in *Beta* // *Theor. and Appl. Genet.* - 1999. - vol 98., № 6-7. - P. 845-852.
14. Morchen, M., J. Cuguen, G. Michaelis, C. Hanni, P. Saumitou-Laprade Abundance and length polymorphisms of microsatellite repeats in *Beta vulgaris* L.// *Theor. and Appl. Genet.* - 1996. - V. 92.- P. 326-333.
15. Desplanque B., Boudry P., Broomberg K., Saumitou-Laprade P., Cuguen J., Van Dijk H. Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weed forms of *Beta vulgaris* L. (Chenopodiaceae), assessed by RFLP and microsatellite markers // *Theor. and Appl. Genet.* – 1999 – V. 98.,№ 8 – P. 1194-1201.
16. Dornate J. Entwicklung, Charakterisierung und Kartierung von Mikrosatellitenmarkern bei der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.). / Dissertation Universität. Gatersleben, 2001. 125 p.
17. Kleinhofs A., Kilian A., Maroof M.A.S. et al. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome // *Theor. and Appl. Genet.* – 1993. – vol. 86. – P. 705-712.
18. Roder M.S., Korzun V., Wendehake K. et al. A microsatellite map of wheat // *Genetics.* – 1998. – 149. – P. 2007-2023.

19. Ma Z. Q., M. Roder, M. E. Sorrells. Frequencies and sequence characteristics di-, tri-, and tetra-nucleotide microsatellites in wheat // Genome.- 1996. - vol. 39. - P. 123-130.

### **Резюме**

Проведенная работа показала эффективность использования метода ISSR-ПЦР для анализа генома сахарной свеклы. Из 34 использованных ISSR праймеров к ди-, три- и тетра-нуклеотидным повторам 19 оказались пригодными к дальнейшему использованию в молекулярно-генетической работе. Наиболее эффективными оказались праймеры с динуклеотидными повторами (AG)<sub>n</sub>, (AC)<sub>n</sub> и (TG)<sub>n</sub>.

Проведена робота показала ефективність застосування методу ISSR-ПЛР для аналізу геному буряка цукрового. З 34 використаних ISSR праймерів до ди-, три- та тетра-нуклеотидних повторів 19 виявилися придатними для подальшого використання в молекулярно-генетичній роботі. Найбільш ефективними виявилися праймери з динуклеотидними повторами (AG)<sub>n</sub>, (AC)<sub>n</sub> та (TG)<sub>n</sub>.

Present work showed the efficiency of ISSR-PCR method for analysis of sugar beet genome. Among 34 ISSR to di-, tri-, and tetra-nucleotide repeats, applied in present work 19 appeared to be suitable for further molecular genetic investigation. The most effective primers were primers with di- nucleotide repeats (AG)<sub>n</sub>, (AC)<sub>n</sub> та (TG)<sub>n</sub>.

**ИВАНОВА Э.А., ВАФИНА Г.Х., ТРОПЫНИНА Т.С., ИВАНОВ Р.С.**

*Институт биологии Уфимского научного центра Российской Академии Наук, Россия, 450053, Уфа, пр. Октября 69, e-mail: evilina@anrb.ru*

### **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ АРГ-Х ПРОТЕОЛИЗА В ПРОТЕОМЕ ГЕНОМА ПРО- И ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК**

Старая догма молекулярной биологии, согласно которой то, что справедливо для кишечной палочки, справедливо и для слона (афоризм Ж. Моно) сейчас подвергается пересмотру [1]. В 1990г вышла статья Гюнтер Альбрехт-Бюлера (Gunter Albrecht-Buehler) [см 2] о том, что цитоплазма клетки высоко структурирована, разделена мембранами и вся пронизана нитями цитоскелета, с этой точки зрения внутриклеточные реакции более адекватно может описывать только надмолекулярная химия иммобилизованных ферментов, где уже интегрированы взаимодействия многих макромолекул. Как известно основой жизни являются линейные гетерополимеры – нуклеиновые кислоты и белки. Многократное сокращение линейных размеров ДНК происходит таким образом, что общая протяженность 2м геномной ДНК средней эукариотической клетки упаковывается в ядре, диаметр которого составляет 8-10мкм, при сохранении доступности определенных участков ДНК для регуляторных факторов и ферментов транскрипции [3]. Что касается бактериальной клетки, то её геном упаковывается в диапазоне 1,1-1,5×2,5-6,0мкм [4]. По мнению С.В. Разина [3] крупномасштабная пространственная организация ДНК в геноме эукариотической клетки играет важную роль в работе эпигенетических механизмов, является достаточно сложной, далеко не случайной и происходит в несколько этапов: накручивание ДНК на нуклеосомы; компактизация нуклеосомной нити с образованием так называемой 30 нм фибриллы; сворачивание 30 нм фибриллы в гигантские петли закрепленные на белковой скелетной структуре ядра – ядерном матриксе. Вся изложенная схема упаковки ДНК в клеточном ядре, как показали экспериментальные данные, не может быть единообразной [5]. Каковы уровни упаковки бактериальной ДНК нам пока мало что известно. В связи с этим

возникает вопрос – в чем заключается особенность транскрипционно-активной фракции хроматина, хромосомы и каким образом транскрипция может регулироваться на уровне хроматиновой, хромосомной фибриллы? К одной из сторон анализа этого вопроса мы решили подойти, исследуя *Arg-X* протеолиз в бактериальной хромосоме и хроматине эукариотической клетки, учитывая, что основные аминокислоты, в частности аргинин, входящий в состав гистонов, (возможно, и гистоноподобных белков нуклеоида бактерии) принимают активное участие в структуризации ДНК. Известно, что протеолитическая система ответственна в эукариотическом организме за целостность отдельной ткани (она тканеспецифична), по-видимому, в бактериальной клетке она ответственна за внутриклеточную сохранность. Кроме того, протеолитическая система филогенетически древнее гормональной или нервной систем, ответственных за функционирование организма в целом. Важным свойством протеолитической системы является также и то, что это форма биологического контроля, дающая быстрый физиологический ответ на изменяющиеся условия внешней среды. Целью данной работы был экспериментальный анализ особенностей *Arg-x* протеолиза в протеоме генома про- и эукариотических клеток в процессе их функционирования.

### **Материалы и методы**

При работе с протеомом из генома прокариотической клетки использовался штамм *E. coli* JC-158 (Hfr PO1, thi1, serA6, lacI22, relA1) [6], любезно предоставленный нашими коллегами И.В. Ступак и Е.Э. Ступак (Институт биологии УНЦ РАН, лаборатория математической и молекулярной генетики). Клетки *E. coli* JC-158 выращивали на богатой питательной среде LB (Лурия-Бертани) [7] до полной логарифмической фазы, собирали центрифугированием и промывали трис-буфером. Первая проба была взята через 50 минут после начала инкубирования. Все клетки, собранные в течение от 50 мин до 430 мин с интервалами в 20 мин, были законсервированы в глицерине по методу [8].

Выделение протеома из генома клеточных ядер пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московской 35 (суперэлита) проводили по методу [9], через каждые 3ч, после замачивания семян в течение 21ч, проводили отделение зародышей от эндосперма, определяли их сырую массу и консервировали при  $-25^{\circ}\text{C}$  в 80-90% глицерине [8]. Клеточные ядра выделяли по способу [8]. Из бактериальных клеток и клеточных ядер пшеницы фракционировали надмолекулярные структуры согласно методу [8] с соответствующим обозначением, представленным ниже. Протеом *E. coli* фракционировали на основе разрыва слабых и сильных взаимодействий надмолекулярных структур с использованием ступенчатого повышения солевого градиента: 0,14 М NaCl; 0,35 М NaCl; 2 М NaCl; 6 М гуанидин – гидрохлорида с 0,004 %  $\beta$  – меркаптоэтанолом на 0,01 М трис – HCl буфере при pH 6,8. Экстракции белков с помощью повышения ионной силы солевых градиентов, приводящих к ослаблению электростатического взаимодействия между белками и адсорбентом, это обычные методы белковой химии для эукариот [9]. Обычно фракция, выходящая при низкой ионной силе 0,14 М NaCl, известна в биохимии клеточного ядра под названием: ядерный сок, нуклеоплазма (Нп) или глобулиновая фракция [10]; остальные фракции известны как соответственно: непрочно (Хр-I) - (0,35 М NaCl), прочносвязанные (Хр-II) - (2 М NaCl) с ядерным матриксом (ЯМ) и собственно ядерный матрикс (6 М гуанидин - гидрохлорида с 0,004 %  $\beta$  – меркаптоэтанолом) [11,12]. Обозначение фракций наше, с учетом выделенных фракций хроматина (Хр-I; Хр-II). По аналогии белковые фракции, выделенные из протеома *E. coli*, можно представить соответственно как: клеточный сок (цитоплазма -Цп), белки непрочно (Бн-I) – и прочносвязанные (Бп-II) с клеточным остатком (КО) и собственно клеточный остаток с жесткой клеточной оболочкой. Для выхода субфракций хроматина и надмолекулярных структур *E. coli* пользовались встряхиванием проб на Micro-shaker



(type 326m; Warszawy) в течение 2-3ч при  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ . Фракции хранили в жидком азоте. Количество белка в надмолекулярных структурах определяли методом Бредфорд в нашей модификации [9]. *Арг-X* активность оценивали по расщеплению *Арг-X* связей в аргининбогатом белке – протамине («Metk») во всех вышеперечисленных фракциях ядер [9]. Протамин- *Salmine-A-I*, его молекула состоит из 33 аминокислот: 22-х молекул *Арг*; 4-х молекул *Сер*; 3-х молекул *Про*; по 2 молекулы *Гли* и *Вал*. Активность *Арг-X*-протеолиза выражали в нмоль аргинина·с<sup>-1</sup>·мкг белка. Числа и точки на графиках представляют среднеарифметические данные. В данной работе представлено их устное описание.

### Результаты и обсуждение

По мнению [13] главной задачей XXI века является - понять как все компоненты клетки взаимодействуют в пространстве и времени, образуя сложные динамические, биологические системы. Такую задачу ставят перед собой интенсивно развивающиеся в последние годы технологии “in vivo imaging” [13]. Пока мало известно о молекулярной подвижности и внутриклеточной молекулярной динамике при образовании временных составных структур внутри клетки. Требуется наблюдение молекул *in vivo*, чтобы проследить структурные изменения во времени. При надмолекулярном описании динамики компонентов клетки в пространственно-временном аспекте, как сообщалось выше, уже интегрированы взаимодействия многих молекул. Волькенштейн [14] считает, что сложные физико-химические взаимодействия в клетке осуществляются на основе сильных (химических) и слабых (Ван-дерваальсовых, гидрофобных и так далее) взаимодействий. Эти взаимодействия всецело определяются свойствами внешних электронных оболочек молекул. Сейчас растет понимание того, что информация о функциях, возможно заложена не только в геноме, а еще и во взаимодействиях продуктов генома [13]. Мультикомпонентные системы, составленные из множества белков, являются «машинами» со своими собственными, не запрограммированными в ДНК, правилами поведения. В этом отношении для нас представляет интерес аргинин – незаменимая аминокислота, входящая в состав белковых молекул генома эу- и прокариотов. Аргинин входит в состав сократительных белков, большей частью вовлекается в их поверхностный слой. Возможно, последующее сжатие и растяжение, экранирование гидрофобных и гидрофильных поверхностей белков способствует образованию мультикомпонентных систем. Гуанидиновая группа аргинина протонируется, стабилизируется резонансом и представляет собой центр связывания фосфатных, ацетильных групп, а также является удобной мишенью, по которой происходят биоспецифические модификации. К тому же аргининсодержащие пептиды легко иммобилизируются. Все это свидетельствует о полифункциональности белка, в составе которого есть аргинин. Особый интерес представляют белки богатые аргинином в составе хроматина клеточного ядра. Один из них H4 эволюционно консервативен и представлен высококонсервативными последовательностями из коротких пептидов, в которых почти везде присутствует аргинин. Значение этих последовательностей ещё предстоит расшифровать. В данной работе мы анализировали *Арг-X* протеолиз на разных уровнях укладки интерфазного хроматина G<sub>1</sub> фазы клеточного цикла и структурной укладки хромосомы прокариотической клетки в периоды ее активного, замедления и прекращения роста на примере бактериальных клеток *E. coli*. Анализ *Арг-X* протеолиза, на разных уровнях укладки хроматина, при его транскрипционной активации в течение G<sub>1</sub> фазы клеточного цикла зрелых зародышей пшеницы, выявил временные трехэтапные циклы, которые связаны с разворачиванием хроматиновых фибрилл при переходе от G<sub>1</sub> фазы клеточного цикла к S-фазе. В клетках бактерий хромосома уложена в виде компактной структуры, связанной с мембраной. Такой ДНК-мембранный комплекс обеспечивает структурную укладку хромосомы, ее репликацию и сегрегацию [см 15]. Путем

мягкого лизиса клеток бактерий неионными детергентами в присутствии 1 М NaCl выделили бактериальную хромосому — нуклеоид, ассоциированный с мембранным материалом [см 15]. Морфология релаксированного бактериального нуклеоида напоминает морфологию нуклеоида эукариотической клетки за тем исключением, что последний имеет большее количество отходящих от центра петель [см 15]. В нашем эксперименте в экспоненциальной фазе роста, при достаточном количестве питательных веществ в среде, клетки бактерий растут с наивысшей скоростью. Это период от 50 до 170 минут. При постепенном исчерпании необходимых питательных веществ и накоплении продуктов метаболизма скорость бактерий снижается (фаза замедления роста), это период от 170 до 290 минут. Затем рост бактерий останавливается – культура переходит в стационарную фазу, это период от 290 до 410 минут и далее 430 минут. В период активного роста от 50 до 170 минут, мы выявили некоторый этап его замедления (от 110 до 170 минут), этот этап сохраняется (от 170 до 230 минут) в периоде замедления от 170 до 290 минут и затем еще раз сохраняется это замедление (от 230 до 290 минут). В таком последнем замедленном состоянии (от 290 до 350 минут) этот этап сохраняется в периоде остановки роста бактерий от 290 до 410-430 минут. Полностью культура переходит в стационарную фазу от 350 до 410-430 минут. Считают, что при переходе бактерий в стационарную фазу запускается программа дифференциации, приводящая к тому, что клетки становятся метаболически менее активными и более устойчивыми к стрессовым факторам, в них происходят серьезные морфологические и биохимические изменения, повышается резистентность клеток к неблагоприятным воздействиям [16]. Многие функции, индуцируемые при входе культуры в стационарную фазу, активируются в это время, когда клетки растут медленно, при лимитировании питательных веществ [16]. Мы рассмотрели особенности молекулярных *Arg-X* механизмов на примере бактериальных клеток *E. coli*. При переходе клеток в стационарную фазу экспрессия большинства бактериальных генов существенно уменьшается. Однако в этих условиях происходит индукция экспрессии большого количества генов и стимулируется синтез специфических белков, прежде всего тех, которые обеспечивают устойчивость бактерий к различным неблагоприятным условиям [16]. В этот период мы отмечаем высокую непрерывную активность *Arg-X* протеолиза на уровне клеточного остатка или цитоскелета клетки. Понимание механизмов регуляции экспрессии соответствующих генов чрезвычайно важно для биотехнологии. В этом плане еще предстоит большая работа.

#### **Выводы**

В протеоме генома эукариотической клетки система *Arg-X* протеолиза функционирует циклически при транскрипционной активации хроматина на разных уровнях укладки ДНК в течение G<sub>1</sub> фазы клеточного цикла. В протеоме генома бактериальных клеток система *Arg-X* протеолиза активно функционирует в стационарной фазе роста бактерий.

#### **Литература**

1. Киселев Л.Л. Терминация белкового синтеза у эукариот и прокариот существенно различается // Молекулярная биология. -1999.-Т.33, №6.- С.1054-1062.
2. Марголис Л.Б. Почему мы не понимаем живую клетку, или Мифы молекулярной биологии // Природа. -1991, №3. –С.97-100.
3. Разин С.В. Пространственная организация эукариотического генома и работа эпигенетических механизмов // Генетика. -2006.-Т.42, №12. С.1605-1614.

4. Определитель бактерий Берджи /Под. ред. Дж.Хоулта, Н.Крига, П.Снита, Дж.Стейли, С.Уилльямса.-М.:Мир.-1997. –Т.1.-С.185.
5. *Разин С.В.* Хроматин и регуляция транскрипции // Молекулярная биология. - 2007.-Т.41, №3.-С.387-394.
6. *Murphy D.B., Pembroke J.T.* Transfer of the IncJ plasmid R391 to recombination deficient *E.coli* K12: evidence that R391 behaves as a conjugal transposon // FEMS Microbiology Letters. -1995. -vol.134. - P.153-158.
7. *Маниатис Т.,Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. - М.:Мир. -1984.-С.84.
8. *Иванова Э.А., Вафина Г.Х.* Способ выделения растительных клеточных ядер // Пат. РФ №1701747.-Бюл.изобр. -1991. №48.
9. *Иванова Э.А., Вафина Г.Х.* Способ получения ядерных фракций, обладающих протеиназной и ингибирующей активностью // Пат. РФ №1733471.-Бюл.изобр. - 1992. №18.
10. *Збарский И.Б.* Организация клеточного ядра. –М.: Медицина. -1988. –С.24.
11. *Збарский И.Б., Кузьмина С.Н.* Скелетные структуры клеточного ядра. –М.: Наука. -1991. -С.30-39.
12. *Караванов А.А., Афанасьев Б.Н.* Негистоновые белки хроматина // Молекулярная биология. -1983.-Т.47, №2.-С.213-233.
13. *Свердлов Е.Д.* Биологический редуционизм уходит? Что дальше? // Вестник РАН. -2006. -Т.76, №8. –С.707-721.
14. *Волькенштейн М.В.* Биополимеры и эволюция // Молекулярная биология. -1985.- Т.19, №1.-С.55-66.
15. *Газиев А.И., Фоменко Л.А., Закржевская Д.Т., Сигаева В.А.* Прочно связанные с ДНК белки в составе нуклеоида *E.coli* // Биохимия. -1985.-Т.50, №5.-С.814-819.
16. *Хмель И.А.* Регуляция экспрессии бактериальных генов в отсутствие активного роста клеток // Генетика. -2005.-Т.41, №9.-С.1183-1202.

#### **Резюме**

Показано, что молекулярный механизм *Arg-X* протеолиза функционирует в протеоме генома эу-, так и прокариотов.

Molecular mechanism of *Arg-X* proteolysis acts in the proteom of genome as eu- as prokaryotes is shown.

**КАМЫШ Н.А., МИХАЙЛОВА М.Е., ВОЛЧОК Н.М., БЕЛАЯ Е.В.**

*ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,  
Республика Беларусь, 220027, г. Минск, ул. Академическая, 27,  
e-mail: L.Belaya@igc.bas-net.by*

#### **ДНК-ТИПИРОВАНИЕ БЕЛОРУССКИХ ПОПУЛЯЦИЙ СВИНЕЙ ПО ГЕНУ *Н-ФАВР*, ДЕТЕРМИНИРУЮЩЕМУ СОДЕРЖАНИЕ ВНУТРИМЫШЕЧНОГО ЖИРА**

С развитием молекулярной генетики становится возможным идентификация генов, напрямую или косвенно связанных с хозяйственно-полезными признаками. Выявление предпочтительных с точки зрения селекции вариантов таких генов (маркер-сопутствующая селекция) позволяет наряду с традиционным отбором животных, например, по толщине шпика, приросту живой массы и т.п., проводить селекцию непосредственно на уровне ДНК, т.е. по генотипу. В настоящее время известен спектр генов-кандидатов, полиморфные варианты которых оказывают прямое или косвенное

влияние на развитие признаков продуктивности у свиней. Одним из таких генов является ген FABP–маркер содержания внутримышечного жира [1].

FABP – fatty acid-binding proteins – мультигенное семейство белков, связывающих жирные кислоты. В настоящий момент известны 8 разновидностей комплекса FABP, выявленные в тканях печени (L), сердца и мышцах (H), жировых клетках (A), эпидермиса (E), мозга (B), миелина (M), кишечника (I), семенников (T) [8]. Гены данного семейства активно изучаются у человека как факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний и у свиней, как факторы качества мясной продукции. H-FABP, экспрессирующийся в сердце и скелетных мышцах, отвечает за внутриклеточный транспорт жирных кислот, играет одну из ключевых ролей в липидном обмене и считается основным претендентом в маркеры качества мяса.

Потребителей прежде всего интересует питательная ценность мясной продукции и ее качественные показатели. Присутствие жировых прожилок в постном мясе (так называемое «мраморное мясо») дает возможность получить изысканный букет готового мясного продукта в сочетании с нежными вкусовыми качествами и сочностью мяса [9]. Поэтому такие гены как Adipocyte-FABP (A-FABP) и Heart-FABP (H-FABP) изучаются как гены-кандидаты, оказывающие основное влияние на отложение внутримышечного жира у свиней. На сегодняшний день, в гене H-FABP известно, по крайней мере, 3 сайта полиморфизма, которые легко детектируются с помощью исследования ПДРФ спектров, которые получаются после обработки соответствующей рестриктазой (HinfI – выявляет так называемый H-полиморфизм, HaeIII – D-полиморфизм, MspI – A-полиморфизм). Все мутации являются молчащими [4,5].

Наиболее стабильно и эффективно проявляются аллельные варианты H-полиморфного участка гена H-FABP, поэтому популяционно-генетические исследования с его использованием являются весьма популярными. Полиморфизм A-типа встречается крайне редко, эффекты различных аллелей изучены недостаточно [6,7].

Была поставлена цель охарактеризовать популяции свиней по аллельным вариантам гена H-FABP следующих мясных пород: ландрас, дюрок, крупная белая, эстонская беконная, белорусская черно-пестрая.

#### **Материалы и методы**

Объектом исследования являются выборки животных свиноводческих комплексов РУСПП «Борисовский» Минской области, «Северный» Витебской области, КУСП «Заря» Гомельской области.

ДНК из отщипов ушных раковин животных выделяли методом солевой экстракции. ДНК-диагностика животных по D- и H- полиморфизму гена H-FABP проводили методом амплификации с дальнейшим анализом полиморфизма длин рестриктных фрагментов [4,8].

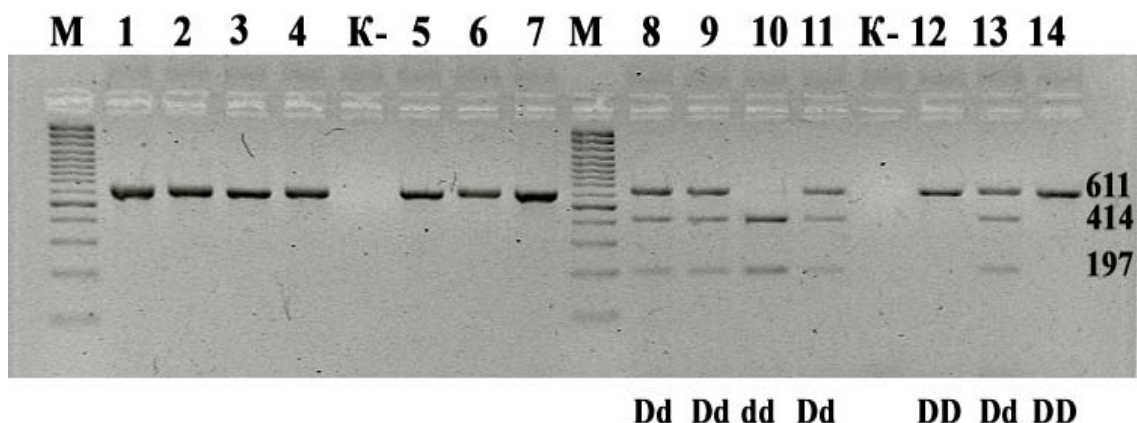
Для амплификации гена H-FABP (D-система) использовали праймеры:

1:FABP3: ATTCAGCTACTCAGCTGTTTCC

2:FABP4: AACAACTCTCAGGAATGGGAG

Основными компонентами реакционной смеси являются: Трис-HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, смесь нуклеотидтрифосфатов (АТФ, ГТФ, ЦТФ, ТТФ), праймеры, препарат анализируемой ДНК, термостабильная ДНК-полимераза. Каждый из компонентов реакционной смеси непосредственно участвует в полимеразной цепной реакции, а концентрация реагентов напрямую влияет на ход амплификации [3].

Рестрикция проводилась с использованием рестриктазы Hae III. Продукты рестрикции разделяли в 2% агарозном геле. Результаты генотипирования по D-системе гена H-FABP хорошо видны на электрофореграмме (Рис. 1).



**Рис.1** Электрофореграмма ПЦР-ПДРФ анализа D-полиморфизма гена H-FABP  
Условные обозначения:

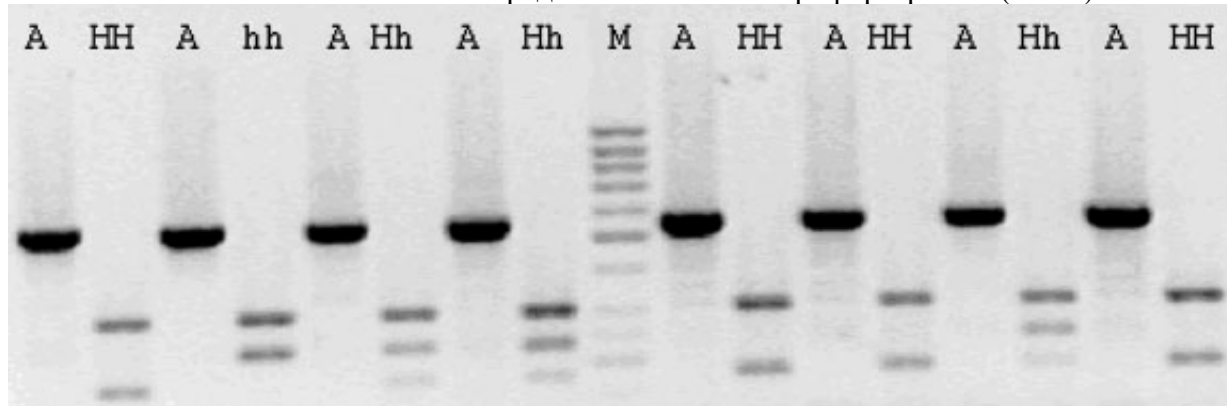
М – маркер 100bp DNA Ladder Plus; К- - отрицательный контроль;  
дорожки 1-7 – амплифицированные фрагменты ДНК; 8-14 — рестриктные фрагменты;  
dd и Dd – предпочтительные генотипы с низким содержанием внутримышечного жира

Для выявления полиморфизма H-системы гена H-FABP использовали следующие праймеры:

FABP1: 5' – AAG AGG ACC AAG ATG CCT ACG - 3'

FABP2: 5'- TGC TGT CCA СТА GCT TCC AGG - 3'

Рестрикция проводилась с использованием рестриктазы HinfI. Генотипирование особей по H-системе гена H-FABP представлено на электрофореграмме (Рис.2).



**Рис. 2** Электрофореграмма ПЦР-ПДРФ анализа H-полиморфизма гена H-FABP  
Условные обозначения: А - амплифицированные фрагменты ДНК; Hh, Hh, hh -  
генотипы животных

Hh– предпочтительный генотип с низким содержанием внутримышечного жира

Результаты исследований ДНК-диагностики животных по D- и H- полиморфизму гена H-FABP в КУСП «Заря» представлены в таблицах 1,2

*Таблица 1*

Частота генотипов и аллелей по гену, детерминирующему содержание  
внутримышечного жира (D-полиморфизм локуса H-FABP)

Порода	Кол-во про-анализ-ных особей	Частота генотипов локуса H-FABP, %			Частота аллелей локуса H-FABP	
		DD	Dd	dd	D	d
Крупная белая	54	14,8	63,0	22,2	0,46	0,54
Белорусская	39	20,5	33,3	46,1	0,38	0,62

мясная						
Эстонская беконная	35	28,6	34,3	37,1	0,45	0,55
Немецкий ландрас	28	25,0	42,9	32,1	0,46	0,54
Дюрок	44	12,5	54,2	33,3	0,39	0,61
Белорусская черно-пестрая	12	25,0	50,0	25,0	0,5	0,5

Таблица 2

Частота генотипов и аллелей по локусу, детерминирующему содержание внутримышечного жира (Н-полиморфизм локуса Н-FABP)

Порода	Количество проанализированных особей	Частота генотипов локуса Н-FABP, Н-система, %			Частота аллелей локуса Н-FABP Н-система	
		НН	Нh	hh	Н	h
Дюрок	29	58,6	34,5	6,9	0,76	0,24

По нашим данным, частота предпочтительных генотипов, детерминирующих содержание внутримышечного жира составляет 58,6 % по Н-системе и 34,5 % по D-системе гена Н-FABP. Частота более ценных Н-аллеля и d-аллеля составляет 0,76 и 0,55 соответственно. Следует отметить, что такие породы, как белорусская мясная и дюрок, имеют наибольшую частоту предпочтительного d-аллеля, дающего лучшие показатели содержания внутримышечного жира (0,62 и 0,61 соответственно).

Уменьшение толщины шпика у герозиготных животных по сравнению с особями, несущими гомозиготный генотип DD, составляло в зависимости от точки измерения от 5,9 до 13%, а у свиней с генотипом dd — от 4,4 до 9,9%. Тенденция пониженной жирности свиней с генотипом dd и Dd по сравнению с генотипом DD сохранялась и по показателю содержания внутреннего жира: уменьшение этого показателя составляло -10 и -13% соответственно.

Выявленная тенденция пониженной жирности туш свиней с генотипом Dd и dd по сравнению с генотипом DD сохранялась и при исследовании содержания сала в туше после обвалки. Процентное содержание сала в тушах свиней с генотипами Dd и dd по сравнению с животными с генотипом DD была ниже, соответственно на 8,9 и 11,5% при увеличении доли мяса соответственно на 7,0 и 10,9%. По процентному содержанию костей существенных различий между группами выявлено не было.

### Выводы

Использование ДНК-диагностики в селекции свиней позволяет осуществлять направленное разведение предпочтительных генотипов, что дает возможность ускорить селекцию свиней на воспроизводительные, откормочные и мясные качества. ДНК-типирование в раннем возрасте племенных животных и ремонтного молодняка по гену Н-FABP, контролирующему содержание внутримышечного жира, способствует увеличению мясной продуктивности свиней. Данные, полученные в результате предлагаемого нами скрининга, станут основой для племенной работы на некоторых свиноводческих комплексах Беларуси, т.к. это позволит целенаправленно вести скрещивание животных в промышленных масштабах, дающее либо постное диетическое мясо, либо деликатесное, т. н. «мраморное» мясо с высоким содержанием жира. Побочным результатом работы является создание банка ДНК свиней различных пород, что позволит проводить масштабные популяционно- и эволюционно-генетические исследования, направленные на интенсификацию племенного процесса в отечественном животноводстве и повышение его эффективности до уровня развитых европейских стран.

## Литература

1. Зиновьева Н.А., Гладырь Е.А. Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных.- Материалы международной научной конференции. –Дубровицы-2002. -С.44-55.
2. Лобан Н.А. Использование методов ДНК-технологий в селекции свиней - Мат. Межд. науч. конф. «Соврем. дост. и проблемы биотех. с.-х. животных». –Дубровицы.-2002.- С.148-150.
3. Арсиенко Р.Ю., Гладырь Е.А. - Мат. Межд. науч. конф. «Соврем. дост. и проблемы биотех. с.-х. животных».- Дубровицы. -2002.- С.94-96.
4. Urban T., Mikolášová R. et al. A study of associations of the H-FABP genotypes with fat and meat production of pigs. // J. Appl. Genet. 43(4)- 2002.-P. 505-509
5. Gerbts F., Veerkamp J.H., E.van Stenderbergen Fatty acid-Binding proteins: their role in intramuscular fat deposition in pigs 18 // Animal genetics.- 2004.- vol.11. -P.1124-1126.
6. Yang G.S. Pang W.J, Sun S.D, Li Y, Chen G.D. Relationship Between Molecular Marker of Western Main Pig H-FABP Gene and IMF Content //Yi Chuan.- 2005, May; 27(3)-P. 351-356.
7. Шейко И.П., Лобан Н.А, Василюк О.Я. Разработка методов молекулярной генной диагностики и их использование в свиноводстве Беларуси. - Весці НАНБ, Серыя аграрных навук, -2005. - №1. -С.62-65.
8. Михайлова М.Е. ДНК-технологии в животноводстве. - Наука и инновации.-2007.- №1(47).-С.32-36.

## Резюме.

Использование ДНК-типирования позволяет ускорить племенную оценку по мясной продуктивности свиней. Аллельные варианты гена H-FABP оказывают значительное влияние на ряд хозяйственно-ценных признаков. Показана ассоциация аллельных вариантов ddHH и DdHH гена H-FABP с такими показателями как толщина «мышечного глазка», шпика и приростом живой массы.

Використання ДНК типування дозволяє прискорити племінну оцінку по м'ясній продуктивності свиней. Алельні варіанти гена H-FABP виявляють значний вплив на ряд господарсько-цінних ознак. Представлена асоціація алельних варіантів ddHH і DdHH гена H-FABP з такими показниками як товщина «мязового волокна», шпигу і приростом живої маси.

Application of DNA-typing intensifies breed assessment for meat productivity of pigs. Allelic variants of the H-FABP gene exhibiting have a great influence on a number of economically variable traits. Association of the allelic variants ddHH and DdHH of the H-FABP gene with such parameters as eye muscle area, thickness of fat and liveweight gain is shown.

## КАРПОВ П.А., ЕМЕЦ А.И., БЛЮМ Я.Б.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии,  
ул. акад. Заболотного, 148, Киев-143, 03680, Украина, e-mail: karpov.p.a@gmail.com

## АНАЛИЗ КИНОМА *ARABIDOPSIS THALIANA* НА ОСНОВАНИИ ГОМОЛОГИИ КАТАЛИТИЧЕСКОМУ ДОМЕНУ ТИРОЗИНКИНАЗЫ *ZAR70 MUS MUSCULUS*

Обратимое фосфорилирование, катализируемое протеинкиназами и протеинфосфатазами, регулирует многие внутриклеточные процессы. В эукариотической клетке около 30% белков подвергаются фосфорилированию. Процессы фосфорилирования белков животных и человека осуществляются серин/треонин- и тирозинкиназами, имеющими общее эволюционное происхождение (Robinson et al., 2000). В отличие от животных, у растений обнаружено большое количество серин/треонин-киназ и фосфатаз, а также дуальных киназ, однако наличие специфических тирозинкиназ

(ПТК) пока остается под вопросом (Rudrabhatala and Rajasekharan, 2004). В принципе, их существование нельзя полностью отрицать, так как их антагонисты – тирозин-специфичные фосфатазы - уже найдены (Almo et al., 2007). Тирозинфосфатазы описаны у арабидопсиса (20 генов) и других растений, что подтверждает важность процесса обратимого фосфорилирования по тирозину у растений (Fordham-Skelton et al., 1999). Так, например, было показано, что уровень актина, фосфорилированного по тирозину, коррелирует с движением листьев у *Mimosa pudica* L. (Kameyama et al., 2000), а ингибиторы тирозинфосфатаз (MacRobbie, 2002) блокируют фосфорилирование актина (Kameyama et al., 2000). Скрининг протеома *Arabidopsis thaliana* показал, что, по крайней мере, 4% киназ арабидопсиса является тирозин-специфичными (Cargi et al., 2002).

Отличительной чертой всех протеинкиназ является наличие консервативного каталитического киназного домена (250-300 аминокислотных остатков). В свою очередь он также содержит субдоменные мотивы, уникальные на уровне киназных подсемейств (Chunhua et al., 2005). Гомология по этим консервативным мотивам уже позволила идентифицировать гены многих ПТК и создать базы данных киномов кишечнорастворимых, нематод, кольчатых червей, членистоногих, иглокожих, ряда позвоночных и человека (Anamika et al., 2007; <http://kinase.com/>). В настоящее время благодаря реализации ряда проектов сиквенирован и частично расшифрован геном *A. thaliana*. Закончена первичная расшифровка и ведется детальная аннотация генома *Oryza sativa*. Доступность данной информации (проекты Tair и TIGR) также способствует дальнейшему продвижению работы по расшифровке киномов растений. Поэтому в настоящей работе представлены результаты первичного сканирования генома *A. thaliana* из базы данных NCBI с использованием последовательности каталитического домена тирозинкиназы Zap70 из *Mus musculus*.

#### Материалы и методы

Для анализа генома *A. thaliana* использовали полные хромосомные последовательности, представленные в NCBI: 1) NC\_003070.5, 2) NC\_003071.3, 3) NC\_003074.4, 4) NC\_003075.3 и 5) NC\_003076.4. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Эталонные последовательности нерецепторных ПТК были взяты из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) и Swiss-Prot (<http://www.expasy.org/>). Множественные выравнивания аминокислотных последовательностей выполняли с помощью программы Clustal X (2.0.5) (<http://www.clustal.org>) с применением матриц BLOSSUM (Larkin et al., 2007). Универсальные мотивы связывающих фосфатных участков ПТК составляли в IUPAC коде с применением универсальных подстановочных символов.

Сканирование полного текста хромосом с помощью универсальных мотивов осуществляли с помощью программы DNAMAN (V.5) (<http://lynnon.com/>). Предсказание доменной архитектуры и состава выполняли с помощью сетевого инструмента SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) и на основании данных, представленных в Swiss-Prot (<http://www.expasy.org/>). Сканирование генома *A. thaliana* с использованием эталонной аминокислотной последовательности выполнялось в NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) с применением алгоритма tBLASTn. Идентификация найденных CDS (Coding DNA Sequence) выполнялось путем сравнения их продуктов в SIB BLAST (<http://www.expasy.org/tools/blast/>) с известными белками с последующим сопоставлением координат и направлений CDS с данными, представленными в Swiss-Prot, KEGG (<http://www.genome.jp/>) и Tair (<http://www.arabidopsis.org/>). Принадлежность найденных продуктов устанавливали путем сканирования в SMART и подтверждали на основании данных гомологии сиквенса, по соответствию моделям Маркова (HMM) и особенностям доменного состава и архитектуры.

#### Результаты и обсуждение

В начале исследования для выбора оптимальной эталонной последовательности было выполнено сканирование полного текста хромосом *A. thaliana* в программе DNAMAN с применением универсальных мотивов фосфат-связывающих участков (ФСУ), составленных для ряда семейств нерецепторных ПТК человека и животных (Табл. 1). В результате были обнаружены консенсусные участки, соответствующие ФСУ киназ семейств Syk/Zap70 и Jak (Табл. 1). В двух случаях (хромосома II: 4823448(+) и хромосома III: 5992532(-)) консенсусы оказались общими для обоих семейств. В результате были выделены три сайта для дальнейшего анализа на соответствие генам протеинкиназ: хромосома II: 4823448(+)(Syk / Zap70 и Jak), хромосома II: 16946596(-) (Syk / Zap70) и хромосома III: 5992532(-)(Syk / Zap70 и Jak). Оказалось, что из трех обнаруженных сайтов (хромосома II: 16946596(-) и хромосома III: 5992532(-)) два расположены в кодирующих областях генов уже известных киназ: O22879 (At2g40560) и Q8RWC9 (AT3G175010.1). Поскольку в обоих случаях наблюдалось соответствие универсальным мотивам кодирующих последовательностей ФСУ семейства Syk/Zap70, последовательности каталитических доменов именно этих киназ были выбраны для дальнейшего сканирования генома *A. thaliana*.

Таблица 1

#### Результаты сканирования генома *A. thaliana* на наличие кодирующих областей, соответствующих фосфат-связывающим участкам киназных доменов ПТК животных

Семейство ПТК	Универсальный мотив в IUPAC коде	Локализация консенсуса в геноме				
		I	II	III	IV	V
Ab1	YTNNGNGGGNGNCARTAYGGNGANGTN	-	-	-	-	-
Ack	YTNNGNGAYGGNCTCNTTYGGNGTNGTN	-	-	-	-	-
Csk	YTNNGNCARGGNTRYTTYGGNGARGTN	-	-	-	-	-



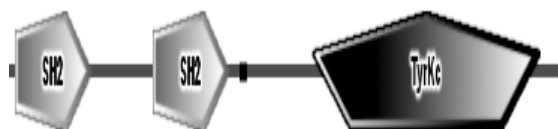
Fak	HTNGGNHNGGNYHNTTYGGNGANGTN	-	-	-	-
Fes	HTNGGNHRNGGNAAYTTYGGNGANGTN	-	-	-	-
Jak	YTNGGNRARGGNHAYTTYGGNHHNGTN	-	4823448(+)	5992532(-)	-
Src	ATHGGNAARGGNGARTTYGGNGAYGTN	-	-	-	-
Tek	HTNGGNHCNGGNYTNTTYGGNYTNGTN	-	-	-	-
Syk/Zap70	YTNGGNHNGGNAAYTTYGGNHHNGTN	-	4823448(+)	5992532(-)	-
			16946596(-)		

Поскольку сходство аминокислотных последовательностей киназных доменов на уровне отдельных подсемейств ПТК разных видов является чрезвычайно высоким (Anamika et al., 2007), это нивелирует приоритет при выборе эталонной последовательности на уровне отдельных подсемейств. *A. thaliana* является общепризнанным модельным объектом в биологии растений, поэтому в качестве эталонной последовательности нами была выбрана аминокислотная последовательность киназного домена Zap70 (P430404), принадлежащую другому модельному объекту - *Mus musculus* (Рис.1). При этом границы каталитического домена были определены на основании анализа последовательности в SMART и данных, представленных в Swiss-Prot.

Сканирование генома *A. thaliana* путем использования инструмента tBLASTn (NCBI) с помощью полных нуклеотидных последовательностей хромосом (по шести рамкам считывания - ORF) выявило 503 консенсуса.

>P430404|ZAP70\_MOUSE Tyrosine-protein kinase ZAP-70 - *Mus musculus* (Mouse).

```
MPDPA AHL PFFYGSISR AEAE EHLKLAGMADGLFLLRQC LRS LGGYVLSLV
HDVRFHNFPIERQLNGTYA IAGGKAHC GPAELCQFYSQD PDGLPCNL RKP C
NRPPGLEPQPGVFDCLRDAMVCDYVRQTWKL EGDAL EQA IISQAPQVEKLI
ATTATHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGQQT D GKFLLRPRKEQGT YALSLVY
GKTVYHYLISQDKAGKYCIPEGTKFDTLWQLVEYLK LKADGLIYRLKEVCP
NSSASA AVAAPTLPANPSTFTQPQRRVDTLNSDGYTPEPARLASSTDKPRP
MPMDTSVYESPYSDPEELKDKKLF LKRENILVADIELGCGNFGSVRQGVYR
MRKKQIDVAIKVLKQGT EKA DKDEMREAQIMHQLDNPIYVRLIGVCQAEA
LMLVMEMAGGGPLHKFLLGKKEEIPVSNVAEL LHQVAMGMKYLEEKNFVHR
DLAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADDSYTTARSAGKWP LK WY APECI
NFRKFSRSSD VWSYGV TMWEAFSYGQKPKYKMKGPQVLDL FKQGRMECP
ECPPEYALMSDCWIYKWBDRPDFLTV EQRMNRYYS PASRAEGPPQCEQV
AEAACG
```



**Рис.1.** Аминокислотная последовательность и доменная архитектура протеинтирозинкиназы Zap70 (P430404) *M. musculus* (согласно данным SMART) (выделение – область соответствующая киназному домену (ТурКс)).

При этом была получена вся необходимая для дальнейшей идентификации гена и его продукта информация: направление открытой рамки считывания (ORF), координаты консенсуса в хромосоме, последовательность CDS, последовательность кодируемого продукта, процент идентичности, процент сходства, статистическая значимость (E-value), число и процент гэпов (Рис.2).

```
>ref|NC_003075.3| Arabidopsis thaliana Chromosome 4, complete sequence
Length=18585042
Score = 94.0 bits (232), Expect = 4e-19
Identities = 73/223 (32%), Positives = 116/223 (52%), Gaps = 15/223 (6%) Frame = +1
Query 7 LCGNFGSVRQGVYMRKKQIDVAIKVLKQGT EKA DKDEMREAQIMHQLDNPIYVRLIGVCQAEA-LMLVMEMAGGGPLHKF L---LGKKEEIPVSNVAEL LHQVAMGMKYLEE---K 118
+G G +G V +GV + VAIK L +A+K E E + + + + +VRL+G C A MLV E G L + + + LG K + + + A G + YL E
Sbjct 1152184 IGQGGYGVYRQVLEDKSM---VAIKNLLNRRGQAEK-EPKVEVEAIGVRHKNLVRLGLGYCVGAHRMLVVEYVDNNGNLEQWIHGGGLGFKSPLTWEIRMNIVLGTAKGLMYLHEGLEP 1152531
Query 119 NFVHRDLAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADDSYTTARSAGKWP LK WY APECI NFRKFSRSSD VWSYGV TMWEAFSYGQKPKYKMKGPQVLDL FKQGRM 221
VHRD+ +N+LL + +K+SDFGL+K LG+ SY T R G + + APE + + RSDV+SG+GV + E S G+ P + P + + + KR+
Sbjct 1152532 KVVHRDIKSNILLDKQWNSKVSDFGLAKLLGSEMSYVTRVMGTF--GVYAPEYASTGMLNERSDVISYFGVLVMEIIS-GRSPVDYSRAPGEVNLVWELKRL 1152831
```

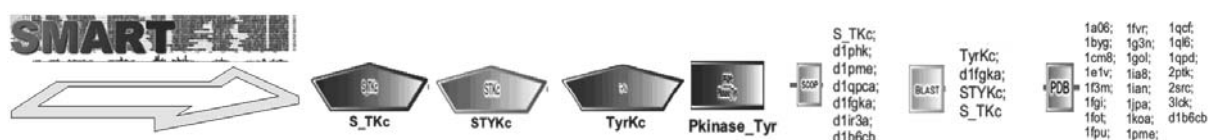
**Рис. 2.** Пример фрагмента отчета tBLASTn для одного консенсуса (выделение показывает информацию, важную для последующей идентификации продукта).

Для установления достоверности консенсусов, потенциальные продукты CDS были проверены путем сканирования в SMART. Поскольку в данный пакет интегрированы инструменты Pfam и PROSITE, результаты анализа отображали как сходство сиквенса, так и соответствие моделям Маркова (HMM). Результаты проверки 503-х потенциальных продуктов показали их принадлежность 494-м протеинкиназам и позволили определить локализацию их генов. При этом согласно результатам анализа, только два из 503-х обнаруженных консенсусов не соответствовали генам протеинкиназ. В ряде случаев несколько консенсусов соответствовали CDS разных экзонов одного гена, что и объясняет конечное число предсказанных нами генов протеинкиназ *A. thaliana*.

Обнаруженные гены были распределены между хромосомами следующим образом: 150 - в I-й, 71 - во II-й, 94 - в III-й, 65 - в IV-й и 114 - в V-й хромосомах. Анализ в SMART показал соответствие потенциальных продуктов целому ряду моделей каталитических доменов протеинкиназ: S\_TKc, STYKc, TykC, Pkinase, Pkinase\_Tyr, S\_TKc, D1phk, D1pme, D1qpcsa, D1fgka, D1ir3a, D1b6cb, 1a06, 1byg, 1cm8, 1el1v, 1f3m, 1fgi, 1fot, 1fpv, 1fv, 1g3n, 1gol, 1ia8, 1ian, 1jpa, 1koa, 1pme, 1qcf, 1ql6, 1qpd, 2ptk, 2src, 3lck, d1b6cb киназ. (Рис.3).

Интересным является тот факт, что среди потенциальных продуктов были как те, которые согласно HMM соответствовали моделям каталитического домена нетипичных тирозин-специфичных киназ

(Pkinase\_Tyr), так и те, которые соответствовали моделям каталитического домена (TyrKc) типичных ПТК животных и человека.



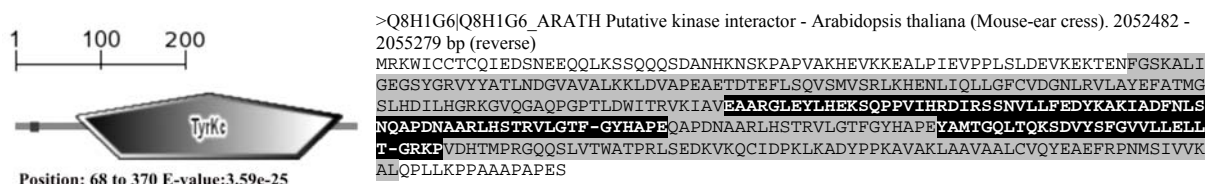
**Рис.3.** Соответствие продуктов обнаруженных CDS каталитическим доменам различных протеинкиназ (на основании соответствия HMM и гомологии сиквенса).

В настоящее время нами закончен анализ киномов первой и второй хромосом *A. thaliana* и восстановлены полные последовательности соответствующих генов и ряда их продуктов на основании данных Taig, KEGG, Swiss-Prot и др. Уже на данном этапе исследования мы можем утверждать, что многие из представленных в базах данных генов протеинкиназ *A. thaliana* установлены частично или интерпретированы недостаточно точно. Многие представлены как белки с неизвестной функцией или как возможные протеинкиназы с неизвестной функцией и специфичностью к субстрату. В связи с этим возникает много новых вопросов, требующих разрешения. В частности, в качестве примера можно привести результаты анализа консенсуса, обнаруженного в I-й хромосоме (Рис.4).

Score = 42.7 bits (99), Expect = 0.001 Identities = 38/128 (29%), Positives = 61/128 (47%), Gaps = 35/128 (27%) Frame = -2 2053576-2053202

```
Query          QVAMGMKYLEEKN---FVHRDLAARNVLLVNRHYAKISDFGLS-KALGADDSYYTARSAGKWLKWAYE-----CINF-----RKFS 180
                + A G+YL EK+   +HRD+ + NVLL + AKI+DF LS +A   ++ R G+   ++APE   C F
Sbjct 2053576  EAARGLEVYLHEKSQPPV IHRDIRSSNVLLFEDYKAKIADFNLNQAAPDNaARLHSTRVLGTF--GYHAP*CFPLSPYCFV*MSNKQLK*CALLCRVAMTGL 2053222
```

```
Query 181      SRSDVWSYGVMTMWEAFSYGQKP 202
                +SDV+S+GV + E + G+KP
Sbjct 2053222  QKSDVYSFGVVLLELLT-GRKP 2053202
```



**Рис. 4.** Нерцепторная киназа, содержащая согласно HMM TyrKc домен.

Согласно данным ExPasy/Swiss-Prot и Taig обнаруженный консенсус соответствует потенциальной протеинкиназе с неизвестной или возможной тирозин-специфичностью. Выполненный же нами анализ показал, что каталитический домен данного белка как по сходству сиквенса, так и по соответствию моделям Маркова с большой вероятностью является гомологичным каталитическому домену тирозинкиназ животных и человека (TyrKc) (Рис.4).

### Выводы

В результате сравнительного биоинформационного скрининга генома *Arabidopsis thaliana* с помощью аминокислотной последовательности каталитического домена протеинтирозинкиназы Zap70 *M. musculus* предсказано существование не менее 494-х генов протеинкиназ. На основании гомологии первичных последовательностей и соответствия каталитических доменов моделям Маркова определены сайты локализации этих генов в геноме *A. thaliana* и дана оценка принадлежности их продуктов. Показана возможность существования у *A. thaliana* тирозин-специфичных протеинкиназ, гомологичных по строению каталитического домена протеинтирозинкиназам животных и человека.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Robinson D.R., Wu Y.M., Lin S.F. The protein tyrosine kinase family of the human genome // Oncogene. - 2000. -vol. 19, № 49. -P.5548-5557.
2. Almo S.C., Bonanno J.B., Sauder J.M., et al. Structural genomics of protein phosphatases // J. Struct. Funct. Genomics. - 2007. - vol.8, № 2-3. -P.121-140.
3. Kameyama K., Kishi Y., Yoshimura M., et al. Tyrosine phosphorylation in plant bending // Nature. - 2000. - vol. 407, № 6800. - P.37.
4. MacRobbie E.A. Evidence for a role for protein tyrosine phosphatase in the control of ion release from the guard cell vacuole in stomatal closure // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2002. - vol. 99, № 18. - P.11963-11968.
5. Rudrabhatla P., Rajasekharan R. Functional characterization of peanut serine/threonine/tyrosine protein kinase: molecular docking and inhibition kinetics with tirosine kinase inhibitors // Biochemistry. - 2004. -

6. vol.43. - P.12123-12132.
7. Yan C., Li Z., Neelam B., et. al. Isolated human kinase proteins, nucleic acid molecules encoding human kinase. - 2005. US Patent.
8. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., et. al. Clustal W and Clustal X version 2.0 // Bioinformatics. - 2007. - vol. 23, - P.2947-2948.
9. Fordham-Skelton A.P., Skipsey M., Eveans I.M., et. al. Higher plant tyrosine-specific protein phosphatases (PTPs) contain novel amino-terminal domains: expression during embryogenesis // Plant. Mol. Biol. - 1999. - vol.39, № 3. -P.593-605.
10. Carpi A., Di Maira G., Vedovato M., et. al. Comparative proteome bioinformatics: identification of a whole complement of putative protein tyrosine kinases in the model flowering plant *Arabidopsis thaliana* // Proteomics. - 2002. - vol. 2, № 11. - P.1494-503.
11. Anamika K., Bhattacharya A., Srinivasan N. Analysis of the protein kinome of *Entamoeba histolytica* // Proteins. - 2007. - vol. 71, № 2. - P.995-1006.

### Резюме

На основании гомологии с каталитического домена тирозинкиназы Zap70 *Mus musculus* предсказано существование 494-х генов протеинкиназ у *Arabidopsis thaliana*. Показана возможность существования у арабидопсиса тирозин-специфичных киназ, гомологичных по строению каталитического домена протеинтирозинкиназам животных и человека.

На підставі гомології із каталітичного домену тирозинкінази Zap70 *Mus musculus* передбачено існування 494-х генів протеїнкіназ *Arabidopsis thaliana*. Показана можливість існування у арабідопсису тирозин-специфічних киназ, гомологічних по будові каталітичного домену протеїнтирозинкіназам тварин і людини.

On the basis of homology to *Mus musculus* Zap70 tyrosine kinase catalytic domain, the existence of 494 protein kinases genes in *Arabidopsis thaliana* is predicted. Shown the possibility of existence of tyrosine-specific protein kinases in *A. thaliana*, which structure of catalytic domain are homologous to animal and human protein tyrosine kinases.

**Н.А. КОЗУБ<sup>1,2</sup>, И.А. СОЗИНОВ<sup>1</sup>, А.А. СОЗИНОВ<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Институт защиты растений УААН,

Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 33, e-mail: sia1@i.com.ua

<sup>2</sup> Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,

Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 148

## ОСОБЕННОСТИ ПЕРЕДАЧИ РЖАНЫХ ТРАНСЛОКАЦИЙ 1AL/1RS И 1BL/1RS ЧЕРЕЗ ГАМЕТЫ У ГИБРИДОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Среди чужеродных транслокаций у коммерческих сортов мягкой пшеницы наиболее распространенной является ржаная 1BL/1RS транслокация (транслокация короткого плеча хромосомы 1R ржи на длинное плечо хромосомы 1B пшеницы), на втором месте — ржаная 1AL/1RS транслокация [1]. Источником 1BL/1RS транслокации у подавляющего большинства современных сортов мягкой пшеницы является линия Riebesel 47-51, созданная Г. Рибезелем (Riebesel), с транслокацией от ржи Petkus (2x) [1]. 1AL/1RS транслокация у большинства сортов происходит от сорта Amigo, созданного в США в 1976 году [1]. Фрагмент ржаной хромосомы 1R у Amigo получен от аргентинского сорта ржи (*Secale cereale* L.) Insave [2] через сорт октоплоидного тритикале Gaucho (сорт мягкой пшеницы Chinese Spring, Китай / рожь Insave). Эти две транслокации значительно отличаются по проявлению в геноме пшеницы. 1BL/1RS транслокация от ржи Petkus, несет гены устойчивости к мучнистой росе *Pm8*, к стеблевой ржавчине *Sr31*, к бурой ржавчине *Lr26* и к желтой ржавчине *Yr9* [3]. 1AL/1RS транслокация от ржи Insave (сорт Amigo) несет ген устойчивости к биотипам тли *Schizaphis graminum* B и C *Gb2* [3], клещу *Aceria tosicheilla* (Keifer) *Cm3* [3, 4], ген устойчивости к мучнистой росе *Pm17* [3]. Эти транслокации отличаются также по влиянию на продуктивность и хлебопекарное качество. Так, наличие 1BL/1RS

транслокации значительно снижает показатели хлебопекарного качества [5], тогда как присутствие 1AL/1RS не приводит к такому резкому снижению этих показателей у твердозерных форм пшеницы [6, 7]. Имеются данные, что присутствие 1BL/1RS транслокации повышает урожайность и экологическую стабильность форм пшеницы (обзор [8]), однако это влияние существенно зависит от генетического фона пшеницы [9]. Информации о влиянии присутствия 1AL/1RS транслокации на урожайность значительно меньше. По данным Espitia-Rangel и др. [10], полученным при сравнении биотипов сорта Nekota, присутствие 1AL/1RS транслокации не имеет положительного эффекта на урожайность и стабильность.

Еще одной особенностью 1BL/1RS транслокации является сниженная частота передачи через мужские гаметы (около 40%) [11–14]. В то же время, передача 1AL/1RS транслокации через гаметы не исследована. Поэтому целью нашей работы было изучение частоты передачи 1BL/1RS и 1AL/1RS транслокаций через мужские и женские гаметы с использованием запасных белков как генетических маркеров.

### **Материалы и методы**

Материалом исследования служили зерна  $F_2$  следующих комбинаций скрещивания сортов и линий озимой мягкой пшеницы: реципрокное скрещивание Б-16 × Одесская красноколосая (ОКК); реципрокное скрещивание почти изогенных линий по глиадиновым локусам GLI-D1-4 × GLI-B1-3, скрещивания Золотоколоса × GLI-A1-1, GLI-A1-1 × Смуглянка. Почти изогенные линии созданы М.М. Копусем на основе сорта Безостая 1 [15]. Б-16 и GLI-B1-3 несут 1BL/1RS транслокацию. Сорта Золотоколоса и Смуглянка имеют транслокацию 1AL/1RS.

Электрофорез глиадинов отдельных зерен  $F_2$  проводили в кислой среде в полиакриламидном геле [14]. Аллели глиадинов обозначали согласно каталогам Metakovsky (обозначение буквами) [16] и Собко и Поперели (обозначение цифрами) [17]. По локусу *Gli-B1* линии Б-16 и GLI-B1-3 имеют аллель *l* (3), ОКК – аллель *c* (15), GLI-D1-4 – аллель *b* (1). По локусу *Gli-A1* линия GLI-A1-1 имеет аллель *m* (1), сорта Смуглянка и Золотоколоса – аллель *17* (обозначенный нами *w*). Генотипы зерен  $F_2$  записывали с учетом дозы гена, где первые две буквы обозначают генотип яйцеклетки, а третья – генотип пыльцевого зерна, которые образовали зерновку. Для анализа расщеплений использовали критерий  $\chi^2$ .

### **Результаты и обсуждение**

Наиболее простым и удобным методом идентификации транслокаций ржаного плеча 1RS в геноме пшеницы является электрофорез спирторастворимых запасных белков зерновки в кислой среде [18]. Маркером 1BL/1RS транслокации является присутствие на электрофореграмме спирторастворимых белков зерна характерного блока компонентов, который был обозначен *Gli-B1l* (*Gli-B1-3*) [16, 17]. Маркером 1AL/1RS транслокации также является характерный спектр секалинов (*Gli-A1-17* по номенклатуре Собко и Поперели [16]). Этот блок нами обозначен как *Gli-A1w*.

Триплоидная природа эндосперма позволяет различать на электрофореграммах глиадиновых спектров зерен  $F_2$  пшеницы четыре класса генотипов: два класса гомозигот и два класса гетерозигот, различающихся по дозе гена [19]. Данные по расщеплению по локусам *Gli-B1* и *Gli-A1* в соответствующих комбинациях скрещивания показаны в табл. 1 и 2. Расщепление по локусу *Gli-B1* у растений  $F_1$  от скрещиваний с участием формы с 1BL/1RS транслокацией (Б-16, GLI-B1-3) значительно отличается от ожидаемого менделевского расщепления ( $P < 0,01$ ). Расщепление по локусу *Gli-A1* у гибридов с участием формы с 1AL/1RS транслокацией (Смуглянка, Золотоколоса) не имеет отклонений и соответствует ожидаемому расщеплению в  $F_2$ . Следует отметить, что линия GLI-A1-1 была специально отобрана для исследований передачи 1AL/1RS транслокации через гаметы, поскольку она несет аллель *Gli-A1m* (*Gli-A1-1*), который имеет больше четырех компонентов в разных зонах

электрофоретического спектра [16, 17] и является удобным для определения дозы гена, в отличие от других распространенных аллелей локуса *Gli-A1* – *b*, *g*, *c* и др.

Таблица 1

Расщепление по локусу *Gli-B1* с учетом дозы гена у зерен F<sub>2</sub> от скрещиваний с участием форм озимой мягкой пшеницы с ржаной 1BL/1RS транслокацией (маркер – аллель *Gli-B1l* (*Gli-B1-3*))

Комбинация скрещивания	Численность зерен с генотипом по <i>Gli-B1</i>				$\chi^2$ (1:1:1:1)
	<i>b.b.b</i>	<i>b.b.l</i>	<i>l.l.b</i>	<i>l.l.l</i>	
GLI-B1-3 × GLI-D1-4	564	365	499	340	77,98**
	<i>c.c.c</i>	<i>c.c.l</i>	<i>l.l.c</i>	<i>l.l.l</i>	
Б-16 × ОКК	1449	989	1351	853	230,9**
ОКК × Б-16	1724	1092	1525	992	287,4**

\*\* P < 0,01

Таблица 2

Расщепление по локусу *Gli-A1* с учетом дозы гена у зерен F<sub>2</sub> от скрещиваний с участием сортов озимой мягкой пшеницы с ржаной 1AL/1RS транслокацией (маркер – аллель *Gli-A1w* (*Gli-A1-17*))

Комбинация скрещивания	Численность зерен с генотипом по <i>Gli-A1</i>				$\chi^2$ (1:1:1:1)
	<i>m.m.m</i>	<i>m.m.w</i>	<i>w.w.m</i>	<i>w.w.w</i>	
Золотоколоса × GLI-A1-1	141	136	132	129	0,60
GLI-A1-1 × Смуглянка	77	93	88	77	2,33

Возможность различать четыре класса генотипов у зерен F<sub>2</sub> позволила определить количество женских и мужских гамет с разными генотипами, которые образовали зерновки F<sub>2</sub>, без проведения специальных скрещиваний. Этот подход был применен нами ранее при анализе расщепления у гибридов озимой мягкой пшеницы с участием линии с 1BL/1RS транслокацией [12–14]. Численности гамет с 1AL/1RS транслокацией достоверно не отличаются от численности гамет без транслокации, что свидетельствует об отсутствии отклонений в передаче этой транслокации как через мужские, так и через женские гаметы (табл. 3). У гибридов, гетерозиготных по 1BL/1RS транслокации, наблюдается сниженная частота передачи 1BL/1RS транслокации через мужские гаметы (табл. 3) (40%), что совпадает с ранее полученными данными [13, 14]. В результате анализа большой выборки зерен F<sub>2</sub> выявлена достоверно сниженная частота передачи 1BL/1RS транслокации также через женские гаметы (табл. 3) (47,5%), хотя это отклонение значительно меньшей величины чем по пыльцевым зернам. Следует отметить, что предыдущие исследования показывают, что отклонение по передаче 1BL/1RS транслокации через женские гаметы наблюдается не во всех случаях [12–14] и выявление закономерностей сниженной передачи 1BL/1RS транслокации через яйцеклетки требует дальнейших исследований.

Таблица 3

Передача ржаной транслокации 1BL/1RS (аллель *Gli-B1l*) и 1AL/1RS (аллель *Gli-A1w*) через гаметы у гибридов F<sub>1</sub> озимой мягкой пшеницы

Комбинация скрещивания	Численность яйцеклеток с генотипом		$\chi^2$ (1:1)	Численность пыльцевых зерен с генотипом		$\chi^2$ (1:1)
	<i>Gli-B1b</i>	<i>Gli-B1l</i>		<i>Gli-B1b</i>	<i>Gli-B1l</i>	
GLI-B1-3 × GLI-D1-4	929	839	4,58*	1063	705	72,49**
	<i>Gli-B1c</i>	<i>Gli-B1l</i>		<i>Gli-B1c</i>	<i>Gli-B1l</i>	
Б-16 × ОКК	2438	2204	11,80**	2800	1842	197,71**

ОКК × Б-16	2816	2517	16,76**	3249	2084	254,50**
	<i>Gli-Alm</i>	<i>Gli-A1w</i>		<i>Gli-Alm</i>	<i>Gli-A1w</i>	
Золотоколоса×GLI-A1-1	277	261	0,48	273	265	0,12
GLI-A1-1 × Смуглянка	170	165	0,08	165	170	0,08

\* P < 0,05

\*\* P < 0,01

### Выводы

Выявлены существенные различия в передаче ржаных 1BL/1RS и 1AL/1RS транслокаций через гаметы. Не наблюдается отклонений в передаче 1AL/1RS транслокации через женские и мужские гаметы, в отличие от 1BL/1RS транслокации. Достоверно сниженная частота передачи 1BL/1RS транслокации обнаружена как для мужских так и женских гамет. Частота передачи 1BL/1RS транслокации через мужские гаметы значительно ниже чем через женские гаметы.

### Литература

1. *Rabinovich S.V.* Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L.// *Euphytica*.– 1998.– vol. 100.– P.323–340.
2. *Sebesta E.E., Wood E.A.* Transfer of greenbug resistance from rye to wheat with X-rays// *Agron. Abstr.* – 1978.– P. 61–62.
3. *McIntosh R.A., Hart G.E., Devos K.M., Gale M.D., Rogers W.J.* Catalogue of gene symbols for wheat// *Proc. 9th Intern. Wheat Genetics Symp.*- 1998, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, vol. 5.- P. 123–145.
4. *Malik R., Brown-Guedira G.L., Smith C.M., Harvey T.L., Gill B.S.* Genetic mapping of wheat curl mite resistance genes *Cmc3* and *Cmc4* in common wheat// *Crop Sci.*– 2003.– 32.– P. 644–650.
5. *Созинов А.А.* Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции.- М.: Наука.– 1985.– 272 с.
6. *Собко Т.А., Хохлов А.Н.* Изучение селекционной ценности пшенично-ржаной транслокации 1AL-1RS сорта озимой мягкой пшеницы Amigo// Тезисы докладов междунаро. конф. "Агробиотехнологии растений и животных". Киев, 1997.– С. 71–72.
7. *Graybosch R.A., Peterson C.J., Hansen L.E., Worrall D., Shelton D.R., Lukaszewski A.J.* Comparative flour quality and protein characteristics of 1BL/1RS and 1AL/1RS wheat-rye translocation lines// *J. Cereal Sci.*– 1993.– 17.– P. 95–106.
8. *Козуб Н.А., Созинов И.А., Созинов А.А.* Сопряженность 1BL/1RS транслокации с качественными и количественными признаками у мягкой пшеницы *T. aestivum*// *Цитология и генетика.*- 2001.- 35, № 5.- С. 74-80.
9. *Singh R.P., Huerta-Espino J., Rajaram S., Crossa J.* Agronomic effects from chromosome translocations 7DL.7Ag and 1BL.1RS in spring wheat// *Crop Sci.*– 1998.– 38.– P. 27-33.
10. *Espitia-Rangel E., Baenziger P.S., Graybosch R.A., Shelton D.R., Moreno-Sevilla B., Peterson C.J.* Agronomic performance and stability of 1A vs. 1AL/1RS genotypes derived from winter wheat 'Nekota'// *Crop Sci.*– 1999.– 39.– P. 643–648.
11. *Rayburn L.A., Mornhinweg D.W.* Inheritance of a 1BL/1RS wheat-rye translocated chromosome in wheat// *Crop Sci.*– 1988.–28.– P. 709–711.
12. *Козуб Н.А., Созинов И.А.* Сопряженность аллельных состояний глиадин- и глютеини кодирующих локусов с предзиготическими процессами у озимой пшеницы// *Цитология и генетика.*- 1993.- 27, N 5.- С. 35–39.
13. *Созинов И.А., Козуб Н.А., Хохлов А.Н.* Реципрокные различия предзиготических процессов по локусам запасных белков у растений F<sub>1</sub> пшеницы// *Цитология и генетика.*- 1994.- 28, N 2.- С. 30–35.

14. Козуб Н.А., Созинов И.А. Особенность расщепления по аллелям глиадинкодирующего локуса *Gli-B1* у гибридов озимой мягкой пшеницы // Цитология и генетика.– 2000.– vol. 34, № 2.– С. 69–76.
15. Копусь М.М. О естественной географии глиадиновых аллелей у озимой мягкой пшеницы// Селекция и семеноводство.- 1994.– N 5, С. 9–14.
16. 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.
17. Собко Т.О., Попереля Ф.О. Частота, з якою зустрічаються алелі глиадинкодуєчих локусів у сортів м'якої озимої пшениці //Вісник сільськогосподарської науки .– 1986.– № 5.– С. 84–87.
18. Созинов А.А., Попереля Ф.А. Электрофорез глиадина как метод идентификации пшениц, у которых 1В-хромосома полностью или частично замещена 1R-хромосомой ржи // Докл. ВАСХНИЛ.– 1977.– N 2.– С. 2–4.
19. Созинов А.А., Попереля Ф.А., Стаканова А.И. Гибридологический анализ как метод изучения генетических закономерностей биосинтеза глиадина// Науч.-техн. бюл. ВСГИ.- 1975.- вып. 24.- С. 10–14.

### Резюме

С помощью запасных белков как генетических маркеров исследована передача ржаных транслокаций 1BL/1RS и 1AL/1RS через гаметы у гибридов F<sub>1</sub> мягкой пшеницы. Не обнаружено отклонений в передаче 1AL/1RS транслокации через женские и мужские гаметы, в отличие от 1BL/1RS транслокации. Достоверно сниженная частота передачи 1BL/1RS транслокации обнаружена как для мужских, так и женских гамет. Частота передачи 1BL/1RS транслокации через мужские гаметы значительно ниже чем через женские гаметы.

За допомогою запасних білків як генетичних маркерів досліджено передачу житніх транслокацій 1BL/1RS і 1AL/1RS через гамети у гібридів F<sub>1</sub> м'якої пшениці. Не спостерігається відхилень у передачі 1AL/1RS транслокації через жіночі і чоловічі гамети, на відміну від 1BL/1RS транслокації. Достовірно знижена частота передачі 1BL/1RS транслокації виявлялась як для чоловічих, так і жіночих гамет. Частота передачі 1BL/1RS транслокації через чоловічі гамети значно нижча ніж через жіночі гамети.

Transmission of the rye 1BL/1RS and 1AL/1RS translocations through gametes was studied in common wheat F<sub>1</sub> hybrids using storage proteins as genetic markers. Transmission of the 1AL/1RS translocation through male and female gametes showed no deviations in contrast to the 1BL/1RS translocation. A significantly reduced frequency of transmission of the 1BL/1RS translocation was detected for both male and female gametes. The frequency of transmission of the 1BL/1RS translocation through male gametes was substantially lower than through female ones.

### ЛЕВИТЕС Е.В.

*Институт цитологии и генетики СО РАН*

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

## К ВОПРОСУ О МНОГОМЕРНОСТИ КОДИРОВАНИЯ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИНФОРМАЦИИ У РАСТЕНИЙ

Потомство, образующееся путем митотической агамоспермии, включающей в себя митотическую диплоспорию, апоспорию и адвентивную эмбрионию [1–3],

теоретически должно быть мономорфно, поскольку зародыш при таком способе репродукции возникает из клетки, не прошедшей мейоз. Однако существует много примеров изменчивости у растений, полученных таким путем. Анализ этой изменчивости позволил предположить, что фактором, определяющим способность клетки переходить к эмбриональному развитию путем митотической агамоспермии, является эндоредупликация хромосом в ядрах этих клеток, а полиморфизм в таком потомстве объясняется комбинаторным процессом, сопровождающим элиминацию избыточных копий хроматид, осуществляющуюся отдельными участками этих хроматид [4, 5].

Например, диплоидное гетерозиготное растение с генотипом *Adh1-F/Adh1-S* (сокращенно *FS*) по локусу, контролирующему алкогольдегидрогеназу, могло иметь в тканях семяпочки соматические клетки с эндоредуплицированными хромосомами, и эти клетки были способны перейти к эмбриогенезу путем митотической агамоспермии и имели генотип *FFFFSSSS* по локусу *Adh1*. Но клетка, вступающая в эмбриогенез, может содержать только две хроматиды. Это является причиной элиминации избыточных хроматид. Клетка, непосредственно вступающая в эмбриогенез, может быть обозначена как апозигота (APZ), а клетки, имеющие избыточное число хроматид и потенциально способные начать переход к состоянию апозиготы – как Pro-APZ.

Предполагается, что элиминация избыточных хроматид идет в сочетании с комбинаторным процессом, который заключается в выборе случайной пары из множества имеющихся копий хроматид. Например, равновероятное сочетание из восьми хроматид *FFFFSSSS* по две приводит к образованию трех возможных генотипических классов в соотношении  $3FF : 8FS : 3SS$ . Сохранение каждой отобранной пары хроматид в ряду последующих делений эмбриогенеза определяется тем, что эти две хроматиды прикрепляются к фактору, представляющему собой либо ядерную мембрану, либо ядерный матрикс. Вывод о прикреплении хромосом эукариот к ядерной мембране впервые был сделан А.Н. Мосоловым [6]. Обозначив хроматиды, прикрепленные к ядерной мембране или к ядерному матриксу, как  $\underline{F}$  или  $\underline{S}$ , процессы можно схематически представить следующим образом:

Pro-APZ генотипа *FFFFSSSS* → APZ генотипа  $\underline{FF}$ , а  $2F$  и  $4S$  теряются

Pro-APZ генотипа *FFFFSSSS* → APZ генотипа  $\underline{FS}$ , а  $3F$  и  $3S$  теряются

Pro-APZ генотипа *FFFFSSSS* → APZ генотипа  $\underline{SS}$ , а  $4F$  и  $2S$  теряются

Предложенная здесь гипотеза подтверждается данными, полученными при изучении зигот ячменя (*Hordeum disticum* cv. Nauchen) на начальных стадиях развития зародыша. Содержание ДНК в ядрах зигот *H. disticum* было  $16C$ , но оно постепенно снижалось в ядрах клеток проэмбрио до  $2C$  [7]. Тот факт, что может происходить потеря генетического материала в течение первых делений эмбриогенеза, хорошо продемонстрирован на *Cyclopoidea* и *Ciliatae* [8, 9]. В наших экспериментах доказательством такой потери может быть наличие нулевых фенотипов в агамоспермных потомствах [10]. Такая потеря активности *ADH1* возможна в том случае, если теряется генетический материал аллелей локуса *Adh1* из всех хроматид.

В некоторых семенных потомствах, полученных агамоспермным путем, выявлялось только два фенотипических класса. Объяснить это можно, предположив, что у всех клеток, вступивших в эмбриогенез и внесших свой вклад в происхождение зародышей и образование семян, только один из двух аллелей был эндоредуплицирован. Возможность неравной редупликации гомологичных хромосом была показана ранее на бобах [11]. Например, возможно, что диморфизм в одном агамоспермном потомстве обусловлен тем, что материнское диплоидное растение было гетерозиготно и имело в тканях семяпочки эндоредуплицированные клетки с генотипом *FFFFFFSS* по маркерному локусу *Adh1*, а другое агамоспермное потомство могло быть получено от диплоидного растения, имевшего, соответственно, эндоредуплицированные клетки с генотипом *FFSSSSSS* по локусу *Adh1*. Возникновение



таких генотипов можно рассматривать как следствие того, что при каждом акте удвоения редуцируется только одна пара хроматид. Причиной этого может быть пространственное ограничение, при котором из всего набора хроматид контактировать с ядерной мембраной или ядерным матриксом могут только две хроматиды.

Процесс возникновения клеток такого генотипа может быть схематично представлен следующим образом:



Эмпирически выявленный диморфизм с соотношением фенотипов 1 : 1 можно объяснить, например, тем, что комбинировать могут также не отдельные хроматиды, а предварительно спаренные по две. У растения, имеющего генотип *FFFFFFSS* по локусу *Adh1* спаренные участки *FF* и *SS* хроматид можно обозначить как *F* и *S*, а генотип переобозначить как *FFFS*. Комбинаторный процесс при таком соотношении и количестве участвующих в нем элементов дает две равных по численности группы. Учитывая возможную роль прикрепления спаренных участков хроматид к ядерной мембране, процесс может быть представлен схематически следующим образом:

Pro-APZ генотипа *FFFS* → APZ генотипа *FF*, а *F* и *S* постепенно теряются

Pro-APZ генотипа *FFFS* → APZ генотипа *FS*, а *2F* постепенно теряются

Таким образом, агамоспермное потомство гетерозиготного растения, имеющего эндоредуплицированные клетки генотипа *FFFS*, при равной вероятности возникновения двух комбинаций будет состоять из двух равных по численности генотипических классов *FF* и *FS*.

Подобным образом возникает соотношение генотипов *FS* и *SS* у агамоспермных зародышей и семян, полученных от растений, у которых эндоредупликация приводит к появлению в археспории клеток генотипа *FSSS*. Необходимо обратить внимание на то, что формирование генотипа апозигот, возникающих из клеток *FFFS* и *FSSS* обусловлено взаимодействием с ядерной мембраной или ядерным матриксом уже не двух, а четырех хроматид.

В то же время необходимо отметить, что возникновение в археспории клеток с генетическим статусом *FSSS* и *FFFS* – процесс равновероятный. Следовательно, потомства и соотношения от обоих типов клеток (*1FF* : *1FS* от клеток *FFFS* и *1FS* : *1SS* от клеток *FSSS*) будут суммироваться и приводить к общему, получаемому от всего растения соотношению генотипов *1FF* : *2FS* : *1SS*. Действительно, такие соотношения часто наблюдаются в агамоспермных потомствах. Симметричность этого соотношения в агамоспермном потомстве обусловлена равным соотношением в археспориальной ткани материнского растения клеток генотипа *FFFS* и *FSSS*. На принадлежность таких потомств к агамоспермным указывает неслучайное распределение фенотипов семян на ветках растений [12]. Те случаи, при которых наблюдается диморфизм во всем потомстве, могут представлять собой проявление импринтинга, когда происхождение аллеля определяет его предрасположенность или непредрасположенность к эндоредупликации.

Экспериментально было обнаружено, что в одном из потомств, образовавшемся путем митотической агамоспермии, наблюдается полная гетерозиготность по ферменту ADH1 и диморфизм по другому ферменту IDH3, контролируемому локусом *Idh3*, сцепленным с локусом *Adh1*. Это указывало на то, что у материнского растения, давшего это агамоспермное потомство, аллели локуса *Adh1* не были эндоредуплицированы, а в локусе *Idh3* был эндоредуплицирован лишь аллель *Idh3-F*. Возможность такого явления подтверждается различиями в степени эндоредупликации различных областей одной и той же хромосомы у *Phaseolus cocineus* [11].

Предложено рассматривать генетическое кодирование, основанное на эндоредупликации, как кодирование во втором измерении (2D), а кодирование, записанное последовательностью нуклеотидов, рассматривать как кодирование в

первом измерении (1D) [4, 5]. В этих статьях было предложено также рассматривать специфическое расположение хромосом в клеточном ядре как кодирование в 3D измерении, и также было сделано предположение о существовании временного кодирования наследственной информации у растений.

Зависимость соотношений фенотипов в агамоспермных потомствах от воздействия колхицина или от вклада родителей материнского растения [10, 13] свидетельствует о том, что генетическое кодирование во втором измерении (2D) зависит от внутренних и внешних условий. Можно полагать, что кодирование в третьем (3D) и тем более кодирование во временном измерении также зависит от внутренних и внешних факторов, а также и от времени.

Модель многомерного кодирования наследственной информации может помочь преодолеть препятствия на пути понимания механизмов наследования приобретенных признаков. Известно, что обработка прорастающих семян пшеницы никотиновой кислотой [14] может вызывать сохраняющиеся в течение 57 поколений изменения морфологических признаков растений. Возникающие при этом признаки гигантизма сопровождались увеличением содержания ДНК в клетках [14]. Не исключено, что такое увеличение содержания ДНК было обусловлено эндоредупликацией хромосом в клетках измененных растений.

Учитывая влияние колхицина на соотношение фенотипов в агамоспермном потомстве и учитывая зависимость этих соотношений от происхождения аллелей маркерного гена, учитывая также увеличение содержания ДНК при возникновении под действием внешних факторов стойких наследуемых изменений, а также тот факт, что репликация в целом зависит от питания, света, температуры и воздействия гормонов [15], можно говорить о том, что дифференциальную эндоредупликацию хромосом можно рассматривать как способ записи наследственной информации о приобретенных признаках.

#### Литература

1. *Gustafsson A.* Apomixis in higher plants // *Lunds. Univ. Arsskz. N.S. Sect.2.* - 1946–1947. vol. 42, № 3. - P. 1–67; vol. 43, № 2. - P. 71–179; vol. 43, № 12. - P. 184–370.
2. *Хохлов С.С.* Апомиксис: классификация и распространение у покрытосеменных растений // *Усп. соврем. генетики.* - М.: Наука, 1967. - Т. 1. - С. 43–105.
3. *Levites E.V.* New classification of the reproduction modes in sugar beet // *Sugar Tech.* - 2002. - vol. 4, № 1/2. - P. 45–51.
4. *Levites E.V.* Sugarbeet plants produced by agamospermy as a model for studying genome structure and function in higher plants // *Sugar Tech.* - 2005. - vol. 7, № 2/3. - P. 67–70.
5. *Levites E.V.* Marker enzyme phenotype ratios in agamospermous sugarbeet progenies as a demonstration of multidimensional encoding of inherited information in plants // on-line 2007: <http://arxiv.org/abs/q-bio/0701027>
6. *Мосолов А.Н.* Новый подход к решению проблемы пространственного расположения хромосом в интерфазном ядре (полярная модель интерфазного ядра) // *Цитология.* - 1972. - т. 14, № 5. - С. 542–552.
7. *Mericle L.W., Mericle R.P.* Nuclear DNA complement in young proembryos of barley // *Mutat. Res.* - 1970. - vol. 10, № 10. - P. 508–518.
8. *Ammermann D.* Morphology and development of the macronuclei of the ciliates *Stylonychia mytilus* and *Euplotes aediculatus* // *Chromosoma.* - 1971. - vol. 33. - P. 209–238.
9. *Гришанин А.К., Акифьев А.П.* Межпопуляционная дифференциация внутри *C.kolensis* and *C. strenuus strenuus* (Crustacea: Copepoda): доказательство на основе цитогенетических методов // *Гидробиология.* - 1999. - т. 417. - С. 37–42.

10. Levites E.V., Denisova F.Sh., Kirikovich S.S., Judanova S.S. (Maletskaya S.S.) Ratios of phenotypes at the *Adh1* locus in the apozygotic offspring in sugarbeet ( $C_1$  generation) // Sugar Tech. - 2000. - vol. 2, № 4. - P. 26-30.
11. Cionini P.G., Cavallini A., Corsi R., Fogli M. Comparison of homologous polytene chromosome in *Phaseolus cocineus* embryo suspensor cells: morphological, autoradiographic and -cytophotometric analyses // Chromosoma. - 1982. - vol. 86. - P. 383–396.
12. Levites E.V., Kirikovich S.S. Natural genetic sampling: a new approach to the study of agamospermy in pollen-sterile sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants // Sugar Tech. - 2005. - vol. 7, № 4. - P.145–149.
13. Levites E.V., Kirikovich S.S., Denisova F.Sh. Expression of enzyme genes in agamospermous progenies of reciprocal hybrids of sugar beet // Sugar Tech. - 2001. - vol. 3, № 4. - P. 160–165.
14. Богданова Е.Д. Эпигенетическая изменчивость, индуцированная никотиновой кислотой у *Triticum aestivum* L. // Генетика. - 2003. - т. 39, № 9. - С. 1221–1227.
15. Barow M. Endopolyploidy in seed plants // BioEssays. - 2006. - vol. 28, № 3. - P. 271–281.

### Резюме

На основании собственных и имеющихся в литературе данных обсуждаются соотношения фенотипических классов маркерных ферментов в агамоспермных потомствах сахарной свеклы и гипотеза о многомерности кодирования наследственной информации у растений.

On the base of previously published and literature data it has been discussed marker enzyme phenotype ratios in agamospermous sugar beet progenies and a concept of multidimensional encoding of inherited information in plants.

**ЛУЦИК А.П., КОЖУХОВА Н.Е., СИВОЛАП Ю.М.**

*Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН*

*Україна, 65036, Одеса, Овідіопольська дорога, 3, e-mail: lytsukandrey@ua.fm*

### **ГЕНИ, ЩО КОДУЮТЬ БІЛКИ ТЕПЛООВОГО ШОКУ КУКУРУДЗИ: СТРУКТУРА ТА ПОЛІМОРФІЗМ**

Одна із загальних властивостей клітин всіх типів живих організмів полягає в тому, що у відповідь на збільшення температури вони включають синтез специфічного набору білків, званих білками теплового шоку (БТШ, heat shock protein, hsp), які допомагають клітині вижити в умовах температурного стресу і повернутися після його припинення до нормального життя. Схожість амінокислотної послідовності (гомологія) деяких з них у різних організмів (від бактерій до людини) свідчить про їх високу консервативність в еволюції, яка характерна для життєво важливих білків. Все це зробило вивчення БТШ та генів, що їх кодують, однією з центральних біологічних проблем, відкрило перспективи до з'ясування молекулярних основ стійкості (резистентності) організмів до високотемпературного стресу [1].

БТШ у всіх організмів представлені великим набором поліпептидів, і їх прийнято іменувати відповідно до молекулярної маси, вираженої в кілодальтонах (кД). У рослин БТШ вперше виявлені в 1980 році. Як і у інших організмів, БТШ рослин множини та представлені групою високомолекулярних (110-60 кД) і низькомолекулярних (35-15 кД) білків [2].

Кукурудза (*Zea mays* L.) є економічно важливою сільськогосподарською культурою південного регіону України, для якого в літній період характерна висока температура (+30...+35 °C). Негативний вплив високої температури на кукурудзу максимальний в період цвітіння і є одним з головних факторів, що лімітує врожайність і продуктивність насіння кукурудзи. Тому створення жаростійких генотипів є актуальною задачею селекції кукурудзи. Добір за допомогою маркерів (Marker Assisted Selection, MAS) дозволяє на якісно новому рівні здійснювати селекційний процес та вирішувати конкретні генетико-селекційні проблеми.

Мета даної роботи складалась з дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму генів, що кодують БТШ, для розробки системи молекулярних маркерів стійкості кукурудзи до високотемпературного стресу.

#### **Матеріали та методи**

Матеріалом слугували 35 інбредних ліній кукурудзи, що різняться стійкістю до високотемпературного стресу (табл. 1). Насіння люб'язно надано к.б.н. Вареником Б.Ф. (Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення УААН, Одеса).

ДНК виділяли із 7-денних етильованих паростків за допомогою СТАВ-методики [3]. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) та електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації здійснювали згідно умов, оптимізованих у попередніх дослідженнях [4]. Послідовності праймерів добрано з електронної бази даних по геноміці і генетиці кукурудзи «MaizeGDB» [5].

Відеозображення електрофоретичних профілів ампліфікованої ДНК та розрахунок розмірів ампліфікованих фрагментів одержували за допомогою системи документації і аналізу електрофорезних гелів „Image Master VDS” („Amersham Pharmacia Biotech”, ОКВ).

Таблиця 1

Перелік інбредних ліній кукурудзи

№	Жаростійкі лінії	№	Нежаростійкі лінії
1	Т 135	19	Гк 26
2	Т 22	20	Одеська 140
3	Дк 322	21	Р 343
4	Одеська 221	22	ОК 115
5	Одеська 329	23	Дк 437
6	Одеська 17	24	ОК 117
7	Дк 277-10	25	Одеська 430
8	СА 33	26	Дк 421
9	Одеська 384	27	Дк 429
10	F 564	28	ЛБ 106
11	W 401	29	Дк 411-12
12	ДС 103	30	Ма 43
13	ОК 44	31	Рv 250
14	ОК 119	32	Р 37/47
15	ОК 5/28	33	Е 35
16	Р 502	34	ОК 124
17	НМv 404 С	35	ОК 265-1
18	Дк 517		

## Результати та їх обговорення

Обов'язковим попереднім етапом будь-якого молекулярно-генетичного дослідження є перевірка однорідності матеріалу, що досліджується. За ПЛР-аналізом трьох мікросателітних локусів (*phi065*, *umc1172*, *phi022*) оцінили генетичну чистоту 35 ліній. Для всіх ліній відмічено гомозиготний стан досліджуваних локусів та ідентичність усіх спектрів ампліфікації, що дозволило перейти до подальших досліджень.

За даними MaizeGDB в геномі кукурудзи прокартовано 13 генів, що кодують БТШ (*hsp*-гени), в т.ч. шаперони (*cpn*-гени). Ці гени локалізовано на дев'яти з 10 хромосом (крім хромосоми 2) (табл. 2).

Таблиця 2

Характеристика локусів, що кодують БТШ кукурудзи

Ген (локус)	Інша назва	Хромосомна локалізація	Продукт
<i>hsp26</i>	<i>umc195</i>	1.03	БТШ 70 кД
<i>cpn2</i>	<i>hsp60</i>	1.08	шаперон 60-2 мітохондриальний
<i>hsp18f</i>	<i>uaz210</i>	3.02	БТШ 18 кД цитоплазматичний
<i>hsp17.2</i>	<i>hsp18</i>	3.04	БТШ 18 кД
<i>uaz171</i>	-	4.07	БТШ 18 кД пластидний
<i>cpn10</i>	<i>umc1610</i>	4.11	шаперон 10
<i>cpn1</i>	<i>hsp60</i>	5.03	шаперон 60-1 мітохондриальний
<i>hsp101</i>	-	6.06	БТШ 101 кД
<i>hsp3</i>	<i>umc1545</i> , <i>umc1546</i>	7.00	БТШ 70 кД мітохондриальний
<i>hsp1</i>	<i>hsp70</i>	8.01	БТШ 70 кД
<i>hsp18c</i>	-	8.02	БТШ 18 кД цитоплазматичний
<i>hsp18a</i>	-	9.04	БТШ 18 кД цитоплазматичний
<i>hsp90</i>	<i>phi071</i> , <i>hsp82</i>	10.04	БТШ 90 кД

В складі декількох генів встановлено наявність мікросателітних повторів. Так, ген *hsp3* (хромосомна локалізація 7.00) містить два мікросателітних регіони *umc1545* та *umc1546*, локус *hsp90* (хромосомна локалізація 10.04) включає мікросателітний регіон *phi071*, у складі ген *cpn10* (хромосомна локалізація 4.11) є мікросателітна ділянка *umc1610*.

В нашій роботі за допомогою ПЛР-аналізу досліджували молекулярно-генетичний поліморфізм локусів *umc1545*, *umc1546*, *phi071*, *uaz171*. На рис. 1 наведено електрофореграму продуктів ампліфікації локусу *umc1545*.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 М 35

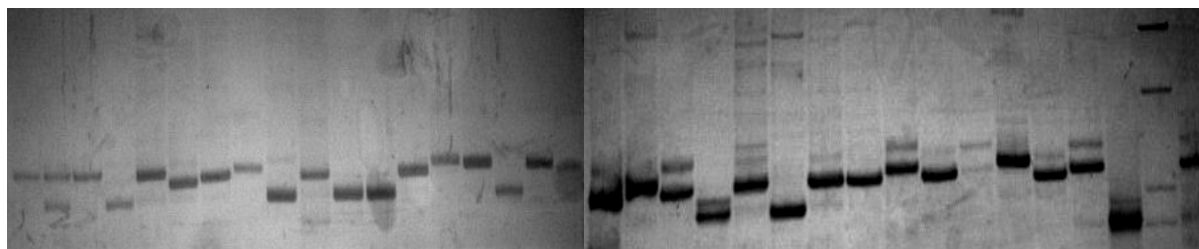


Рис. 1. Електрофореетичне розподілення продуктів ампліфікації локусу *umc1545*. Лінії кукурудзи: 1-18 – жаростійкі, 19-35 - нежаростійкі (нумерація ліній згідно табл. 1). М — маркер молекулярної ваги pGEM (“Promega”, США).

Здійснили розрахунок частот зустрічальності алелів досліджених локусів та провели порівняльний аналіз розподілу алелів між вибірками ліній, що різняться за жаростійкістю (табл. 3).

## Алельний склад локусів, що кодують БТШ

Локус	Довжина алелів, п.н.	Частота зустрічальності алелів в вибірці ліній	
		жаростійких	нежаростійких
umc1545	68	0,28	0,07
	72	0,06	0,13
	76	0,21	<b>0,47</b>
	80	<b>0,39</b>	0,26
	84	0,06	0,07
uaz171	84	<b>0,83</b>	0,36
	98	0,17	<b>0,64</b>
phi071	179	0,11	0,13
	194	<b>0,50</b>	<b>0,33</b>
	108	0,28	0,27
	222	0,11	0,27
umc1546	76	0,41	0,19
	124	0,06	0,06
	129	<b>0,53</b>	<b>0,75</b>

Для локуса umc1545 характерно п'ять алелів розмірами 68, 72, 76, 80 і 84 п.н. Для вибірки нежаростійких генотипів найбільш часто зустрічався алель довжиною 76 п.н. (0,47), а жаростійких - 80 п.н. (0,39).

Локус umc1546 містив три алелі розмірами 76, 124, 129 п.н. У жаростійких та нежаростійких генотипів найчастіше зустрічався алель довжиною 129 п.н. (0,53 і 0,75, відповідно).

За локусом phi071 отримано чотири алелі розмірами 179, 194, 208, 222 п.н. У жаростійких і нежаростійких генотипів частіше зустрічався 194 п.н.-алель (0,50 і 0,33, відповідно).

Локус uaz171 містив два алеля розмірами 84 і 98 п.н. У жаростійких генотипів частіше зустрічався 84 п.н.-алель (0,83), у нежаростійких – 98 п.н.-алель (0,64).

Таким чином, за допомогою ПЛР-аналізу досліджено поліморфізм локусів, що кодують БТШ, та встановлені набори алелів, найбільш характерні для вибірки жаростійких і нежаростійких генотипів кукурудзи.

### Література

1. Кулаева О.Н. Белки теплового шока и устойчивость растений к стрессу // Соросовский Образовательный журнал. Серия «Биология». – 1997. - № 7. – С. 1-10.
2. Войников В.К., Иванова Г.Г., Рудиковский А.В. Белки теплового шока растений // Физиология растений. 1984. Т. 31. С. 970-979.
3. Сиволап Ю.М. и др. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях. – Киев: Аграрна наука. – 1998. – С. 34-37.
4. Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Е. Оцінка генотипів кукурудзи (*Zea mays L.*) на стійкість до коренево-стеблевої гнилі (збудник *Fusarium moniliforme Sheldon*). – Одеса. – 2007. – С. 3-6.
5. [www.maizeGDB.org](http://www.maizeGDB.org)

### Резюме

Проанализированы данные о структуре генов кукурузы, кодирующих белки теплового шока. Исследован молекулярно-генетический полиморфизм генов uaz171, hsp3 и hsp90, в состав которых входят микросателлитные повторы. Установлены

наборы аллелей, характерные для выборок жаростойких и нежаростойких инбредных линий кукурузы.

Проанализовані дані про структуру генів кукурудзи, що кодують білки теплового шоку. Досліджений молекулярно-генетичний поліморфізм генів *uaz171*, *hsp3* і *hsp90*, до складу яких входять мікросателітні повтори. Встановлені набори алелів, характерні для вибірок жаростійких і нежаростійких інбредних ліній кукурудза.

Information about the structure of maize genes encoding the heat shock proteins is analysed. Molecular-genetic polymorphism of genes *uaz171*, *hsp3* and *hsp90* containing microsatellite repeats is investigated. The alleles sets characteristic for samplings of the heat-resistant and unheat-resistant inbred lines are defined.

**МЕЛЬНИКОВА М.Н., ПАВЛОВ С.Д., АНТИПОВА Н.В.**

*Московский Государственный Университет, биологический факультет, кафедра ихтиологии,*

*119899 Россия, Москва, Ленинские Горы 1, стр.12. e-mail: melnik-06@mail.ru*

### **ПОЛИМОРФНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ В ПОПУЛЯЦИЯХ КАМЧАТСКОЙ МИКИЖИ (*PARASALMO (O.) MYKISS*)**

Камчатская микижа (*Parasalmo (O.) mykiss*) является объектом красной книги, а ее жилая форма (микижа, радужная форель (rainbow trout)) один из наиболее ценных объектов мирового рыбоводства. В то же время, статус этого вида дискусионен, единого мнения о его родовой принадлежности не существует; разные авторы относят микижу к родам *Salmo*, *Parasalmo* или *Oncorhynchus*. Некоторые ученые по-прежнему полагают, что камчатская семга и жилая микижа не две формы одного и того же вида, а разные виды. Продолжению этой дискуссии способствует чрезвычайная высокая экологическая пластичность микижи. На камчатском полуострове этот вид образует не только проходную и жилую формы но целый ряд промежуточных между ними форм.

Все это, а также то, что только в Азии тихоокеанские лососи представлены единственными сохранившимися в мире дикими популяциями, места обитания которых находятся в труднодоступных районах, делает их уникальным объектом для проблем происхождения группы, микроэволюции, структуры вида и видообразования.

Данное исследование является продолжением работ по оценке внутривидовой изменчивости на уровне генома ДНК у камчатской географической группы *Parasalmo (O.) mykiss*, первые результаты которого описаны в предыдущих работах авторов [1].

Рестриктный анализ и секвенирование фрагментов мт-ДНК (гены *cytb*, ND/3, ND/4, ATF 6, ATF 8, части D-loop) обнаружили низкий уровень изменчивости митохондриальной ДНК камчатских популяций микижи по сравнению с американскими популяциями и оказались неперспективными для дальнейших исследований популяционного уровня. Анализ генетической изменчивости ядерной ДНК, включающий в себя секвенирование спейсеров рибосомальной ДНК и рестриктный анализ мелкощепящими эндонуклеазами гормонов роста I и II обнаружил единичные мутации. Стало очевидно, что представленные в литературе данные по варибельным участкам генома у американских форелей и дающие генетическую детерминацию популяций у других организмов не дают результатов в применении к монофилитичной камчатской группе *Parasalmo (O.) mykiss*.

Более перспективным показалось использование в качестве маркерных систем полиморфных последовательностей ДНК, которые могут находиться как в кодирующей части генома, так и в некодирующей.

## Материалы и методы

В данной работе произведен поиск полиморфных RAPD-фрагментов для разных популяций камчатской микижи и конструирование на их основе SCAR- маркеров.

Материал был собран от разных форм *Parasalmo (O.) mykiss*, обитающих в наиболее крупных реках и водных бассейнах Камчатки, близ Шантарских островов, а также американских популяций. Всего было исследовано 7 популяций *O. mykiss*, в качестве репера были использованы образцы североамериканской микижи: steelhead and inland формы).

Тотальную ДНК выделяли из замороженной мышечной ткани стандартным методом, включающим гомогенизацию материала с буфером Net 25 (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5-8. 25 mM EDTA), лизис клеток 3%-ным саркозилем Na, инкубацию лизата с протеиназой K (100 mg/ml) в течении 3 часов при 60°C и депротеинизацию смесью фенол-хлороформ (1:1) и хлороформ-изоамиловый спирт (24:1).

Реакцию амплификации для определения RAPD-маркеров проводили по стандартному протоколу и стандартной программе [2]. Полиморфные фрагменты вырезали из геля, выделяли ДНК.

Элюированный RAPD-фрагмент лигировали с pGEM-T-вектором набора для клонирования pGEM-T vector system II («Promega»). Все операции проводили по протоколу фирмы «Promega». После трансформации из рекомбинантных клонов выделяли плазмидную ДНК, проверяли на наличие клонированных RAPD-фрагментов и секвенировали. К полученным последовательностям подбирали SCAR-праймеры, имеющие длину 24-30bp, и обычно, включающие в себя всю или часть последовательности RAPD- праймера. Амплификацию проводили еще раз.

## Результаты и обсуждение

Нами был получен полиморфизм по семи парам сконструированных SCAR-праймеров, при амплификации других фрагментов полиморфизма получить не удалось.

Таблица

SCAR-праймеры и условия ПЦР-реакции для амплификации SCAR-маркеров камчатской микижи.

Номер фрагмента, размер полученного SCAR-продукта	Праймеры на фрагмент (SCAR-праймеры)	Температура отжига °C
(470bp)		
1	Ccgggcacctacaggctgaattcg Tagtagagtagtgcctgagggca	65
(358bp)		
2	Tgatgtcacctgtcccctaatg Cactgcactctgggaagcctaact	65
(155 bp)		
3	Gcctctttgcgaacattgtaaacctcc Gcaatactagtgtttaagctacttttgaa	65
4 (617 bp)	Ccctagtctttgtggtgaaactg Actggagtggagcaaatgttagcg	68
5 (483 bp)	Ctggaggctaaggagcagagga Ttctagtggctcagtgtgggtca	71
6 (383 bp)	Gtgtattccatctcccctcttg Ttctttgtgggttcgactatagcg	65
7 (293 bp)	Aacgagcttccatgccatacaaca	



	Gtttggcagcatgagtgaaggagg	
--	--------------------------	--

Исчезновение полиморфизма при создании SCAR-маркеров было не раз отмечено в литературе. Оно обычно происходит в тех случаях, когда исходный полиморфизм был вызван точковой мутацией в сайте отжига праймера, и объясняется тем, что единичная замена основания в сайте отжига предотвращает туда посадку более короткого RAPD-праймера, но не препятствует отжигу более длинного SCAR-праймера, удерживаемого большим числом связей. Кроме того, в случае использования SCAR-праймеров сайт точковой мутации, лежащий в основе исходного RAPD-полиморфизма, смещается в середину SCAR-праймера, и как правило, не влияет на эффективность и специфичность амплификации.

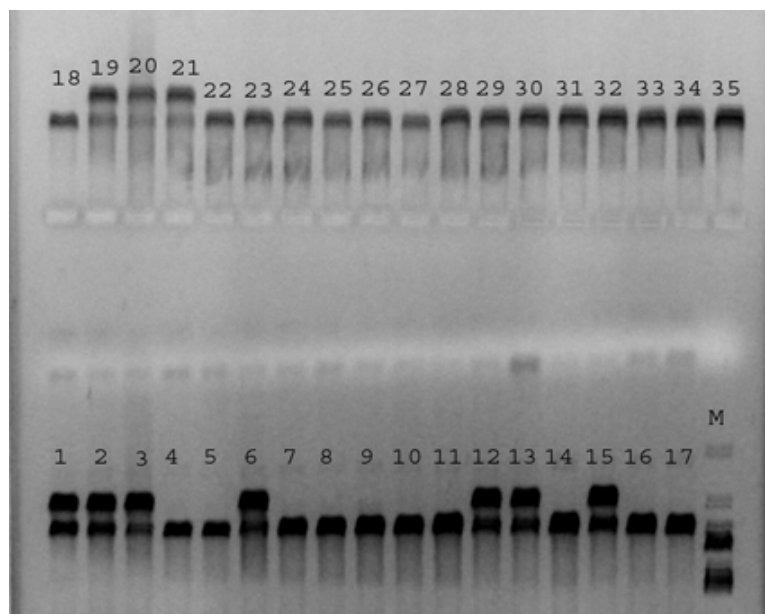
Из хорошо известных методов восстановления полиморфизма (оптимизация параметров ПЦР, рестрикция полученных фрагментов, подбор новых, иногда вырожденных праймеров, использование генетически отдаленных видов и т.д.) нами было использовано только повышение температуры отжига праймера.

При использовании, вышеуказанных SCAR-праймеров, в наших исследованиях амплифицировался единственный фрагмент по размеру чуть меньше исходного полиморфного RAPD-фрагмента. Для проверки полученных экспериментальных данных мы выборочно секвенировали несколько полученных SCAR-маркеров. Их последовательность полностью совпала с соответствующим RAPD-продуктом.

При проверке выделенных последовательностей, имеющих полиморфизм, по Gene-банку выяснилось, что только одна из последовательностей (SCAR-маркер 155 bp) имеет около 32% сходства (64 нуклеотида из 200 возможных – 82-86% идентичности) со структурными генами *Salmo salar* (*caspase 3B gene*, *pparb2B gene for peroxisome proliferator-activated receptor beta2B*, exon 5), *Oncorhynchus mykiss SYPG1 gene*. Другой SCAR-маркер (617 bp) имел фрагмент в 108 bp (14,4%) на 87 % идентичный *Oncorhynchus mykiss SYPG1 gene*. Остальные последовательности имели очень малый процент сходства с последовательностями, имеющимися в Gene-банке. Так, фрагмент SCAR-маркера (358 bp) в 32 нуклеотида был на 94% идентичен интрону d гормонов роста I и II разных видов *Coregonus*, а SCAR-маркер (514 bp) только очень маленькими фрагментами в 20-23 нуклеотида был идентичен последовательностям из полных геномов *Zebrafish* и *Homo sapiens*. SCAR-маркер (470 bp) имел сходство с имеющимся в Gene-банке микросателлитным CA-повтором *S.salar* и 16-28 S RNA бактерий. SCAR-маркер (483 bp) имел небольшие фрагменты (около 30 bp) сходные с разнообразными повторами человека, мышей и собак. SCAR-маркер (383 bp) имел фрагмент в 120 bp, схожий с микроглобулиновым геном *O.mykiss*.

Таким образом, по всей вероятности мы получили фрагменты некодирующих и потому накапливающих мутации повторяющихся последовательностей ДНК. Количество этих повторов варьирует в популяциях Камчатской семги и может являться генетическим маркером при популяционном анализе данной группы организмов.

При анализе подобранных SCAR-маркеров на больших выборках камчатской микижи оказалось, что пять из них выявляют географический полиморфизм у данного вида организмов.



**Рис.** Полиморфный SCAR профиль: (1-21) микижа из реки Коль, (22-35) – микижа из реки Облуковина; маркер 1 kb ("SibEnzim")

#### Литература

1. Павлов С.Д., Колесников А.А., Мельникова М.Н., Ушакова М.В. Генетическая дивергенция камчатской микижи (*Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss*) на ареале по результатам рестрикционного анализа и секвенирования гена цитохрома b мтДНК. 2004. *Генетика*. 40, 12, 1695—1701
2. Мельникова М.Н., Гречко В.В., Медников Б.М. Исследование полиморфизма и дивергенции геномной ДНК на видовом и популяционном уровнях (на примере ДНК пород домашних овец и диких баранов). 1995. *Генетика*. 31, 8, 1120-1131.

#### Резюме

Проведенные ранее исследования, основанные на секвенировании гипервариабельных последовательностей митохондриальной ДНК, и рестрикции последовательностей гормонов роста показали выраженную монофилетичность камчатских популяций микижи и необходимость подбора специальных маркеров для этой группы организмов. В ходе экспериментов были подобраны 7 SCAR-маркеров, выявляющих географический полиморфизм популяций данного вида.

Проведені раніше дослідження, засновані на секвенуванні гіперваріабельних послідовностей мітохондріальною ДНК, і рестрикції послідовностей гормонів зростання показали виражену монофілетичність камчатських популяцій мікижі і необхідність підбору спеціальних маркерів для цієї групи організмів. В ході експериментів було підбрано 7 SCAR-маркерів, що виявляють географічний поліморфізм популяцій даного вигляду.

Carried out before the research, based on sequenced hypervariable sequences of mitochondrial DNA, and restriction sequences of growth hormones have shown expressed monophyletic the Kamchatka populations of mykizha and necessity selection of special markers for this group organisms. During experiments have been picked up 7 SCAR-markers revealing geographical polymorphism of populations for this species.

**МУРАВЕНКО О.В.**

*Институт молекулярной биологии им.В.А.Энгельгардта Российской академии наук,  
Российская Федерация, 119991, Москв.,ул.Вавилова, 32, e-mail: omur@eimb.ru*

## **СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОМОВ У ВИДОВ ПЯТИ СЕКЦИЙ РОДА *LINUM* L. С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХРОМОСОМНЫХ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ**

Как известно, структура хромосом в геноме является одним из важных видовых признаков, позволяющих определять его систематическое положение и филогенетические связи. Изучение хромосом у одной из наиболее известных технических сельскохозяйственных культур – льна и других дикорастущих видов рода *Linum* L. обнаружило, они имеют сходную морфологию (в основном метантрики) и их размеры колеблются от 1 мкм до 6 мкм (Ray, 1944). До сих пор имеются виды льнов у которых не определено даже число хромосом и для большинства видов остается актуальной проблема идентификации хромосом в геномах. Тем не менее, на основании монохромного окрашивания хромосом были построены предполагаемые филогенетические древа как для старосветских, так и для новосветских видов рода *LINUM*. Для старосветских видов льна в качестве исходного вида был принят лен австрийский - *L. austriacum* L., а для новосветских видов - лен многолетний (сибирский) *L. perenne* L. (Harris, 1968; Chennaveeraiah, Joshi, 1983). Генетическое родство геномов различных видов льнов изучали как классическим методом межвидовых скрещиваний и современными методами геномного анализа видов (RFLP, RAPD, SSR, ITS). (Лемеш и др., 2001; Fu Yong-Bi et al., 2002; Ambruster et al., 2006). На данном этапе исследование филогении рода по полиморфизму транскрибируемых межгенных спейсеров генов 45S РНК показало одновременную дивергенцию основных секций рода от общего предкового вида, что во многом подтвердило точку зрения ряда систематиков и генетиков (Кутузова и др., 1999; Светлова, 2007; Оньасюк, 2007).

### **Материалы и методы**

Изучены кариотипы у образцов видов *Linum usitatissimum* L. var. *usitatissimum* сорт Оршанский 2 (2n=30); *L. angustifolium* Huds. (2n=30); *L. bienne* Mill. (2n=30) полученных из ИГиЦ НАН Беларуси. Образцы видов, полученные из Генного банка Института генетики растений и исследования возделываемых растений г. Гетерслебена (Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany): *L. grandiflorum* Desf. (2n=16) accession number Lin 4/99, *L. decumbens* Desf. (2n=16) accession number Lin 1913/98, *L. austriacum* subsp. *austriacum* L. Lin 6/76, *L. austriacum* subsp. *euxinum* Juz. (Syn. *L. squamulosum* Rudolphi) Lin 1546, *L. leonii* F.W. Schultz Lin 1672/92, *L. perenne* L. Lin 1807/94, *L. lewisii* Pursh. Lin 1550/84, *L. komarovii* Juz. Lin 1716/92, *L. altaicum* Ledeb. Lin 1632/83, *L. mesostylum* Juz. Lin 1662/90, *L. pallescens* Bunge Lin 1645/01, *L. stelleroides* Planch Lin 1655/82, : *L. flavum* L. Lin 99/89, Lin 1633/83, *L. capitatum* Kit. ex Schultes Lin 1903/98, Lin 1549/78, Lin 1549/96, *L. campanulatum* L. Lin 1760/98, *L. thracicum* Degen Lin 1553/82, Lin 1764/89, *L. tauricum* Willd. Lin 1611/86, Lin 1604/80, *L. elegans* Sprun. ex Boiss. Lin 1652/88, *L. nodiflorum* L. LIN 1634, *L. hirsutum* L. subsp. *hirsutum* LIN 1649. В данном исследовании при указании деления видов по секциям мы придерживались систематики Юзепчука и Егоровой (Флоры СССР, 1949 и Флора Восточной Европы, 1996). Используемые в работе методы приготовления хромосомных препаратов, С-, DAPI-окрашивания, флуоресцентной гибридизации *in situ* с пробами рибосомных генов и теломерных последовательностей и хромосомного анализа подробно описаны ранее (Muravenko et al., 2003; Большева и др., 2005; Семенова и др., 2006).

### **Результаты и обсуждение**

Изучение рисунков распределения C/DAPI -бэндов по длине хромосом у всех видов показало, что в их кариотипах более крупные гетерохроматические блоки в большинстве хромосом расположены в прицентромерных районах хромосом, а средние и небольшие C-бэнды - преимущественно в теломерных и интеркалярных районах. Хромосомспецифичные рисунки C/DAPI - окрашивания позволили идентифицировать все пары гомологов в кариотипах изученных видов. Числа хромосом для *L. decumbens* (2n=16), *L. komarovii* (2n=18) *L. mesostylum*(2n=18) *L. stelleroides*(2n=18) *L. squamulosum* Rudolphi (2n=18) и *L. thracicum* Degen (2n=28+1-3B) определены впервые. В-хромосомы в кариотипах видов секции *Syllinum* с 2n =28 обнаружены и изучены также впервые.

### **Секция *Linum***

Исследование рисунков C/DAPI-окраски митотических хромосом показало, что геномы близкородственных видов *L. usitatissimum* L. (2n=30), *L. bienne* Mill. (2n=30) и *L. angustifolium* (Huds.) (2n=30) сходны по рисунку распределения C/DAPI-блоков, но у хромосом *L. angustifolium* размеры C/DAPI-бэндов больше. Сходство рисунков C-окраски у разных пар хромосом подтверждало данные о автотетраплоидном происхождении их генома (Cullis, 2005). Аналогичные рисунки C-окраски для всех восьми хромосом выявлены также в геномах у *L. grandiflorum* Desf. (2n=16) и *L. decumbens* Desf. (2n=16). У 16- и 30-хромосомных видов секции *LINUM* выявлен основной сайт совместной локализации рибосомных генов на спутничной хромосоме 1. Сайты 5S rDNA картированы на 3 парах хромосом у видов льна 2n=30 и на 1 паре у видов 2n=16. Сравнение результатов дифференциального окрашивания хромосом и расположения рибосомных генов позволило предположить перичентрическую инверсию в 3 хромосоме, захватывающую локус 5S рДНК, по которой различаются вид *L. angustifolium* и виды *L. usitatissimum* и *L. bienne*. Наши результаты все три вида рассматривают как отдельные (Юзенчук, 1949).

У вида *L. narbonense* L. (2n=28) было две пары ядрышкоорганизующих хромосом и четыре локуса 5S рДНК в отличие от других видов этой секции. По рисунку C-окраски и расположению рибосомных генов хромосомы были схожи не только с хромосомами видов секции *Linum*, но также с видами секции *Syllinum*., что подтверждает мнение систематиков, выделивших этот вид в отдельную секцию (Светлова, 2007, Онтасюк, 2007).

### **Секция *Adenolinum***

Все изученные виды этой секции (2n=18) были идентичны по основному рисунку распределения C-блоков по длине хромосом. У всех видов 26S и 5SpДНК локализуется в районе вторичной перетяжки SAT хромосомы 1, в проксимально-медианном районе другого плеча этой же хромосомы расположен крупный локус 5S рДНК. По рисунку C-окраски виды этой секции были очень схожи с видами секции *Linum*. Выявлена транслокация 1 и 3 хромосом между и дупликация хромосомы 8 по сравнению с 16-хромосомными видами секции.

### **Секция *Stellerolinum***

В эту секцию систематики выделили единственный вид *L. stelleroides* (2n=18), однако геном этого вида по рисунку C-окраски хромосом и расположению рибосомных генов был идентичен геномам видов секции *Adenolinum*.

### **Секция *Syllinum***

Впервые у этих видов льна были обнаружены В-хромосомы, что позволило уточнить основное число А хромосом в их кариотипах. Обнаружено, что кариотипы всех видов из этой секции имеют по 28 хромосом и еще 1-3 добавочные В-хромосомы. 26S и 5S рибосомные гены локализируются совместно на паре спутничных хромосом в середине короткого плеча и на В-хромосомах. Кроме того, сайты 5S рДНК расположены на 2 парах хромосом в проксимальном и дистальном положении.

У *L. nodiflorum* установлено 26 хромосом и В-хромосом не обнаружено. Спутничная хромосома несет 26S и 5S рДНК, локализованные вместе и отличается по морфологии от спутничной хромосомы видов секций *Linum* и *Adenolinum*. пара хромосом а 1 пара хромосом - 5S рДНК гены. По рисунку С-окраски хромосомы этого вида схожи не только с частью хромосом видов с  $2n=28$  из этой секции, но и с хромосомами вида *L. hirsutum* из секции *Dasylinum*. Результаты хромосомного анализа этого вида показывают, что он содержит геном, отличающийся от геномов других изученных видов льна, и подтверждает мнение систематиков, выделивших его в отдельную секцию *Tubelinum* (Светлова, 2007).

#### **Секция *Dasylinum***

У вида *L. hirsutum* в геноме восемь хромосом, размеры которых самые крупные из всех изученных видов. Рисунки С-бэндинга представлены центромерными, теломерными бэндами и небольшими интеркалярными бэндами. 26S и 5S рДНК локализована совместно на 2 парах спутничных хромосом, расположенных прителомерно и дистально. На медианном районе одной пары хромосом расположен небольшой сайт 5S рДНК. Этот вид по распределению С-бэндов и рибосомных генов также занимает особое положение, что подтверждает его помещение в секцию *Dasylinum*. Гибридизация с теломерными последовательностями ДНК обнаружила, что эволюция хромосом этого вида шла, по-видимому, не только за счет накопления повторов, но и за счет хромосомных слияний (Большеева и др., 2005).

#### **Выводы**

Результаты сравнительного анализа рисунков С/DAPI-окраски и распределения сайтов рибосомных генов у видов секции *Linum* и секции *Adenolinum*. позволили предположить, что все они произошли от общего 16-хромосомного предка, но в геноме 18-хромосомных видов произошла транслокация между хромосомами 1 и 3 с точками разрывов по границам районов 1L 1.3 и 3L 1.3 и дупликация хромосомы 8, а в геноме 30-хромосомных видов - автополиплоидизация с потерей или перестройкой одной из хромосомных пар в процессе видообразования. Сравнение геномов видов из всех изученных секций льнов позволило предположить, что предковая форма секций *Adenolinum*, *Stellerolinum* и *Linum*, а также секций *Dasylinum*, *Syllinum*, *Tubelinum* дивергировали от предка *Protolinum* одновременно, что согласуется с данными геномного анализа и данными систематиков.

Работа поддержана грантами РФФИ 08-08-00391 и 07-04-00268.

#### **Литература**

1. Большеева Н.Л., Семенова О.Ю., Муравенко О.В., Носкова И.В., Попов К.В., Зеленин А.В. Локализация теломерных последовательностей в хромосомах двух видов льна. // Биологические мембраны. 2005.- т. 22.- п. 3.- с. 227-231.
2. Кутузова С.Н., Гаврилюк И.П., Эгги Э.Э. Перспективы использования белковых маркеров в уточнении систематики и эволюции рода *Linum* // Труды по ботанике, генетике и селекции. 1999. Т. 156. С. 29-39.
3. Лемеш В.А., Малышев С.В., Грушецкая З.Е., Хотылева Л.В. Применение RAPD-анализа для определения таксономического статуса диких сородичей культурного льна. // ДНАН Беларуси. 2001. -Т.45. -N 3. -С. 88-90.
4. Оптасюк О.М. Род *Linum* во флоре Украины. Автореферат канд. дисс. Киев.-2007.- Институт ботаники НАНУ. -21с.
5. Светлова А.А. Род *Linum* L.: таксономия, география, эволюция. Автореферат канд. дисс. -Санкт-Петербург, 2007.-Институт ботаники им. Комарова. -26с.
6. Семенова О.Ю., Саматадзе Т.Е., Зеленин А.В., Муравенко О.В. Сравнительное изучение геномов видов льна секций *Adenolinum* и *Stellerolinum* с использованием флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). // Биологические мембраны. 2006.- т. 23.- п. 6.- с. 453 – 460.

7. Юзенчук С.В. Льновыє-*Linaceae* // Флора СРСР Под ред. Шишкина Б.К., М. - Л.: Наука, 1949. -Т. 14. -С. 92-145.
8. Armbruster WS, Pérez-Barrales R, Arroyo J, Edwards ME, Vargas P. Three-dimensional reciprocity of floral morphs in wild flax (*Linum suffruticosum*): a new twist on heterostyly. // *New Phytol.* -2006.-vol.171.-n 3.-p. 581-90.
9. Chennaveeraiah M.S., Joshi K.K. Karyotypes in cultivated and wild species of *Linum* // *Cytologia.* 1983. vol. -48. -P. 833-841.
10. Cullis C.A. Mechanisms and control of rapid genomic changes in flax // *Annals Botany.* - 2005. -vol. -95. P. -201–206.
11. Harris B.D. Chromosome numbers and evolution in North American species of *Linum* // *Amer. J. Bot.* 1968. vol. 55.-n 10.- P.1197-1204.
12. Fu Yong-Bi, G.Peterson, A.Diederichsen, K.W.Richards RAPD analysis of genetic relationships of seven flax species in the genus *Linum* L. // *Genetic Resources and Crop Evolution.* 2002. -vol.49. -P.253-259.
13. O.V. Muravenko, A.V. Amosova, T.E. Samatadze, K. V. Popov, A.I. Poletaev, Zelenin A. V. 9-aminoacridin- an efficient reagent to improve human and plant chromosome banding patterns and to standardize chromosome image analysis. // *Cytometry.*- 2003. vol. 51.- p.52 – 57.
14. Ray C. Cytological studies on the flax genus (*Linum*) // *Amer. J. Bot.* 1944. V.31. P.241-248.

#### **Резюме.**

Сравнение хромосом видів льна секцій *Syllinum*, *Dasylinum*, *Adenolinum*, *Stellerolinum* і *Linum* показало, що види секцій *Adenolinum*, *Stellerolinum* і *Linum* мають спільний предковий геном, який дивергував одночасно (радіальна дивергенція) з геномами видів із секцій *Syllinum*, *Dasylinum*, *Adenolinum* від предкової форми *Protolinum*.

Chromosome comparison of species from sections *Syllinum*, *Dasylinum*, *Adenolinum*, *Stellerolinum* and *Linum* was shown that species from sections *Adenolinum*, *Stellerolinum* and *Linum* have common ancestor which simultaneously radiated with species of sections *Syllinum*, *Dasylinum*, *Adenolinum* from common progenitor *Protolinum*.

**НОВОХАЦЬКА О.В., ЦИБА Л.О., СКРИПКІНА І.Я., НІКОЛАЄНКО О.В., ДЕРГАЙ О.В., РИНДИЧ А.В.**

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України*

*03143, м. Київ, вул. Заболотного, 150, e-mail: olga.novokhatska@gmail.com*

#### **ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ АДАПТОРНОГО БІЛКА ІНТЕРСЕКТИНУ 2 З БІЛКАМИ-ПАРТНЕРАМИ**

Інтерсектин 1 та 2 (ITSN1 та ITSN2) належать до еволюційно консервативної родини білків представлених у людини, гризунів, земноводних та риб. Обидва гени характеризуються подібною екзон-інтронною будовою, а білки, які вони кодують, мають однакову доменну структуру. У ссавців було виявлено дві основні ізоформи інтерсектину, які утворюються в результаті альтернативного сплайсингу: коротка ізоформа складається з двох ЕН-доменів,  $\alpha$ -спірального регіону, п'яти SH3-доменів (А-Е); довга форма містить три додаткові С-кінцеві домени (DH, PH і C2) [1]. ITSN1 є адапторним білком, який взаємно локалізує та модулює активність білків задіяних в

ендоцитозі, передачі клітинного сигналу, перебудовах цитоскелету та апоптозі; на сьогодні виявлено близько двадцяти його білків-партнерів.

Відомо, що більшість білків задіяних в ендоцитозі належать до родин білків, що кодуються групами паралогічних генів. Паралогічні гени утворюються внаслідок дуплікації ділянок геному і в ході еволюції можуть набувати відмінних функцій. Свого часу було висунуто дві теорії стосовно еволюції паралогічних генів [2]. Згідно з теорією субфункціоналізації одразу після події дуплікації відбувається зниження тиску природного добору на один із паралогів, який починає швидко еволюціонувати і набуває нових функцій. Функція ITSN2 не відома, встановлено лише, що його локалізація в клітині подібна до інших компонентів апарату ендоцитозу, а підвищена експресія ITSN2, подібно до ITSN1, інгібує інтерналізацію трансферину [3]; серед відомих на сьогодні партнерів – ГТФаза Cdc42 та білок WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome protein), які беруть участь в перебудовах цитоскелету [4] та білок вірусу саркоми Капоші K15. Враховуючи мультидоменну структуру ITSN2, можна припустити існування значно більшої кількості білків, з якими він утворює комплекси, що можуть бути спільними партнерами з ITSN1 або відрізнятися.

### **Матеріали і методи**

*Створення плазмідних конструкцій.* кДНК послідовності, що відповідають SH3A-, B-, C-, D- та E-доменам ITSN2 одержували за допомогою PCR використовуючи кДНК ITSN2, люб'язно надану Др. де ла Луна (Центр досліджень геномної регуляції, м. Барселона, Іспанія). Продукти PCR клонували за сайтами EcoRI and XhoI у вектор для експресії в бактеріальних клітинах рGEX-4T-3. Всі конструкції були перевірені сиквенуванням.

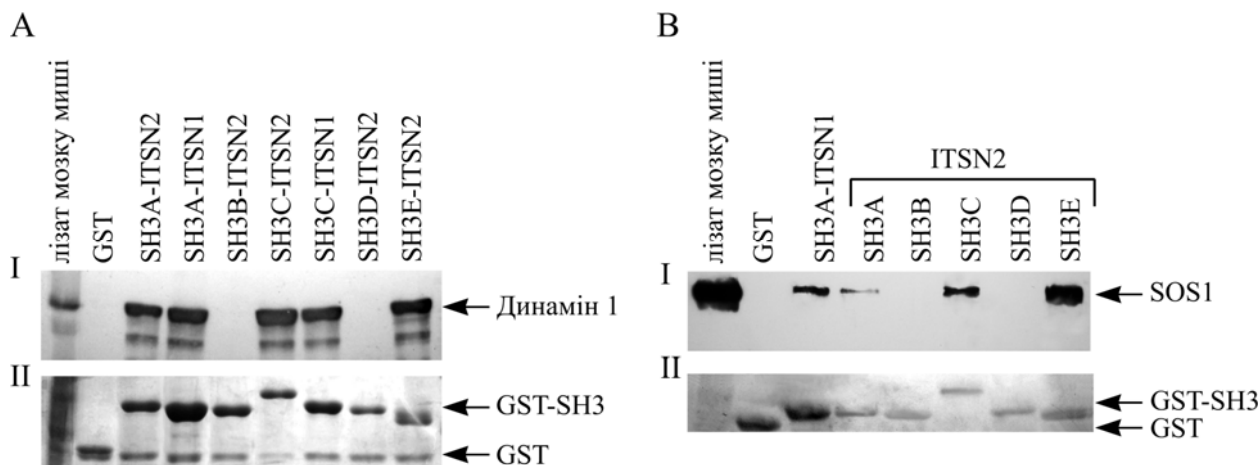
*Експресія рекомбінантних білків, pull-down та Вестерн-блот аналіз.* Рекомбінантні GST-злиті білки експресували в клітинах *E. coli* BL21(DE3)pLysE та очищували використовуючи глутатіон сефарозу 4B ("GE Healthcare") згідно з рекомендаціями фірми-виробника. Білок c-CBL у векторі pCDNA4/HisMaxC експресували у клітинах лінії MCF7 використовуючи реагент для трансфекції jetPEI відповідно до вимог виробника ("Polyplus-transfection", США). Лінія клітин MCF7, де білок CIN85/Ruk у векторі pEGFP-N1 експресувався постійно, була люб'язно надана Л.Б. Дробот (Інститут біохімії ім. Паладіна, м. Київ).

Лізати готували у буфері (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X-100, суміш протеазних інгібіторів ("Roche", Німеччина)) та центрифугували 20 хв при 12000g та 4°C. Для проведення pull-down експериментів лізат інкубували з 3-10 µg GST та GST-злитих білків, іммобілізованих на глутатіон сефарозу, 1 год при 4°C, сефарозу промивали 4 рази, зв'язані білки елюювали кип'ятінням в буфері Лемлі та переносили на нітроцелюлозну мембрану ("Bio-Rad", США). Мембрану блокували 1 год в 5% (w/w) розчині знежиреного молока, 1xTBS, 0,1% Triton X-100, інкубували з відповідними первинними антитілами 1 год та відмивали. Для Вестерн-блот аналізу використовували антитіла до динаміну 1 (C-16): sc-16, SOS1(C-23): sc-256, Omni-probe (M-21): sc-499 ("Santa Cruz", США), та моноклональні антитіла до SH3A-домену GFP-CIN85/Ruk люб'язно надані Л.Б. Дробот. Детекцію проводили видоспецифічними вторинними антитілами кон'югованими з пероксидазою хрому ("Promega", США).

### **Результати і обговорення**

Насьогодні відомо близько двадцяти білків, з якими взаємодіє ITSN1, серед них білки, що беруть участь в ендоцитозі, регуляції перебудов актинового цитоскелету, клітинному сигналінгу та апоптозі. З метою виявлення білків, з якими взаємодіє інтерсектин 2, у вектор для експресії в бактеріальних клітинах рGEX-4T-3 було клоновано фрагменти кДНК інтерсектину 2, які кодують SH3-домени (A-E) та одержані відповідні GST-злиті рекомбінантні білки, а також GST-злиті SH3A- та SH3C-домени інтерсектину 1, які в подальшому використовували у GST-pull-down експериментах.

Насамперед взаємодію інтерсектину 2 було перевірено з динаміном 1, мозкоспецифічною ГТФазою, яка є ключовим білком на пізніх стадіях ендоцитозу [5]. Pull-down експерименти проводили на лізатах мозку миші, динамін 1 детектували Вестерн-блот аналізом з використанням специфічних антитіл. В результаті було показано, що ITSN2 взаємодіє з динаміном 1 *in vitro*, у зв'язуванні беруть участь SH3A-, SH3C- та SH3E-домени (Рис.1). SH3B- і SH3D-домени інтерсектину 2 динамін 1 не преципітували. Подібні взаємодії було виявлено і для ITSN1, SH3A-, SH3C- та SH3E-домени якого зв'язували динамін 1. Істотних відмінностей у силі взаємодії доменів ITSN1 та ITSN2 не було виявлено, варто лише відмітити вищу афінність SH3E-домену ITSN2 до динаміну. Здатність декількох SH3-доменів інтерсектину 2 зв'язувати динамін 1 припускає можливість кластеризації молекул ГТФази під час ендоцитозу.



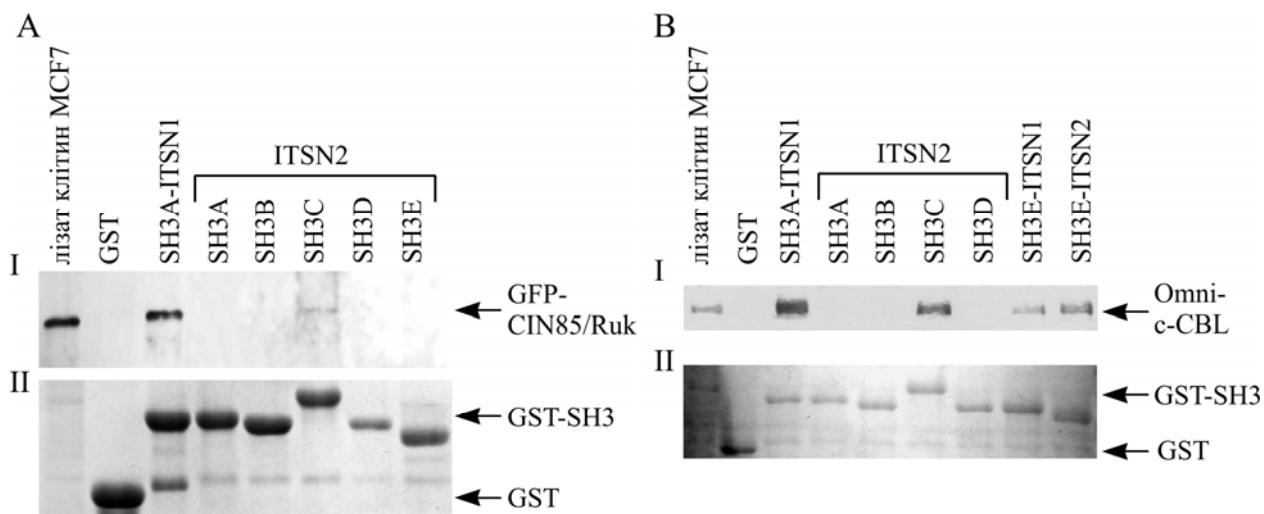
**Рис. 1.** Інтерсектин 2 взаємодіє з динаміном 1 (А) та SOS1 (В) через SH3A-, SH3C- та SH3E-домени *in vitro* (I – детекція динаміну 1 та SOS1 за допомогою Вестерн-блот-аналізу антитілами до кожного з білків; II – нижня частина гелю пофарбована Кумассі для оцінки кількості GST-злитих білків у експерименті).

Існує ряд свідчень щодо участі ITSN1 в регуляції активації Ras через взаємодію з SOS1. Показано, що ITSN1 утворює комплекси з Ras на внутрішньоклітинних везикулах та стимулює рівень RasGTP через зв'язування SOS1 з SH3A-, -C та -E доменами ITSN1. Відомо також, що експресія інтерсектину 1 і 2 у мозку миші є подібною, за винятком зон проліферації, де було виявлено лише ITSN1 [3]. Нами було досліджено участь ITSN2 у сигнальних шляхах клітини через взаємодію ITSN2 з білком SOS1, який є гуанін-нуклеотид обмінним фактором для Ras. Результати pull-down експериментів показали, що SH3A-, SH3C- і SH3E-домени ITSN2 здатні зв'язувати SOS1 *in vitro* (Рис. 1), проте з нижчою афінністю порівняно з SH3A-доменом ITSN1. Подібно до інтерсектину 1, SH3B- та SH3D-домени ITSN2 не взаємодіяли з SOS1. Одержані нами результати вказують на те, що і ITSN2, подібно до ITSN1, може бути одним із важливих білків, що забезпечують зв'язок ендоцитозу та передачі внутрішньоклітинного сигналу.

Взаємодію ITSN2 перевіряли також з адапторним білком CIN85/Ruk. Для GST-pull-down експериментів використовували лізати клітин MCF7, які експресували рекомбінантний білок GFP-CIN85/Ruk. Відомо про існування внутрішньомолекулярних взаємодій між власним SH3A-доменом білка CIN85/Ruk та його пролін-збагаченим регіоном (PRD), що створює умовно "закриту" конформацію і запобігає зв'язуванню з іншими білками. SH3A-домен інтерсектину 1 взаємодіє з PRD білка CIN85/Ruk, ймовірно, внаслідок конкурентного витіснення власного SH3A-домену цього білка і таким чином переводить останній в умовно "відкриту" конформацію, що було показано нами раніше. Результати експериментів показали, що подібне не спостерігалось в



присутності доменів ITSN2. Цей факт може пояснюватися тим, що SH3A-домен у інтерсектинів є найменш консервативним, до того ж у ITSN2 не було виявлено ні послідовності гомологічної до 20-го екзону паралогічного гена, ні відповідно мозкоспецифічного сплайсингу цього екзона. Це могло б відобразитися на зв'язуванні інтерсектину з білками-партнерами, що ми спостерігаємо на прикладі взаємодії з CIN85/Ruk.



**Рис. 2.** Аналіз взаємодії інтерсектину 2 з CIN85/Ruk (A) та c-CBL (B) *in vitro* (I – детекція CIN85/Ruk та c-CBL за допомогою Вестерн-блот-аналізу відповідними антитілами; II – гель пофарбований Кумассі для оцінки кількості GST-злитих білків у експерименті).

Відомо, що інтерсектин 1 стимулює убіквітинілювання та деградацію активованого рецептора епідермального фактора росту (EGFR). За допомогою РНК-інтерференції було показано, що відсутність ITSN1 призводить до інгібування інтерналізації EGFR та проходження мітогенного сигналу від цього рецептора, оскільки інтерсектин 1 є риштувальним білком для утворення комплексів ендцитозних білків та, зокрема, убіквітинлігаз родини CBL. Білки родини CBL є мультидоменними адапторними білками, які беруть участь в багатьох клітинних процесах, регулюють рецептор-індуковану проліферацію, виживання клітин та їх морфологію. Взаємодію ITSN2 перевіряли з убіквітинлігазою c-CBL. Нами раніше було показано взаємодію c-CBL з SH3A-, SH3C- та SH3E-доменами інтерсектину 1, тоді як у випадку інтерсектину 2 зв'язування *in vitro* спостерігалось лише з SH3C- та SH3E-доменами, що може вказувати на специфічність регуляції убіквітинілювання та інтерналізації рецептора різними представниками родини ITSN. До того ж аналогічний вплив на EGFR було показано і для CIN85/Ruk, який також є скаффолдом для c-CBL, і може узгоджено з інтерсектином координувати та модулювати проходження сигналу в клітині.

Таким чином, нами вперше показано, що інтерсектин 2 взаємодіє з ендцитозним білком динаміном 1, гуанін-нуклеотид обмінним фактором для Ras білком SOS1, убіквітинлігазою c-CBL та адапторним білком CIN85/Ruk *in vitro*. Враховуючи значення ендцитозу для інтерналізації рецепторів, вивчення функціонального різноманіття молекул, які його контролюють, допоможе з'ясувати механізми взаємодії ендцитозу та сигнальної трансдукції. Подальші дослідження дозволять встановити, чи дублює ITSN2 функції ITSN1 та чи існують білки-партнери і відповідно процеси, специфічні для кожної з форм інтерсектину.

Дослідження були здійснені за підтримки гранту INTAS (Ref #05-1000004-7762) та гранту НАН України для молодих вчених.

### Література.

1. Guipponi M., Scott H., Haiming C. et al. Two isoforms of a human intersectin (ITSN) protein are produced by brain-specific alternative splicing in a stop codon // *Genomics*. – 1998. – Vol. 53, №7. – P. 369–376.
2. Koonin V. Eugene Orthologs, paralogs and evolutionary genomics // *The Annual Review of Genetics*. – 2005. – Vol. 39. – P. 309-338.
3. Pucharcos C., Estivill X., Luna S. et al. Intersectin 2, a new multimodular protein involved in clathrin-mediated endocytosis // *FEBS Letters*. – 2000. – Vol. 478. – P. 43-51.
4. McGavin M., Badour K., Hardy A.L. et al. The intersectin 2 adaptor links Wiskott Aldrich syndrome protein (WASp)-mediated actin polymerization to T cell antigen receptor endocytosis // *Journal of Experimental Medicine*. – 2001. – Vol. 194, №12. – P. 1777-1787.
5. Yamabhai M., Hoffman N.G., Hardison N.L. et al. Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five src homology 3 domains // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V.273. – P.31401-31407.

### Резюме

Інтерсектин 1 та 2 (ITSN1 та ITSN2) людини належать до еволюційно консервативної родини адапторних білків. Показана участь інтерсектину 1 в багатьох процесах в клітині, тоді як роль інтерсектину 2 залишається не дослідженою. В даній роботі нами встановлено, що ITSN2 взаємодіє з ендоцитозним білком динаміном 1, гуанін-нуклеотид обмінним фактором для Ras білком SOS1, убіквітинлігазою c-CBL та адапторним білком CIN85/Ruk *in vitro*.

Інтерсектин 1 и 2 (ITSN1 и ITSN2) человека принадлежат к эволюционно консервативному семейству адапторных белков. Показано участие ITSN1 во многих клеточных процессах, тогда как роль ITSN2 остается неисследованной. В данной работе нами было установлено взаимодействие ITSN2 с эндоцитозным белком динамином 1, гуанин-обменным фактором для Ras белком SOS1, убиквитинлигазой c-CBL и адапторным белком CIN85/Ruk *in vitro*.

Human intersectins (ITSN1 and ITSN2) are members of a conserved family of endocytic adaptor proteins. ITSN1 is known to participate in multiple cellular processes while the function of ITSN2 is currently unknown. In this study we demonstrated *in vitro* interaction of ITSN2 with endocytic GTPase dynamin 1, guanine nucleotide exchange factor for Ras SOS1, ubiquitin ligase c-CBL and adaptor protein CIN85/Ruk and showed differences in binding properties of ITSN1 and ITSN2 with these proteins.

### ОЖЕРЕДОВА И.П., КОЗЕРЕЦКАЯ И.А.

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка

Украина, 01033, Киев, ул. Владимирская, 64, e-mail: ozheredova@mail.univ.kiev.ua

### ПРЕДСКАЗАНИЕ ФУНКЦИИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* НА ОСНОВАНИИ ГОМОЛОГИИ С ИЗВЕСТНЫМИ БЕЛКАМИ

В настоящее время флора Морской Антарктики включает в себя два вида сосудистых растений: *Deschampsia Antarctica* Desv. (*Poaceae*) и *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*). Южная граница распространения *Colobanthus quitensis* и *Deschampsia antarctica* пролегает между 64° и 66° ю.ш. на Антарктическом материке и антарктических островах [1,2].

Почему только эти два вида сосудистых растений и почему именно они успешно колонизируют эти территории, тогда как в тех же широтах северного полушария произрастает около 100 различных видов сосудистых растений, является одним из открытых научных вопросов [3].

В настоящее время большой интерес представляют исследования, направленные на изучение механизмов адаптации высших растений к длительному воздействию экстремальных абиотических факторов. В связи с этим, использование в качестве модельных объектов *Deschampsia antarctica* и *Colobanthus quitensis* представляет особый интерес. Показано, что активность основных метаболических процессов этих растений зависит от условий произрастания, что, возможно, и обеспечивает выживание растений в экстремальных условиях [4]. Исследования ультраструктурной организации органелл клеток тканей листа не выявили наличие выраженных адаптационных механизмов на данном уровне [5]. Таким образом, можно предположить, что адаптация данных видов имеет молекулярно-генетическую природу и детерминирована генотипом [6]. Данное предположение может быть подтверждено с помощью анализа геномов и протеомов данных видов.

Целью нашего исследования была систематизация имеющихся в базах данных (БД) последовательностей *D.antarctica* с последующим анализом их гомологии к последовательностям *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. и *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare.

#### **Материалы и методы**

Поиск последовательностей *D.antarctica* проводился в открытых БД Swiss-Prot / TrEMBL ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) [7], GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) [8].

Предсказание функции представленных в базах данных последовательностей выполнялось путем сравнения с потенциальными гомологами из *A.thaliana* и *O.sativa* [9,10]. Сравнение последовательностей белков выполнялось при помощи инструмента BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) [11]. Выравнивание последовательностей белков проводилось с помощью локального пакета ClustalW [12] с использованием матриц BLOSUM [13].

При отборе гомологичных последовательностей для дальнейшего анализа, в соответствии с принятой методикой, белки отмечались как гомологичные, если их идентичность была не ниже 25% при E-value > 10<sup>-3</sup>.

#### **Результаты и обсуждение**

В настоящее время (март 2008 года) для *D.antarctica* представлено 37 последовательностей потенциальных генов которые располагались в БД GenBank, TrEMBL и Swiss-Prot (<http://www.expasy.org/>; Приложение 2).

Исходя из результатов поиска в БД можно сказать, что анотирование генома *D.antarctica* находится на начальном этапе, и функции практически всех потенциальных белков имеющихся в БД окончательно не определены. Данные о потенциальной роли каждого из представленных продуктов могут быть получены с помощью анализа таких показателей, как сходство и идентичность аминокислотных последовательностей с известными белками, для которых структура и функция уже доказаны экспериментально. Подобный анализ с довольно высокой степенью дает возможность предсказать функцию имеющихся в БД гипотетических продуктов на основании их гомологии с ранее известными белками из других видов.

Для выяснения функций представленных в БД потенциальных белков *D.antarctica* нами был проведен поиск потенциальных гомологов с использованием программы NCBI BLAST. В результате было выделено 12 последовательностей *A.thaliana* и 9 последовательностей *O.sativa* которые соответствовали намеченным критериям отбора.

Для оценки дистанции между найденными аминокислотными последовательностями были выполнены множественные выравнивания и построены

филогенетические древа. На основании полученных результатов выравниваний и анализа кладограмм были выделены потенциальные гомологичные белки *A.thaliana* и *O.sativa* (табл.1)

Таблица 1

Потенциальные белки *D.antarctica* и их ближайшие гомологи из *A.thaliana* и *O.sativa*

№ н/п	Растительный объект	Белковая последовательность	Авторы
1.	<i>D.antarctica</i>	AAK53442.2	14
	<i>A.thaliana</i>	NP 195030.1; NP 174170.1	15,16
	<i>O.sativa</i>	NP001062537.1; NP001058265.1	17
2.	<i>D.antarctica</i>	AAM22748	14
	<i>A.thaliana</i>	NP566076; NP197812	18
	<i>O.sativa</i>	NP001061149, NP001046591, NP001056486	
3.	<i>D.antarctica</i>	AAM11915	19
	<i>A.thaliana</i>	NP199836.1, NP194208.1, NP190914.1, NP850692.1, NP181259.1	20,21,22,23,24
	<i>O.sativa</i>	NP001062073.1; NP001053710.1; NP001058927	
4.	<i>D.antarctica</i>	AAM22752	19
	<i>A.thaliana</i>	NP001077723, NP175929, NP197696	
	<i>O.sativa</i>	NP001060922	

Полученные результаты свидетельствуют, что для белка AAK53442.2 из *D.antarctica* наиболее близкими являются белки *A.thaliana* выполняющие функцию обменного промежуточного звена в тиол-дисульфатных обменных реакциях [25,26]

Белки *A.thaliana*, которые согласно сходству последовательностей гомологичные белку AAM22748 *D.antarctica*, отвечают за обратимое взаимодействие протеосомных субъединиц с белком путем активации инозитол или фосфатидинозитол киназ [18], Функция белка NP\_176628 *A.thaliana* пока еще не определена [27].

Белок AAM11915 *D.antarctica* обладает высокой гомологией с белками *A.thaliana* выполняющими функцию избирательного взаимодействия с РНК [20, 21, 22, 23, 24].

AAM22752 соответствуют белки *A.thaliana* выполняющие функцию активной лигазы. Лигазы – ферменты, принадлежащие согласно номенклатуре ЕС к классу 6. Лигазы выполняют функцию катализа процесса лигирования двух веществ с сопутствующим расщеплением дифосфатных связей и, например, играют важную роль в образовании нуклеозидтрифосфатов.

POC072 выполняет функцию белка-модификатора, образующего ковалентную связь с лизином, находящимся в мономерном или полимерном состоянии. Так, его взаимодействие с полимером Lys-48, вызывает протеосомальную деградацию, а соединение с мономерным лизином или с альтернативно связанным полимером лизина деградацию не вызывает. Это, вероятно, необходимо для осуществления целого ряда процессов, таких как поддержка структуры хроматина, ген-регуляция, стрессовый ответ, рибосомальный биогенез и репарация ДНК. Так же возможно POC073 и POC072 вовлечены в процесс холодной адаптации [14].

#### Выводы

Таким образом, выполненное нами исследование 37 потенциальных белков из *D.antarctica* позволило сделать предварительные выводы о их функции. На основании сходства первичных последовательностей нами предсказана функция 4 потенциальных продуктов из *D.antarctica*. Наши выводы основывались на их гомологи с белками

*A.thaliana*, так как все гомологичные белки из *O.sativa*, имели неизвестную функцию. Несомненно, полученные нами данные носят предварительный характер и требуют дальнейшего уточнения как *in silico* так *in situ*. Однако, полученные результаты позволяют значительно сократить объем экспериментальной работы необходимой для окончательной идентификации анализировавшихся последовательностей и целых продуктов.

### Литература

1. Greene D.M. and Holtom A., Studies in *Colobanthus quitensis* (Kunth.) Bartle and *Deschampsia antarctica* Desv. III. Distribution, Habitats and Performance in the Antarctic Botanical Zone, *Brit. Antarc. Surv. Bull.*, 1971, vol. 26, № 1, P.1–29.
2. Kappen L. and Schroeter B., 18 Plants and Lichens in the Antarctic, Their Way of Life and Their Relevance to Soil Formation, *Geoecology of Antarctic Ice-Free Coastal Landscapes, Ecological Studies*, Springer-Verlag, 2002, vol. 154, P.327–374.
3. Lewis Smith, R.I., The Enigma of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica* in Antarctica, *Antarctic Biology in Global Context*, Huiskes, A.H.L., Ed., Leiden: Backhuys Publ., 2003, P.234–239.
4. Н.Ю. Таран, Л.М. Бацманова, О.А. Оканенко, Адапційні реакції *Deschampsia Antarctica* Desv. За умов Антарктиди на дію оксидного стресу, *Укр.ботан.журн.*, 2007, т.64, №2, С.279-289
5. I.Gielwanowska - Ewa Szczuka, New ultrastructural features of organelles in leaf cells of *Deschampsia antarctica* Desv. *Polar Biol* 2005 28, P.951–955
6. Киряченко С.С., Козерецкая И.А., Ракуса-Сушевски С. Цитология и генетика 2005, №4, С. 75-80
7. Bairoch A., B. Boeckmann, S. Ferro and E. Gasteiger. Swiss-Prot: Juggling between evolution and stability. Briefings in Bioinformatics. - 2004. - V.5. № 1, P.39–55
8. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL., "GenBank", *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan;35(Database issue), P.21-25.
9. Poole RL., The TAIR Database, *Methods Mol Biol.* 2007, 406, P.179-212.
10. Chan AP, Rabinowicz PD, Quackenbush J, Buell CR, Town CD., Plant database resources at the institute for genomic research, *Methods Mol Biol.* 2007; 406, P.113-136
11. Jian Ye, Scott McGinnis and Thomas L. Madden BLAST: improvements for better sequence analysis March 20, 2006
12. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG., The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997 Dec 15; 25-24, P.4876-4882
13. Henikoff, S. and Henikoff, J.G. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, P.10915-10919.
14. Gidekel M., Destefano-Beltran L., Garcia P., Mujica L., Leal P., Cuba M., Fuentes L., Bravo L.A., Corcuera L.J., Alberdi M., Concha I., Gutierrez A.; "Identification and characterization of three novel cold acclimation-responsive genes from the extremophile hair grass *Deschampsia antarctica* Desv."; *Extremophiles* 2003, 7, P.459-469.
15. Chung HT, Ma R, Toyota B, Clark B, Robar J, McKenzie M. Audiologic and treatment outcomes after linear accelerator-based stereotactic irradiation for acoustic neuroma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004, 59(4), P.1116-1121.
16. Spadaro SE, Luciano WJ, Jennings DE. DENCOT trains EFDA's. *Dent Assist.* 2004 May-Jun; 73(3), P.30-32.
17. Ohyanagi,H., Tanaka,T., Sakai,H., Shigemoto,Y., Yamaguchi,K., Habara,T., Fujii,Y., Antonio,B.A., Nagamura,Y., Imanishi,T., Ikeo,K., Itoh,T., Gojobori,T. and Sasaki,T. The Rice Annotation Project Database (RAP-DB): hub for *Oryza sativa* ssp. *japonica* genome information, *Nucleic Acids Res.* 2006, 34, P. 741-744.

18. Felley-Bosco E, André M. Proteomics and chronic inflammatory bowel diseases. *Pathol Res Pract.* 2004;200(2), P.129-133
19. Gidekel M., Destefano-Beltran L., Garcia P., Fuentes L., Alberdi M., Bravo L., Corcuera L., Gutierrez A.; "Deschampsia antarctica a unique source of genes during cold acclimation."; Submitted (MAR-2002)
20. Jimenez C, Dang GT, Schultz PN, El-Naggar A, Shapiro S, Barnes EA, Evans DB, Vassilopoulou-Sellin R, Gagel RF, Cote GJ, Hoff AO. A novel point mutation of the RET protooncogene involving the second intracellular tyrosine kinase domain in a family with medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jul;89(7), P.3521-3526.
21. Reims HM, Fossum E, Hieggen A, Moan A, Eide I, Kjeldsen SE. Adrenal medullary overactivity in lean, borderline hypertensive young men. *Am J Hypertens.* 2004 Jul;17(7), P.611-618.
22. Atomi H, Matsumi R, Imanaka T. Reverse gyrase is not a prerequisite for hyperthermophilic life. *J Bacteriol.* 2004 Jul;186(14), P.4829-4833.
23. Ohta M, Sugita M, Sugiura M. Three types of nuclear genes encoding chloroplast RNA-binding proteins (cp29, cp31 and cp33) are present in *Arabidopsis thaliana*: presence of cp31 in chloroplasts and its homologue in nuclei/cytoplasm. *Plant Mol Biol.* 1995 Feb; 27(3), P.529-539,
24. Iles MM, Cannings C. Sequential genotyping within TDT families. *Math Med Biol.* 2004 Jun;21(2), P.115-127.
25. Chung HT, Ma R, Toyota B, Clark B, Robar J, McKenzie M. Audiologic and treatment outcomes after linear accelerator-based stereotactic irradiation for acoustic neuroma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Jul 15; 59(4), P.1116-1121.
26. Spadaro SE, Luciano WJ, Jennings DE. DENCOT trains EFDA's. *Dent Assist.* 2004 May-Jun; 73(3), P.30-32.
27. Bauer KP, Dom PM, Ramirez AM, O'Flaherty JE. Preoperative intravenous midazolam: benefits beyond anxiolysis. *J Clin Anesth.* 2004 May; 16(3), P.177-183.

### Резюме

В работе сделан обзор и проведена систематизация последовательностей *Deschampsia antarctica* представленных в базах данных, доступных для общего использования. Проведён поиск гомологичных последовательностей в протеомах *Arabidopsis thaliana* и *Oryza sativa japonica*. На основании проведённого анализа предсказаны функции для 4 потенциальных продуктов генома *Deschampsia antarctica*.

У роботі приведені результати огляду та систематизації послідовностей *Deschampsia antarctica*, які присутні у базах даних, доступних для загального користування. Також представлені результати пошуку гомологічних послідовностей в протеомах *Arabidopsis thaliana* і *Oryza sativa japonica*. На підставі проведеного аналізу передбачені функції для 4 потенційних продуктів генома *Deschampsia antarctica*.

The results of an analysis sequences of *Deschampsia antarctica* from available databases are presented together with the results of the search of homologous sequences in proteomes of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa japonica*. We predicted the function of 4 potential products of the genome of *Deschampsia antarctica* on the basis of our analysis.

**ПІДПАЛА О.В., ЯЦИШИНА А.П., ЛУКАШ Л.Л.**

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,*

*Україна, 03680, Київ, вул.Заболотного, 150, e-mail:specrada@imbg.org.ua*

## ДО ПИТАННЯ ПРО ПОХОДЖЕННЯ ВІРОЇДІВ

Віроїди – низькомолекулярні одноланцюгові кільцеві РНК, які є патогенами вищих рослин [1]. Їх вважають найпростішою формою життя. Вони не кодуєть білки, а їхня реплікація здійснюється клітинними ферментами. Віроїди належать до двох родин – *Pospiviroidae*, які реплікуються у ядрі за асиметричним механізмом кільця, що котиться та мають форму палички і *Ausunviroidae*, які розмножуються у хлоропластах, використовуючи симетричний механізм кільця, що котиться і набувають розгалуженої чи паличкоподібної форми [2-5].

У вивченні віроїдів багато не з'ясованого. Це стосується і механізмів реплікації та патогенезу, і походження. Найпоширенішою є гіпотеза “інтрону-втікача”, коли вирізані під час сплайсингу несмислові ділянки мРНК можуть випадково набувати здатності до реплікації [6-8]. Розглядають можливість походження віроїдів від мобільних генетичних елементів (МГЕ), які втратили кодуєчі ділянки [9]. Також висловлюють припущення, що віроїди можуть еволюціонувати від прокариотної РНК при зараженні рослин бактеріями [3]. Проте, досліджуючи схожість нуклеотидних послідовностей віроїдів із різними організмами (від бактерій до ссавців), не виявлено суттєвої гомології, тому автори дослідження піддали сумніву всі існуючі на сьогодні гіпотези [10].

Серед гіпотез про походження віроїдів не розглядається зв'язок із бактеріальними IS-елементами. Хоча відомо: за механізмом кільця, що котиться, реплікуються бактеріальні IS-елементи (IS91) та пов'язані із ними філогенетично елементи типу Helitron (окремий клас серед ДНК-транспозонів еукаріотів) та гемінівіруси. Існує думка, що елементи типу Helitron дали початок рослинним вірусам [11]. Схожість із бактеріальними IS-елементами (IS630) простежують і для MITE (Miniature inverted repeat transposable element) - МГЕ, які широко розповсюджені у рослинах [12]. Тому метою нашої роботи було з'ясувати, чи мають віроїди гомологію із бактеріальними IS-елементами.

### Матеріали і методи

Нуклеотидні послідовності 38 відомих на сьогодні віроїдів та основну інформацію про них взято із бази даних GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) та Subviral RNA Database (<http://subviral.med.uottawa.ca/cgi-bin/home.cgi>) [13] (табл.1). Гомологію із бактеріальними IS-елементами визначали, користуючись ISfinder ([www.is.biotoul.fr](http://www.is.biotoul.fr)) [14]. Пошуки гомології із еукаріотними МГЕ здійснювали за програмою CENSOR (<http://www.girinst.org/censor/index.php>) [15]. Функціональні сайти визначали користуючись програмою TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites (ver 1.3) (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). Інформацію про нуклеотидні послідовності хлоропластних ДНК взято із бази даних Chloroplast Genome Database (ChloroplastDB) (<http://chloroplast.cbio.psu.edu/cgi-bin/organism.cgi>) [16].

### Результати та обговорення

Аналізуючи віроїдні послідовності виявлено, що всі вони містять фрагменти бактеріальних IS-елементів (рис.1). У переважній більшості віроїдів вони становлять 20-60 % від загальної довжини, незалежно від родової приналежності. Винятком є віроїд хлоротичної крапчатості хризантем (*CChMVd*), геном якого містить найменшу кількість нуклеотидних послідовностей, які виявляють часткову гомологію із бактеріальними IS-елементами. Для представників родини *Pospiviroidae*, які належать до родів *Pospiviroid* (у 5 із 8), *Apscaviroid* і *Coleviroid*, показано наявність маркерних IS-фрагментів, що зустрічаються винятково у межах роду (табл.2). У єдиного представника роду *Hostuviroid* (*HSVd*) виявлено фрагмент ISSc1, але з іншими координатами. Три представники роду *Cocadviroid* (*CCCVd*, *CtiVd*, *HLVd*) не мають спільних маркерних IS-фрагментів ні між собою, ні з іншими представниками родини

Pospiviroidae. Не виявлено маркерних IS-фрагментів і у нечисленних віроїдів родини Avsunviroidae: Avsunviroid (*ASBVd*); Pelamoviroid (*CChMVd*, *PLMVd*); Elaviroid (*ELVd*).

Таблиця 1

**Перелік та основна інформація про віроїди**

Номер, n	Повна назва	Скорочення	Реєстраційний номер у GenBank	Розміри, у нуклеотидах
1	<i>Apple dimple fruit viroid</i>	<i>ADFVd</i>	NC_003463	306
2	<i>Apple fruit crinkle viroid</i>	<i>AFCVd</i>	NC_003777	371
3	<i>Apple scar skin viroid</i>	<i>ASSVd</i>	NC_001340	329
4	<i>Australian grapevine viroid</i>	<i>AGVd</i>	NC_003553	369
5	<i>Avocado sunblotch viroid</i>	<i>ASBVd</i>	NC_001410	247
6	<i>Chrysanthemum chlorotic mottle viroid</i>	<i>CChMVd</i>	NC_003540	399
7	<i>Chrysanthemum stunt viroid</i>	<i>CSVd</i>	NC_002015	356
8	<i>Citrus bent leaf viroid</i>	<i>CBLVd</i>	NC_001651	315
9	<i>Citrus dwarf viroid</i>	<i>CDVd</i>	NC_005821	294
10	<i>Citrus exocortis viroid</i>	<i>CEVd</i>	NC_001464	317
11	<i>Citrus viroid II</i>	<i>CVd-II</i>	NC_003881	299
12	<i>Citrus viroid III</i>	<i>CVd-III</i>	NC_003264	292
13	<i>Citrus viroid IV</i>	<i>CVd-IV</i>	NC_003539	284
14	<i>Citrus viroid Ia</i>	<i>CVd-Ia</i>	NC_001907	326
15	<i>Citrus viroid OS</i>	<i>CVd-OS</i>	NC_004359	330
16	<i>Citrus viroid -I-LSS</i>	<i>CVd-LSS</i>	NC_004358	327
17	<i>Citrus viroid V</i>	<i>CVd-V</i>	NC_010165	294
18	<i>Coconut cadang-cadang viroid</i>	<i>CCCVd</i>	NC_001462	246
19	<i>Cocotun tinangaja viroid</i>	<i>CtiVd</i>	NC_001471	254
20	<i>Coleus blumei viroid</i>	<i>CbVd</i>	NC_003882	295
21	<i>Coleus blumei viroid 1</i>	<i>CbVd-1</i>	NC_003681	248
22	<i>Coleus blumei viroid 2</i>	<i>CbVd-2</i>	NC_003682	301
23	<i>Coleus blumei viroid 3</i>	<i>CbVd-3</i>	NC_003683	364
24	<i>Columnea latent viroid</i>	<i>CLVd</i>	NC_003538	370
25	<i>Eggplant latent viroid</i>	<i>ELVd</i>	NC_004728	335
26	<i>Grapevine yellow speckle viroid 1</i>	<i>GYSVd-1</i>	NC_001920	366
27	<i>Grapevine yellow speckle viroid 2</i>	<i>GYSVd-2</i>	NC_003612	362
28	<i>Hop latent viroid</i>	<i>HLVd</i>	NC_003611	256
29	<i>Hop stunt viroid</i>	<i>HSVd</i>	NC_001351	302
30	<i>Iresine viroid</i>	<i>IrVd</i>	NC_003613	370
31	<i>Mexican papita viroid</i>	<i>MPVd</i>	NC_003637	360
32	<i>Peach latent mosaic viroid</i>	<i>PLMVd</i>	NC_003636	337
33	<i>Pear blister canker viroid</i>	<i>PBCVd</i>	NC_001830	315
34	<i>Persimmon viroid</i>	<i>PrVd</i>	NC-010308	396
35	<i>Potato spindle tuber viroid</i>	<i>PSTVd</i>	NC_002030	359
36	<i>Tomato apical stunt viroid</i>	<i>TASVd</i>	NC_001553	360
37	<i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i>	<i>TCDVd</i>	NC_000885	360
38	<i>Tomato planta macho viroid</i>	<i>TPMVd</i>	NC_001558	360

Для віроїдів ідентифікація і класифікація ґрунтується не на структурно-функціональних характеристиках як у вірусів, а на аналізі їхніх нуклеотидних послідовностей. Та все ж 6 віроїдів лишаються на сьогодні не класифікованими. Для них шукали маркерні IS-фрагменти або ж гомологію за фрагментами бактеріальних IS-елементів. У трьох не класифікованих віроїдів (*AFCVd*, *CVd-OS*, *CVd-LSS*) знайдено маркерний IS-фрагмент (ISHma6), спільний для представників роду *Arscaviroid*. У не класифікованого віроїду *CDVd* виявлено не лише маркерний для *Arscaviroid* IS-фрагмент (ISHma6), але і значну гомологію до фрагментів бактеріальних IS-елементів



одного із представників зазначеного роду *CVd-III* (рис.2а). Значну гомологію між фрагментами бактеріальних IS-елементів виявлено і між неklasифікованим віроїдом *CVd-II* і єдиним представником роду *Hostuviroid (HSVd)* (рис.2б). Застосовуючи цей підхід до неklasифікованого віроїду *TCDVd*, знайдено часткову гомологію між ним і п'ятьма представниками роду *Pospiviroid*, що узгоджується із даними про їхній еволюційний зв'язок [17]. Для віроїду *CVd-Ia*, якого зараховують до *ASSV* групи [18], виявлено значну гомологію із представником цього ж роду, віроїдом *CBLVd*. Віроїд *CVd-IV* вважають продуктом рекомбінації між віроїдами *CEVd* і *HSVd* [19], але спільних фрагментів бактеріальних IS-елементів у них не знайдено.

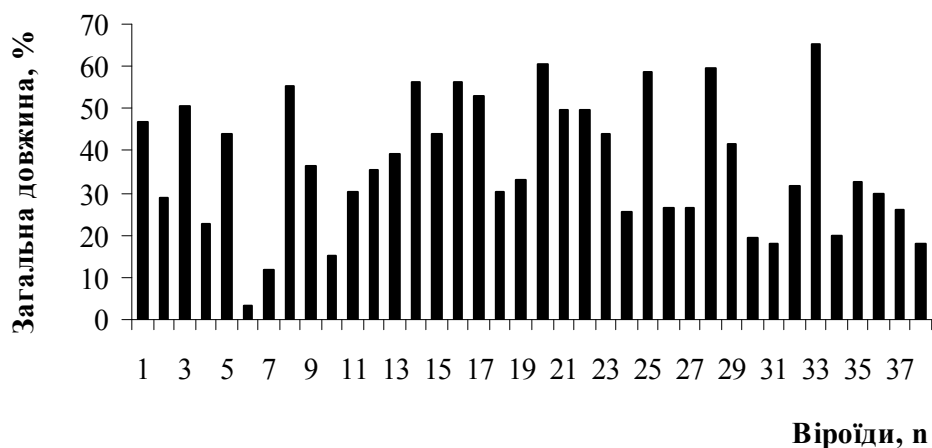


Рис. 1. Фрагменти бактеріальних IS-елементів у віроїдах

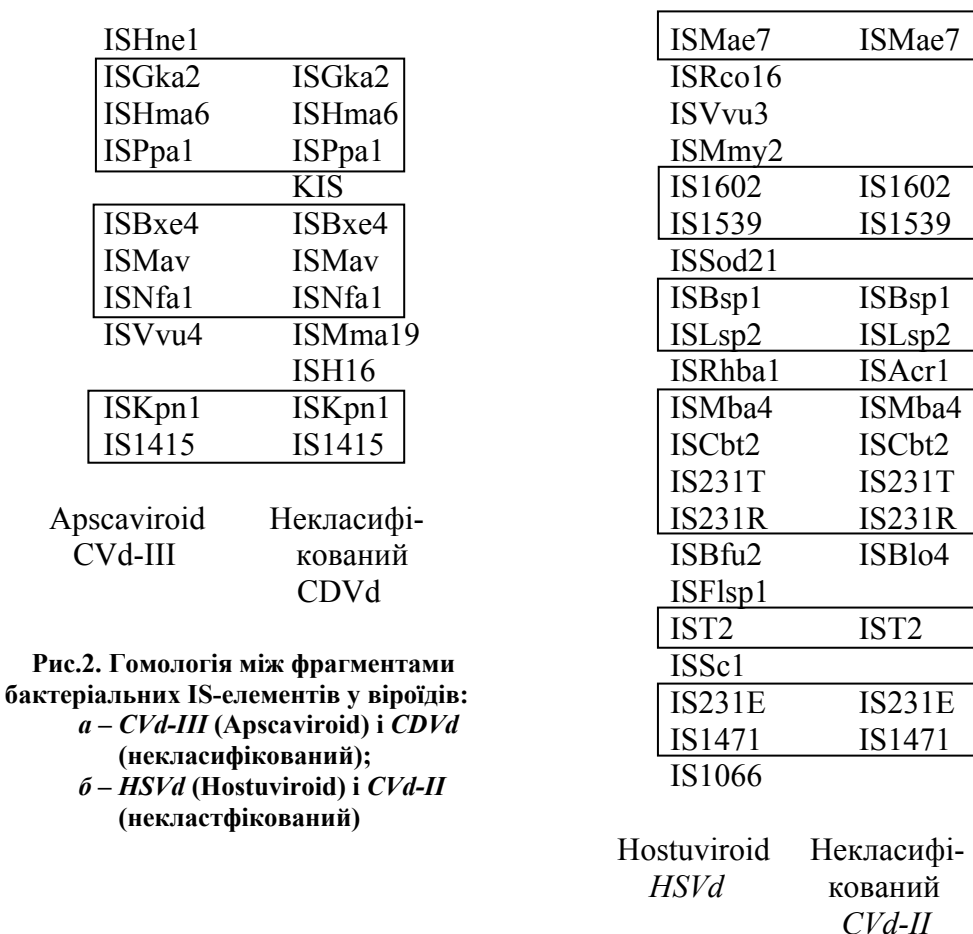
Таблиця 2

**Маркерні IS-фрагменти для різних родів віроїдів родини Pospiviroidae**

Родина	Рід	Вид	Фрагменти бактеріальних IS-елементів								
			ISSc1	ISHmab	ISRt1	IS406	IS1081	IS1512	IS1408	IS1407	IS1395
Pospiviroidae	Pospiviroid	<i>CEVd</i>	+								
		<i>CLVd</i>	+								
		<i>MPVd</i>	+								
		<i>PSTVd</i>	+								
		<i>TPMVd</i>	+								
	Apscaviroid	<i>ALFVd</i>			+						
		<i>ASSVd</i>			+						
		<i>AGVd</i>			+						
		<i>CBLVd</i>			+						
		<i>CVd-III</i>			+						
		<i>CVd-V</i>			+						
		<i>GYSVd-1</i>			+						
		<i>GYSVd-2</i>			+						
	<i>PBCVd</i>			+							
	Coleviroid	<i>CbVd</i>				+	+	+	+	+	+
<i>CbVd-1</i>					+	+	+	+	+	+	
<i>CbVd-2</i>					+	+	+	+	+	+	
<i>CbVd-3</i>					+	+	+	+	+	+	

Паралельно із пошуками гомології до бактеріальних IS-елементів, віроїди аналізували на гомологію із еукаріотними МГЕ, але ні для жодного віроїду її не виявили. Таким чином, на основі одержаних результатів, можна зробити висновок про

прокаріотне походження віроїдів, а саме: про залучення до цього процесу продуктів деградації бактеріальних IS-елементів (внаслідок рекомбінації між ними).



**Рис.2. Гомологія між фрагментами бактеріальних IS-елементів у віроїдів:**  
*a* – *CVd-III* (Арскавіроїд) і *CDVd* (некласифікований);  
*б* – *HSVd* (Hostuviroid) і *CVd-II* (некласифікований)

Зважаючи на те, що віроїди знайдено лише у рослинах і враховуючи бактеріальне походження хлоропластів, шукали маркерні IS-фрагменти серед інтронних послідовностей, генів рРНК і тРНК хлДНК у одного із представників цитрусових (*Citrus sinensis*), які є основними рослинами-господарями для 10 віроїдів. Натомість, у інтронних послідовностях хлДНК виявили сайти зв'язування для Р активатора біосинтезу флавоноїдних генів. Такі ж функціональні сайти було знайдено і у 20 із 38 віроїдів. Оскільки флавоноїди виконують захисні функції, забезпечуючи рослини від різноманітних несприятливих зовнішніх чинників [20], можна припустити, що віроїди супресуючи біосинтез флавоноїдних генів, знижують імунітет рослин.

### Висновки

Виявлено, що до утворення віроїдів залучені фрагменти бактеріальних IS-елементів і, можливо, фрагменти інтронних послідовностей хлДНК. Показано, що фрагменти бактеріальних IS-елементів можуть бути інформативними при класифікації віроїдів та як філогенетичні маркери. Очевидно, віроїди мають поліфілетичне, а не монофілетичне походження, як прийнято вважати дотепер.

### Література

1. Diener T.O. Subviral pathogens of plants: viroids and viroidlike satellite RNAs // FASEB J. - 1991.- vol. 5, № 13.- P. 2808-2813.
2. Diener T.O. Discovering viroids - a personal perspective // Nat. Rev. Microbiol.- 2003.- vol. 1, № 1.- P. 75-80.
3. Góra-Sochacka A. Viroids: unusual small pathogenic RNAs // Acta Biochim. Pol.- 2004.- vol. 51, № 3.- P. 587-607.
4. Tabler M., Tsagris M. Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents // Trends Plant Sci.- 2004.- vol. 9, № 7.- P. 339-348.

5. *Daròs J.A., Elena S.F., Flores R.* Viroids: an Ariadne's thread into the RNA labyrinth // EMBO Rep.- 2006.- vol. 7, № 6.- P. 593-598.
6. *Diener T.O.* Are viroids escaped introns? // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1981.- vol. 78, № 8.- P. 5014-5015.
7. *Collmer C.W., Hadidi A., Kaper J.M.* Nucleotide sequence of the satellite of peanut stunt virus reveals structural homologies with viroids and certain nuclear and mitochondrial introns // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1985.- vol. 82, № 10.- P. 3110-3114.
8. *Dinter-Gottlieb G.* Viroids and virusoids are related to group I introns // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1986.- vol. 83, № 17.- P. 6250-6254.
9. *Kiefer M.C., Owens R.A., Diener T.O.* Structural similarities between viroids and transposable genetic elements // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1983.- vol.80, №20.- P. 6234-6238.
10. *Trivedi S., Shekhawat G., Purohit S.* Analysis of similarities between viroid, prokaryote and eukaryote genome to revisit theories of origin of viroids // J. Cell and Mol. Biol.- 2007.- vol. 6, № 1.- P. 9-18.
11. *Kapitonov V.V., Jurka J.* Rolling-circle transposons in eukaryotes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 2001.- vol. 98, № 15.- P. 8714-8719.
12. *Feschotte C., Zhang X., Wessler S.* Miniature inverted-repeat transposable elements and their relationship to established DNA transposons / Mobile DNA II // Ed. Craig N.L., Craigie R., Gellert M., Lambowitz A.M. Washington DC: ASM Press, 2002.- P. 1147-1158.
13. *Rocheleau L., Pelchat M.* The Subviral RNA Database: a toolbox for viroids, the hepatitis delta virus and satellite RNAs research // BMC Microbiol.- 2006.- vol. 6.- P. 24.
14. *Siguièr P., Perochon J., Lestrade L., Mahillon J., Chandler M.* ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences // Nucleic Acids Research.- 2006, vol.34.- D32-36.
15. *Kohany O., Gentles A.J., Hankus L., Jurka J.* Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor // BMC Bioinformatics.- 2006.- vol. 7.- P. 474.
16. *Cui L., Veeraraghavan N., Richter A., Wall K., Jansen R.K., Leebens-Mack J., Makalowska I., dePamphilis C.W.* ChloroplastDB: the Chloroplast Genome Database // Nucleic Acids Res.- 2006.- vol. 34.- D692-696.
17. *Singh R.P., Nie X., Singh M.* Tomato chlorotic dwarf viroid: an evolutionary link in the origin of pospiviroids // J. Gen. Virol.- 1999.- vol. 80, № 11.- P. 2823-2828.
18. *Foissac X., Duran-Vila N.* Characterisation of two citrus apscaviroids isolated in Spain // Arch. Virol.- 2000.- vol.145, № 9.- P.1975-1983.
19. *Puchta H., Ramm K., Luckinger R., Hadas R., Bar-Joseph M., Snger, H.L.* Primary and secondary structure of citrus viroid IV (CVd IV), a new chimeric viroid present in dwarfed grapefruit in Israel // Nucleic Acids Res.- 1991.- vol.19, № 23.- P. 6640.
20. *The Science of Flavonoids* / Ed. Grotewold E. Springer, 2006.- 274 p.

### Резюме

Обнаружено, что в образовании вироидов могут принимать участие фрагменты бактериальных IS-элементов и, возможно, фрагменты интронных последовательностей хлДНК. Показано, что фрагменты бактериальных IS-элементов могут быть информативными при классификации вироидов и как филогенетические маркеры. Возможно, вироиды имеют полифилетическое, а не монофилетическое происхождение.

Fragments of bacterial IS-elements and probably fragments of intron sequences of chloroplast DNA have been shown to form viroids. Fragments of bacterial IS-elements have been shown to be informative for viroid classification and phylogenetic markers. Probably the viroids are of polyphyletic origin.

**ПОЛІЩУК Л.В.<sup>1</sup>, ЛУКЯНЧУК В.В.<sup>1</sup>, МАРІЄВСЬКИЙ В.Ф.<sup>2</sup>, РУБАН Н.М.<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup> Інститут мікробіології і вірусології НАН України,

Україна, Д03680, Київ, вул. акад. Заболотного, 154, e-mail: Polischuk@serv.imv.kiev.ua

<sup>2</sup> Інститут епідеміології та інфекційних хвороб АМН України,

Україна, 03038, Київ, вул. акад. Амосова, 5

## **ДОСЛІДЖЕННЯ НУКЛЕОТИДНОЇ ПОСЛІДОВНОСТІ ПЛАЗМІДИ pEC1257**

Одним з сучасних напрямків молекулярної біології і генетики є дослідження первинної будови хромосомних та плазмідних ДНК мікроорганізмів. Найпоширенішим сучасним методом встановлення нуклеотидної послідовності ДНК є сіквенування. Чисельні проекти сіквенування та аналізу ДНК в останні роки 20-го століття та на початку 21-го привели до встановлення послідовностей та опису геномів багатьох мікроорганізмів всіх головних таксономічних груп. Однією з перших була встановлена повна послідовність хромосомної ДНК *Escherichia coli* [1, 2,3].

Як відомо, плазміди мікроорганізмів детермінують ряд властивостей, що здатні забезпечувати виживання клітин-носіїв в несприятливих умовах. Таким чином, визначення нуклеотидної будови плазмідних ДНК корисне, як для дослідження фундаментальних біологічних процесів, так і має практичне значення, наприклад, для генно-інженерних та біотехнологічних робіт [4, 5].

### **Матеріали і методи**

В роботі аналізували гібридну плазмідну ДНК трансформанта *Escherichia coli* (Tr22) [6].

В експериментах використовували середовища МПА та МПБ, які містили ампіцилін в концентрації 100 мкг/мл.

Плазмідну ДНК з клітин трансформанта отримували за методикою Т. Kieser [7]. Електрофорез плазмідної ДНК проводили в 0,8 % агарозі в ТБЕ-буфері [8].

Сіквенс-аналіз проводили з використанням пари праймерів:

F-праймер 5'-GTAAAACGACCGCCAGT-3'

R-праймер 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'.

Визначення нуклеотидних послідовностей проводили на сіквенаторі SEQ2000XL "Beckman".

### **Результати та обговорення**

Штам *Escherichia coli* 1257 був виділений від хворого при спалаху внутрішньолікарняної інфекції. У штаму *Escherichia coli* 1257 було виявлено плазмиду pEC1257 (5,0 тпн) [9].

Було проведено клонування плазмиди pEC1257 в човниковому векторі pWHM4 (6,6 тпн). Конструювання гібридних плазмід провели з використанням ендонуклеази BamHI для якої обидві плазмиди мають по одному сайту рестрикції, таким чином гібридна молекула мала молекулярний розмір (11,6 тпн) і містила усю послідовність плазмиди pEC1257. В якості реципієнта для гібридної молекули ДНК використали штам *E. coli* JM109 [6].

Метою даної роботи було встановити нуклеотидну будову 2 фрагментів плазмиди pEC1257, які розташовані по обидва боки від сайту рестрикції для ендонуклеази BamHI. Для сіквенс-аналізу було використано плазмідну ДНК отриманого раніше трансформанта Tr22 [6].

Сіквенування ДНК— це набір біохімічних методів, який дозволяє встановити послідовність досліджуваної ДНК. Сучасні методи сіквенс-аналізу дозволяють швидко визначити первинну будову фрагменту ДНК довжиною 100 – 500 тпн. В теперішній час визначена нуклеотидна послідовність тисяч генів про- і еукаріот і ця інформація накопичена в ряді Інтернет-баз даних. Знаючи нуклеотидну послідовність окремого гена, можна визначити амінокислотну послідовність білка, що він кодує. Раніше для

встановлення первинної будови білка доводилося виконувати дуже дорогі та клопіткі процедури по виділенню та аналізу амінокислотної послідовності білка [1, 2, 3].

Було проведено сіквенування 2 фрагментів ДНК плазмиди рЕС1257, які прилягають до BamHI сайту рестрикції по якому було проведено клонування колійної плазмиди. Розміри визначених нуклеотидних послідовностей становили 534 пн (F-праймер) та 467 пн (R-праймер) (рис).

```
1   AGAGGATCCTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCCTGTA
51  ACGAAAAACGCCTGGGGAGCGTTTAGTCGAGGTTAGTCAGTTGGGGA
101 CTGCTTACCCGAGGTAAGTCTCAGCAGAGCGCANGATACCAAATACT
151 GTTCTTTCAGTGTAGCCGAGTTGGGCCATCACTTCAGAACTCTGTAGCA
201 TCGGATAATTTCGCTCGCTATTCGTACGTGCGCGCAGTGGCTTAGCTTTTA
251 CGGTGGACCAGAGAAGTACCGATAAGCCGCGTCGGCGACGGGGGTCGTG
301 CCACAGCCAGCTGGACGACNANCTAACCCAACTGAGGTACCACGCGTTA
351 CCCATNAAAAGCGCCGCCTTCCGAGGAAAAGGCGGACGGTTCGGTACC
401 GCCAGTTGACAGAACCACAGAAGTTCGGGACCCNTATTTTTATGTGTTNCC
451 CTGCTCCTATTTATAT
```

**Рис.** Визначена нуклеотидна послідовність плазмиди рЕС1257 (R-праймер).

Порівняння визначених нуклеотидних послідовностей плазмиди рЕС1257 з Інтернет-базами даних, які містить інформацію про визначені нуклеотидні послідовності ДНК мікро- і макроорганізмів дозволили виявити тотожність первинної будови фрагменту ДНК з рядом плазмідних та хромосомних ДНК різних видів мікроорганізмів. Наприклад, виявлено наявність тотожних послідовностей (гомологія становить 88-91%) плазмідних ДНК *Escherichia coli* (pColE1-H22, pCol-let, pColK-K235, рМН11, рСА4), *Acetobacter pasteurianus* (pAP2), *Erwinia amylovora* (pEA2.8), *Bacillus intermedius* (pET3ха-barn36), *Enterobacter cloacae* (HSD), *Klebsiella pneumoniae* (pKPN2) та деяких інших. Нуклеотидна будова даного фрагмента плазмиди рЕС1257 виявилася також гомологічною до послідовностей хромосомних ДНК ряду мікроорганізмів, наприклад, *Staphylococcus epidermidis* SR1 та *Vibrio cholerae*.

Значну гомологію нуклеотидної будови (до 91 %) виявлено для фрагменту плазмиди рЕС1257 (R-праймер) в 160 пн з послідовностями відрізка ДНК ряду плазмід *Escherichia coli*: pColE1-H22 (5,1 тпн), pCol-let (5,8 тпн), pColK-K235 (3,8 тпн), рМН11 (6,5 тпн) та інших.

Однак, за отриманими результатами сіквенс-аналізу однозначно визначити функцію даного фрагменту плазмиди рЕС1257 неможливо – гомологічними є нуклеотидні послідовності фрагментів ДНК плазмід та хромосом, для генів які входять до їх складу визначено детермінацію ензимів з різними функціями (стійкість до коліцинів і антибіотиків, рестриктазна активність, ферментація вуглеводів, протеїнів та ряду інших субстратів).

В зв'язку з тим, що послідовності ДНК з даною нуклеотидною будовою досить широко поширені серед мікроорганізмів різних родів та виявлені в складі плазмід - ми вважаємо, що цей фрагмент є консервативним за своєю первинною будовою.

Штам *Escherichia coli* 1257 був виділений від хворого під час спалаху ВЛІ [9]. Для штамів мікроорганізмів, що є збудниками ВЛІ характерна стійкість до антибіотиків, дезинфікуючих засобів та УФ-променів [10]. Встановлено, що стійкість до біоцидів (особливо антибіотиків) у збудників ВЛІ може детерминуватися плазмідними ДНК [11]. Крім того, для багатьох штамів *Escherichia coli* характерною є коліціногенія, яка, як відомо, детермінується плазмідами [4, 5].

Проведено дослідження резистентності госпітального патогену 1257 до 14 антибіотиків різної хімічної природи та механізмів дії. Встановлена резистентність штаму *Escherichia coli* 1257 до ряду антибіотиків, що належать до пеніцилінів,

лінкозамідів та макролідів. В той же час особливо чутливим штам виявився до антибіотиків цефалоспоринової групи цефазоліну та цефтриаксону [6]. Встановлена також здатність цього штаму кишкової палички засвоювати ряд вуглеводів та амінокислот.

Планується продовжити дослідження фізіологічних та біохімічних властивостей штаму *Escherichia coli* 1257 та визначити які з них мають плазмідну детермінацію.

### **Висновки**

Проведено сіквенс-аналіз нуклеотидної послідовності плазмиди pEC1257. Розміри визначених нуклеотидних послідовностей становили 654 пн (F-праймер) та 515 пн (R-праймер). Порівняння визначених нуклеотидних послідовностей плазмиди pEC1257 з Інтернет-базою даних, яка містить інформацію про визначені нуклеотидні послідовності ДНК дозволили виявити тотожність первинної будови фрагменту її ДНК з такими ряду плазмідних та хромосомних ДНК різних видів мікроорганізмів (ервіній, бацил, клебсієл, стафілококів, вібріонів та інш).

### **Література**

1. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. (Ред. С. Херрингтон, Дж. Макги) // Москва: Мир.- 1999.- 345 с.
2. Методы молекулярной генетики и генной инженерии. (Ред. Салганик Р.И.) // Новосибирск: Наука.- 1990.-256 с.
3. Экспериментальные методы исследования белков и нуклеиновых кислот (Ред. Прокофьев М.А.) // Москва: Издательство МГУ.-1985.- 279 с.
4. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии: Минск.-Высшая школа.- 1986.- 186 стр.
5. Брода П. Плазмиды//1982.- Москва: Мир.-220 с.
6. Марієвський В.Ф., Лук'янчук В.В., Поліщук Л.В., Рубан Н.М. Дослідження колийної плазмиди pEC1257 //Лабораторна діагностика.-2008 (у друці).
7. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli* // Plasmid.- 1984.-vol.12.- № 1.-P.19-36.
8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии // Москва: Мир.- 1984.-450 с.
9. Марієвський В.Ф., Рубан Н.М., Крелевецька Н.М., Лук'янчук В.В., Поліщук Л.В. Плазміда штама pEC1257//Лабораторна діагностика.-2006.-38.-№4.-стр. 35-37.
10. Зарицький А.М. Дезінфектологія .Ч.1.- Житомир: Рута.- 2001.- 383 с.
11. Russell A.D., Day M.J. Antibiotic and biocide resistance in bacteria\ Microbios.- 1996.-vol.85.-№342.-p.45-65.

### **Резюме**

Проведено сіквенс-аналіз колийної плазмиди pEC1257 (5,0 тпн). Порівняння встановлених нуклеотидних послідовностей фрагментів плазмиди pEC1257 з відповідними Інтернет-базами даних дозволили виявити тотожність (88-91%) первинної будови фрагменту її ДНК з рядом плазмідних та хромосомних ДНК мікроорганізмів, представників різних родів та видів

Проведено сиквенс-анализ колийной плазмиды pEC1257 (5,0 тпн). Сравнение определенных нуклеотидных последовательностей фрагментов плазмиды pEC1257 с соответствующими Интернет базами данных позволили выявить гомологию (88-91%) первичного строения фрагмента ее ДНК с рядом плазмидных и хромосомных ДНК микроорганизмов, представителей различных родов и видов.

Sequence analyze of *Escherichia coli* plasmid pEC1257 (5.0 bp) was carried out. Comparison of determined nucleotide sequences of plasmid pEC1257 with corresponding Internet databases have allowed real homology (88-91%) of primary structure of its fragment

DNA to a number of plasmid and chromosomal DNA of microorganisms, representatives of various species and genera.

**ТИЩЕНКО Е.Н., МИХАЛЬСКАЯ С.И., СЕРГЕЕВА Л.Е.**

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,  
Украина, 0302, Киев, ул. Васильковская 31/1, e-mail: oltyko@gmail.com*

### **НЕСТАБИЛЬНОСТЬ RAPD-АМПЛИКОНОВ СОИ ПРИ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ОКСИАНИОНАМ ВОЛЬФРАМА И ВАНАДИЯ**

Генетические аспекты устойчивости/толерантности культурных растений к разнообразным абиотическим факторам имеют важное фундаментальное и прикладное значение. Основными неблагоприятными факторами окружающей среды, оказывающими негативное влияние на процессы развития сельскохозяйственных культур и их продуктивность, являются засуха и засоление. Вместе с тем увеличивающееся в последнее время антропогенное загрязнение окружающей среды токсичными элементами ставит и эту проблему в число приоритетных. Актуальным является получение растительных форм с комплексной устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды.

Один из вопросов комплексной устойчивости связан с генетическим разнообразием в популяциях растений, которое является результатом изменчивости полинуклеотидных последовательностей ДНК и/или пloidности генома. Источником такого разнообразия может быть соматическая изменчивость при культивировании растений *in vitro* [1]. Однако, поиск новых форм с повышенной устойчивостью к комплексу абиотических факторов затруднен при использовании и традиционных, и биотехнологических методов селекции. В связи с чем нами [2] для гарантированного отбора ценных мутаций, возникающих при культивировании *in vitro* тканей растений, предложено направление клеточной селекции, которое заключается в создании моделированных систем *in vitro* с использованием токсичных концентраций ионов тяжелых металлов, которые даже в микроколичествах оказывают многовекторные стрессовые воздействия на растительный организм. Такой подход экспериментально обоснован на примере табака, а именно, получены клеточные линии и растения-регенеранты, обладающие уникальным свойством – комплексной толерантностью к разным типам засоления (хлоридному и хлоридно-сульфатному), водному стрессу и селективному агенту. В качестве последнего представляют интерес оксианионы вольфрама и ванадия, которые оказывают негативное воздействие на процессы дыхания и фосфорилирования в растениях [3]. К тому же, оксианион вольфрама является токсичным аналогом иона молибдена, входящего в состав кофактора нитратредуктазы – ключевого фермента ассимиляции нитрата, чувствительного к различным абиотическим стрессам [4].

Нами получены клеточные линии сои (*Glycine max* L., Merr), устойчивые к токсичным концентрациям вольфрамат-оксианионов. Такие линии показывают устойчивость к ионным и осмотическим стрессорам. Целью данной работы был анализ изменчивости ДНК вольфрамустойчивой клеточной линии (WR-линия) при действии летальных доз ванадатоксианионов.

#### **Материалы и методы**

ДНК исходного каллуса, индуцированного из листьев стерильных растений сои (*Glycine max* L., Merr.) сорта Киевская 27 (селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины), и полученной от него WR-линии, культивируемой в

присутствии летальной дозы оксианионов вольфрама или ванадия (по 1мМ), выделяли по модифицированному нами методу Деллапорта [5].

Уровень полиморфизма ДНК анализировали методом RAPD-анализа (Random Amplified Polymorphic DNA), используя 9 декамерных праймеров (табл.). Амплификацию ДНК осуществляли в программируемом приборе «Терцик» (Россия) в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 25-30 пг ДНК, 2,5 мкл 10-кратного реакционного буфера (Promega, без MgCl<sub>2</sub>), по 0,2 мМ каждого дАТФ, дГТФ, дТТФ, дСТФ, 0,3 мкМ праймера, 1 ед Tag-полимеразы ((Promega), 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>. На реакционную смесь наслаивали по 20 - 30 мкл минерального масла. Условия амплификации: предденатурация 94 °С, 3 мин; затем 42 цикла - денатурация 94 °С, 1 мин; отжиг – 36 °С, 1 мин; синтез – 72 °С, 2 мин; конечная элонгация 72 °С, 7 мин. Продукты реакции амплификации разделяли по размеру фрагментов путем электрофореза в 2,0 %- ном агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия в 1хТВЕ при напряжённости 3-4 в/см в течение 4-6 часов. Для количественной оценки продукты амплификации разной интенсивности представляли в виде бинарной матрицы, где наличие или отсутствие одинаковых по размеру фрагментов соответствовало значениям 1 и 0. Уровень гомологии и дивергенции ДНК, представленной в спектрах сравниваемых ампликонов, определяли по коэффициентам Жаккарда, учитывая воспроизводимые минорные и мажорные продукты синтеза 2-х биологических повторностей опыта.

#### **Результаты и обсуждения**

Исследование клеточных линий, устойчивых к летальным дозам стрессора, значительно расширяет представление об уровне структурно-функциональных изменений генома и позволяет получить информацию о молекулярно-генетических аспектах устойчивости как конечного результата реализации защитных механизмов растительных клеток, индуцируемых в ответ на неблагоприятные факторы окружающей среды.

Методом «плейтинга» получены WR-линии сои. При этом принципиальное значение имел выбор селективирующей (токсичной) концентрации стрессора. Ею считали такую минимальную концентрацию оксианионов вольфрама (1мМ), при которой полностью останавливался рост исходного каллуса и при последующем возврате в нормальные условия жизнедеятельность клеток не восстанавливалась. Если при переносе в нормальные условия пролиферация и рост клеток возобновлялся, то концентрацию этого стрессора постепенно повышали. Полученные клеточные линии в отличие от исходных каллусов выдерживали селективное давление 0,8 М маннита, а также по 1 % солей морской воды либо сульфата натрия, которые при культивировании *in vitro* моделируют условия ионных и осмотических стрессов.

При исследовании WR-линий сои на устойчивость к оксианионам ванадия показано, что они способны выдерживать летальные дозы этого стрессора, равные 1мМ. Помимо интегрального критерия устойчивости клеточных культур - относительного прироста биомассы каллуса для дифференциации неустойчивых и устойчивых клеточных линий использовали один из основных показателей необратимого перехода клеток на путь гибели – фрагментацию ДНК [5]. Показано, что под влиянием выбранной селективной концентрации ионов ванадия в отличие от устойчивых линий суммарная ДНК дикого штамма сои подвергается интенсивной дегградации с образованием непрерывного спектра фрагментов широкого диапазона молекулярных масс, где олигонуклеосомной фрагментации, характерной для программированной клеточной гибели, не наблюдается. Это свидетельствует о том, что токсичные концентрации оксианионов ванадия вызывают гибель клеток сои путем некроза.

Для изучения уровня генетической изменчивости ДНК исходного каллуса и WR-линий, культивируемой на питательных средах с 1мМ оксианионов вольфрама (WR<sup>W</sup>)



или ванадия ( $WR^V$ ), использовали RAPD-метод, позволяющий оценить вариабельность значительного числа локусов, распределенных на протяжении всего генома. Все используемые нами 9 произвольных декамерных праймеров с разной эффективностью обеспечивали синтез определенного набора фрагментов размером  $\sim 200 \div 3\,500$  п.н., количество которых составляло от 4 до 18.

Сравнение спектров амплификации ДНК исходного каллуса и полученной от нее WR-линий показало, что среди 111 синтезированных фрагментов наблюдается разница только для 4-х ампликонов (табл.). В частности, с использованием праймера 5'-GCG CAT TAG A-3' выявлено исчезновение фрагментов размером  $\sim 1550$  и  $1350$  п.н. у  $WR^W$ -линии, тогда как при применении праймера 5'-GGC TAG GGC A-3' у этой линии появлялся новый ампликон размером  $1700$  п.н. и отсутствовал фрагмент размером  $\sim 500$  п.н. Установленные различия могут быть результатом замены пар оснований в одном и/или обоих сайтах связывания праймеров ДНК, делециями или вставками последовательностей внутри амплифицируемых локусов ДНК. Индекс подобия и дивергенции составил  $0,964$  и  $0,036$ , соответственно.

Таблица

**Сравнительная характеристика продуктов амплификации ДНК исходного каллуса и WR-линий, культивируемой на питательных средах с  $1\text{мМ}$  оксианионов вольфрама ( $WR^W$ ) или ванадия ( $WR^V$ )**

Праймеры	Количество ампликонов		
	Исходный каллус	WR-линия	
		$WR^W$	$WR^V$
5'-CTC AGC CCA G-3'	16	16	16
5'-GCG CAT TAG A-3'	14 [1, 1]	12 [0, 0]	14 [1, 1]
5'-GGC TAG GGC A-3'	14[0, 1]	14[1, 0]	12[0, 0]
5'-ATC AAG CTG C-3'	8	8	8
5'-GGT TCC AGC T-3'	16	16	16
5'-CTG AGG CAA A-3'	4	4	4
5'-GAG CCA ACC G-3'	18	18	18
5'-CAC GGC GGG T-3'	13	13	13
5'-GCC ATC AAG A-3'	7	7	7
Всего	110	108	108

Примечание:

в квадратных скобках представлены вариабельные ампликоны, где 1 и 0 означают присутствие и отсутствие фрагмента, соответственно;

При чередовании стрессовых факторов, предполагая, что каждый из них может приводить к нестабильности генома, теоретически можно ожидать следующие варьирования в паттернах ампликонов ДНК исходного каллуса,  $WR^W$  и  $WR^V$ : 1-0-0, 1-1-0, 1-0-1, 0-1-1, 0-0-1, 0-1-0. Часть фрагментов присутствуют во всех спектрах амплификации (1-1-1). Только полиморфные фрагменты, идентифицированные в ДНК исходного каллуса и длительно культивируемой  $WR^W$ -линий, показывали вариабельность в ДНК  $WR^V$ . При этом под влиянием токсичных концентраций оксианионов ванадия новых ампликонов не синтезировалось, однако происходило их варьирование. Так, фрагменты размером  $\sim 1550$  и  $1350$  п.н., которые отсутствовали у  $WR^W$ -линии, появлялись у  $WR^V$ , а ампликон размером  $\sim 1700$  п.н., который не наблюдался в ДНК исходного каллуса, исчезал в спектре  $WR^V$ . Фрагмент размером  $\sim 500$  п.н. был присущ только ДНК исходного каллуса. То есть, при использовании указанных праймеров наблюдали следующие типы изменений в ампликонах: 1-0-0, 1-0-1, 0-1-0. Тот факт, что для 3-х из 4-х полиморфных ампликонов имеет место их появление/ исчезновение (1-0-1, 0-1-0) в спектре  $WR^V$ , свидетельствует об

изменчивости полинуклеотидных последовательностей ДНК сои при чередовании летальных доз оксианионов вольфрама и ванадия. Такая реверсия ампликонов позволяет сделать предположение о наличии в геноме сои локусов, повышенная нестабильность которых обусловлена действием различных стрессовых факторов. Не исключено, что помимо ионов W и V определенный вклад вносят и условия культивирования *in vitro*.

Следует отметить, что данные о дифференциальной нестабильности одних и тех же последовательностей в ДНК растений немногочисленны. В частности, генетический полиморфизм установлен при изменении уровня пloidности (тетраплоид → диплоид → тетраплоид) в культуре *in vitro* с использованием колхицина у *Eragrostis curvula*, где ревертантные ампликоны включают в большинстве случаев некодирующие последовательности, хотя среди них встречаются и гомологи генам [6]. Элвис и соавт. [7] предполагают существование в геноме ржи «горячих зон мутагенеза». Преимущественные точки локализации FB-транспозона позволяют частично объяснить этот феномен. Тем не менее механизмы, связанные с нестабильностью конкретных локусов генома растений, не ясны.

Таким образом, идентифицированы RAPD-ампликоны, дифференциально синтезируемые с ДНК WR-линии при чередовании стрессоров – оксианионов W и V. Предположено наличие в геноме сои локусов, повышенная нестабильность которых обусловлена действием различных стрессовых факторов.

#### Литература

1. Larkin P.J., Scowcroft W.R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // Theor. Appl Genet.- 60. – P.167-214.
2. Сергеева Л.Е. Изучение комплексной устойчивости ванадий- и вольфрамустойчивых клеточных линий табака // Физиология и биохимия культ. растений. - 2000.- т.32, №6.- С.490-493.
3. Ridge I., Omer J., Osborne D.J. Different effects of vanadate on net proton secretion in the fern *Regnellidium diphyllum* and the dicotyledon *Nymphoides peltata*: relevance to cell growth// J. Plant Physiol.–1998.–153.–№ 3/4.–P.430-436.
4. Deng M., Moureaux T., Caboche M. Tungstate, a molybdate analog inactivating nitrate reductase, deregulates the expression of the nitrate reductase structural gene //Plant Physiol. - 1989. – 91.- P.304-309.
5. Тищенко Е.Н., Даскалюк Т.М., Михальская С.И. Марьюшкин. Денатурация ДНК при старении створок бобов сои // Біополімери і клітина. – 2004. – 20, №5. – С.410-415.
6. Mecchia M.A., Ochogavia A., Selva J.P., Laspina N., Felitti S., Martelotto L.G., Spangenberg G., Echenique V., Pessino S.C. Genome polymorphisms and gene differential expression in 'back-and-forth' ploidy-altered series of weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*) // Journal of Plant Physiology. – 2007. – 164, №8. – С.1051-1061.
7. Alves E., Ballesteros I., Linacero R., Vazques A.M. RYS1, a foldback transposon, is activated by tissues culture and `shows preferential insertion points into the rye genome // Theor. Appl. Genet. – 2005. – 111. - P.431-436.

#### Резюме

Установлено наличие одних и тех же RAPD-ампликонов, дифференциально синтезируемых с ДНК вольфрамустойчивой клеточной линии сои (*Glycine max* L., Merr.) при действии летальных доз оксианионов вольфрама или ванадия, а также её исходного штамма. Предположено наличие в геноме сои локусов, повышенная нестабильность которых обусловлена действием различных стрессовых факторов.

Встановлено наявність одних і тих RAPD-ампліконів, які диференційно синтезуються з ДНК вольфрам стійкої клітинної лінії сої (*Glycine max* L., Merr.) за дії

летальных доз оксианионів вольфрама або ванадія. Припущена наявність у геномі сої локусів, підвищена нестабільність яких обумовлена дією різних стресових факторів.

Using lethal dose of oxyanions W or V the same RAPD-amplicons that are differentially synthesized from DNAs of tungsten-resistant cell line as well as their wild culture of soybean (*Glycine max* L., Merr.) are shown. The presence of instable loci in genome of soybean under different stressors are under discuss.

**ФЕДОРОВА Н.Б., ЧАДОВА Е.В.**

*Институт цитологии и генетики СО РАН,*

*Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. акад. Лаврентьева, 10, тел.(383)333 2976,*

*e-mail:bonife@bionet.nsc.ru*

### **МУТАЦИЯ В ОНТОГЕНЕ ДРОЗОФИЛЫ ВЫЗЫВАЕТ ПЕРЕМЕЩЕНИЕ РЕТРОТРАНСПОЗОНА 412**

Генетическая нестабильность (ГН) – картина, характерная для ряда явлений: канцерогенеза, гибридного дисгенеза, отдаленных последствий облучения. Несмотря на очевидную общность характера ГН и связь явлений между собой, до сих пор ГН рассматривается в каждой из этих трех областей изолированно. В общем случае под ГН понимают «длительное сохранение отклонений в строении и функционировании генетического аппарата, ДНК - белкового комплекса» [1]. ГН выражается в длительном образовании с высокой частотой точковых мутаций, хромосомных перестроек, канцерогенезе, анеуплоидии, хронической гибели части клеток в культурах *in vitro*.

Механизмы индукции и поддержания ГН дискутируются. В случае облучения причины возникновения ГН связывают с прямым повреждением ДНК и продуктов цитоплазмы. Одной из причин ГН при канцерогенезе предполагается анеуплоидия [2]. Феноменология ГН связана с увеличением транспозиционной активности мобильных генетических элементов (МЭ). Для канцерогенеза это - мобилизация ретровирусных элементов, для гибридного дисгенеза - систем МГЭ типа Р-М и I-R [3]. Облучение тоже является индуктором транспозиционной активности МГЭ. Под действием облучения скорости инсерций увеличиваются более чем на порядок величин [4].

Ранее нами был обнаружен новый класс мутаций – мутации генов, управляющих онтогенезом (онтогены) [5, 6]. Формально генетически это - факультативные доминантные летальные мутации (ФДЛ). Их факультативность (условность) заключается в том, что у особей одного генотипа они проявляют летальное действие, у особей другого генотипа – не проявляют. Перестройки способны снимать летальное действие ФДЛ [7], сохраняя тем самым мутации в популяции. Мутация в онтогене может сохраниться и в том случае, если она возникнет в уже перестроенном геноме. Последующая дестабилизация генома связана с массовыми перемещениями МЭ и феноменологически схожа с картиной дисгенеза.

#### **Материалы и методы**

Линии *Drosophila melanogaster*. Для получения мутаций была использованы линии дикого типа - *Berlin wild* и *Barnaul* и изогенная линия 51 с мутацией *radius incompletus, ri* (III; 47сМ). Для ведения в культурах и выявления свойств мутаций использовали линии: 1) *yellow (y)*; 2) *C(1)DX, y w f /Y*; 3) *Muller-5* и 5) *net dp b pr cn/In(2LR)Cy, Cy dp<sup>lv1</sup> pr Bl cn<sup>2</sup> L<sup>4</sup>*.

Получение мутаций (ФДЛ). Для получения мутаций в X-хромосоме самцов дрозофилы *Berlin wild* и изогенной линии 51 облучали  $\gamma$ -лучами в дозе 30 Gr. Через три часа их скрещивали с самками *C(1)DX, y w f /Y*, несущими сцепленные X-хромосомы,

свободную Y-хромосому и цепочку маркеров. Тестирование на наличие ФДЛ проводили путем индивидуального скрещивания полученных сыновей с самками линии *yellow*. Признаком наличия ФДЛ является отсутствие самок в их потомстве. В каждом из опытов анализировали потомство от 3 тысяч индивидуальных скрещиваний.

Поддержание культур. Мутации в X-хромосоме содержали двумя способами: на сцепленных X-хромосомах *C(1)DX*, *y w f/Y*, или на комплексной инверсии *Muller-5*.

Образование диморфных линий. При переводе мутаций в X-хромосоме – 7 и 18 из культур со сцепленными X-хромосомами в культуры с *Muller-5* возникли особи с новым фенотипом: мутантный фенотип имели самки, самцы внешне были нормальны.

Для исследования транспозиционной активности МЭ 412 у мутантов исследовали локализацию 412 элемента в двух диморфных линиях с ФДЛ - 7 и №18, в изогенной линии 51 и в контрольной линии 3С. Линии 7, 18 и 3С были получены на основе исходной линии 51, самцы из которой были взяты для облучения. Линии 7 и 18 по результатам тестирования содержали ФДЛ, а линия 3С, пройдя все этапы получения, не проявила признаков наличия ФДЛ.

**Гибридизация.** Для локализации сайтов, содержащих копии МЭ 412 применяли FISH-гибридизацию меченого зонда с полнотелыми хромосомами слюнных желез дрозофилы. В линиях исследовали выборки из 10 личинок, анализируя в среднем по 25 ядер на препарат. В качестве зонда использовали ДНК клона pOR708, несущего полноразмерную копию 412 элемента в составе вектора pBR322. Мечение зонда проводили методом НИК-трансляции.

Для оценки статистической достоверности транспозиционных эффектов – инсерций и эксцизий применили критерий Фишера для редких событий.

#### **Результаты и обсуждение**

##### **Феноменология дестабилизации генома**

Коллекция лаборатории на данный момент насчитывает более 100 мутаций онтогенов в X-хромосоме и аутосомах. Дальнейшее изучение ФДЛ показало, что мутации приводят к дестабилизации генома [8, 9], феноменология которой кратко изложена ниже.

**«Разлеталивание».** Мутации поддерживали двумя способами - в культурах с инверсией *In(1) Muller-5* и на сцепленных X - хромосомах. Потеря летального действия мутаций была обнаружена через год после получения мутаций: самцы из нескольких культур в скрещивании с самками *yellow* стали давать дочерей. За 4 года из 23 летальных мутаций 9 мутаций полностью потеряли летальность, а 5 перешли в разряд полеталей [9].

##### **Потеря проявления доминантной мутации в оппозиционной хромосоме.**

Летальные мутации в аутосоме 2, поддерживающиеся в гетерозиготе с инвертированной хромосомой *In(2LR)Cy*, *Cy Bl L<sup>4</sup>*, характеризуются «потерей» проявления доминантных мутаций *Cy*, *Bl* и *L<sup>4</sup>* в инвертированной хромосоме. Потеря происходила в скрещиваниях при поддержании мутаций и в скрещиваниях между мутантными культурами. За полгода поддержания мутаций было замечено 20 случаев потери проявления: в 17 случаях произошла потеря одного маркера, в 3 случаях – двух [9].

**Хромосомная нестабильность.** В потомстве самок - гетерозигот по инверсии *Muller-5* и мутации в X-хромосоме с самцами *yellow* возникает большое количество патроклинных самцов *yellow*: они находились в потомстве 20 мутаций из 21, причем у 11 мутаций доля патроклинных самцов была очень высокой - более 10% потомства. Образование патроклинных самцов свидетельствует о потере X-хромосомы во время образования ооцита или о мейотическом нерасхождении X-хромосом [10]. Исследование других мутаций онтогенов показало, что в оогенезе мутантов происходят оба процесса [8].

**Единичные и массовые модификации.** В культурах мутаций появляются волны *фенокопий*. В одном или нескольких поколениях воспроизводится тот или иной фенотип известных мутаций: *black, purple, brown, trident, abnormal abdomen, Notch, yellow, Dichaete* и др. Попытка закрепить новый фенотип в отводке оказывается безуспешной [9].

**Массовое образование морфозов.** Выщепление новых фенотипов в культурах мутаций онтогенов происходит на фоне образования разнообразных односторонних морфологических дефектов клонального типа - морфозов [6, 8, 9]. Они не наследуются, но наследование мутаций онтогенов обеспечивает образование морфозов в каждом поколении культур. По частоте встречаемости в культурах морфозы намного превосходят мутации и модификации.

**Образование видимых мутаций.** В процессе поддержания культур с ФДЛ среди особей нормального фенотипа возникают особи, соответствующие фенотипам известных мутаций. Изменения фенотипа наследуются, причем мутации могут иметь полную и неполную пенетрантность. Так, в культурах возникли мутации с полной пенетрантностью типа *plexus, dumpy, brown* и с неполной - *cubitus interruptus, radius incompletus, black*. Фенотипически проявляющиеся мутации образовывались и целыми наборами в одном или в следующих друг за другом поколениях [9].

#### Перемещение МЭ 412 в диморфных линиях

Среди мутаций онтогенов в X – хромосоме, полученных на основе изогенной линии № 51, были получены две мутации с видимым фенотипическим проявлением: «коротконожка» (7) и «прерванная жилка» (18). Мутации были рецессивными и диморфными: самки имели мутантный фенотип, а самцы были фенотипически нормальны [12]. Фенотип мутации 18 представлен прерыванием радиальной жилки крыла, а фенотип мутации 7 («коротконожка») складывается из четырех компонентов: 1) отсутствия четырех члеников лапок на каждой ноге; 2) косо срезанных крыльев; 3) прерывании радиальной жилки на крыльях и 4) образовании пузырей на одном или двух крыльях.

Исследовали уровни транспозиционной активности мобильного элемента (МЭ) 412 в линиях 7, 18 и контрольной линии 3с. Линия 3с была получена в ходе того же эксперимента, в котором были получены 7 и 18 линии, но не содержала ФДЛ. Она была использована для оценки увеличения частот транспозиций, вносимого процедурой выведения линий.

Согласно критерию Фишера ( $F_{\phi}$ ), ни по инсерциям, ни по эксцизиям линия 3С не отличается от исходной 51 линии. Это означает, что сама методика получения линий с ФДЛ не показала значимых отличий от контроля (табл. 1).

Таблица 1

Числа инсерционных (новых) и эксцизионных (утраченных) позиций МЭ 412 при изогенизации линии *forked* и в диморфных линиях с ФДЛ

Исследованные линии	Изогенизация (контроль – гетерог.)		Исследованные линии (контроль - 51)			Исследованные линии (контроль - 3С)	
	3	5	3 С	7	18	7	18
Число новых позиций	15***	11**	7	15**	6	13***	5
Число утраченных позиций	3	5	2	5	13**	12**	17***
Всего позиций в линии	48	42	50	64	49	64	49

Примечание. Достоверные отличия по Фишеру ( $F_{\phi}$ ): \*\* $P > 0,99$ , \*\*\* $P > 0,999$ .

Диморфные линии достоверно отличаются от 51 контрольной линии: 7 линия - по инсерциям, а 18 – по эксцизиям. При этом частоты инсерций и эксцизий находятся на уровне частот при изогенизации (левая часть табл. 1), наиболее мощном из известных индукторов перемещений МЭ [11].

Более высокие частоты инсерций 412 элемента в 7 линии и частоты эксцизий в 18 линии в сравнении с линией 3С (контроль – изогенная линия 51) дают возможность предполагать, что видимая и генетически выявленная нестабильность генома в диморфных линиях присутствует и на молекулярном уровне. Сравнение транспозиционной активности МЭ 412 7 и 18 линий с уровнем 3С (правая часть табл. 1) дает возможность оценить генетическое своеобразие линий, несущих ФДЛ. Линия 7 достоверно отлична от 3С и по инсерциям, и по эксцизиям, а линия 18 – по эксцизионной активности элемента.

### **Выводы**

Полученные данные о высоких частотах перемещения МЭ 412 согласуются с генетическими свидетельствами нестабильности линий с мутациями в онтогенах. Мутацию в онтогене можно рассматривать как ключевое событие, переводящее геном из стабильного состояния в нестабильное. Образование ФДЛ, а затем комплекса «доминантная леталь + перестройка», по нашему мнению, является наиболее перспективным для последующего видообразования [12]. Становление нового вида будет связано с переустройством его регуляторной системы, что на генетическом уровне обеспечивается массовыми перемещениями МЭ генома.

### **Литература**

1. *Ярмоненко С.П., Вайнсон А.А.* Радиобиология человека и животных. Москва: Высшая школа, 2004. 550 с.
2. *Duesberg P., Rausch C., Rasnick D., Hehlmann R.* Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Nov (10), 95 (23). P. 13692-13697.
3. *Хесин Р.Б.* Непостоянство генома. Москва: Наука. 1985. 472 с.
4. *Забанов С.А., Васильева Л.А., Ратнер В.А.* Индукция транспозиций МЭ Dm 412 при помощи  $\gamma$  – облучения в изогенной линии *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1995. Т. 31. № 6. С. 798-803.
5. *Чадов Б.Ф., Чадова Н.Б., Копыл С.А., Федорова Н.Б.* Новый класс мутаций у *Drosophila melanogaster* // Докл. РАН. 2000. Т. 373. №5. С. 714-717.
6. *Чадов Б.Ф.* Факультативные доминантные летали: генетика, онтогенез и филогенез // Эволюционная биология: Материалы II конф. "Проблема вида и видообразования" / Под ред. В.Н. Стегния. Томск: Томский государственный ун-т. 2002. Т. 2. С. 118-142.
7. *Чадов Б.Ф., Чадова Е.В., Хоцкина Е.А., Артёмова Е.В., Федорова Н.Б.* Главное действие хромосомной перестройки – изменение работы регуляторных генов. Генетика. 2004. Т. 40. № 7. С.723-731.
8. *Чадов Б.Ф., Чадова Е.В., Копыл С.А., Хоцкина Е.А., Федорова Н.Б.* Гены, управляющие онтогенезом: морфозы, фенкопии, диморфы и другие видимые проявления мутантных генов // Генетика. 2004. Т.40. № 3. С. 353-365.
9. *Чадов Б.Ф., Чадова Е.В., Хоцкина Е.А., Федорова Н.Б.* Мутация в онтогене – дестабилизация генома – формообразование. В кн. «Эволюционная биология» (под ред. В.Н. Стегния ) г. Томск : Томский государственный университет. 2005. Т.3. С. 92-106.
10. *Bridges C.B.* Nondisjunction as proof of the chromosome theory of heredity // Genetics. V.1. P.1-52, 107-162.
11. *Ратнер В.А., Васильева Л.А.* Индукция транспозиций и эксцизий мобильных генетических элементов у дрозофилы в процессе изогенизации // Генетика. 1996. Т.32. № 7. С.933-944.
12. *Чадов Б.Ф., Чадова Е.В., Копыл С.А., Артёмова Е.В., Хоцкина Е.А., Федорова Н.Б.* От генетики внутривидовых отличий к генетике внутривидового сходства // Генетика. 2004. Т.40. № 9. С.1157-1172.

### **Резюме**

Факультативные доминантные летали (ФДЛ) являются мутациями регуляторных генов, управляющих онтогенезом (онтогенов). Линии, содержащие ФДЛ, демонстрируют высокую нестабильность. В двух диморфных линиях с ФДЛ обнаружили множественные перемещения ретротранспозона 412. Считаем, что мутация в онтогене является ключевым событием, переводящим генотип из стабильного состояния в нестабильное.

**ЧУМАЧЕНКО А.Г., МЯЗИН А.Е., РАМАЙЯ Л.К., ПОМЕРАНЦЕВА М.Д., ШАЙХАЕВ Г.О., РУБАНОВИЧ А.В.**

*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова, РАН, Москва.*

*E-mail: a\_chumachenko@mail.ru*

### **ВЛИЯНИЕ ОБЛУЧЕНИЯ НА ТРАНСГЕНЕРАЦИОННУЮ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ RAPD-МАРКЕРОВ ПОТОМКОВ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C**

Одним из факторов экспериментальной и естественной микроэволюции является воздействие ионизирующих излучений, как природного, так и техногенного происхождения. Поэтому, актуальной проблемой радиационной генетики, на разрешение которой направлены многие современные исследования, является изучение эффектов воздействия ионизирующих излучений, передающихся по наследству от облученных родителей потомству. Значительная часть таких исследований посвящена изучению явления геномной нестабильности (НСГ)[1-4]. При этом большое внимание уделяется возникновению полиморфизма в высоковариабельных микро- и минисателлитных локусах, для которых была показано повышение частоты мутаций вследствие воздействия физических и химических факторов, в первую очередь – ионизирующей радиации.

В данной работе была поставлена задача исследовать генетический эффект облучения в дозе 3 Гр, проявляющийся у потомков облученных мышей, с использованием оценки полиморфизма RAPD-маркеров (random amplified polymorphic DNA). К настоящему времени опубликован ряд работ, в которых с помощью RAPD-теста, были обнаружены радиационно-индуцированные эффекты, передающиеся потомкам облученных мышей и человека [5, 6, 7].

#### **Материалы и методы**

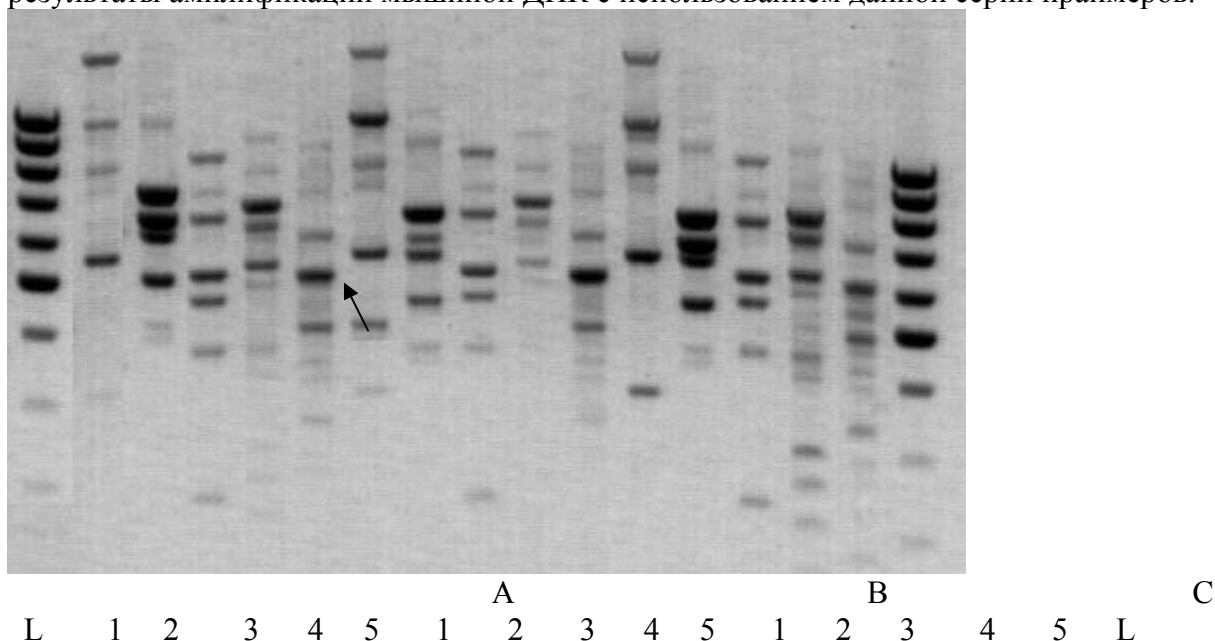
RAPD-анализ основан на использовании серии случайных праймеров. Электрофореграммы продуктов такой амплификации дают картину, специфичную для данного генома, так называемые ДНК-фингерпринты, «отпечатки пальцев ДНК». При этом предварительное секвенирование генома данного организма не требуется. Это позволяет широко применять данный метод для филогенетических исследований, для стандартизации пород, линий, сортов и штаммов. Следовательно, RAPD-анализ является ценным методом для радиационно-генетического мониторинга, поскольку дает возможность мультилокусного «сканирования» гипервариабельных локусов в геноме практических любых организмов, являющихся объектами мониторинга. Минусом является низкая воспроизводимость электрофореграмм, связанная с высокой чувствительностью метода к изменению параметров амплификации и состава реакционной смеси. Большое значение имеет стабильность работы полимеразы и количество матричной ДНК. То есть, требуется предварительная отработка условий, с целью стандартизации реакции.

Мышей-самцов линии BALB/c облучили в дозе 3 Гр на установке ГУПОС-1 (4,5 Гр/мин, <sup>137</sup>Cs). Через три месяца после облучения, самцов скрестили с самками той же

линии. В этом случае в оплодотворении участвовали спермии, облученные на стадии стволовых сперматогониев. Потомство контрольных и облученных самцов содержали в стандартных условиях и забивали в возрасте 3-4 недель. Выделение ДНК из печени и ПЦР проводили с помощью наборов Diatom DNAprep и GenePak PCR Core (ООО «Изоген»), руководствуясь прилагаемыми инструкциями. Программа амплификации состояла из 35-ти циклов: Тд- 95 °С, 25 сек, Тм – 42 (циклы 1-4), затем- 58 °С (циклы 5-35), 5 сек, Тс- 74 °С, 80 сек. Для ПЦР использовали программируемый термостат ПТ-48 (ООО «ТДЛ»). Сочетание использования ингибированной полимеразы и повышения температуры отжига в процессе амплификации, обеспечило высокую воспроизводимость результатов ПЦР. Продукты амплификации разделяли в 1,5%-ном агарозном геле. Для гель-документации использовали видеосистему Gel Imager. Результаты анализа электрофореграмм обрабатывали статистически.

#### Результаты и обсуждение

Предварительно из 20-ти схожих по составу праймеров были отобраны девять (табл. 1), которые были использованы в дальнейшей работе. На рис.1 представлены результаты амплификации мышинной ДНК с использованием данной серии праймеров.



**Рис.1.** Электрофореграмма RAPD-маркеров облученного самца (А), потомка (В) и самки (С). 1- 759, 2- 760, 3- 765, 4 – М1, 5- М2, L- ладдер 1000-100 п.о. Стрелочкой отмечена неродительская полоса.

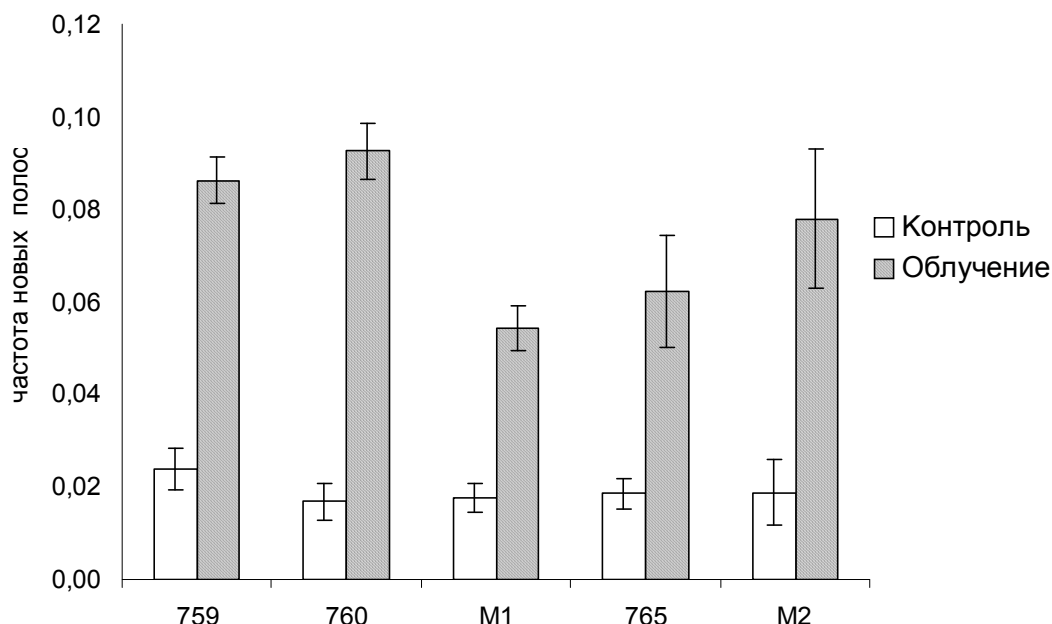
Анализ RAPD-профилей потомков контрольной и опытных групп проводили по таким параметрам, как процент новых, «неродительских полос», и средняя частота появления новых полос на одно животное. Всего была проанализирована ДНК 98-ми потомков опытной и 97-ми - контрольной группы (табл.2). В силу специфики метода, реакция полимеризации должна всегда проходить в стандартных условиях. Поэтому, была использована ингибированная полимеразы в составе лиофилизированных смесей. Для повышения воспроизводимости результатов, была отработана программа амплификации, включающая в себя циклы с более низкой температурой отжига (42°С).

Нами обнаружено увеличение процента и частоты неродительских полос у потомков облученной группы относительно контрольной группы. В зависимости от праймера, данные показатели в 3-6 раз превышали контрольные значения. Средняя частота новых полос в контрольной группе была примерно одинакова (Рис.2).

Повышение уровня полиморфизма RAPD-маркеров, а так же повышение частот мутаций в микро- и минисателлитных локусах, в потомстве родителей, подвергшихся хроническому либо острому облучению, отмечено в ряде работ. Например, Безлепкии и



др. [5] обнаружили в потомстве мышей линии BALB/c, подвергшихся хроническому облучению в дозах 0,25-0,5 Гр, достоверное увеличение частоты появления неродительских полос в сравнении с контролем. Острое облучение в дозах 0,5-2 Гр также приводило к увеличению уровня полиморфизма ДНК в потомстве [6]. Dubrova et al [8] выявили повышенную частоту минисателлитных мутаций методом ДНК-фингерпринтов в потомстве мышей линии СВА/Н подвергшихся острому и хроническому воздействию нейтронов (0,125-0,5 Гр) и рентгеновских лучей (0,5-1 Гр).



**Рис.2.** Средняя частота появления «неродительских» полос на одного потомка опытной и контрольной группы.

Неожиданно высокий уровень минисателлитных мутаций был обнаружен у детей, родители которых подвергались облучению в зонах радиоактивного загрязнения в Могилевской области после Чернобыльской аварии. Уровень этих мутаций у потомства облученных родителей существенно превышал ожидаемые значения точечных мутаций, определяемых по кодирующим локусам [9]. В работе [8] приводятся результаты обследования с помощью RAPD и inter-SSP-PCR детей ликвидаторов последствий Чернобыльской аварии, у которых отмечено достоверное увеличение частоты неродительских полос. Следовательно, результаты, полученные в настоящей работе, не противоречат литературными данными.

Еще в 50-60-ые годы двадцатого века были показаны различия в чувствительности к мутагенному действию ионизирующей радиации половых клеток на разных стадиях сперматогенеза. По литературным данным, наименьшую генетическую радиочувствительность проявляют сперматогонии, тогда как сперматиды и сперматозоиды обладают наибольшей радиочувствительностью. Но также следует отметить, что результаты исследований по генетической радиочувствительности стволовых половых клеток и сперматогониев противоречивы и не дают представления о природе возникающих вследствие облучения мутаций [10]. Примененный нами методический подход позволил выявить повреждения, полученные премейотическими половыми клетками в результате облучения и реализовавшиеся в потомстве как увеличение уровня полиморфизма RAPD-маркеров. При этом, высокий уровень полиморфизма выявляется, несмотря на селективные процессы, происходящие в ходе созревания половых клеток, и направленные на элиминацию клеток с

повышенным уровнем поврежденности ДНК. Обнаруженный повышенный полиморфизм RAPD-маркеров может являться следствием как спонтанных генетических мутаций, так и трансгенерационного явления НСГ в потомстве облученных родителей, которая могла реализоваться в ходе клеточной пролиферации, имеющей место в процессах гаметогенеза, а так же в процессе эмбриогенеза и постнатального развития организма.

#### **Выводы**

Обнаружено увеличение процента и частоты неродительских полос у потомков облученной группы в сравнении с контрольной группой

#### **Литература**

1. *Morgan W.F., Day J.P., Kaplan M.I.* Radiat. Res. 1996. V. P. 247-258
2. *Little J.B.*// Int. J. Radiat00. Biol. 1998. V. 74. P. 663-671.
3. Genetic Instability and Tumorigenesis / Ed. M.B. Kastan. B.: 1997. 210 p.
4. *Шевченко В.А.* Последствия Чернобыльской катастрофы: Здоровье человека/ Под.Ред. Е.Б. Бурлаковой. М.: ЦЭПР, 1996, с 50-67.
5. *Безлепкин В.Г., Васильева Г.В., Ломаева М.Г., Сирота Н.П., Газиев А.И.* Радиационная биология. Радиоэкология, 2000, т. 40, №5, с. 506-512.
6. *V. Bezlepkina, G. Vasil'eva, M. Lomaeva, N. Sirota, A. Gaziev* Genetic Consequences of Emergency Radiation Situations. Proceedings. Moscow, June 10-13, 2002. p. 45-46
7. *Weinberg H., Korol A., Kirzhner V. et al.* Proc. R. Soc. Lond. B(2001) 268, p. 1001-1005.
8. *Dubrova Yu, Plumb M., Brown J. and Jeffreys A.* Int. J. radiat. Biol. 1998, v. 74, № 6, 689-696.
9. *Dubrova Yu, Nesterov V., Krouchinsky N. et al.* Nature, vol. 380, April 1996.
10. *Шевченко В.А., Померанцева М.Д.* Генетические последствия действия ионизирующих излучений. М.: Наука, 1985, 279 с.

#### **Резюме**

С помощью RAPD-анализа мы изучали трансгенерационные последствия облучения. Анализ RAPD-профилей потомков контрольной и опытных групп проводили по таким параметрам, как процент новых, «неродительских полос», и средняя частота появления новых полос на одно животное. Обнаружено увеличение процента и частоты неродительских полос у потомков облученной группы в сравнении с контрольной группой.

За допомогою RAPD-аналізу ми вивчали трансгенерационні наслідки опроміювання. Аналіз RAPD-профілів нащадків контрольної і досвідчених груп проводили по таких параметрах, як відсоток нових, «небатьківських смуг», і середня частота появи нових смуг на одна тварина. Виявлено збільшення відсотка і частоти небатьківських смуг у нащадків опроміненої групи порівняно з контрольною групою.

By random amplified polymorphic DNA we studied trasgeneration consequences of radiation treatment. We estimated RAPD-patterns in offspring of experimental and control groups according to the rates of new "not parental bands" and the average frequency of appearance new bands per mouse. We revealed increase of rate and frequency not parental bands in offspring of irradiated group relatively control group.

## МЕХАНИЗМИ ВЗАЄМОДІЇ ТА ЕКСПРЕСІЇ ГЕНЕТИЧНИХ СИСТЕМ

**АЗАРИН К. В.**

*Южный федеральный университет, биолого-почвенный факультет,  
Россия, 344112, Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая, 105, e-mail: azkir@rambler.ru*

### МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ СТРУКТУРЫ ГЕНА, КОНТРОЛИРУЮЩЕГО СИНТЕЗ УРАТОКСИДАЗЫ

Кодирующие макромолекулы эволюционируют с разными скоростями. Наибольшую консервативность проявляют гены и белки «домашнего хозяйства» контролирующие основные и наиболее древние жизненные функции и процессы, которые идентичны или генетически подобны у многих форм жизни. Одним из таких древних метаболических путей является процесс катаболизма пуринов. Ключевой фермент пуринового метаболизма уриказы (*uox*), катализирует превращение мочевой кислоты в аллантаин. Аллантаин и мочевая кислота являются одними из важных звеньев «неферментативной части» антиоксидантной системы, обеспечивающих адаптацию к воздействию разнообразных факторов [1, 2,]. Мочевая кислота, превращается под действием уриказы в аллантаин, который способен выполнять роль тушителя свободных радикалов как часть общей антиоксидантной системы. Помимо этого, экспериментально была показана высокая антимуtagenная активность аллантаина [2]. Тем не менее, при интерпретации данных по антиоксидантной активности аллантаина у человека необходимо учитывать то, что мочевая кислота также обладает определенной антиоксидантной активностью. При этом нужно учесть, что урат является основным катаболитом азотсодержащих соединений у высших приматов. В связи с чем, целью данной работы было исследование антиоксидантного потенциала аллантаина и мочевой кислоты при помощи апробированной нами ранее методологии и анализ свойств и закономерностей в последовательности ДНК гена *uox* на молекулярно – генетическом уровне.

#### **Материал и методы**

Материалом для молекулярно-генетического исследования послужили нуклеотидные последовательности ДНК генов уратоксидазы из базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Для множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей использовалась программа CLUSTAL W [3] пакета программ BioEdit Sequence Alignment Editor [4]. Генетические дистанции между всеми возможными парами индивидуальных последовательностей ДНК измерялись с помощью так называемого "дистанционно - матричного" метода, где последовательности попарно сравниваются друг с другом (DNADIST) [5]. Предсказание вторичной структуры белка проводили с помощью программы PSSFinder, использующей Марковские цепи ([www.softberry.com](http://www.softberry.com)) и PSIPRED [6, 7]. Расчет и сравнение профилей гидропатии проводили с помощью программ Tmred, SOSUI, TopPred (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/kPROT/>) и ProtScale по шкале гидрофобности Kyte-Doolittle. Моделирование последовательностей путем внесения случайным образом мутации было сделано в EMBOSS MsBar ([www.bioportal.cgb.indiana.edu/cgi-bin/emboss](http://www.bioportal.cgb.indiana.edu/cgi-bin/emboss)).

Антиоксидантную активность урата и аллантаина *in vivo* оценивали методом биолюминесцентного анализа SOS-ответа клеток *E.coli* на действие перекиси водорода [2, 8]. Фактор индукции определяли как отношение интенсивности свечения суспензии штамма PT-1 (pPLS-1), содержащей тестируемое соединение, к интенсивности контрольной пробы. Для коррекции результатов использовали штамм C600(pPLS-5), Lux-оперон которого находится под контролем конститутивного промотора (9). Для определения способности антиоксидантов подавлять генерацию  $O_2^{\cdot -}$  использовали разработанную методику [10]. Данные по СУА антиоксидантов представляли в виде единиц активности супероксиддисмутазы, рассчитанных согласно Фридовичу [11].

## Результаты и обсуждение

В ходе анализа были выявлены 12 консервативных регионов гена уриказы, которые практически неизменны у всех исследованных позвоночных, включая как несинонимичные, так и синонимичные мутации.

Данные регионы могут, как входить в состав активного центра, так и быть ответственными за формирование пространственной структуры. Присутствие таких консервативных участков может свидетельствовать о давлении отбора направленного как на активный, так и на псевдо ген *uox* в случае высших приматов. Была предсказана вторичная структура аминокислотной последовательности уриказы. В результате структурного анализа выборки последовательностей, обнаружен детерминизм распределения локально упорядоченных жестких сегментов полипептидной цепи – альфа-спиралей и бета-тяжей. Однако на протяжении длительной эволюции приматов ген *uox* сохранял функциональность и только у гоминид произошло превращение гена в псевдоген. В этой связи возникает вопрос, достаточно ли прошло времени, чтобы за счёт случайно фиксированных мутаций нарушились все поддерживающиеся до этого времени консервативные мотивы и предсказанная вторичная структура белка. Расстояние между геном мыши и человека 49 замен, а расстояние между геном мыши и маргышек – 25. То есть в гене *uox* *H. sapiens* 24 «сверхнормативно» фиксированных мутаций на общую длину 915 н.п., или 2.6%. Можно предположить, что 2.6% перечисленных замен локализуются в переменных областях по случайным причинам. С этой целью путём моделирования было внесено случайным образом по 24 мутации в последовательность функционального гена *uox* *M. mulatta*. На полученных таким образом 50 последовательностях, было проверено насколько нарушаются консервативные мотивы и предсказанная вторичная структура. Консервативные регионы, неизменные у всех исследованных позвоночных с активным геном *uox*, сохраняют эту тенденцию и у *H. sapiens*, где частота мутирования составляет 0.0%. Частота мутирования этих участков в модельных последовательностях от 22% до 46%. То есть, в среднем вероятность возникновения случайной замены составляет 35.5% для каждого консервативного региона, что на высоком уровне значимости ( $P = 0.001$ ) отличается от последовательности *H. sapiens*. Следовательно, с высокой вероятностью можно судить, что разница между распределением мутаций носит не случайный, а систематический характер.

Анализируемые последовательности гена *uox* по значениям генетических дистанций образуют два крупных кластера, первый из которых состоит из последовательностей ДНК характерных для млекопитающих, а второй – для земноводных. Генетические дистанции между *Xenopus tropicalis* и млекопитающими находятся в пределах от 0.456 до 0.475, где минимально значение относится к *Sus scrofa*, а максимальное к *M. musculus*. Типы гена *uox* приматов по генетическим дистанциям вначале образуют 2 группы, разделяющие обезьян Нового и Старого света. Дистанция между *Aotus trivirgatus* и *H. sapiens* равняется 0.054. Наибольшее различие с приматами Нового света наблюдается для вида *Gorilla gorilla* (0.058), следующим идёт *Hylobates lar* и *P. troglodytes* (0.053). В общем, кластер, объединяющий Hominoidea, отличается более высокими генетическими дистанциями в отношении *Aotus trivirgatus*, тогда как для кластера Cercopithecidae они снижены и приобретают наименьшее значение у *Papio hamadryas* (0.041). Генетические дистанции в группе приматов не превышают расстояние между близкими видами *M. musculus* и *Rattus norvegicus*.

Результаты влияния урата и аллантаина на индуцированный перекисью водорода SOS-ответ клеток *E. coli* показали, что урат, также как и аллантаин, проявляет антимутагенную активность практически, во всех вариантах опыта. Максимальная активность регистрируется для концентрации  $10^{-3}$  М. Максимальная активность регистрируется для аллантаина в концентрации  $10^{-4}$  М. В отличие от урата, его

активность сохраняется и при его малых концентрациях –  $10^{-10}$  -  $10^{-11}$ М. Максимальное значение антимутагенной активности аллантина превышает аналогичный показатель для урата в 1,37 раза.

Данные по СУА аллантина и мочевой кислоты показывают, что для аллантина увеличение концентрации не приводит к достоверному росту СУА, тогда как для урата обнаружена явная зависимость эффекта от дозы. Максимум супероксидустраняющей активности проявляет урат в концентрации  $10^{-5}$ М. Это указывает на значительную роль мочевой кислоты в качестве клеточного протектора от активных форм кислорода, таких как супероксид-анион.

### **Выводы**

Мочевая кислота, как показано выше, является эффективным тушителем гидроксильных и супероксид радикалов. С повышением концентрации урата, вследствие *Uox*- мутаций [12], связывают увеличение продолжительности жизни у человека и снижение уровня возрастных раковых заболеваний [1]. С другой стороны, в результате атаки мочевой кислоты свободными радикалами образуется аллантин, обладающий свойствами антиоксиданта, антимутагена и витамина [2]. Таким образом, неферментативная генерация аллантина у видов, потерявших уриказную активность, может отражать развитие адаптационной составляющей окислительного стресса. В организме существует целый ряд взаимосвязанных антиоксидантных систем, основная роль которых заключается в поддержании гомеостаза клеток и тканей при действии экстремальных факторов, обладающих прооксидантными свойствами. Низкомолекулярные антимутагены - это лишь часть системы защиты от ДНК-тропных воздействий. Но эта часть отражает эволюционное развитие метаболизма, сложившегося в аэробных условиях и несущего определенную антиокислительную нагрузку. Полученные в этой работе данные дают материал для рациональной оценки места урата и аллантина в системе антиоксидантной защиты. Совокупность таких антиоксидантов, как мочевая кислота и аллантин, вносит вклад в общий антиоксидантный пул метаболизма, величина которого имеет важнейшее адаптивное значение.

### **Литература**

1. Ames B.N., Cathcart R., Schwiers E., Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. -1981. – vol. 11, - P. 6858-6862.
2. Гуськов Е.П., Клецкий М.Е., Корниенко И.В., Олехнович Л.П., Чистяков В.А., Шкурат Т.П., Прокофьев В.Н., Жданов Ю.А. Аллантин как тушитель свободных радикалов // ДАН, серия Биохимия, Биофизика – М. - 2002. - Т. 383, № 2. -с.105-107.
3. Tompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions - specific gap penalties and weight matrix choice. // Nucl. Acids Res. - 1994. – vol. 22,- P. 4673–4680.
4. Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids. Symp. -1999. – vol. 41, - P. 95-99.
5. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. // Brief. Bioinform. - 2004. – vol. 2. – P. 150-163.
6. McGuffin L.J, Bryson K., Jones D.T.. The PSIPRED protein structure prediction server // Bioinformatics. – 2000.- vol. 16,- P. 404-405.
7. Jones D.T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. J. Mol. Biol.- 1999.// vol. 292,- P. 195-202.
8. Птицын Л.Р. Биолюминесцентный анализ SOS-ответа клеток *Escherichia coli* // Генетика.- 1996. - № 3,- с. 354-358.
9. Сазыкина М.А., Чистяков В.А., Войнова Н.В. Способ определения генотоксичности химических веществ.// Патент РФ № 2179581. 2001.

10. Чистяков В.А., Корниенко И.В., Клецкий М.Е., Корниенко И.Е., Лисицын А.С. Новиков В.В. Супероксидустрояющая активность некоторых аминокислот в водных растворах. // Биофизика.- 2005.- т.50, №4- с. 601-605.
11. Imlay, J.A., Fridovich I. J. Biol. Chem.- 1991.- vol. 226, - P. 6957-6965.
12. Oda M., Satta Y., Takenaka O., Takahata N. Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications // Molecular Biology and Evolution.- 2002.- vol. 19,- P. 640-653

### Резюме

Анализ структурной организации гена уриказы показал, что он представлен системой коротких консервативных регионов, стабильных у всех исследованных позвоночных. Урат способен более эффективно, чем аллантиин «перехватывать» супероксид анион, проявляя в то же время меньшую способность инактивировать действие перекиси водорода.

Analysis of structural organization of *uox* gene showed, that *uox* gene consists of a short conservative region unchanging in all investigated vertebrates. Urat can more effectively than allantoin "intercept" superoxide anion, but at the same time urate showed less ability to inactivate free radicals responsible for the DNA-destructive activity of hydrogen peroxide.

### АНДРИЕВСКИЙ А. М.

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,  
Украина, 65026, Одесса, ул. Дворянская, 2, e-mail: andriev\_scar@mail.ru

## ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗНООБРАЗИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ КАРБОКСИЭСТЕРАЗ У ДРОЗОФИЛ И ОТДЕЛЬНЫХ ВИДОВ КЛАССА *INSECTA*

Ферментативные системы являются важнейшими интегративными компонентами биохимического фенотипа и в определённой мере отражают степень адаптации живых организмов к условиям среды обитания [1]. Одна из таких систем представлена карбоксиэстеразами, гидролизующими разнообразные сложные эфиры карбоновых кислот [2]. К сожалению, группа эстеразных ферментов отдельных видов животных, как в онтогенетическом, так и в филогенетическом аспектах практически не изучена [3]. В связи с этим, целью данной работы было исследовать филогенетические особенности разнообразия и экспрессии молекулярных форм карбоксиэстераз у представителей рода *Drosophila*, а также провести сравнительный анализ по изучаемым биохимическим признакам отдельных видов класса насекомых.

### Материалы и методы

В экспериментах, направленных на исследование филогенетических особенностей экспрессии карбоксиэстераз у дрозофил использовали такие виды насекомых как: стрекоза коричневая (*Orthetrum cancellatum*), златоглазка обыкновенная (*Chrysoperla carnea*), трихограмма (*Trichogramma pentoi*, *Trichogramma evanescens*), муравей рыжий лесной (*Formica rufa*), комар грибной (*Bradysia pilistriata*), комар хаборус (*Chaoborus species*), мухи: падальная синяя, мясная серая, комнатная, бабочница, плодовая мушка чернотелая, плодовая мушка мужественная и другие представители рода *Drosophila* (*Calliphora species*, *Coprosarcophaga haemorrhoidalis*, *Musca domestica*, *Psychoda phalaenoides*, *Drosophila melanogaster*, *Drosophila virilis*, *Drosophila species*, *Drosophila species*, *Drosophila species*).

Опытные образцы для электрофоретического разделения готовили, гомогенизируя ткани в 0,1 М глицин-NaOH буфере pH 9,0 в соотношении 1 : 10. Ферментсодержащие экстракты получали путём центрифугирования гомогенатов при 10 000 g в течение 15 мин. После проведения щелочного электрофореза карбоксиэстеразы выявляли с помощью совместно используемых субстратов  $\alpha$ -нафтилацетата и  $\beta$ -нафтилацетата [4, 5, 6]. Полученные энзимограммы использовали для установления числа молекулярных форм карбоксиэстераз у каждого конкретного вида организмов, определения числа  $\alpha$ -специфичных форм эстераз,  $\beta$ -специфичных форм эстераз и эстераз со смешанной субстратной специфичностью. Кроме того, определяли число медленноподвижных форм эстераз ( $Rf$  0,000 – 0,330), среднеподвижных ( $Rf$  0,330 – 0,660) и быстроподвижных ( $Rf$  0,660 – 1,000).

#### **Результаты и обсуждение**

Полученные нами данные по разнообразию молекулярных форм карбоксиэстераз у представителей разных таксономических категорий позволяют судить о том, что в процессе филогенетического развития у насекомых происходили существенные изменения в системе эстеролитических ферментов, отражающие соответствующие адаптации к условиям среды существования. В этой связи основными показателями исторического преобразования исследуемой системы на наш взгляд являются количество молекулярных форм эстераз, отражающие разнообразие биохимических функций, и как следствие этого – субстратная специфичность, указывающая на конкретную реализацию отдельной функции определенного фермента.

По нашим данным насекомые по показателям разнообразия карбоксиэстераз представляют собой наиболее интересную группу животных организмов, что, скорее всего, связано с типами питания на различных этапах онтогенеза, а также со сложными перестройками самого организма в процессе индивидуального развития. Так, у личинок стрекозы коричневой нами обнаружено 5 форм карбоксиэстераз, одна из которых обладает довольно высокой нафтилацетазной активностью.

Необычайно ярким по выраженности активности оказался спектр карбоксиэстераз трихограмм. Из шести молекулярных форм – 3 обладают  $\alpha$ - $\beta$ -нафтилацетазной активностью и 2 –  $\beta$ -нафтилацетазной.

Карбоксиэстеразный спектр другого представителя перепончатокрылых – муравья лесного рыжего – оказался также весьма разнообразным: из подавляющего большинства (6 форм) медленноподвижных и среднеподвижных эстераз чётко выделяется одна фракция  $\beta$ -специфичной карбоксиэстеразы.

В отличие от вышеописанных видов, спектр изучаемых ферментов златоглазки обыкновенной представлен нами в онтогенезе насекомого. У эмбрионов златоглазки эстеразы экспрессируются крайне слабо, хотя уже на этой первой стадии цикла развития усматривается их субстратная  $\alpha$ -специфичность. Существенного уровня активности ферментативная система достигает на стадии личинки, и в это время наиболее выражено проявляются среднеподвижные эстеразы, гидролизующие как  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -нафтилацетат. В то же время обнаруживается медленноподвижная форма  $\beta$ -специфичной эстеразы. На стадии куколки экспрессия эстераз со смешанной специфичностью достигает максимума. Вполне вероятно, что эти ферменты на стадии покоя выполняют крайне важную экстеро-липазную функцию, направленную на гидролиз жиров, депонированных личинкой-хищником. На стадии имаго, как у самцов, так и у самок, экспрессия той же группы эстераз заметно снижается; при этом по отдельным фракциям ферментов обнаруживается полиморфизм. Индивидуальное развитие комара грибного нами представлено стадиями личинки и имаго, которые существенно различаются по разнообразию и степени выраженности молекулярных форм эстераз. У питающихся мицелием вешенки личинок идентифицируется 7 основных фракций ферментов, причем 6 из них проявляют  $\alpha$ - $\beta$ -специфичную активность, тогда как  $\beta$ -специфичный энзим отсутствует вовсе. У непитающихся же

самцов и самок имаго большинство личиночных форм карбоксиэстераз сохраняется, однако их каталитическая активность менее выражена.

По сравнению с комаром грибным, у комара-звонца электрофоретический спектр карбоксиэстераз оказался намного беднее. Крайне слабо выраженными представлены единичные формы эстераз эмбрионов; значительно сильнее экспрессируются эстеразы у личинок и куколок, а имагинальные особи, очевидно, ввиду редукции пищеварительной системы и ослабления пищеварительной функции демонстрируют низкий уровень экспрессии всех форм карбоксиэстераз.

Судя по нашим данным, радикальные преобразования система карбоксиэстераз претерпевает у мух (таблица 1): появляются дополнительные формы ферментов, по некоторым из них обнаруживаются аллозимные варианты, у всех представителей прослеживается наличие одной, двух и более форм  $\beta$ -специфичной эстеразы, представленной отдельными аллозимными вариантами; у подавляющего большинства представителей этой группы двукрылых определяется широкий спектр субстратной специфичности. Так, у мухи падальной синей из 8 отдельных форм эстераз – 5 проявляют  $\beta$ -специфичность и 3 являются неспецифичными. В расчёте на одну особь все формы эстераз этой мухи являются очень высоко экспрессивными, что вполне соответствует основному типу её питания, предусматривающему утилизацию разнообразных сложных эфиров, и в том числе жиров, разлагающихся организмов. Чётким, однако менее разнообразным оказался эстеразный спектр у мухи мясной серой. Он насчитывает всего три хорошо различающиеся фракции со смешанной и  $\beta$ -специфичной ферментативной активностью. У мухи комнатной выявлено 5 форм карбоксиэстераз, как и у предыдущих двух видов мух, характеризующихся медленной и средней электрофоретической подвижностью и, в основном, сходным отношением к используемым нами субстратам.

Интересным объектом оказалась муха-бабочница, в тканях которой насчитывается, как минимум 6 высокоактивных форм карбоксиэстераз, пять из которых проявляют явную  $\beta$ -специфичность по отношению к  $\beta$ -нафтилацетату и, кроме того, распределяются по всем зонам электрофоретической подвижности в ходе электрофореза. В онтогенезе этой мухи происходят существенные преобразования в системе карбоксиэстераз, по-видимому, связанные с переходом насекомого на другой тип питания.

Таблица 1

**Разнообразие молекулярных форм карбоксиэстераз у отдельных представителей отряда *Diptera***

№	Виды	$\Sigma Mff$	$\Sigma S$ ,	$\Sigma M$ ,	$\Sigma F$ ,	$\Sigma$ $\alpha$ -эстераз	$\Sigma$ $\alpha$ - $\beta$ -эстераз	$\Sigma$ $\beta$ -эстераз
			<i>Rf</i> 0 – 0,330	<i>Rf</i> 0,330 – 0,660	<i>Rf</i> 0,660 – 1			
1	<i>Calliphora species</i>	8	3	5	0	0	3	5
2	<i>Coprosarcophaga haemorrhoidalis</i>	3	2	1	0	0	1	2
3	<i>Musca domestica</i>	5	3	2	0	1	2	2
4	<i>Psychoda phalaenoides</i>	6	3	2	1	1	0	5
5	<i>Drosophila species</i>	5	5	0	0	1	2	2
6	<i>Drosophila melanogaster</i>	6	6	0	0	1	3	2
7	<i>Drosophila virilis</i>	8	4	2	2	1	6	1
8	<i>Drosophila species</i>	7	4	1	2	1	5	1
9	<i>Drosophila species</i>	7	3	2	2	0	7	0

Примечание:  $\Sigma Mff$  – общее количество молекулярных форм ферментов;  $\Sigma S$ , *Rf* 0 – 0,330 – количество медленноподвижных молекулярных форм,  $\Sigma M$ , *Rf* 0,330 – 0,660 – количество среднеподвижных молекулярных форм,  $\Sigma F$ , *Rf* 0,660 – 1 – количество быстроподвижных молекулярных форм;  $\Sigma \alpha$ -эстераз – количество  $\alpha$ -специфичных молекулярных форм,  $\Sigma \alpha$ - $\beta$ -эстераз – количество  $\alpha$ - $\beta$ -специфичных молекулярных форм,  $\Sigma \beta$ -эстераз – количество  $\beta$ -специфичных молекулярных форм.

Наиболее подробно в филогенетическом аспекте нами были изучены представители семейства *Drosophilidae*. Среди них – 3 неустановленных вида характеризовались сходным общим количеством форм карбоксиэстераз, охватывающих весь диапазон субстратной специфичности, за исключением вида, расположенного в таблице 1 под номером 9. Как у самок, так и у самцов имаго этой дрозофилы практически не экспрессировалась  $\beta$ -специфичная эстераза, обычная для других



представителей рода *Drosophila*. Кроме того, ацетилэстераза не проявляла строгой  $\alpha$ -специфичности по отношению к используемым субстратам, хотя и обладала сходной с аналогичным ферментом других видов электрофоретической подвижностью. Однако, что интересно, у этого вида, как и у другого, условно названного *Апаратской* линией, обнаруживаются одна-две быстроподвижные формы карбоксиэстераз, явно представляющие собой аллозимы одного и того же фермента. Это указывает на существование в популяциях данных видов полиморфизма по соответствующему локусу обнаруженной карбоксиэстеразы. Весьма сходным, однако несколько более богатым оказался энзимный спектр *Drosophila virilis* и, в отличие от дрозофилы чернотелой, он также как и спектры неустановленных нами видов, содержит две формы сверхподвижных эстераз.

Анализируя карбоксиэстеразные спектры отдельных видов дрозофил, можно прийти к выводу о том, что их система карбоксиэстераз представлена большим количеством (5 – 8) молекулярных форм, обладающих разной субстратной специфичностью и характеризующихся определенным межвидовым сходством.

### **Выводы**

1. Представители рода *Drosophila* характеризуются большим разнообразием молекулярных форм карбоксиэстераз. 2. Среди эстераз дрозофил присутствуют ферменты, обладающие групповой субстратной специфичностью, а также эстеразы, избирательно действующие на  $\beta$ -изомеры сложных эфиров. 3. По наличию средне- и быстроподвижных форм  $\beta$ -специфичной эстеразы изучаемые виды дрозофил сходны с большинством представителей отряда *Diptera*. 4. Разнообразие индивидуальных форм  $\beta$ -специфичной эстеразы у различных представителей насекомых указывает на наличие генетически обусловленного полиморфизма по данному биохимическому признаку. 5. Экспрессия всех исследуемых форм карбоксиэстераз у представителей отряда двукрылых носит онтогенетически зависимый характер. 6. Экспрессия и разнообразие молекулярных форм карбоксиэстераз у представителей рода *Drosophila* являются как организменными, так и популяционно-видовыми адаптациями, отражающими особенности филогенеза группы плодовых мушек.

### **Литература**

1. Голубцов А.С. Внутрипопуляционная изменчивость животных и белковый полиморфизм. – М.: Наука, 1988. – 168 с.
2. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. – М.: Мир, 1982. – Издание в 3-х томах. – Т. 1. – 389 с.
3. Глазко В. И., Созинов И. А. Генетика изоферментов животных и растений. – Киев: Урожай, 1993. – 528 с.
4. Андриевский А. М., Тоцкий В. Н. Генетическая структура экспериментальной популяции *Drosophila melanogaster*, полиморфной по локусу  $\beta$ -фильной карбоксиэстеразы // Цитология и генетика, 2006. – Т. 40, № 6. – С. 3 – 10.
5. Андриевский А. М. Половой диморфизм по экспрессии эфиров карбоновых кислот в популяциях *Drosophila melanogaster* // Вісник ОНУ, 2006. – Т. 11, Вип. 9. – С. 7 – 17.
6. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшая школа, 1973. – 320 с.

### **Резюме**

Методом электрофореза анализировали многообразие молекулярных форм карбоксиэстераз у отдельных видов дрозофил и других представителей класса *Insecta*. Установлено количество и субстратная специфичность ферментов исследуемых видов насекомых. Показано межвидовое сходство и различие по изучаемым биохимическим признакам. Выявлены филогенетические особенности формирования системы карбоксиэстераз у представителей рода *Drosophila* относительно других видов класса насекомых.

Методом електрофорезу аналізували різноманітність молекулярних форм карбоксиестераз у окремих видів дрозофіл та інших представників класу *Insecta*. Встановлено кількість та субстратна специфічність ферментів досліджуваних видів комах. Показано міжвидову схожість та відмінності за певними біохімічними ознаками. Виявлено філогенетичні особливості формування системи карбоксиестераз у представників роду *Drosophila* відносно інших видів класу комах.

A variety of molecular forms of carboxylesterases in some species of drosophila and other representatives of class *Insecta* has been analyzed with the help of electrophoresis. There are established quantity and substrate specificity of enzymes in investigated species of insects. Interspecific similarity and distinction in some biochemical attributes are shown. Phylogenetic features of system carboxylesterases formation at representatives of sort *Drosophila* concerning other species of class *Insecta* are revealed.

**БОГУСЛАВСКИЙ Д.В.<sup>1</sup>, ЗАХАРОВ И.С.<sup>2</sup>, БАЛАБАН П.М.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, РАН;  
Россия, Москва, 117485, ул. Бутлерова, 5А, e-mail: boguslavsky@rambler.ru

<sup>2</sup>Институт биологии развития, РАН;  
Россия, Москва, 119991, ул. Вавилова, 26, e-mail: iszakharov@yandex.ru

### **РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК - ПРЕДШЕСТВЕННИК НЕЙРОПЕПТИДОВ ПИЩЕВОГО ПОВЕДЕНИЯ**

Одной из важнейших проблем современной биологии является изучение экспрессии генов, которые в большом количестве описаны у животных и человека. Физиологические воздействия на молекулярные механизмы экспрессии генов должны быть особенно важны в нервной системе, в которой экспрессируется наибольшее количество генов, и где такие воздействия оказывают существенное влияние на пластичность нервных клеток и синапсов. Что касается генов, локально экспрессирующихся в ЦНС в физиологически идентифицированных нейронах, изучение их экспрессии впервые начато в нашей лаборатории (Bogdanov et al., 1994). Была обнаружена экспрессия отдельных генов в группах нейронов, участвующих в реализации определенного типа поведения.

В нашей лаборатории был открыт новый ген, названный preHelixSFamid, экспрессирующийся в группе серотонинергических нейронов виноградной улитки *Helix lucorum*, вовлеченных в модуляцию работы нейросети. Последовательность preHelixSFamid гомологична последовательности таких пептидов, как LymnaDFamide и педального пептида тритонии. Препропротеин preHelixSFamid состоит из гидрофобного лидера в N-концевой части и десяти предположительно амидируемых пептидов (Рис.1). *In situ* гибридизация и окрашивание антителами показало селективную экспрессию гена preHelixSFamid в отдельных идентифицированных нейронах педального, церебрального и плеврального ганглия. Эта экспрессия коррелирует с проявлением пищевого поведения. Было показано увеличение количества клеток, экспрессирующих preHelixSFamid у голодных улиток. Также показано достоверное увеличение количества нейронов, транскрибирующих preHelixSFamid у ювенильной улитки до начала активного питания. По-видимому, пептиды preHelixSFamid участвуют в организации пищевого поведения виноградной улитки.

Met Leu Leu Val Lys Glu Thr Met Glu Lys Arg Arg Phe Asp Ser Ile Ser Gly His Ser Pro Phe Gly Ser Phe Gly Lys Arg Glu Asp Glu Glu Lys Arg Arg Phe Asp Ser Ile Ser Gly His Ser Ser Phe Gly Ser Phe Gly Lys Arg Lys Glu Glu Lys Arg Arg Phe Asp Ser Ile Ser Gly Leu Ser

*Ser Phe Gly Ser Phe Gly Lys Arg Glu Asp Gly Glu Lys Arg Arg Phe Asp Ala Ile Ser Gly Leu Ser Ser Phe Gly Ser Phe Gly Lys Arg Asp Asp Gly Glu Lys Arg Arg Phe Asp Ser Ile Ser Gly Leu Ser Ser Phe Gly Ser Phe Gly Lys Arg Arg Gly Glu Lys Arg Arg Phe Asp Ser Ile Ser Gly Leu Ser Ser Phe Gly Ser Phe Gly Lys Arg Asp Asp Gly Glu Lys Arg Arg Phe Asp Ser Ile Ser Gly His Ser Pro Phe Gly Ser Phe Gly Lys Arg Asn Asp Glu Glu Lys Arg Arg Phe Asp Ser Ile Ser Gly His Ser Ser Phe Gly Ser Tyr Gly Lys Arg Glu Asp Glu Glu Lys Arg Arg Phe Asp Ser Ile Ser Gly Leu Ser Ser Phe Gly Ser Phe Gly Lys Arg Glu Asp Gly Glu Lys Arg Arg Phe Asp Ser Ile Ser Gly His Ser Ser Phe Gly Ser Tyr Gly Lys Arg Lys Lys Lys Arg Asp Asp Leu Ile Leu Phe Leu Ala*

**Рис.1.** Первичная структура белка кодируемого геном preHelixSFamid. Курсивом выделены пептиды, жирным шрифтом – места протеолиза, подчеркнут гидрофобный лидер в N-концевой части белковой молекулы.

#### **Материалы и методы**

##### ***Приготовление зонда к мРНК***

Открытая рамка считывания изучаемого гена была клонирована в вектор pBSK II + (pBluescript II SK+; Stratagene) по сайту рестрикции Not I. Смысловая мРНК синтезировалась с промотора T7, соответственно антисмысловая – с T3. Перед синтезом вектор был линейаризован рестрикцией по сайту Sac I (для синтеза смысловой мРНК) и по сайту Kpn I (для синтеза антисмысловой мРНК). После чего плазмидную ДНК очищали через легкоплавкую агарозу.

##### ***Гибридизация in situ на whole-mount препаратах***

Изолированную ЦНС виноградной улитки фиксировали 2 часа в 4% растворе параформальдегида. Затем инкубировали трижды по 5 мин. в буфере PTW (1X PBS, 0,1% Tween 20) и дегитратировали путем последовательной инкубации в растворах PTW/метанол 3:1, 1:1 и 1:3 по 10 мин., после чего ткани переносили на 5 мин. в метанол. Регидратация тканей проводилась путем их перенесения в вышеупомянутые растворы в обратном порядке. После регидратации препараты обрабатывали 10 - 15 мин. раствором протеиназы К (Boehringer, 10 мкг/мл) в PTW. Препараты ЦНС подвергали постфиксации в 4% параформальдегиде на 1X PBS в течение 20 минут. Затем ЦНС 2 раза промывали раствором глицина (2мг/мл) в PTW и дважды PTW. Препараты ЦНС дважды промывали 0,1 М раствором триэтаноламина гидрохлорида (рН 8.0), помещали в свежий раствор триэтаноламина гидрохлорида и по каплям при постоянном помешивании добавляли уксусный ангидрид из расчета 12,5 мкл на 5 мл. Данную смесь инкубировали 5 мин. и затем к ней опять добавляли такое же количество уксусного ангидрида с последующей инкубацией в течение 5 мин. Препарат несколько раз промывали PTW и помещали в гибридизационный буфер, содержащий 50% формамид, 5 мМ ЕДТА, 5X SSC, 1X раствор Денхардта (0,02% фиколл, 0,02% поливинилпирролидон и 0,02% BSA), 0,1% Tween20 и 0,5мг/мл тРНК. Предгибридизацию проводили 6-8 часов при 50°C.

Гибридизацию проводили в гибридизационном буфере при 50°C 12-14 часов. Концентрация зонда к мРНК, меченного дигоксигенином составляла 0,3-0,5 мкг/мл. Непрогибридизовавшуюся пробу отмывали последовательными инкубациями при 60°C следующими растворами: 50% формамид/5X SSC/1% SDS; 50% формамид/ 2X SSC/ 1%SDS и дважды 0,2X SSC. Каждая инкубация с вышеупомянутыми растворами длилась по 30 мин. После этого образцы несколько раз промывали буфером PBT (1X PBS, 0,1% TritonX100, 2мг/мл BSA) и инкубировали 60-90 мин. при 4°C в растворе PBT, содержащем 10% инактивированной теплом нормальной овечьей сыворотки.

К препаратам затем добавляли PBT, содержащий 1% инактивированной теплом нормальной овечьей сыворотки и конъюгированные со щелочной фосфатазой антитела к дигоксигенину (Boehringer Mannheim, разведение 1:1500), и инкубировали при постоянном помешивании 12-14 часов при 4°C. Не связавшиеся антитела отмывали инкубацией с PBT трижды по 20 мин., а затем препараты промывали дважды по 5 мин.

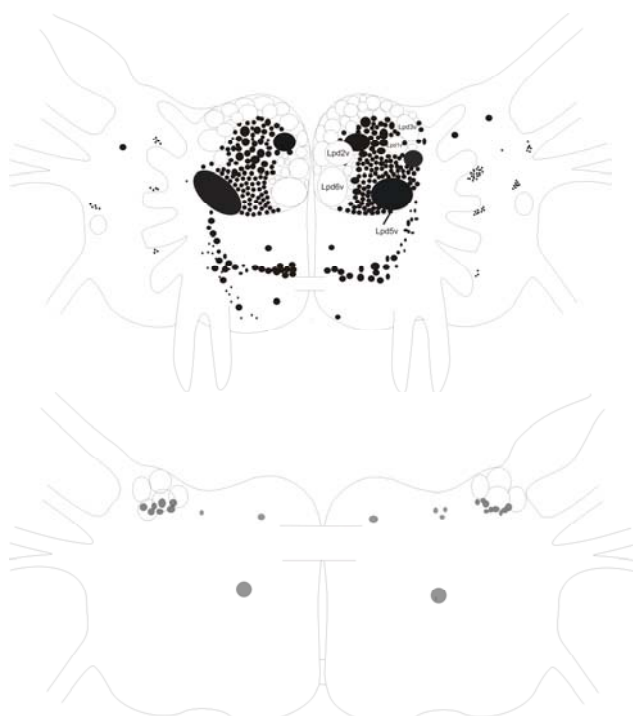
раствором, содержащим 100мМ NaCl, 50мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Tween 20, 1мМ levamisol (Sigma) и 100мМ Трис/Cl pH 9,5. После этого к образцам добавляли вышеупомянутый раствор, содержащий на 10 мл 45 мкл NBT и 35 мкл ВСIP. Данную смесь инкубировали в темноте при помешивании и при комнатной температуре, периодически проверяя под микроскопом интенсивность окраски нейронов. По достижении необходимого соотношения сигнал/фон окрашивание прекращали, помещая препарат в 1X PBS, 10мМ EDTA (на несколько минут). Далее препараты помещались в раствор параформальдегида/PBS.

### Результаты и обсуждение

На первом этапе мы картировали транскрипцию изучаемого гена у взрослых животных при отсутствии, каких-либо воздействий. Цель данных исследований – выяснение паттерна экспрессии *preHelixSFamid* в норме, для последующего анализа изменений экспрессии данного гена при различных функциональных состояниях животных, и в онтогенезе. Было изучено распределение экспрессии *preHelixSFamida* у 32 животных для получения максимально полной карты транскрипции гена.



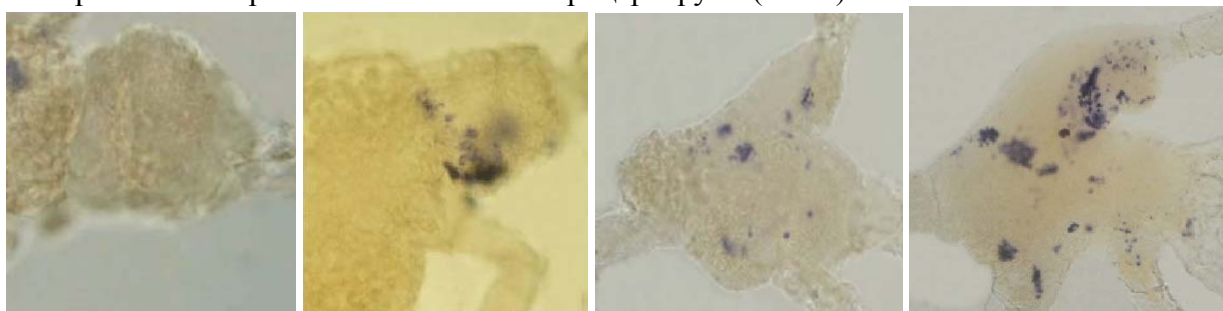
**Рис.2.**Паритетальный ганглий (вентральная сторона - слева, дорсальная сторона-справа).



**Рис.3.** Педальный ганглий (вентральная сторона – слева, дорсальная сторона – справа).

По результатам выполненных нами гибридизаций построена карта транскрипции гена *preHelixSFamid* в ЦНС виноградной улитки (Рис.2,3). На карте отмечены отдельные нейроны, экспрессирующие данный ген. Такие нейроны присутствуют в следующих ганглиях: буккальных, церебральных, педальных и плевральных. Часть этих нейронов идентифицирована по выполняемой ими функции, все они включены в сеть пищевого поведения.

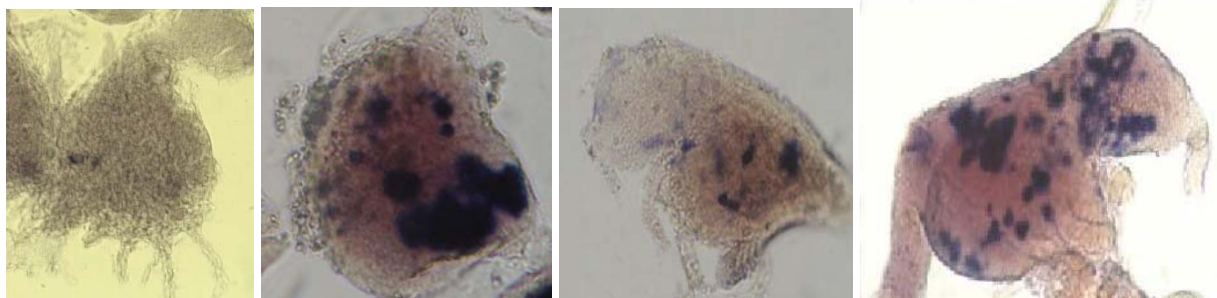
На втором этапе исследований мы попытались установить закономерность изменений в паттерне распределения в нервной системе экспрессии изучаемого гена, сопоставляя результаты гибридизации *in situ* нервной системы животных, находящихся в разном функциональном состоянии. Были поставлены эксперименты по исследованию зависимости уровня экспрессии гена *preHelixSFamid* от состояния насыщения животного. Для этого две группы животных (по 15 улиток) содержали в течение 12-14 дней в активном состоянии. При этом одна группа пищи не получала, а другая получала *ad libitum*. На препаратах ЦНС голодных улиток после проведения гибридизации *in situ* выявляется на 20-40% больше *preHelixSFamid*-экспрессирующих нейронов в плевральных ганглиях и в процеребруме (Рис.4).



**Рис.4.** Изменение паттерна экспрессии *preHelixSFamid* при пищевой депривации (плевральный ганглий, сытая улитка, голодная улитка; процеребрум, сытая улитка, голодная улитка).

На третьем этапе исследовали паттерн экспрессии гена *preHelixSFamid* на различных стадиях эмбриогенеза и у ювенильных улиток до 30-дневного возраста после вылупления (Рис.5). Исследования проводили на эмбрионах, начиная с 10 дня после откладки яиц (соответствует примерно 56% эмбрионального развития) с

интервалом в 1 сутки. У ювенильных улиток анализировали нервную систему в 1-й день (новорожденные), на 4-й и 7-й день после вылупления.



**Рис.5.** Изменение паттерна транскрипции preHelixSFamid в онтогенезе (педальный ганглий, новорожденная улитка; эмбрион, новорожденная улитка; церебральный ганглий, новорожденная улитка; церебральный ганглий, ювенильная улитка).

Экспрессия данного гена в нервной системе начинается достаточно рано. Самая ранняя стадия, на которой в наших условиях устойчиво выявлялись клетки, маркированные зондом на мРНК preHelixSFamid, соответствует 11-12-ому дню эмбриогенеза. Единичные, относительно крупные клетки появляются примерно одновременно в педальных, церебральных ганглиях и парието-висцеральном комплексе и среднего размера клетки – в буккальных ганглиях. Нейрон, который в зрелой ЦНС идентифицируется нами как Pd5v (на вентральной поверхности педального ганглия), является самой ранней из этих первых preHelixSFamid-экспрессирующих клеток в эмбриональной ЦНС. Общим правилом, видимо, является то, что клетки, имеющие наибольшие размеры в зрелом состоянии, в эмбриогенезе выявляются как preHelixSFamid-экспрессирующие раньше других. Таким образом, анализ паттернов экспрессии гена preHelixSFamida в ЦНС новорожденных и семидневных улиток показывает значительное уменьшение экспрессии данного гена, сходное по своей интенсивности с уменьшением экспрессии у сытого взрослого животного. Такая корреляция объясняется тем, что до 6-7 дня после рождения улитка не питается.

#### **Выводы**

Показано увеличение количества клеток, экспрессирующих preHelixSFamid у голодных улиток и достоверное увеличение количества нейронов, транскрибирующих preHelixSFamid у ювенильной улитки до начала активного питания. По-видимому, пептиды preHelixSFamid участвуют в организации пищевого поведения улитки.

Работа поддержана грантом РФФИ 07-04-01379.

#### **Литература**

Bogdanov YD, Ovchinnikov DA, Balaban PM, Belyavsky AV. (1994) Novel gene HCS1 is specifically expressed in the giant interneurons of the terrestrial snail. *Neuroreport*. Jan 31; 5(5): 589-92.

#### **Резюме**

Новый ген, экспрессирующийся в серотонинергических нейронах *Helix lucorum*, кодирует белок-предшественник нейропептидов. Пептиды preHelixSFamid участвуют в организации пищевого поведения виноградной улитки. Было показано увеличение количества клеток, экспрессирующих preHelixSFamid у голодных улиток и достоверное увеличение числа preHelixSFamid нейронов у ювенильной улитки до начала активного питания.

Novel gene is expressed in serotonin-containing neurons of *Helix lucorum*, coding protein-precursor neuropeptides. Peptides preHelixSFamid participate in the organization of feeding behavior of terrestrial snail. Was shown increase in number of the preHelixSFamid gene-expressing cells in hungry snails relative the number in sated animals and increase in number of gene-expressing neurons in juvenile snails prior to the beginning of an active feed.



**ВАГИН Ю.В., ВАГИНА И.Н.**

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины*

*Украина, 03143, Киев, Ул. Заболотного, 150, e.mail: [maliuta@imbg.org.ua](mailto:maliuta@imbg.org.ua)*

## **ОВАРИАЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ ПЕРИИМПЛАНТАЦИИ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

По всей вероятности, возникновение в процессе эволюции млекопитающих периимплантации явилось ключевым событием, предопределившим формирование инфракласса – *Eutheria* [1]. Наиболее полная информация о событиях, характерных для периимплантационного периода, собрана в исследованиях, проводившихся на мышевидных грызунах [2,6]. Периимплантационный период сопровождается рядом цитологических, морфологических и физиологических перестроек матки и эмбрионов, способствующих их подготовке к имплантации [2]. Все указанные изменения направлены на подготовку и успешное завершение процесса имплантации и сопряжены с активацией *de novo* сотен генов [6]. Успех имплантации эмбриона определяется его “диалогом” с маткой, происходящем на клеточно-молекулярном уровне [2,6,12]. У всех изученных до настоящего времени плацентарных млекопитающих матка в течение периимплантационного периода обретает способность к эффективному двустороннему “общению” с бластоцистами, инициирующему восприимчивость матки и готовность эмбриона к имплантации [2]. Состояние восприимчивости длится ограниченное время [2,6]; при этом маточная среда способна поддержать рост бластоцисты, ее прикрепление и последующие процессы имплантации [5,10]. Последовательность указанных событий четко выверена в рамках пространственно-временного континуума. Соответственно, сдвиги в данной системе координат могут иметь роковые последствия для развивающегося в утробе матери потомства. Главными факторами, определяющими восприимчивость матки, являются овариальные стероиды - прогестерон и эстрогены. Однако если у мышей и крыс успех имплантации зависит от обоих гормонов, то у кунных, свиней, морских свинок, кроликов и хомячков указанный процесс обеспечивается только прогестероном [2,6]. В исследованиях на мышевидных грызунах было установлено, что процессы активации и имплантации их бластоцист быстро инициируются единичной инъекцией эстрогена в прогестерон-подготовленную матку [2]. Таким образом, у мышей важными факторами, определяющими состояние восприимчивости матки к имплантации, являются овариальные стероиды - прогестерон и эстрогены. Данное состояние матки подразделяется на три фазы: пререцептивное – матка еще не обрела восприимчивости к имплантации, рецептивное – матка восприимчива к имплантации, неререцептивное (рефракторное) – матка утратила восприимчивость к имплантации [5]. Временной период, когда матка находится в рецептивной фазе, был назван “окном имплантации” [2]. У плацентарных млекопитающих, в том числе у мышей и крыс, переход матки в состояние, определяющее успех имплантации бластоцист, возможен лишь в условиях их обоюдного взаимодействия с маткой [2,6,12]. Продолжительность этого состояния крайне ограничена [10]. При этом матка способна обеспечивать рост бластоцисты, ее прикрепление и последующий процесс имплантации [5,10]. Выяснилось, что у мыши матка полностью рецептивна на четвертый день, а в течение первых трех дней беременности или псевдобеременности ее можно считать пререцептивной [10]. В тоже время матку мыши можно сделать рецептивной путем инъекции особым малым дозам эстрогена через 24-48 часов после обработки матки прогестероном [2]. Рецептивность матки и, соответственно, эффективность имплантации постепенно снижаются, и к шестому дню матка становится полностью рефракторной. Было установлено, что состояние открытости-закрытости “окна имплантации” у мышей определяется

изменениями уровней концентраций эстрогена в пределах довольно узкой области: при низких уровнях эстрогена "окно" остаётся открытым в течение достаточно длительного времени, однако оно стремительно закрывается по мере их повышения. При этом, очень высокие уровни эстрогена, переводя матку в фазу нерцептивности, в тоже время обуславливают нехарактерную для данной фазы экспрессию генов, связанных с имплантацией. Еще одним важным фактором, контролирующим, наряду с эстрогенами, процесс формирования "окна имплантации", является состояние активности бластоцисты. Очевидно, что активная и "спящая", бластоцисты молекулярно и физиологически различны. Так, рецептор эпидермального фактора роста (ЭФР), циклоксигеназа-2 (ЦОГ-2) и рецептор гистамина второго типа являются факторами, связанными с реакцией прикрепления, и экспрессируются в реактивированных бластоцистах, но снижают свою экспрессию в покоящихся [10]. Напротив, экспрессия каннабиоидного рецептора-1, связанного с G-белком, активирующаяся природными и эндо- каннабиоидами, снижается в активных бластоцистах и повышается в "спящих" бластоцистах [13]. В целом, эти данные отражают специфику молекулярных механизмов, контролирующих активацию бластоцисты и ее покоящееся состояние. Эстрогены обладают плеiotропным митогенным эффектом, распространяющимся на ткани мишени через мембранные и ядерные эстрогеновые рецепторы [8]. Они играют ключевую роль в активации и имплантации бластоцисты у мышей и крыс [6]. Мембранные эстрогеновые рецепторы (ЭР) экспрессируются в клетках всех типов покоящихся и реактивированных бластоцист мыши [9], а оба типа ядерных эстрогеновых рецепторов, ЭР $\alpha$  и ЭР $\beta$ , идентифицировались в клетках только покоящейся бластоцисты [11]. Обработка мыши, находящейся на стадии задержки имплантации, эстрадиолом-17 $\beta$  приводила через 6 часов к активации S-фазы клеточного цикла ее эмбрионов, а через 12 часов у них наблюдалось увеличение количества клеток [14]. В дальнейшем выяснилось, что основные эстрогены млекопитающих - эстрадиол-17 $\beta$ , эстрон и эстрил – не активируют непосредственно покоящийся эмбрион мыши, поскольку эстрадиол-17 $\beta$  не способен индуцировать экспрессию связанного с бластоцистой эпидермального фактора роста (ЭФР), являющегося ключевым признаком ее активации; кроме того, обработанные эстрогеном *in vitro* бластоцисты не приобретали способности к имплантации [11]. По мнению авторов указанного сообщения, эстрогеновые эффекты, связанные с реактивацией покоящихся бластоцист, могут опосредоваться не через классические ядерные рецепторы; указанным авторам удалось, используя негеномный сигнальный путь, вызвать активацию эмбрионов с помощью ЭФР и маточных катехоловых эстрогенов. Позднее наличие данного сигнального пути получило дополнительное подтверждение [7]. За последнее время накопилось достаточно фактов, указывающих на то, что действие эстрогена при подготовке матки и таковое при активации бластоцисты – два разных процесса. В экспериментах *in vitro*, проведенных на покоящихся бластоцистах, было установлено, что они не достигают имплантационной компетенции при обработке эстрадиолом, хотя и имеют оба типа ядерного ЭР. В свою очередь, бластоцисты, находящиеся в состоянии покоя, при культивировании *in vitro* становятся имплантационно компетентными, реагируя на катехолэстроген: 4-гидрокси-17- $\beta$ -эстрадиол (4-ОН-Э<sub>2</sub>). Вместе с тем, антагонист ядерного ЭР, ICI-182,780, не изменяет этой реакции, а это свидетельствует о том, что передача сигналов через ядерный ЭР не является решающей для активации бластоцисты [11]. Результаты экспериментов по переносу зародышей реципиентным самкам мышей с задержанной имплантацией свидетельствовали о том, что первичный эстроген, 17- $\beta$ -эстрадиол, инициировал имплантационные процессы в самой матке, а его катехоловый метаболит, 4-ОН-Э<sub>2</sub>, участвовал в активации "спящих" бластоцист. Наряду с 4-ОН-Э<sub>2</sub> в активации бластоцист принимают участие простагландины (ПГны), синтезированные с помощью ЦОГ-2 и цАМФ [2,11]. Результаты использования указанного выше антагониста



ядерного ЭР показали, что эстрадиол подготавливает прогестерон-обработанную матку к рецептивному состоянию эндокринно - через взаимодействие с ядерными ЭРми; в свою очередь, 4-ОН-Э<sub>2</sub>, образовавшийся в матке из эстрадиола, осуществляет активацию бластоцисты паракринно, то есть использует сигнальный путь, минуя ядерные ЭРы. Таким образом, представленные выше результаты экспериментов, призванных прояснить специфику действия эстрогенов на матку и покоящуюся бластоцисту, показали, что первичные эстрогены готовят матку к рецептивной фазе, а их производные, катехолэстрогены, активируют бластоцисту. При этом, указанные гормоны используют также и различные сигнальные пути. Итак, классическое действие эстрогенов осуществляется через взаимодействие с ядерным эстрогеновым рецептором, лиганд-зависимым транскрипционным фактором, который представлен двумя типами: ЭР $\alpha$  и ЭР $\beta$  [3]. Комплекс эстроген-ЭР образует гомодимер, связывающийся с эстроген-реагирующими элементами (ЭРЭами) в регуляторных областях целевых генов; данные элементы обычно присутствуют в 5'-фланкирующей области специфических генов. Выяснилось также, что у большинства эстроген-реагирующих генов напрочь отсутствуют известные ЭРЭты [15]. Эти результаты также подтверждают представление о негеномном сигнальном пути, через который опосредуются некоторые эстрогеновые эффекты. Количество данных, указывающих на то, что многие из быстрых маточных эффектов эстрогенных соединений не связаны с классическими геномными эффектами [6], продолжает расти. Так, самки мышей, мутантные по гену, контролирующему продукцию ЭР $\alpha$ , проявляют реакцию на катехолэстрогены или ксеноэстрогены. И все же приходится признать, что координированные эффекты эстрогена, наблюдаемые в матке при имплантации, реализуются, в основном, через их ядерные рецепторы [11]. В экспериментах с мышами, мутантными по генам, контролирующим экспрессию эстрогеновых рецепторов, выяснилось, что ЭР $\alpha$  / ЭР $\alpha$  особи имеют гиперстимулированные яичники и гипопластические матки и, соответственно, бесплодны. В дальнейшем было установлено, что им для успешной имплантации необходим функционально-активный ЭР $\alpha$ , поскольку перенос бластоцист в эстроген-прогестерон-обработанные матки мышей ЭР $\alpha$  / ЭР $\alpha$  не способствовал имплантации [4]. При этом выяснилось, что эти мыши могут индуцировать и поддерживать децидуализацию в ответ на искусственные стимулы при соответствующей подготовке даже одним прогестероном. Вероятно у ЭР $\alpha$  / ЭР $\alpha$  мышей нарушение имплантации обусловлено срывом реакции прикрепления, поскольку процесс децидуализации у них протекает нормально. Эстрадиол гидроксилируется до 4-ОН-Э<sub>2</sub> с помощью P450 связанного фермента CYP1B1 [6]. Данный фермент присутствует повсеместно в мышечной матке на четвертый день, но исчезает из мест имплантации на пятый день беременности [11]. Было установлено, что покоящиеся бластоцисты, перенесенные в матки реципиентов с задержанной имплантацией, имплантируются в пределах одного часа после введения эстрадиола. Однако аналогичные бластоцисты не имплантировались, если пересаживались в матки реципиентов по истечению часового периода. Эти результаты указывают на то, что *in utero* процессы реактивации и имплантации бластоцист быстротечны и ограничены непродолжительным интервалом времени [11]. Напротив, покоящиеся бластоцисты, культивируемые в присутствии 4-ОН-Э<sub>2</sub> (но без эстрадиола), приобретали компетенцию к имплантации; в результате, при их переносе в матки псевдобеременных реципиентов, они имплантировались далеко за пределами одночасового окна. Сходные данные были получены при культивировании покоящихся бластоцист в присутствии простагландина E<sub>2</sub> (ПРGE<sub>2</sub>) или цАМФ, что указывает на важную роль ЦОГ-2 сигнального пути в реактивации бластоцист [11]. Показано, что коинкубация покоящихся бластоцист и ингибитора ЦОГ-2, происходящие в присутствии 4-ОН-Э<sub>2</sub>, эффективно блокирует их активацию и имплантацию при переносе в подходящих реципиентов. Данный эффект ЦОГ-2 ингибитора частично снимался добавлением

ПРГЕ<sub>2</sub> в культуральные среды. Эти результаты убедительно свидетельствуют о том, что действие 4-ОН-Э<sub>2</sub> на покоящиеся бластоцисты, реиницирующее их развитие, осуществляется через ЦОГ-2 сигнальный путь, ведущий к увеличению внутриклеточных концентраций цАМФ [6].

### Литература

1. *Вагин Ю.В.* Периимплантационная программа морфогенеза – эволюционное know how плацентарных млекопитающих. // Биополимеры и клетка. – 2007. – 23. – С. 332-337.
2. *Carson D.D., Bagchi I., Dey S.K., Enders A.C., Fazleabas A.T., Lessey B.A., Yoshinaga K.* Embryo implantation. // *Dev. Biol.* – 2000. – 223. – P. 217–237.
3. *Couse J.F., Korach K.S.* Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? // *Endocr. Rev.* – 1999. – 20. – P. 358–417.
4. *Curtis H., Goulding E.H., Eddy E.M., Korach K.S.* Studies using the estrogen receptor knockout uterus demonstrate that implantation but not decidualization-associated signaling is estrogen dependent. // *Biol. Reprod.* – 2002. – 67. – P. 1268–1277.
5. *Dey S.K.* Implantation. // In book: *Reproductive endocrinology, surgery and technology.* New York: Lippincott-Raven. – 1996. – P. 421–434.
6. *Dey S.K., Lim H., Das S.K., Reese J., Paria B.C., Daikoku T., Wang H.* Molecular cues to implantation. // *Endocrine Reviews.* – 2004. – 25. – P. 341–373.
7. *Driggers P.H., Segars J.H.* Estrogen action and cytoplasmic signaling pathways. Part II: the role of growth factors and phosphorylation in estrogen signaling. // *Trends in Endocrinology and Metabolism.* – 2002. – 13. – P. 422–427.
8. *Frasor J., Danes J.M., Komm B., Chang K.C., Lyttle C.R., Katzenellenbogen B.S.* Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. // *Endocrinology.* – 2003. – 144. – P. 4562–4574.
9. *Hou Q, Paria BC, Mui C, Dey SK & Gorski J.* Immunolocalization of estrogen receptor protein in the mouse blastocyst during normal and delayed implantation. // *PNAS.* – 1996. – 93. – P. 2376–2381.
10. *Paria B.C., Huet H., Dey S.K.* Blastocyst's state of activity determines the “window” of implantation in the receptive mouse uterus. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – 90. – P. 10159–10162.
11. *Paria B.C., Lim H., Wang X.N., Liehr J., Das S.K., Dey S.K.* Coordination of differential effects of primary estrogen and catecholesterogen on two distinct targets mediates embryo implantation in the mouse. // *Endocrinology.* – 1998. – 139. – P. 5235–5246.
12. *Paria B.C., Song H., Dey S.K.* Implantation: molecular basis of embryo-uterine dialogue. // *J.Dev. Biol.* – 2001. – 45. – P. 597-605.
13. *Paria B.C., Song H., Wang X., Schmid P.C., Krebsbach R.J., Schmid H.H., Bonner T.I., Zimmer A., Dey S.K.* Dysregulated cannabinoid signaling disrupts uterine receptivity for embryo implantation. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – 276. – P. 20523–20528.
14. *Spindler R.E., Renfree M.B., Gardner D.K.* Carbohydrate uptake by quiescent and reactivated mouse blastocysts. // *J. Exp. Zool.* – 1996. – 276. – P. 132–137.
15. *Stancel G.M., Boettger T., Chiappetta C., Hyder S.M., Kirkland J.L., Murthy L., Loose M.* Toxicity of endogenous and environmental estrogens: what is the role of elemental interactions? // *Environ. Health Perspect.* – 1995. – 103(Suppl 7). – P. 29–33.

### Резюме

Представлены данные о событиях, связанных с контролем периимплантационного периода, осуществляемым с помощью овариальных факторов.

Представлено дані про події, щодо контролю періімплантаційного періоду, який здійснюється за допомогою овариальних факторів.

The data presented concerning events on periimplantation period control, which is accomplished with the help of ovarian factors.

**ВОЛКОВА Н.С., ВОРОБІЙОВА Л.І.**

*Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна*

*Україна, 61077, Харків, пл. Свободи 4, e-mail: volkova\_natalya@bk.ru*

### **ВПЛИВ ПІГМЕНТНИХ МУТАЦІЙ НА СТАТЕВУ ПОВЕДІНКУ *Drosophila melanogaster***

На сучасному етапі розвитку нейрогенетики та генетики поведінки триває пошук та дослідження зручних моделей, які дозволили б аналізувати генетичну структуру комплексних ознак поведінки людини як в нормі, так і при різних патологіях. Досить широкого вжитку набув у зазначеній галузі і класичний об'єкт генетичних досліджень – *Drosophila melanogaster* [1, 2], адже ключові сполуки та біохімічні реакції, що забезпечують функціонування нервової системи, а відповідно і формування фенотипу поведінки, є надзвичайно еволюційно консервативними. Більш того, за результатами проєктів “Геном дрозофіли” та “Геном людини” було встановлено цілу низку генів, які є гомологічними для видів *D. melanogaster* та *Homo sapiens* (www.FlyBase.com). Дане дослідження мало на меті вивчити вплив деяких генів, які контролюють певні реакції обміну амінокислот, що є джерелом нейроактивних речовин, на статеву поведінку *D. melanogaster*.

#### **Матеріали та методи**

Вихідний матеріал: лінії *D. melanogaster* з колекції кафедри генетики і цитології ХНУ ім. В.Н. Каразіна: *Canton-S (C-S)*, *Oregon (Or)* – інбредні лінії дикого типу та у (1 – 0.0) – жовте тіло, *w* (1 - 1.5) – білі очі, *w<sup>a</sup>* (1 - 1.5) – абрикосові очі, *b* (2 – 48.5) – чорне тіло, *cn* (2 - 57.5) – кіноварні очі – аутбредні мутантні лінії. Для всіх зазначених генів виявлені гомологічні послідовності у геномі *Homo sapiens* (www.FlyBase.com). Лінії утримували у культуральних склянках (висота 10 см; діаметр 2,0 см; об'єм поживного середовища у склянці – 5 мл) на стандартному дріжджовому середовищі у термостаті ( $t=23\pm 1^\circ\text{C}$ ). У експеримент брали лише віргіних статевозрілих особин (вік – 3 доби). До досягнення необхідного віку самців та самиць утримували окремо. Статеву активність самців визначали за кількістю останніх, які здійснили парування упродовж 1 години [3, 4]. Для цього особин поміщали до тестерної камери у співвідношенні  $2n\text{♀}:\text{♂}$ , де  $n$  – кількість особин ( $5\pm 2$ ), та фіксували відсоток особин чоловічої статі, які здійснили парування упродовж 1 години. Аналіз статевої рецептивності самиць проводили аналогічно, але особин брали у співвідношенні  $n\text{♀}:\text{♂}$ :  $2n\text{♂}:\text{♂}$  та фіксували долю самиць, які здійснили парування упродовж 1 години. Варіанти, коли жодна з пар у копуляцію не вступила, приймали за «0». Для вивчення впливу окремих локусів на статеву поведінку попередньо проводили насичуючі схрещування мутантних ліній с лінією *C-S* та з лінією *Or* в умовах направленою добору на маркерну мутацію та отримали вирівняні за генотипом мутантні лінії. Використовували методи статистичного аналізу:  $t$ -критерій Ст'юдента, дисперсійний аналіз кількісних ознак (силу впливу факторів ( $h_x^2$ ) оцінювали за методом М. Снедекора) [5].

#### **Результати та обговорення**

Встановлено, що пігментні мутації, які призводять до порушень певних реакцій обміну амінокислот-джерел нейроактивних речовин, у низці випадків істотно впливають і на статеву поведінку особин *D. melanogaster* (Табл.1.). При цьому не спостерігається єдиноспрямованого пригнічення або стимуляції в наслідок заміщення генотипу мутантних особин, а напрямок впливу різних мутацій на статеву активність

самців та статеву рецептивність самиць відрізняється. За результатами дисперсійного аналізу міжлінійні розбіжності за статевою активністю самців зумовлені дією мутації ( $F=30,7$ ;  $p<0,001$ ) та результатом взаємодії мутантного гену з іншими генами генетичного фону ( $F=49,4$ ;  $p<0,001$ ). Аналогічні результати отримані для ознаки статевої рецептивності самиць ( $F=20,9$ ;  $p<0,001$  – вплив мутації;  $F=7,9$ ;  $p<0,001$  – вплив взаємодії мутантного гену з генами генетичного фону). Встановлений також вплив фактору хромосомної локалізації мутацій (локалізації у хромосомі 1 чи 2) на статевою активність самців ( $F=48,4$ ;  $p<0,001$ ): самці, мутантні за генами *b* та *cn* є більш активними у порівнянні з тими, які несуть мутацію у X-хромосомі.

Таблиця 1

**Показники статевої поведінки вирівняних за генотипом мутантних ліній та вихідних ліній дикого типу**

Лінія	Статева активність самців (%)			Статева рецептивність самиць (%)		
	$X \pm S_x$	$t(\Gamma\Phi)$	$p(\Gamma\Phi)$	$X \pm S_x$	$t(\Gamma\Phi)$	$p(\Gamma\Phi)$
<i>C-S</i>	55,68 ± 7,31	-	-	79,04 ± 3,58	-	-
<i>Or</i>	23,75 ± 4,07	-	-	47,19 ± 5,83	-	-
<i>y<sub>C-S</sub></i>	81,83 ± 3,91	3,15	<0,01	75,33 ± 3,13	0,78	> 0,05
<i>y<sub>Or</sub></i>	15,83 ± 3,21	0,75	> 0,05	77,50 ± 2,42	4,80	<0,001
<i>w<sub>C-S</sub></i>	24,56 ± 4,02	3,73	<0,001	33,33 ± 5,05	7,38	<0,001
<i>w<sub>Or</sub></i>	56,57 ± 0,77	8,91	<0,001	41,67 ± 5,79	0,67	> 0,05
<i>w<sup>a</sup><sub>C-S</sub></i>	45,99 ± 6,34	1,00	> 0,05	59,52 ± 3,70	3,79	<0,001
<i>w<sup>a</sup><sub>Or</sub></i>	8,10 ± 1,11	2,75	<0,01	37,00 ± 4,76	1,35	> 0,05
<i>b<sub>C-S</sub></i>	54,14 ± 7,44	0,15	> 0,05	38,33 ± 7,04	5,15	<0,001
<i>b<sub>Or</sub></i>	83,34 ± 3,09	12	<0,001	68,89 ± 1,80	3,55	<0,001
<i>cn<sub>C-S</sub></i>	53,33 ± 7,81	0,22	> 0,05	64,11 ± 6,61	1,98	<0,05
<i>cn<sub>Or</sub></i>	86,67 ± 3,50	12	<0,001	70,22 ± 4,37	3,16	<0,001

Примітка:  $\Gamma\Phi$  – генетичний фон;  $t$  - критерій Ст'юдента;  $p$  – рівень значущості.

Кожна мутація (Табл. 2.), або як самостійний фактор, або у комбінації з іншими генами загального генетичного фону лінії впливає на статевою поведінку дрозофіли. Серед досліджуваних мутацій найбільш вираженим моногенним ефектом на статевою активність самців характеризується мутація *b* (Табл. 3), а на статевою рецептивність самиць – мутація *w*.

Таблиця 2

**Вплив генетичних факторів на ознаки статевої поведінки *D. melanogaster* ( $F$ ;  $p$ )**

Маркер лінії	Статева активність самців			Статева рецептивність самиць		
	Мутація	Ген. фон	Комбінація	Мутація	Ген. фон	Комбінація
<i>y</i>	4,31;<0,05	118,29;<0,001	8,29;<0,01	6,18;<0,05	12,12;<0,001	15,94;<0,001
<i>w</i>	0,14;>0,05	0,48;>0,05	59,52;<0,001	28,13;<0,001	4,7;<0,05	13,87;<0,001
<i>w<sup>a</sup></i>	5,19;<0,05	53,92;<0,001	0,002;>0,05	13,54;<0,001	31,77;<0,001	0,89;>0,05
<i>b</i>	27,13;<0,001	0,64;>0,05	34,73;<0,001	5,58;<0,05	0,01;>0,05	35,54;<0,001
<i>cn</i>	27,75;<0,001	0,18;>0,05	36,81;<0,001	0,05;>0,05	5,47;<0,05	11,98;<0,001

Мутації *w* та *w<sup>a</sup>* є різними алелями одного гену [6], що утворюються внаслідок інсерцій у ген *w<sup>+</sup>* мобільних елементів різного типу: *Dos* – у випадку алелі *w* та *coria* – у випадку *w<sup>a</sup>* [7]. Це дозволяє проаналізувати вплив алельного стану гену *w* і його взаємодії з загальним генетичним фоном на ознаки статевої поведінки. Встановлено, що алельний стан досліджуваного локусу може бути самостійним фактором впливу, як на статевою активність, так і на статевою рецептивність самиць. При цьому сила впливу складає 6,6 % і 15,6 % відповідно.

Таблиця 3

**Сила впливу генетичних факторів на ознаки статевої поведінки *D. melanogaster***  
 $h_x^2 \pm S_{hx^2}$  (%);  $p$

Маркер лінії	Статева активність самців			Статева рецептивність самиць		
	Мутація	Ген. фон	Комбінація	Мутація	Ген. фон	Комбінація
<i>y</i>	1,7±0,84; >0,05	60±0,37; <0,001	7,5±2,3; >0,05	4,9±0,8; <0,05	10,5±0,8; <0,01	28±1,9; <0,01
<i>w</i>	-	-	66±0,85; <0,001	23,3±0,65; <0,01	3,2±0,82; >0,05	22,1±2,1; <0,01
<i>w<sup>a</sup></i>	7,2±0,79; <0,01	91±0,08; <0,001	-	12±0,79; <0,01	29,8±0,6; <0,01	-
<i>b</i>	17±0,7; <0,001	-	44±1,4; <0,001	3,4±0,82; <0,05	-	52±1,2; <0,01
<i>cn</i>	1,1±0,84; >0,05	-	53,8±1,2; <0,001	-	5,2±0,81; <0,01	25,4±1,9; <0,001

Щодо механізмів, які лежать в основі впливу досліджуваних мутацій на поведінку. Первинними продуктами активності генів *b* та *cn* є ферменти. Зокрема, продуктом гену *cn* – є фермент кінуренін-3-гідроксилаза [8]. В мутантів заблоковане гідроксилювання кінуреніну, що призводить до накопичення кінуренової кислоти [2]. Зазначимо, що накопичення кінуренової кислоти у мозку людини призводить до прояву симптомів шизофренії [9]. Можливим механізмом впливу генів *w*, *w<sup>a</sup>* та *cn* на поведінку є участь ферментів кінуренінової гілки метаболізму триптофану та побічних метаболітів у модуляції окремих ланок сигнального каскаду “рецептори глутамату – актин цитоскелету” у надглотковому ганглії дрозофіли [10]. Відомо, що мутанти *b* дрозофіли не здатні синтезувати β-аланін та характеризуються зниженням аспартат декарбоксилазної активності. Як наслідок, спостерігається порушення меланіногенезу, процесу, що, у свою чергу, тісно пов’язаний з обміном катехоламінів, дофаміну зокрема [11, 12], який є нейромедіатором не тільки для досліджуваного виду, а й у для багатьох інших. Таким чином, на наш погляд, порушення активності генів *b* та *cn* є типовими ферментопатіями, які характеризуються чисельними системними порушеннями. Щодо гену *y*, продукт його активності, з одного боку, регулює інтенсивність та розташування меланіну в кутикулі [13], а отже може плейотропно впливати на обмін катехоламінів. З іншого боку, існує гіпотеза, що на ранніх стадіях розвитку дрозофіли Yellow-протеїн може діяти подібно до гормонів чи факторів росту та є одним з регуляторів *fruitless*-опосередкованої гілки детермінації статі [14], порушення якої спричиняють зміни стать-специфічної програми поведінки [15].

### **Висновки**

Досліджений вплив пігментних мутацій, які призводять до порушень певних реакцій обміну амінокислот-джерел нейроактивних речовин, на статево поведінку *D. melanogaster*. Виявлений істотний моногенний ефект мутації *b* на статево активність самців та мутації *w* на статево рецептивність самиць. Встановлено, що алельний стан досліджуваного локусу може бути самостійним фактором впливу на ознаки статевої поведінки дрозофіли.

### **Література**

1. Greenspan R.J., Dierick H.A. ‘Am not I a fly like thee?’ From genes in fruit flies to behavior in humans // Human Molecular Genetics. – 2004. – V.13, Iss.2. – P. 267-273.
2. Savvateeva E., Popov A., Kamyshev N. et al. Age-dependent memory loss, synaptic pathology and altered brain plasticity in the Drosophila mutant *cardinal* accumulating 3-hydroxykynurenine // Journal of Neural Transmission. – 2000. – V. 107, No 5. – P. 581-601.

3. Полэ И.Р. Анализ генетической детерминации половой активности самцов *Drosophila melanogaster*: Автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.00.15 / - ЛГУ. – Л., 1979. – 20 с.
4. Субочева Е.А., Романова Н.И., Карпова Н.Н. и др. Репродуктивное поведение самцов в линиях *Drosophila melanogaster*, отличающихся по аллелям гена *flamenco* // Генетика. - 2003. - Т. 39, № 5. - С.675–681.
5. Лакин Г. Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
6. Lindsley D.L., Grell E.H. Genetic Variations of *Drosophila melanogaster*. - Carnegie Just. Wash. Publ., 1968. – 627 p.
7. Жимулёв И.Ф. Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. 2-е изд., испр. и доп. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2003. – 479 с.
8. Rongvaux A., Andris F., Van Gool F., Leo O. Reconstructing Eukaryotic NAD Metabolism // BioEssays. – 2003. – V. 25, No 7. – P. 683-690.
9. Электронный ресурс [http://www.thelocal.se/9013/]: Link found between TBE and schizophrenia. - Published: November 6 2007 (09:26 CET).
10. Лопатина Н.Г., Зачепило Т.Г., Чеснокова Е.Г., Савватеева-Попова Е.В. Мутации структурных генов ферментов метаболизма триптофана по кинурениновому пути в модуляции звеньев сигнального каскада – рецепторы глутамата-актин цитоскелета // Генетика. – 2007. – Т.43, №10. – С. 1396-1401.
11. Phillips A. M., Smart R., Strauss R. et al. The *Drosophila black* enigma: The molecular and behavioural characterization of the *black<sup>1</sup>* mutant allele // Gene. – 2005. – V. 351. – P. 131-142.
12. Walter M.F., Zeineh L.L., Black B.C. et al. Catecholamine metabolism and *in vitro* induction of premature cuticle melanization in wild type and pigmentation mutants of *Drosophila melanogaster* // Arch. Insect Biochem. Physiol. – 1996. – V. 31, No 2. – P. 219-233.
13. Walter M.F., Black B.C., Afshar G. et al. Temporal and spatial expression of the *yellow* gene in correlation with cuticle formation and DOPA decarboxylase activity in *drosophila* development // Developmental Biology. – 1991. – V. 147, Iss. 1. – P. 32-45.
14. Drapeau M.D. A Novel Hypothesis on the Biochemical Role of the *Drosophila* Yellow Protein // Biochem. and Biophys. Research Communications. – 2003. – V. 311. – P. 1-3.
15. Hall J.C. The Mating of a Fly // Science. – 1994. - V. 264, No 5166. - P. 1702-1714.

### Резюме

Встановлено вплив низки мутацій (*y*, *w*, *w<sup>a</sup>*, *b*, *cn*) у генах, які контролюють певні реакції обміну амінокислот-джерел нейроактивних речовин та біосинтезу пігментів, на статеву поведінку *D. melanogaster*. Розглянуто можливі механізми впливу даних генів на ознаки поведінки та обговорюється можливість моделювання на дрозофілі ферментопатій та нервових розладів людини.

Установлено влияние ряда мутаций (*y*, *w*, *w<sup>a</sup>*, *b*, *cn*) в генах, контролирующих определённые реакции обмена аминокислот-источников нейроактивных веществ и биосинтеза пигментов, на половое поведение *D. melanogaster*. Рассмотрены возможные механизмы влияния данных генов на признаки поведения и обсуждается возможность моделирования на дрозофиле ферментопатий и нервных расстройств человека.

The influence of mutations (*y*, *w*, *w<sup>a</sup>*, *b*, *cn*) in genes that control definite metabolic reactions of amino acid precursors of neuro active substances and pigments biosynthesis on *D. melanogaster* mating behavior is demonstrated. Possible mechanisms of these genes effects on behavior traits are reviewed, and the possibility of human enzymatic pathologies and nervous disorders modeling in *Drosophila* is discussed.

**ГЕРБЕК Ю.Э., ОСЬКИНА И.Н., ГУЛЕВИЧ Р.Г., ПЛЮСНИНА И.З.**

*Институт цитологии и генетики СО РАН,*

*Россия, 630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10, e-mail: herbek@bionet.nsc.ru*

## **ВЛИЯНИЕ ОТБОРА ПО ПОВЕДЕНИЮ И МЕТИЛОБОГАЩЁННОЙ ДИЕТЫ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ В ГИППОКАМPE СЕРЫХ КРЫС**

Важную роль в эволюции высших позвоночных, по-видимому, играют изменения нейрогормональных регуляторных систем, связанных с поведением [1, 2]. Особое внимание привлекает гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система (ГГНС), обладающая широким регуляторным эффектом практически на все системы организма и являющаяся ключевой в развитии реакции на стресс. В результате исследований серых диких крыс, селекционируемых на доместикационное поведение, нами были установлены значительные изменения во всех звеньях ГГНС. Отбор по поведению по отношению к человеку фактически явился отбором на стресс-реактивность, так что ответ на стресс у ручных крыс оказался значительно слабее, чем у агрессивных [3]. Эти изменения во многом схожи с широкой модификационной изменчивостью, наблюдаемой в поведении и ГГНС вследствие раннего постнатального воздействия у различных млекопитающих [4, 5]. Логично было предположить, что схожи и механизмы, обеспечивающие эти изменения, а широкая модификационная изменчивость ГГНС при экстремальном давлении отбора может канализировать микроэволюционные изменения механизмов стресс-реакции [1, 6]. Группой канадских исследователей под руководством М. Мини был описан молекулярный механизм таких изменений, возникающих у крыс под воздействием раннего постнатального хэндлинга, при увеличении числа материнских контактов с детёнышами или при введении деметилирующих агентов в гиппокамп [7]. Рецепторы глюкокортикоидов (ГР) обеспечивают действие глюкокортикоидов, конечного звена ГГНС, на различные системы организма. ГР гиппокампа, в свою очередь, являются важной частью глюкокортикоидной отрицательной обратной связи, регулирующей ответ на стресс. Увеличение количества ГР в гиппокампе усиливало отрицательную обратную связь, значительно ослабляя ответ на стресс, и снижало эмоциональность крыс. Известно, что мРНК ГР транскрибируется в виде нескольких вариантов, отличных по нетранслируемому первому экзону. В гиппокампе же среди прочих вариантов выявляется мРНК, содержащая специфический экзон 1<sub>7</sub> [8]. Снижение экспрессии гена ГР в гиппокампе в описываемой модели происходило за счёт метилирования CpG-динуклеотида в сайте связывания фактора транскрипции NGFI-A, который расположен в промоторной области экзона 1<sub>7</sub>. Деметилирование, в свою очередь, приводило к повышению экспрессии. На нашей модели, наряду с другими схожими изменениями, было показано значительное превышение количества ГР в гиппокампе ручных крыс по сравнению с агрессивными.

Указанные выше соображения поставили нас перед необходимостью исследовать: 1) сопровождаются ли различия в количестве ГР в гиппокампе соответствующей разницей в уровне их мРНК; 2) обусловлена ли разница в общем количестве мРНК ГР соответствующими изменениями в мРНК, содержащей экзон 1<sub>7</sub>; 3) наблюдаются ли различия в паттерне метилирования промоторной области экзона 1<sub>7</sub> гена ГР между ручными и агрессивными крысами; 4) вызывает ли метилобогащённая материнская диета изменения в экспрессии гена ГР и паттерне метилировании экзона 1<sub>7</sub> ГР.

### **Материалы и методы**

Эксперимент проводился на потомках серых диких крыс, селекционируемых на ручное и агрессивное поведение по отношению к человеку. Матери опытных потомков

содержались во время беременности на метилобогаченной диете [9], а матери контрольных – на стандартном питании. После декапитирования у крыс извлекали мозг и отделяли гиппокамп. Суммарную РНК и ДНК выделяли с помощью “TRI Reagent” (Sigma, США). Общее количество мРНК ГР определили методом ОТ-ПЦР, амплифицируя фрагмент кДНК ГР и *grL19* (внутренний контроль экспрессии). Количество мРНК ГР, содержащую экзон 1<sub>7</sub>, устанавливали методом ПЦР-РВ [10] в тех же образцах, амплифицируя фрагменты кДНК экзона 1<sub>7</sub> ГР и  $\beta$ -III тубулина (внутренний контроль экспрессии). Для оценки метилирования промотора экзона 1<sub>7</sub> гена ГР в гиппокампе использовали метод бисульфитного секвенирования. Геномная ДНК обрабатывалась бисульфитом натрия по стандартной методике [11] и сразу использовалась в двухэтапной ПЦР с вложенными праймерами [12]. Нарботанный ПЦР-продукт клонировали и секвенировали с использованием BigDye Terminator v.3.1 Sequencing kit (Applied Biosystems, США).

### **Результаты и обсуждение**

Регуляция экспрессии генов многих нейропептидов и нейромедиаторов, связанных с поведением, происходит при участии ГР головного мозга и, в частности, гиппокампа. Поэтому изучение экспрессии гена ГР при отборе по поведению представляет особый интерес. В настоящем исследовании показано, что количество мРНК ГР в гиппокампе ручных крыс почти в 2 раза выше, чем у агрессивных, что хорошо соответствует полученным ранее данным об уровне цитозольного ГР [3].

Из литературы известно, что мРНК ГР транскрибируется в виде нескольких вариантов, отличных по 5'-нетранслируемой области, однако идентичных по белок-кодирующим экзонам. Механизм альтернативной транскрипции гена ГР связан с возможностью инициации транскрипции с нескольких различных промоторов и последующим альтернативным сплайсингом [8]. Исследованиями группы под руководством М. Мини был вскрыт эпигенетический механизм изменений, во многом схожих с различиями, наблюдаемыми на нашей модели [7]. Описываемые изменения связаны с повышенной частотой материнских контактов с крысятами в ранний постнатальный период. У крыс, воспитанных такими матерями, во взрослом состоянии наблюдается пониженная эмоциональность, сниженный уровень глюкокортикоидов в крови и повышенное количество ГР и их мРНК в гиппокампе по сравнению с крысами, воспитанными матерями с более низким числом контактов с детёнышами. По мнению Вивера с соавт., это обусловлено повышением количества специфичной для гиппокампа мРНК, содержащей нетранслируемый альтернативный экзон 1<sub>7</sub>. При исследовании образцов ДНК, выделенной из гиппокампа, показано, что более высокий уровень транскрипции мРНК ГР под контролем промотора экзона 1<sub>7</sub> в гиппокампе таких крыс связано с меньшей частотой метилирования CpG-динуклеотида на 5'-конце сайта связывания фактора транскрипции NGFI-A, находящегося в промоторной области экзона 1<sub>7</sub> гена ГР (16-ый CpG-динуклеотид в исследованной области). У крыс же, воспитанных матерями с низким числом контактов с детёнышами, частота метилирования этого CpG-динуклеотида достигает 100% [12].

Мы предположили, что различия в количестве мРНК ГР в гиппокампе ручных и агрессивных крыс обусловлено подобным же механизмом. Однако данные, полученные в настоящем исследовании, не подтвердили наше предположение. Нами не было найдено достоверных различий в количестве мРНК ГР, содержащей экзон 1<sub>7</sub>, в гиппокампе ручных и агрессивных крыс. Из литературы известно, что содержание беременных крыс на метилобогаченной диете влияет на паттерн метилирования и экспрессию некоторых генов [13]. Однако метилобогаченная материнская диета также не повлияла на количество в гиппокампе мРНК ГР с экзонам 1<sub>7</sub> ни у ручных, ни у агрессивных крыс. Исследования образцов ДНК, выделенных из гиппокампа, показали, что паттерн метилирования промоторной области экзона 1<sub>7</sub> достоверно не различается у ручных и агрессивных крыс и не изменяется под влиянием метилобогаченной



материнской диеты. Более того, частота метилирования 16-ого CpG-динуклеотида была крайне низкой.

И, тем не менее, общее количество мРНК ГР у ручных крыс достоверно снижается под влиянием метилобогатённой материнской диеты почти до уровня агрессивного контроля, тогда как снижение уровня мРНК ГР у агрессивных крыс недостоверно. Из этого можно заключить, что метилирование ДНК, по-видимому, вносит определённый вклад в различия в количестве мРНК ГР в гиппокампе ручных и агрессивных крыс, однако механизм этих изменений, по-прежнему, остаётся неясным.

Исследования, проведённые на пациентах, с заболеваниями, вызывающими изменения в ГГНС, также не показали отличий в паттерне метилирования гомологичного экзона ГР, хотя этот участок является высоко консервативным у крысы, мыши, человека и некоторых других млекопитающих. Частота же метилирования 16-ого CpG-динуклеотида оказалась ничтожно мала [14]. Известно, что мРНК ГР, содержащая экзон 1<sub>7</sub>, составляет лишь 8% от общего количества мРНК этого рецептора [8], и, вероятно, механизм изменения количества ГР нужно искать в изменении уровня транскрипции мРНК ГР под контролем более сильных промоторов. В недавних работах К. Лилликроп с соавт. показано, что транскрипция с промотора экзона 1<sub>10</sub> в тканях печени при белково-дефицитной материнской диете также повышается, вероятно, вследствие изменения паттерна метилирования этого промотора [15]. В промоторе экзона 1<sub>10</sub> также есть консенсусная последовательность транскрипционного фактора NGFI-A, а количество мРНК ГР с экзоном 1<sub>10</sub> составляет более 60% от общего уровня мРНК этого рецептора как в печени, так и в гиппокампе [8]. Не исключено также, что метилобогатённая диета влияет на экспрессию транскрипционных факторов регулирующие транскрипцию мРНК ГР. Кроме того, насколько нам известно, до сих пор не проводилось исследований механизма изменений экспрессии гена ГР в гиппокампе, возникающих вследствие пренатального стрессирования [5]. Вероятно, они также не связаны с изменениями транскрипции с промотора экзона 1<sub>7</sub>.

### **Выводы**

Таким образом, нами показано, что различия в количестве ГР в гиппокампе сопровождаются соответствующей разницей в уровне их мРНК. Однако количество мРНК ГР, содержащей экзон 1<sub>7</sub>, не отличается ни у ручных, ни у агрессивных крыс и не изменяется вследствие кормления матерей метилобогатёнными добавками. Не обнаружено также различий в паттерне метилирования промоторной области экзона 1<sub>7</sub> гена ГР в образцах ДНК, выделенных из гиппокампа ручных и агрессивных крыс ни в норме, ни при кормлении матерей метилсодержащими добавками. Однако установлено, что метилобогатённая материнская диета вызывает достоверное снижение общего количества мРНК ГР в гиппокампе ручных крыс по сравнению с контролем.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №08-04-01412).

### **Литература**

1. Шмальгаузен И.И. Факторы эволюции. – М.- 1968.- 452 с.
2. Беляев Д.К., Бородин П.М. Влияние стресса на наследственную изменчивость и его роль в эволюции // Эволюционная генетика. – Л.- 1982.- С.35-59.
3. Оськина И.Н., Плюснина И.З. Гипофизарно-надпочечниковая система при отборе животных на доместикационное поведение // Сб. науч. тр. / ИЦиГ СО РАН – Новосибирск.- 2000. - С.327-333.
4. Levine S. Infantile experience and resistance to physiological stress // Science.- 1957.- vol. 126, № 3270.- P.405.
5. Seckl J.R. Glucocorticoid programming of the fetus; adult phenotypes and molecular mechanisms // Mol. Cell. Endocrinol.- 2001. - vol. 185, № 1-2.- P.61-71.
6. Науменко Е.В., Попова Н.К., Иванова Л.Н. Нейроэндокринные и нейрохимические механизмы доместикации животных // Генетика.- 1987. - Т. 23, № 6.- С.1011-1025.

7. Meaney J.M., Szyf M. Maternal care as a model for experience-dependent chromatin plasticity? // Trends Neurosci.- 2005.- vol. 28, № 9.- P.456-463.

8. McCormick J.A., Lyons V., Jacobson M.D., Noble J., Diorio J., Nyirenda M., Weaver S., Ester W., Yau J.L., Meaney M.J., Seckl J.R., Chapman K.E. 5'-heterogeneity of glucocorticoid receptor messenger RNA is tissue specific: differential regulation of variant transcripts by early-life events // Mol. Endocrinol.- 2000.- vol. 14, № 4.- C.506-517.

9. Прасолова Л.А., Трут Л.Н., Оськина И.Н., Гулевич Р.Г., Плюснина И.З., Всеволодов Э.Б., Латыпов И.Ф. Влияние метилсодержащей диеты в период беременности крыс (*Rattus norvegicus*) на фенотипическую модификацию агути окраса у их потомков // Генетика.- 2006.- Т. 42, № 1.- С.78-83.

10. Weaver I.C., D'Alessio A.C., Brown S.E., Hellstrom I.C., Dymov S., Sharma S., Szyf M., Meaney M.J. The transcription factor nerve growth factor-inducible protein a mediates epigenetic programming: altering epigenetic marks by immediate-early genes. // J Neurosci.- 2007.- vol. 27, № 7.- C.1756-1768.

11. Clark S.J., Harrison J., Paul C.L., Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. // Nucleic Acids Res.- 1994.- vol. 22, № 15.- P.2990-2997.

12. Weaver I.C., Champagne F.A., Brown S.E., Dymov S., Sharma S., Meaney M.J., Szyf M. Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life. // J Neurosci.- 2005.- vol. 25, № 47.- P.11045-11054.

13. Cooney, C.A., Dave, A.A., and Wolff, G.L, Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. // J. Nutr.- 2002.- vol. 132, №8 Suppl.- P.2393S-2400S.

14. Moser D, Molitor A, Kumsta R, Tatschner T, Riederer P, Meyer J. The glucocorticoid receptor gene exon 1-F promoter is not methylated at the NGFI-A binding site in human hippocampus. // World J Biol Psychiatry.- 2007.- vol. 8, № 4.-P.262-268.

15. Lillycrop K.A., Slater-Jefferies J.L., Hanson M.A., Godfrey K.M., Jackson A.A., Burdge G.C. Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications. // Br J Nutr.- 2007.- vol. 97, № 6.- P.1064-1073.

### **Резюме**

Исследования, проведённые на серых крысах, селекционируемых по поведению, показали значительное превышение мРНК рецептора глюкокортикоидов в гиппокампе ручных крыс по сравнению с агрессивными. Установлено достоверное снижение уровня мРНК ГР у потомков ручных крыс, содержащихся во время беременности на метилобогатой диете.

Here we report that selection for behaviour and maternal methyl-supplemented diet alter rat hippocampus glucocorticoid receptor (GR) mRNA expression. Tame selection is associated with increased GR mRNA expression as compared with aggressive rats, whereas maternal methyl-supplemented diet inhibits tame rat GR gene activity.

**ГРАЧЕВА М.А., ВОРОБЬЕВА Л.И.**

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина,  
Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: rarog70@mail.ru

### **ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПА НА ЭКСПРЕССИВНОСТЬ МУТАЦИИ *eu* И НЕКОТОРЫЕ АДАПТИВНО ВАЖНЫЕ ПРИЗНАКИ *Drosophila melanogaster* Meig**

Согласно выдвинутой Д.К.Беляевым концепции дестабилизирующего отбора, ведущую роль в эволюционных преобразованиях играют изменения регуляторных систем организменного уровня [1]. Показано, что направленный отбор по адаптивно важным признакам становится ключевым механизмом, определяющим скорость эволюционных преобразований, создает дополнительные источники изменчивости, реорганизует регуляторную систему и процессы морфогенеза [1-3]. Возникающие при этом комплексные генетические и морфофизиологические изменения могут иметь сложный системный плейотропный эффект на процессы индивидуального развития организма. Различные аспекты таких преобразований изучены недостаточно и представляют существенный интерес, как для развития эволюционной теории, так и для изучения процессов фенотипической реализации генотипа. В связи с этим целью данной работы было изучение влияния генетического фона линий, полученных в результате дестабилизирующего отбора, на проявление мутаций с варьирующей экспрессивностью, показатели активности ядерного генома и адаптивно важные признаки. Ранее нами была изучена взаимосвязь между функцией эндоредупликации гигантских хромосом и экспрессивностью признака *eu* при переведении мутации *eu* на генетический фон линий НА (низкоактивная), ВА (высокоактивная) и *Oregon-R* (дикий тип) [4]. В задачи данной работы входило проанализировать взаимосвязь между изменениями экспрессивности признака *eu* и адаптивно важными признаками – плодовитостью и продолжительностью жизни при переведении мутации *eu* на генетический фон указанных линий.

Линии НА и ВА были получены Л.З. Кайдановым (Санкт-Петербургский университет) в результате длительной селекции по половой активности самцов в сочетании с тесным инбридингом [5]. Отбор привел к приобретению линией НА комплекса генетически контролируемых изменений, важнейшие из которых затронули нейроэндокринную систему мух. Множественность отклонений от нормы в линии НА позволила авторам высказать предположение о том, что в этой линии возникли нарушения ключевых звеньев общего метаболизма либо регуляторных систем общеорганизменного значения и наблюдаемые изменения признаков являются следствием такого «глубинного нарушения» [3].

#### **Материалы и методы**

Материалом исследования служили неселектируемая аутбредная линия *eyeless*, а также линии *eu<sub>НА</sub>*, *eu<sub>ВА</sub>*, *eu<sub>Or</sub>*, которые были получены путем шести насыщающих скрещиваний мух линии *eyeless* с мухами высокоинбредных линий НА, ВА и *Oregon-R* *Drosophila melanogaster*. К началу эксперимента неселектируемая линия дикого типа *Oregon-R* прошла 82 поколения инбридинга, селективируемые линии НА и ВА – 750 поколений. После проведения насыщающих скрещиваний линии *eu<sub>НА</sub>*, *eu<sub>ВА</sub>*, *eu<sub>Or</sub>* поддерживали путем тесного инбридинга на протяжении всего эксперимента.

Мух выращивали на стандартной сахарно-дрожжевой среде при температуре 24±0,5°C. Экспрессивность мутации *eu* оценивали по проценту особей с полной редукцией одного или обоих глаз от числа всех мух в исследуемой группе. Плодовитость имаго оценивали по количеству взрослых потомков от одной пары родительских особей. Продолжительность жизни оценивали общепринятым методом. Полученные результаты обработаны методами вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Фенотипическими проявлениями «глубинных нарушений», произошедших в ходе отбора по половой активности самцов в линии НА, являются низкая двигательная активность, низкая плодовитость, высокая эмбриональная смертность, низкая продолжительность жизни имаго, низкое содержание цАМФ, и ряд других показателей [3,7]. В то же время линия ВА, полученная путем возвратного отбора в плюс-направлении из линии НА, существенно превосходит линию НА по плодовитости, теплоустойчивости, жизнеспособности, скорости развития, конкурентоспособности, степени политении хромосом и другим показателям [3,6-8].

При переведении мутации *eu* на генетический фон линий НА, ВА и *Oregon-R* установлено увеличение плодовитости и продолжительности жизни (Таблица 1) в насыщенных линиях по сравнению с исходной линией *eyeless*. Значения этих показателей коррелируют со значениями средней степени политении хромосом [4]. При этом в линиях *eu<sub>НА</sub>*, *eu<sub>ВА</sub>* сохраняется характер различий между линиями НА и ВА: линия *eu<sub>ВА</sub>* существенно превосходит линию *eu<sub>НА</sub>* по плодовитости и продолжительности жизни (степень достоверности различий, соответственно,  $p < 0,001$  и  $p < 0,05$ ), а также по степени политении хромосом [4]. В то же время в ходе проведенных насыщающих скрещиваний генетические системы, детерминирующие уровень политении хромосом и другие изучаемые нами признаки в исходных линиях, претерпели, по-видимому, ряд существенных преобразований. Вследствие этого в синтезированных линиях (*eu<sub>НА</sub>*, *eu<sub>ВА</sub>*) возрос уровень гетерозиготности и влияние последствий длительного инбридинга и селекции значительно ослабло. Этим можно объяснить увеличение средней степени политении в линиях *eu<sub>НА</sub>* и *eu<sub>ВА</sub>* по сравнению с исходными линиями НА и ВА [4,6,7]. При этом важно отметить статистически достоверное преимущество линии *eu<sub>ВА</sub>* по плодовитости и продолжительности жизни также и над линией *eu<sub>Or</sub>* – производной от линии дикого типа.

Таблица 1.

Экспрессивность мутации *eu*, плодовитость и продолжительность жизни в линиях *Drosophila melanogaster*, несущих мутантный ген *eu* на различном генетическом фоне.

Показатели		Линии дрозофилы			
		<i>eu</i>	<i>eu<sub>НА</sub></i>	<i>eu<sub>ВА</sub></i>	<i>eu<sub>Or</sub></i>
Экспресси- в- ность признака <i>eu</i> , %	Самки	3,83 ± 0,28	1,82 ± 0,3***	1,77 ± 0,12***	1,62 ± 0,24***
	Самцы	3,01 ± 0,26	0,82 ± 0,19***	0,81 ± 0,14***	0,48 ± 0,12***
	Среднее	3,43 ± 0,19	1,29 ± 0,18***	1,29 ± 0,12***	1,02 ± 0,13***
Продолжи- тельность жизни, сутки	Самки	18,94 ± 0,54	24,2 ± 2,03	30,5 ± 1,24***	23,54 ± 1,67
	Самцы	22,89 ± 0,49	30,85 ± 1,8***	32,7 ± 0,93***	23,48 ± 1,32
	Среднее	20,85 ± 0,37	28,01 ± 1,38***	31,7 ± 0,76***	23,5 ± 1,03
Плодовитость		63,1 ± 2,93	97,7 ± 8,5***	205 ± 8,49***	134 ± 9,68***

Примечание: \* – степень достоверности различий по сравнению с аутбредной линией *eyeless*  $p < 0,05$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$

Переведение мутации *eu* на генетический фон линий НА, ВА и *Oregon-R* приводит к резкому снижению экспрессивности мутантного фенотипа (Таблица 1). Одна из возможных причин этого – более низкий уровень гетерозиготности в линиях *eu<sub>НА</sub>*, *eu<sub>ВА</sub>* и *eu<sub>Or</sub>*, чем в аутбредной линии *eyeless*. Аналогичный эффект был получен также в работе Л.И. Воробьевой [9] при переведении данной мутации на генетический

фон инбредной линии дикого типа *Canton-S*. Увеличение числа глазных фасеток в насыщенных линиях, вероятно, обусловлено увеличением числа аллелей генов, позитивно влияющих на нормальную экспрессию гена *ey*. При этом существенная роль принадлежит генам-модификаторам, локализованным в X-хромосоме и/или взаимодействию генов аутосом и половых хромосом: в линиях *ey<sub>HA</sub>*, *ey<sub>VA</sub>* и *ey<sub>Or</sub>* резко – в два-три раза – возрастают половые различия по экспрессивности мутации *ey* по сравнению с исходной линией *eyeless* (Таблица 1). Практически одинаковая экспрессивность мутации *ey* в линиях *ey<sub>HA</sub>* и *ey<sub>VA</sub>*, а также отсутствие значимых различий по данному показателю между этими линиями и линией *ey<sub>Or</sub>* (Таблица 1) свидетельствует о том, что реорганизация генома дрозофилы, произошедшая в результате длительного направленного отбора по половой активности самцов в линиях HA, VA [3], по-видимому, не затронула систем регуляции экспрессии гена *ey*.

Сходство характера распределения значений СПХ, плодовитости и продолжительности жизни в линиях *eyeless*, *ey<sub>HA</sub>*, *ey<sub>VA</sub>*, *ey<sub>Or</sub>* позволяет предположить механизм, обуславливающий характер этих зависимостей. Как известно, созревание яиц у дрозофилы происходит при участии специализированных клеток – трофоцитов. Из питающих клеток в ооцит поступают РНК различных типов, белки, некоторые цитоплазматические органеллы (рибосомы, митохондрии). Накопленные в ооплазме компоненты после оплодотворения определяют ранние события эмбриогенеза [10]. Высокая интенсивность синтетических процессов в трофоцитах обусловлена умножением дозы генов при последовательных эндоредупликациях хромосом. Возможно, влияние генотипа линий *eyeless*, *ey<sub>HA</sub>*, *ey<sub>VA</sub>* и *ey<sub>Or</sub>*, на функцию эндоредупликации гигантских хромосом наблюдаемое при исследовании клеток слюнных желез, проявляется также и в ядрах трофоцитов. Таким образом, генетически обусловленные различия по степени полипloidности хромосом могут оказывать непосредственное действие, как на плодовитость имаго, так и на жизнеспособность особей следующего поколения.

#### **Выводы**

1. При переведении мутации *ey* на генетический фон линий HA, VA и *Oregon-R* установлено резкое снижение экспрессивности мутантного фенотипа по сравнению с исходной линией *eyeless*.
2. Показано статистически достоверное увеличение степени полипloidности хромосом, плодовитости, продолжительности жизни в линиях *ey<sub>HA</sub>*, *ey<sub>VA</sub>*, *ey<sub>Or</sub>* по сравнению с исходной линией *eyeless*.

#### **Литература**

1. *Беляев Д.К.* Дестабилизирующий отбор // Развитие эволюционной теории в СССР (1917-1970-е годы) / Ред. Микулинский С.Р., Полянский Ю.И. – Л.: Наука. – 1983. – С. 266-277.
2. *Трут Л.Н.* Система эволюционных взглядов академика Д.К. Беляева, ее предпосылки и основные положения // Проблемы генетики и теории эволюции/ Ред. Шумный В.К., Рувинский А.О. – Новосибирск: Наука. – 1991. – С. 52-67.
3. *Кайданов Л.З., Мыльников С.В., Галкин А.П.* и др. Генетические эффекты дестабилизирующего отбора при селекции по адаптивно важным признакам в линиях *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 1997. – Т. 33, №8. – С. 1102-1109.
4. *Рарог (Грачева) М.А., Воробьева Л.И., Страшнюк В.Ю.* Влияние генотипа на функцию эндоредупликации гигантских хромосом и экспрессивность признака *eyeless* у *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 2003. – Т.39, №8. – С. 1053-1058.
5. *Кайданов Л.З.* Анализ генетических последствий отбора и инбридинга у *Drosophila melanogaster* // Журн. общ. биологии. – 1979. – Т. 40, №6. – С. 834-849.
6. *Страшнюк В.Ю., Ненейвода С.Н., Шахбазов В.Г.* Цитоморфометрическое исследование полипloidных хромосом *Drosophila melanogaster* Meig в связи с

- эффектом гетерозиса, отбором по адаптивно важным признакам и полом // Генетика. – 1995. – Т. 31, №1. – С. 24-29.
7. Кайданов Л.З., Мыльников С.В., Иовлева О.В., Галкин А.П. Направленный характер генетических изменений при длительном отборе линий *Drosophila melanogaster* по адаптивно важным признакам // Генетика. – 1994. – Т. 30, №8. – С. 1085-1096.
  8. Страшнюк В.Ю. Генетична варіабельність та адаптивні модифікації ступеня політенії гігантських хромосом у *Drosophila melanogaster* // Труды по фундаментальной и прикладной генетике. – Харьков: Штрих, 2001. – С. 285-295.
  9. Воробьева Л.И. Зависимость эффекта гетерозиса от уровня гетерозиготности исходных линий: Дис. ... канд. биол. наук. Харьков: Харьковский гос. ун-т, 1988. 170 с.
  10. Cummings M.K., Robin M.S., Ganetzky B. Biochemical aspects of oogenesis in *Drosophila melanogaster* // J. Ins. Physiol. – 1971. – vol. 17. – P. 2105-2118.

### Резюме

При переведении мутации *ey* на генетический фон высокоинбредных линий НА (низкоактивная), ВА (высокоактивная) и *Oregon-R* (дикий тип) *Drosophila melanogaster* установлено резкое снижение экспрессивности мутантного фенотипа, а также достоверное увеличение плодовитости, продолжительности жизни, по сравнению с исходной аутбредной линией *eyeless*.

При переведенні мутації *ey* на генетичне оточення ліній високоінбредних НА (низькоактивна), ВА (високоактивна) та *Oregon-R* (дикий тип) *Drosophila melanogaster* встановлено різке зниження експресивності мутантного фенотипу, а також вірогідне збільшення плодючості, тривалості життя порівняно з аутбредною лінією *eyeless*.

On genetic background of lines LA (low activity), HA (high activity), and *Oregon-R* (wild type) *Drosophila melanogaster* expressivity of the *ey* mutation was shown to be far lower than in original *eyeless* line. But in lines *ey*<sub>LA</sub>, *ey*<sub>HA</sub>, *ey*<sub>Or</sub>, fecundity, life span were significantly higher compared with original *eyeless* lines.

**ДМИТРИЄВ О. П., КРАВЧУК Ж.М., НАУМЕНКО В.Д., ПОЛЯКОВСЬКИЙ С.О., ДЯЧЕНКО А.І.**

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України  
Київ, 03143 вул. акад. Заболотного, 148, e-mail: dmyt@iatp.org.ua*

### **ІНДУКУВАННЯ СИСТЕМНОЇ СТІЙКОСТІ У РОСЛИН ЗА ДОПОМОГОЮ БІОГЕННИХ ЕЛІСИТОРІВ**

Захист рослин, як відомо, ґрунтується на двох головних принципах: одержанні стійких сортів і використанні пестицидів. Однак процес селекції стійких сортів є досить тривалим і виникнення нових вірулентних рас патогенів найчастіше випереджає можливості селекціонерів. Крім того, орієнтація селекційної роботи в останні десятиліття на підвищення врожайності сільськогосподарських культур привела до значного ослаблення їхньої стійкості. Що стосується пестицидів, то майже всі вони відносяться до класів сполук, серед яких зустрічаються мутагени і канцерогени. Наявність залишкових кількостей пестицидів у складі готової сільськогосподарської продукції може створювати загрозу здоров'ю населення [1]. І, нарешті, деякі навіть найбільш ефективні пестициди справляють моносайтову дію, внаслідок чого в популяціях фітопатогенів можуть накопичуватися резистентні до них форми.

Все це обумовлює доцільність пошуку альтернативних методів захисту рослин, необхідних для одержання екологічно чистої продукції й оздоровлення навколишнього середовища. Одним з найбільш перспективних є метод індукування природної стійкості рослин. Він заснований не на пригніченні патогенів, як це має місце у випадку використання пестицидів, а на індуванні імунного потенціалу рослин подібно до того, як це відбувається в природі.

Відомо, що у патогенів є особливі метаболіти – індуктори або еліситори, які є антигенною детермінантою паразита. Рослини здатні розпізнавати ці біогенні індуктори і вмикати у відповідь свої захисні реакції [2]. До числа найбільш важливих з них відносяться: утворення активних форм кисню (АФК), механічне зміцнення клітинної стінки (відкладення калози і лігніну), синтез антибіотичних речовин – фітоалексинів (ФА) і нагромадження патоген-залежних (PR-) білків [3]. Одні з захисних реакцій виникають безпосередньо в місці інфікування і є «локальними». Інші – це «системні» захисні реакції, що розвиваються у вільних від зараження тканинах інфікованої рослини. Цей феномен набуття стійкості віддаленими від місця зараження тканинами рослини одержав назву системної індукованої стійкості (СІС) [4].

**Системна індукована стійкість.** СІС виявлена у багатьох видів рослин. Як у дводольних - картоплі, томатів, сої, червоної конюшини, люцерни, так і однодольних, наприклад, рису [5]. До числа трьох, найбільш досліджених біологічних моделей для вивчення СІС, відносяться тютюн, огірок і різущка Таля - *Arabidopsis thaliana*.

Показано, що попередня інокуляція рослин тютюну вірусом тютюнової мозаїки (ВТМ) приводить до підвищення їхньої стійкості, яка виявлялася, коли тютюн *Xanthi-nc*, що несе ген *N*, був повторно інокульований ВТМ [6]. Підвищення стійкості безпосередньо в місці інфікування одержало назву локальної індукованої стійкості (ЛІС) на відміну від СІС, що виявлялася у віддалених і вільних від зараження тканинах цієї рослини.

Виявилось, що попередня інокуляція не тільки вірусами, але й грибами або бактеріальними патогенами може індукувати стійкість до цих або філогенетично віддалених патогенів, тобто однією з найбільш важливих особливостей СІС є широкий спектр набутої стійкості до різних збудників хвороб. Пізніше було встановлено, що у рослин, інфікованих ВТМ, підсилюється експресія PR-білків (хітинази та глюканази), що корелює з розвитком стійкості. Оскільки руйнування флоєми зупиняло розвиток СІС, було висловлене припущення, що сигнал, який обумовлює розвиток стійкості, переміщається по флоємі. Встановлено можливість індукції СІС в рослин тютюну з використанням хімічних сполук - саліцилової кислоти (СК) і 2,6-дихлор-ізонікотинової кислоти (ІНК) [7].

Іншою добре охарактеризованою модельною системою для дослідження індукованої стійкості стали рослини огірка. В ранніх роботах Й. Кюча [6] показано, що системну стійкість до захворювань, викликаних *Colletotrichum lagenarium*, *Cladosporium cucumerinum*, *Pseudomonas lachrymans* і вірусом некрозу тютюну (ВНТ), вдається індукувати попередньою інокуляцією кожним з цих патогенів. Захисний ефект зберігався протягом декількох тижнів і також характеризувався широким спектром набутої стійкості.

*A. thaliana* був успішно використаний як модель для вивчення СІС. При індуванні стійкості до бактерії *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* і гриба *Peronospora parasitica* за допомогою ІНК виявлене нагромадження мРНК для гомологів PR-білків і поява самих білків в апопласті [8]. Пізніше з'явилися повідомлення про індукцію СІС одним видом грибів до іншого виду і авірулентними бактеріями до вірулентних штамів тих же бактерій. Аналіз т.зв. СІС-білків (кількість і активність яких добре корелює з підтримкою стану стійкості) показав, що багато хто з них відносяться до PR-білків.

**Мобільний сигнал для системної індукованої стійкості.** Після первинного зараження *P. syringae* у флоємі рослин огірків і тютюну відбувалось підвищення

концентрації СК. Було висловлене припущення, що саме СК є мобільним сигналом для розвитку СІС у вище розташованих неінфікованих листках [9]. Однак, в інших експериментах, коли інфіковані листки відрізали через 4 год після первинного ураження, це не позначалося на нагромадженні СК або прояві реакції СІС у вище розташованих листках. Крім того, протягом перших 4 год у флоемі не відзначалося істотного підвищення вмісту СК. Це викликало перші сумніви щодо ролі СК як мобільного сигналу. Деяку ясність внесли експерименти з щепленнями, у яких використовували рослини з генотипом NahG, що не накопичують СК у відповідь на ураження патогеном [10]. Коли на підщепи NahG-рослин або підщепи дикого генотипу прищеплювали черешки дикого типу в останніх відбувалася індукція СІС після інфікування підщеп ВТМ. З іншого боку, у щеплень з генотипом NahG не виникала СІС, незалежно від того, на які підщепи робилося щеплення. Отримані результати свідчать, що СК навряд чи виконує функції мобільного сигналу. Утворення сигналу не залежить від СК, але, очевидно, вона необхідна для індукції СІС сигналом, природа якого дотепер невідома.

Тому особлива увагу дослідників привабила жасмонова кислота (ЖК) та її метиловий ефір (Ме-ЖК) після того, як була відкрита їхня гормональна активність, здатність регулювати ріст і прискорювати старіння рослин. Ці сполуки утворюються при окислюванні ліноленової кислоти ліпоксигеназою за участю молекулярного кисню. Вважається, що вони є реальними кандидатами на роль сигнальних молекул, що ініціюють комплекс імунних процесів у рослинних клітинах. Вміст ендогенних ЖК і Ме-ЖК зростає в результаті механічного поранення рослинних тканин, а також після додавання еліситорів в суспензійну культуру клітин різних видів рослин [11]. Показано, що жасмонати індукують синтез інгібіторів протеїназ у відповідь на поранення або інфікування, а також тіонінів - поліпептидів з антигрибною активністю. Висловлене припущення, що ЖК є інтегральною частиною системи трансдукції сигналу, що регулює в рослинах індукцію захисних генів. Проте є факти, які суперечать цій думці: Ме-ЖК не індукував експресію СІС-генів або стан стійкості в тютюну. Крім того, ЖК і Ме-ЖК справляють пряму антимікробну дію на патогени, що утрудняє їхній аналіз як сигнальних молекул.

З'ясування шляхів формування СІС веде до нових підходів у створенні трансгенних рослин з підвищеною стійкістю до хвороб.

**Індукування хворобостійкості у рослин.** Розвиток технології рекомбінантних ДНК дозволяє переносити в рослини гени, що беруть участь у синтезі ФА і контролюють хворобостійкість. Теоретично тут можливі кілька підходів. По-перше, генетичне вдосконалення вищих рослин з наданням їм можливостей синтезувати нові ФА, які вони раніш не виробляли. По-друге, зміна генома таким чином, щоб рослина могла продукувати ФА у відповідь на зараження сумісною расою гриба (перенесення генів, які контролюють утворення рецепторів на цитоплазматичній мембрані, і т.п.). І, нарешті, перенесення генів хворобостійкості з однієї рослини в іншу, котрі не схрещуються між собою при звичайній гібридизації.

Відомо, що багато спеціалізованих патогенів можуть переборювати захисні реакції рослин, перешкоджаючи індукуванню ФА, виробляючи в собі толерантність до них або метаболізуючи ФА до нетоксичних сполук. Але ці ж патогени виявляються чутливими до ФА інших рослин і тому, швидше за все, не є патогенними для цих рослин. У перспективі гени біосинтезу ФА можна буде клонувати і переносити, розширюючи, таким чином, арсенал ФА тієї або іншої рослини. Деякі автори пропонують індукувати у рослинах великі концентрації ФА за рахунок їх обробки індукторами. Однак при цьому вміст ФА в рослинах може досягти токсичних для людини і тварин концентрацій, тобто вони стануть непридатними для харчових і кормових цілей. Крім того, індукування ФА в здорових рослинах у великій кількості



перетворить їх з індукованих у конститутивні речовини і, по суті, "розсекретить" захисну зброю рослин, внаслідок чого паразит зможе швидко до неї пристосуватися.

Більш ефективним, на нашу думку, є підвищення стійкості сприйнятливих рослин до ураження шляхом їх обробки малими дозами біогенних індукторів, які викликають лише сліди ФА в рослинних тканинах, але разом з тим істотно підвищують їх стійкість при наступному контакті з патогеном. Обробка дисків картоплі ЛГП-комплексом у низьких концентраціях сенсibiliзувала тканини до наступного зараження сумісною расою *P. infestans* [12]. Під дією цього комплексу індукувались лише сліди ФА картоплі рішитину, але у відповідь на наступне зараження кількість ФА значно зростало у порівнянні з не обробленими індуктором бульбами. Польові дослідження показали, що обробка різних сортів картоплі ЛГП-комплексом дозволяє захистити рослини від ряду патогенних грибів, бактерій і нематод.

В наших дослідженнях показана принципова можливість підвищення хворобостійкості рослин томатів і цибулі за допомогою біогенного індуктора з клітинних стінок гриба *Fusarium solani* [1]. Препарат сенсibiliзував рослинні тканини, які внаслідок цього швидше й ефективніше вмикали систему своїх захисних реакцій, зокрема, утворення ФА при наступному контакті з патогеном. Передпосівне замочування насіння цибулі в розчині індуктора або обприскування ним вегетуючих рослин в умовах штучного інфекційного фону зменшували поширення і ступінь розвитку дуже небезпечної хвороби цибулі - пероноспороза.

Оскільки біогенні індуктори діють за тим же принципом, по якому рослини захищаються в природних умовах, можна вважати, що при їх використанні для підвищення хворобостійкості рослин не буде забруднюватися навколишнє середовище і не будуть знищуватися популяції мікроорганізмів, як це має місце при обробці пестицидами.

### **Заключення**

Поки ще передчасно робити далекосяжні висновки щодо практичного значення індукування стійкості у рослин. Хімічний метод захисту рослин став у наш час основним і рентабельним землеробством без нього в сучасних умовах практично неможливе. Отримані результати не стільки розкрили механізми імунітету рослин, скільки намітили підходи до їх подальшого дослідження фахівцями різного профілю. Треба буде створювати промислову біотехнологію одержання і використання в рослинництві ефективних індукторів захисних реакцій, виділених з мікроорганізмів.

За останні 15 років опубліковано більше 3 тис. статей присвячених СІС, дослідження якої по праву стало гарячою точкою фітоімунології [13]. Індукувати стійкість рослин змушує складна екологічна обстановка. Пестицидний і інфекційний тиск на рослини часто перевищує їх адаптаційні можливості. Тому головним, на нашу думку, має бути інтеграція наявних методів захисту рослин з максимальним використанням адаптивних можливостей природної стійкості самих рослин.

### **Література**

1. *Дмитриев А.П.* Фитоалексины и их роль в устойчивости растений. - Киев: Наук. думка, 2000. - 207 с.
2. *Метлицкий Л.В., Озерецковская О.Л., Кораблева Н.П. и др.* Биохимия иммунитета, покоя, старения растений - М.: Наука, 1984.- 264 с.
3. *Тарчевский И.А.* Сигнальные системы клеток растений. – М: Наука, 2002. – 294 с.
4. *Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G. et al.* Systemic acquired resistance // *Plant Cell*. - 1996. – Т. 8. - P. 1809-1819.
5. *Van Loon L.C.* Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins // *Eur. J. Plant Pathol.* – 1997. – Т. 103. – P.753-765.
6. *Kuc J.* Expression of latent genetic information for disease resistance in plants // *Innovative Approaches to Plant Disease Control*. Chef J. (ed) New York:- 1987.- P. 255-274.

7. Cameron R.K., Dixon R., Lamb C. Biologically induced systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. - 1994.- N 5.- P. 715-725.
8. Dangl J. L. Applications of *Arabidopsis thaliana* to outstanding issues in plant-pathogen interactions // Int. Rev. Cytology. - 1993. –Т. 144. - P. 53-83.
9. Durner J., Shah J., Klessig D.F. Salicylic acid and disease resistance in plants // Trends Plant Sci. – 1997. – N 2. – P. 266-274.
10. Neuenschwander U., Lawton K., Ryals J. Systemic acquired resistance. 1996.- New York: Chapman & Hall.- P. 81-106.
11. Ebel J., Cosio E.G. Elicitors of plant defense responses // Int. Rev. Cytology.- 1994. –Т. 148. - P. 1-36.
12. Озерецковская О.Л. Индуцирование устойчивости растений биогенными элиситорами фитопатогенов // Прикл.биохим. и микробиол. -1994. –Т. 30, N 3. - С. 325-339.
13. Dmitriev A.P. Induction of systemic resistance in plants // Cytology and Genetics. – 2004. – N5. – P. 72-81.

### Резюме

Рослини здатні розпізнавати певні метаболіти патогена (т.зв. індуктори або еліситори) та реагувати на його вторгнення активацією каскаду захисних реакцій. На цьому базується метод індукування природної стійкості рослин біогенними індукторами, що дозволяє уникати забруднення навколишнього середовища, пов'язаного з широким використанням пестицидів. Розглянуто дані про молекулярні аспекти взаємодії фітопатогенних мікроорганізмів з рослиною-хазяїном.

Растения способны распознавать особые метаболиты патогена (т.н. индукторы или элиситоры) и реагировать на его вторжение активацией каскада защитных реакций. На этом базируется метод индуцирования естественной устойчивости растений биогенными индукторами, который позволяет избежать загрязнения окружающей среды, связанного с широким использованием пестицидов. Рассмотрены сведения о молекулярных аспектах взаимоотношений фитопатогенных микроорганизмов с растением-хозяином.

Plants are capable to recognize the penetrating pathogen and to respond to his invasion by activation of the set of defense responses. That is the base for a new method of systemic acquired resistance (SAR) in plants by biotic inducers derived from the pathogens. The method is allowed to avoid contamination of the environment caused by intensive usage of pesticides. The review summarizes data on molecular aspects of plant-pathogen interactions.

**ДЬЯЧЕНКО Л.Ф.<sup>1</sup>, ТОЦЬКИЙ В.М.<sup>1</sup>, ФАЙТ В.І.<sup>2</sup>, ТОПТИКОВ В.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Одеський національний університет ім. І.І.Мечникова

Україна 65026, Одеса вул. Дворянська 2, e-mail: caphgen@ukr.net

<sup>2</sup>Селекційно-генетичний інститут УААН, Україна, 65036 Одеса, Овідіопольська дор., 3

### **ЕКСПРЕСИВНІСТЬ МНОЖИННИХ ФОРМ ДЕЯКИХ ФЕРМЕНТІВ У ТКАНИНАХ РОСЛИН ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ З РІЗНИМИ ГЕНАМИ ФОТОПЕРІОДИЗМУ**

Фотоперіодична чутливість значною мірою визначає рівень адаптації рослинного організму до конкретних умов вирощування. М'яка пшениця є рослиною довгого дня, але її сорти дуже поліморфні щодо реакції на скорочення тривалості світового періоду від майже нейтральних до дуже чутливих генотипів [1, 2]. Більшість

сучасних сортів слабо або середньо чутливі до фотоперіоду, що обумовлено присутністю 1-2 домінантних алелів генів *Ppd* [3, 4]. Відмінності між генотипами за фотоперіодичною чутливістю проявляються вже на початкових етапах розвитку рослини [5]. Зазначені відмінності мають прямий ефект на рівень морозостійкості конкретних генотипів [6, 7]. Сильна фотоперіодична чутливість затримує розвиток зачатків репродуктивних органів восени та підвищує рівень стійкості генотипу до стресових умов в період перезимівлі. Слабка фотоперіодична чутливість, навпаки, прискорює розвиток, але такі посіви більше гинуть від морозів [1]. Фотоперіодична нейтральність домінує, тому сильна реакція на скорочений день обумовлена рецесивними алелями генів фотоперіодизму.

Відомо, що домінантні алелі генів *Ppd* виявляють плейотропний ефект на ряд агрономічних ознак пшениці, наприклад на морозостійкість, врожайність, висоту рослин та ін. [6, 7]. Адаптаційна здібність рослин пов'язана зі змінами генної експресії багатьох структурних та регуляторних генів, зокрема ферментів. Тому метою даної роботи є з'ясування змін у функціонуванні деяких генів ферментів та вплив на цей процес домінантних і рецесивних генів фотоперіодизму в геномі сорту Миронівська 808 при загартуванні рослин в природних умовах.

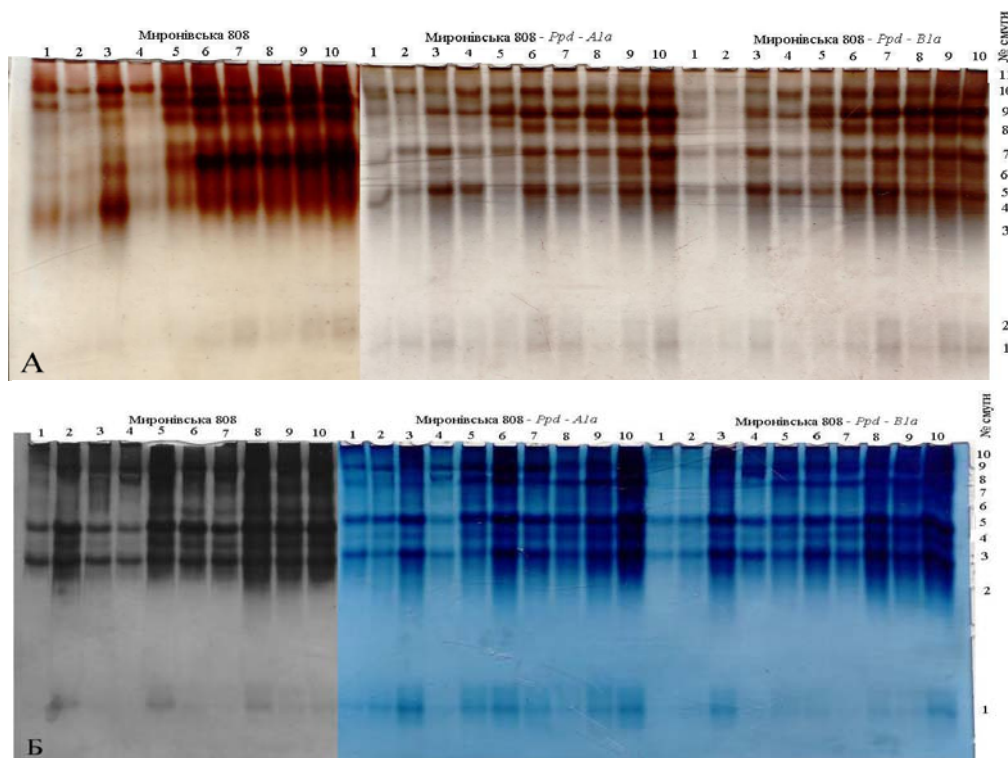
### **Матеріали і методи**

Матеріалом досліджень слугували рослини озимої пшениці сорту Миронівська 808 та її майже ізогенні по генах фотоперіодизму лінії, які створені у відділі генетики Селекційно-генетичного інституту [8]. Сорт Миронівська 808 є носієм тільки рецесивних алелів генів *Ppd* і має генотип *Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1b* [3]. Генотипи ліній Миронівська 808-*Ppd-A1a* та Миронівська 808-*Ppd-B1a* можуть бути позначені відповідно : *Ppd-A1a Ppd-B1b Ppd-D1b* та *Ppd-A1b Ppd-B1a Ppd-D1b*. Посів проводили 1.10.2006 р. Рослинний матеріал для визначення ферментів (зелені листки) відбирали через сім діб протягом десяти тижнів, починаючи з п'ятої доби після сходів (25.10.06). Температурні умови вирощування у вказаний проміжок часу сприяли проходженню загартовування рослин в природних умовах (м. Одеса).

Екстрагування ферментів (пероксидаза – ПО, фенолоксидаза – ФО, цитохромоксидаза - ЦХО, супероксиддисмутаза – СОД, естераза), розподіл їх в поліакриламідному гелі та візуалізацію смуг провадили за методиками, що наведені раніше [9]. Електрофореграми аналізували за програмою АнаИС, за допомогою якої для кожної форм досліджуваного ферменту визначали експресивність (площу та інтенсивність забарвлення відповідної смуги в гелі в умовних одиницях) та частку питомої щільності кожної смуги на денситограмі у відсотках. Статистичний, кореляційний та дисперсійний аналіз результатів провадили за програмами Microsoft Excel.

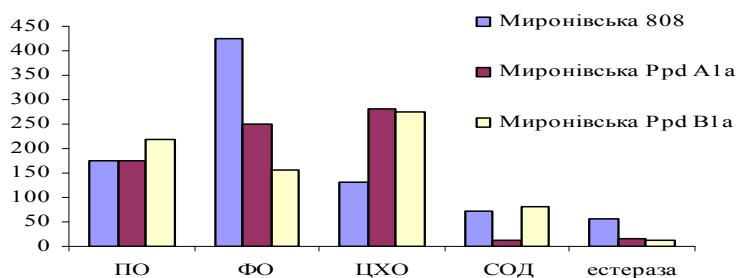
### **Результати та обговорення**

Електрофоретичний розподіл множинних молекулярних форм пероксидази та цитохромоксидази представлено на рис.1. ПО в гелі поділяється на 11, а ЦХО – на 10 смуг з різною рухливістю та інтенсивністю забарвлення, що корелює з експресивністю ферментів. Смуги нумерували, починаючи з № 1 як найбільш рухливої форми. На п'ятий тиждень від початку відбору листків для аналізу, коли середня температура повітря була нижчою 10 °С, спостерігається підвищення експресивності обох ферментів. Таке підвищення при загартуванні рослин стосується переважної більшості форм ферменту, але особливо це помітно у форм 5 та 7-10 у пероксидази і 3, 5, 9 у цитохромоксидази. Схожі зміни експресивності відбувалися і з боку інших досліджуваних ферментів. Якісної різниці між спектрами досліджуваних ферментів у сорту Миронівська 808 та у її майже ізогенних по генах *Ppd* ліній не спостерігається.



**Рис. 1.** Електрофоретичні спектри пероксидази (А) і цитохромоксидази (Б) в рослинах сорту Миронівська 808 та її майже ізогенних ліній при загартування рослин в польових умовах (1 - 10 – тижні дослідження)

Загальна експресивність досліджуваних ферментів при загартуванні рослин пшениці змінюється неоднаково (рис. 2). Майже у всіх випадках вона зростає, інколи не змінюється і в жодному варіанті досліду не спостерігається зменшення цього показника. Показник експресивності максимально зростає у випадку фенолоксидази : в рослинах Миронівської 808 – на 424 % порівняно з незагартованими рослинами, в рослинах Миронівської 808-*Ppd-A1a* на 250 %, а у рослин лінії Миронівська 808-*Ppd-B1a* – на 155 %. Експресивність ЦХО змінюється по-іншому: у ізогенних ліній наприкінці загартування вона однакова і вдвічі перевищує експресивність цього ферменту в рослинах сорту Миронівська 808. Експресивність ПО підвищується практично однаково у всіх трьох генотипів рослин. Загальна експресивність СОД и, особливо естерази, майже не змінюється в процесі загартовування рослин.



**Рис. 2.** Зміни загальної експресивності ферментів при загартовуванні рослин пшениці в польових умовах (відсотки від експресивності до загартування)

Заміна в геномі Миронівської 808 рецесивних генів фотоперіодизму на домінуючі призводить до помітних змін експресивності та питомої ваги досліджуваного ферменту у загальному ензимному спектрі (таблиця 1). Ці зміни залежать як від алеля генів фотоперіодизму, так і від досліджуваного ферменту. Дисперсійний аналіз даних експресивності та відсоткових часток окремих форм показав, що перенос в геном Миронівської 808 домінуючих генів фотоперіодизму призводить до вірогідної різниці між трьома ге-

Таблиця 1

Вплив загартування рослин Миронівської 808 та її ліній на окремі показники досліджуваних ферментів

Генотип	Фермент	Кількість форм	Кількість форм, експресивність яких корелює з загартуванням		Кількість форм, частка яких корелює з загартуванням		Сумарна експресивність	Дисперсійний аналіз*	t-тест**
			↑	↓	↑	↓			
Миронівська 808	ПО	11	11	-	-	3	↑	P ≤ 0,46	
Миронівська- <i>Ppd A1a</i>	ПО	11	6	-	1	4	↑		P ≤ 0,42
Миронівська- <i>Ppd B1a</i>	ПО	11	11	-	1	2	↑		P ≤ 0,001
Миронівська 808	ФО	10	7	-	3	3	↑	P ≤ 0,001	
Миронівська- <i>Ppd A1a</i>	ФО	10	9	-	2	2	↑		P ≤ 0,001
Миронівська- <i>Ppd B1a</i>	ФО	10	8	-	3	3	↑		P ≤ 0,001
Миронівська 808	ЦХО	10	6	1	2	3	↑	P ≤ 0,012	
Миронівська- <i>Ppd A1a</i>	ЦХО	10	8	-	1	3	↑		P ≤ 0,02
Миронівська- <i>Ppd B1a</i>	ЦХО	10	2	-	3	3	↑		P ≤ 0,16
Миронівська 808	СОД	11	6	-	2	2	↑	P ≤ 0,001	
Миронівська- <i>Ppd A1a</i>	СОД	11	-	-	1	-	-		P ≤ 0,001
Миронівська- <i>Ppd B1a</i>	СОД	11	7	-	2	3	↑		P ≤ 0,001
Миронівська 808	Естераза	11	3	-	2	3	↑	P ≤ 0,002	
Миронівська- <i>Ppd A1a</i>	Естераза	11	-	-	-	-	-		P ≤ 0,001
Миронівська- <i>Ppd B1a</i>	Естераза	11	1	3	-	2	-		P ≤ 0,025

\*Значення P для дисперсійного комплексу по трьом генотипам для кожного ферменту

\*\*Попарне порівняння окремої ізогенної лінії з Миронівською 808

нотипами по усіх ферментах за виключенням пероксидази. Парний двовибірковий t-тест для середніх також свідчить про вірогідну різницю між змінами у функціонуванні ферментів у рекурентного генотипу та його майже ізогенними лініями. В протилежність цьому вірогідної різниці між самими лініями зазначеним методом не виявлено. В цілому заміщення алеля *Ppd-B1b* на алель *Ppd-B1a* або не змінює, або збільшує досліджувані показники порівняно з контрольними рослинами, а заміщення рецесивного гену *Ppd-A1b* на домінуючий *Ppd-A1a* зменшує рівень змін експресивності досліджуваних ферментів у відповідь на загартування низькими температурами. Як свідчать дані інших авторів [6-7], вказані домінуючі алелі неоднаково впливають на ряд важливих агрономічних ознак, тобто розрізняються інтенсивністю плейотропного ефекту, що підтверджується і в даному дослідженні.

### Висновки.

1. В тканинах незагартованих і загартованих рослин пшениці не виявлено відмінностей в електрофоретичному розподілі окремих ізоформ досліджуваних ферментів.
2. Загартування рослин пшениці призводить до змін у функціонуванні досліджуваних ферментів, що відзначається значним підвищенням їх експресивності та змінами кількісних співвідношень між окремими ізоформами ферментів.
3. Майже ізогенні по генах *Ppd* лінії Миронівської 808 за експресією досліджуваних ферментів вірогідно відрізняються від своєї рекурентної батьківської форми.
4. При загартуванні рослин домінуючий алель *Ppd-B1a* переважно сприяє збільшенню експресивності досліджуваних ферментів порівняно з алелями *Ppd-B1b* або *Ppd-A1a*.

## Література

1. Файт В.І. Морозостійкість і урожайність окремих сортів озимої м'якої пшениці // Вісник аграрної науки. – 2005. – №11. – С. 25-29.
2. Стельмах А.Ф., Литвиненко В.І., Файт В.І. Яровизаційна потреба та фоточутливість сучасних генотипів озимої м'якої пшениці // Зб. наук. праць СГІ-НАЦ НАІС. – Одеса, 2004. – Вип.5 (45). – С. 118-127.
3. Файт В.І., Федорова В.Р. Ідентифікація сортів озимої м'якої пшениці за генами фотоперіодичної чутливості // Зб. наук. праць СГІ – НАЦ НАІС. – Одеса. – 2007. – Вип. 9(49). – С. 9-21.
4. Гончаров Н.П. Генетический контроль фотопериодической реакции у мягкой пшеницы // С.-х. біологія. – 1986. - № 11. – С. 84-90.
5. Стельмах А.Ф., Мартынюк В.Р. Эффекты доминантных генов *Ppd* по особенностям органогенеза у озимой мягкой пшеницы // Цитология и генетика. - 1998. – Т. 32, №6. – С. 27-34.
6. Worland A.J., Borner A., Korzun V. et al. The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheat // Euphytica. – 1998. – V. 100. - P. 385-394.
7. Файт В.І., Федорова В.Р. Влияние различий генов *Ppd* на агрономические признаки озимой мягкой пшеницы // Цитология и генетика. – 2007. – Т. 37, №5. - С. 69-76.
8. Файт В.І., Стельмах А.Ф., Мартынюк В.Р., Воронин А.Н. Создание изогенных по локусам *Ppd1-3* линий мягкой пшеницы // Науч.-тех. бюл. СГИ. – 1997. – №1(87). – С. 18-21.
9. Дьяченко Л.Ф., Топтіков В.А., Міресь С.Л., Бабаянц Л.Т., Тоцький В.М. Множинні молекулярні форми деяких оксидоредуктаз і резистентність м'якої пшениці до фузаріозу // Вісник ОНУ. – 2001. – Т. 6, №1. – С. 59-66.

## Резюме

Досліджували електрофоретичні спектри пероксидази, супероксиддисмутази, фенолоксидази, цитохромоксидази і естераз в листках пшениці сорту Миронівська 808 та її майже ізогенних по генах *Ppd* ліній. При загартуванні рослин в польових умовах домінуючі гени *Ppd-A1a* та *Ppd-B1a* неоднаково впливали на зміни експресивності окремих ізоформ ферментів.

Исследовали электрофоретические спектры пероксидазы, супероксиддисмутазы, фенолоксидазы, цитохромоксидазы и эстераз в листках линий пшеницы сорта Мироновская 808 и ее почти изогенных по генам *Ppd* линий. При закаливании растений в полевых условиях доминантные гены *Ppd-A1a* и *Ppd-B1a* по-разному влияли на изменения экспрессивности отдельных изоформ ферментов.

The electrophoretic spectra of multiple molecular forms of peroxidase, superoxide desmutase, phenoloxidase, cytochromoxidase and esterase in winter *Ppd* nearisogenic lines of v. Mironovskaya 808 have been studied. During autumn vernalization in the field some isoforms of enzyme expression in nearisogenic lines differentiated from recurrent genotype.

## ЕВТУШЕНКОВ А.Н., АГАБОЗОРГИ С.

Белорусский государственный университет.

Беларусь, 220030, Минск, проспект Независимости, 4 e-mail: evtushenkov@bsu.by

## ВИРУЛЕНТНЫЕ СВОЙСТВА МУТАНТОВ БАКТЕРИЙ *ERWINIA ATROSEPTICA* ПО ГЕНАМ СИСТЕМЫ СЕКРЕЦИИ III ТИПА

Бактерии *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* способны поражать растения как в период вегетации, вызывая сосудистый бактериоз “черную ножку” картофеля, так и

при хранении в зимнее время, провоцируя мягкие гнили клубней картофеля.

Основными факторами вирулентности для пектолитических видов *Erwinia* являются внеклеточные деполимеризующие ферменты, в том числе пектолитические, целлюлолитические, протеолитические, а также некоторые другие, роль которых до конца не выяснена [1]. Важную роль как фактора вирулентности среди пектолитических ферментов *Erwinia* играет пектатлиаза, представленная несколькими изоферментами. С помощью деполимеризующих ферментов бактерии *E.carotovora subsp.atroseptica* разрушают (мацерируют) растительные ткани различных растений, таких как клубни картофеля, корнеплодов моркови, свеклы и ряда других культур, демонстрируя тем самым отсутствие специализации и приводя к порче значительной части урожая [2].

До недавнего времени считали, что деполимеризующие ферменты бактерий *E.carotovora subsp.atroseptica* являются основными факторами вирулентности и основное внимание уделяли их регуляции их синтеза и секреции.

Но открытие вначале у специализированных патогенов, а затем и у бактерий *Erwinia*, системы секреции III типа (ССТТ) и белков, субстратов этой системы стимулировало интерес к этой системе и изучению ее роли в вирулентности *E.carotovora subsp.atroseptica* [3].

Первым белком фитопатогенных бактерий, для которого была показана способность к секреции через ССТТ был HrpN из *Erwinia amylovora* [4]. Этот небольшой (385 а.о.), термостабильный, богатый глицином, гидрофильный белок, названный харпином<sub>Еа</sub>, обладал уникальной способностью при инфильтрации в ткани листьев табака вызывать развитие реакции гиперчувствительности, приводящей к локальной гибели растительных клеток. В настоящее время описано большое количество белков харпинов у разных фитопатогенов, и проводится выяснение их роли в вирулентности бактерий [5].

Ранее в нашей лаборатории были получены мутанты по разным генам ССТТ *E.carotovora subsp.atroseptica* и показана роль этих генов в индукции реакции гиперчувствительности и работе секреторной системы [6-8]. Целью данной работы являлось изучение роли генов ССТТ в мацерации бактериями тканей клубней картофеля и корнеплодов моркови.

#### Материалы и методы

В работе использовали бактерии *Erwinia carotovora subsp.atroseptica* дикого типа и мутанты, свойства которых приведены в табл.1.

Для определения пектатлиазной активности бактерии выращивали в минеральной среде 1А с 0,3% полипектата натрия и 0,5% глицерина.

Минеральную среду 1А готовили по прописи, приведенной в руководстве Дж.Миллер [9]. Среда 1А включала (в г/л): K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> -10,5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 4,5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 1,0, цитрат Na - 0,5, источник углерода - 5,0. Питательная среда LB, производства фирмы Sigma (США) состояла (в г/л): триптон - 10, дрожжевой экстракт - 5, NaCl - 10. Полипектат натрия производства фирмы Sigma (США).

Пектатлиазную активность определяли по образованию ненасыщенной дигалактуроновой кислоты путем спектрофотометрического измерения увеличения УФ-абсорбции реакционной смеси при длине волны 235нм [10].

Таблица 1

#### Штаммы бактерий, использованные в данной работе

Штаммы	Характеристика	Происхождение, ссылка
1	2	3
<i>E.carotovora subsp. atroseptica</i> JN42	Rif <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> (Tn9) r <sup>-</sup>	Коллекция кафедры молекулярной биологии

JN504	hrpN::pJP5603, hrpW:: $\Omega^{sp/sm}$ rif <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> (Tn9)	То же
VKW	hrpW::pJP5603 Km <sup>r</sup>	То же
HW1	JN42 hrpW:: $\Omega^{sp/sm}$	То же [8]
JN502	JN42 hrpN::pJP5603; Km <sup>r</sup>	То же
TA85	JN42 hrpJ::pJP5603	То же [6]
VKE	JN42 dspE:: pJP5603	То же [7]
TA5	JN42 hrpJ:: $\Omega^{sp/sm}$ rif <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> (Tn9)	То же

Мацерирующую активность определяли путем заражения стерильных ломтиков картофеля и моркови 18 часовой культурой бактерий. На срезы толщиной 1 см и площадью 2-3 см<sup>2</sup> наносили 5 мкл культуры и ломтики инкубировали в чашках Петри при 28<sup>0</sup> С в течение суток, после чего взвешивали массу мацерированной ткани. Каждый эксперимент ставили минимум в трехкратной повторности и данные обрабатывали статистически.

### Результаты и обсуждение

Фитопатогенные бактерии *Erwinia carotovora subsp.atroseptica* JN42 вызывают «черную ножку» картофеля при заражении стеблей и поражают клубни картофеля провоцируя мягкие гнили. При инокуляции клеток бактерий в растения табака они индуцируют реакцию гиперчувствительности, которая обеспечивается функционированием ССТТ [5]. Ранее нами получены мутанты по различным компонентам ССТТ, которые наряду с изменением ряда свойств, характеризовались утратой способности индуцировать реакцию гиперчувствительности. В данной работе ставилась задача изучить влияние мутаций по ССТТ на мацерацию клетками бактерий тканей клубней картофеля и корнеплодов моркови и пекаттлазную активность бактерий. Полученные результаты приведены в таблице 2.

Все изученные штаммы эффективно разрушали ткани клубней картофеля и корнеплодов моркови в течение суток с момента заражения. Но масса мацерированной ткани (мацерирующая активность) существенно различалась у бактерий «дикого» типа и мутантов.

У мутантов *E.carotovora subsp.atroseptica* по генам системы секреции III типа (штаммы JN504, TA5, JN502, TA85, VKE) достоверно наблюдалось значительное увеличение мацерирующей активности тканей клубней картофеля (до 80%) в сравнении с активностью исходного штамма JN42 (табл.2). В то же время пекаттлазная активность мутантных бактерий не превышала активность исходного штамма и даже была чуть ниже, т.е. повышение мацерирующей активности мутантов по генам ССТТ нельзя связать с пекаттлазной активностью.

У мутантов JN502 нарушен синтез белка харпина HrpN, а штамм JN504 дефектный по синтезу белков харпинов HrpN и HrpW. Предполагается что белки харпины необходимы для обеспечения функции транспорта белков авирулентности из бактериальной в растительную клетку [11]. В силу своих гидрофобных свойств, белки-харпины встраиваются в мембраны растительной клетки, формируя транспортные каналы. Следствием этого процесса встраивания является нарушение проницаемости растительных мембран и потеря клетками низкомолекулярных веществ, используемых в метаболизме клеток бактерий.

Таблица 2

### Мацерирующая активность бактерий *E.carotovora subsp.atroseptica*

Штаммы	Мацеранная активность бактерий (в мг мацерированной ткани на один ломтик картофеля)	Мацеранная активность бактерий (в мг мацерированной ткани на один ломтик моркови)	Пекаттлазная активность бактерий (Е/мл)
TA85	445±15,5	307,5±37,7	3,3
VKE*	512,5±34,4	285±40,9	3,4
JN504	665±39,2	532,5±17,5	3,8



JN42	357,5±14,9	455±39,6	4,0
TA5-	597,5±51,0	485±88,3	3,6
HW1	335±29,0	445±45,1	3,7
VKW	477,5±35,6	450±18,7	3,4
JN502*-	657,5±54,2	450±10,8	3,6

С этой стороны белки харпины выступают как факторы вирулентности бактерий, так как способствуют размножению клеток в растительной ткани, обеспечивая приток питательных веществ. Можно было бы ожидать, что мутации по генам *hrpN*, *hrpW* у бактерий *E.carotovora subsp.atroseptica* приведут к снижению вирулентности бактерий, но не усилению мацерации растительной ткани, что мы наблюдаем на самом деле. С другой стороны белки харпины необходимы для индукции реакции гиперчувствительности, т.е.защитной реакции растений. Можно предположить, что в данном случае нарушение у мутантных бактерий способности индуцировать защитную реакцию у растений привело к усилению мацерирующей активности. В пользу данной гипотезы свидетельствуют и данные полученные для мутантов *E.carotovora subsp.atroseptica* TA85 и VKE , у которых также повысилась мацерирующая активность (табл.2). Мутация по гену *hrpJ* (штамм TA85) нарушает функцию всей системы секреции III типа [6], в том числе приводит к утрате способности индуцировать гиперчувствительный ответ. Аналогичный эффект вызывает и мутация по гену *dspE* (штамм VKE).

Другая картина наблюдалась при мацерации мутантными бактериями тканей корнеплодов моркови (Табл.2). отличалась от мацерации клубней картофеля. Все изученные мутантные штаммы по мацерирующей активности на тканях моркови достоверно не отличались от бактерий дикого типа (JN42).

Таким образом, мутации по генам *hrpN*, *dspE*, *hrpJ* усилили способность мутантных бактерий мацерировать ткани клубней картофеля, но не корнеплодов моркови. Если предположить, что этот эффект связан с белками *HrpN* и *DspE*, то в случае с растениями картофеля они выступают как факторы авирулентности, но не влияют на взаимодействие с растениями другого семейства (морковь), то есть эти белки определяют специфичность взаимодействия патогенна с растением.

Секреция белков харпинов фитопатогенными бактериями осуществляется посредством системы секреции III типа (ССТТ), в то время как другие факторы вирулентности такие как пектолитические и целлюлолитические ферменты секретируются посредством системы секреции II типа. Поэтому не удивительно, что пектатлиазная активность не изменилась ни у одного из изученных мутантных штаммов.

### **Выводы**

Установлено, что мутации по генам *hrpN*, *hrpJ*, *dspE* увеличивают способность бактерий мацерировать ткани клубней картофеля, но не корнеплодов моркови, в то же время указанные мутации не влияли на пектолитическую активность бактерий. Возможно, выявленный эффект мутаций связан с утратой мутантными бактериями способности индуцировать защитную реакцию растений.

### **Литература**

1. *Barras F.* Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*// *Annu.Rev.Phytopathol.* - 1994.- Vol.32.- P.201-234.
2. *Pérombelon, M.C.M. and Salmond, G.P.C.* Bacterial soft rots. In: *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases //Prokaryotes* .- Oxford, UK: Pergamon ,1995.- Vol. 1. -P 1–20.
3. *Bell.* Sample sequencing of a selected region of the genome of *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* reveals candidate phytopathogenicity genes and allows comparison with *Escherichia coli*// *Microbiology*.-2002.- Vol.148. P. 1367– 1378.

4. Wei Z. M., Laby R. J., Zumoff C. H., Bauer D. W., He S. Y. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora* // Science – 1992. – 257. – P. 85 – 88
5. Nissinen R.M. Analyses of the secretomes of *Erwinia amylovora* and selected hrp mutants reveal novel type III secreted proteins and an effect of HrpJ on extracellular harpin levels//Molecular Plant Pathology.-2007.-Vol. 8, № 1.-P. 55–67
6. Лагоненко А.Л., Т.В.Овчинникова, Николайчик Е.А., Евтушенков А.Н. «Характеристика локализации белка HrpJ, компонента системы секреции III типа бактерий *Erwinia carotovora* subsp.atroseptica // Доклады НАН Б.- 2004.- Т. 48, №5.- С.65-69
7. Николайчик Е.А., Овчинникова Т.В., Валентович Л.Н., Губич О.И., Шолух М.В., Евтушенков А.Н. Транслокация белка DspE фитопатогенными бактериями *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* в клетки *Nicotiana Tabacum* и его необходимость для индукции реакции гиперчувствительности как необходимое условие // Доклады НАНБ.- 2005.- Т.49.- Стр.81-85.
8. Лагоненко А. Л., Николайчик Е. А., Евтушенков А. Н. Характеристика харпина HrpW бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*/ // Доклады НАН Беларуси. Т.50.-2006.-№1.-С.70-73.
9. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике/Миллер Дж. – М.:Мир, 1976. – 436 с
10. Чернов С.П., Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Мацерация тканей клубней картофеля пектолитическими бактериями рода *Erwinia* // Прикладная биохимия и микробиология. - 1991. - Т.21. - С.885-889.
11. Collmer A. Genomic mining type III secretion system effectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for all TTSS prospectors// Trends Microbiol.-2002.-Vol. 10.-P. 462–46.

### Резюме

Изучали влияние мутаций по генам системы секреции III типа на вирулентность бактерий *Erwinia atroseptica*. Выявлено, что мутации по генам hrpN, hrpJ, dspE усиливали способность бактерий мацерировать ткани клубней картофеля, но не моркови.

We have investigated the effect of some gene mutations in type III secretion system on virulence activity of bacteria *Erwinia atroseptica*. It was established that, hrpN, hrpJ, dspE gene mutations increase bacterial ability in maceration of potato tuber tissue, while carrot root-crop was not affected by the same experience.

**КИРИКОВИЧ С.С., ДЕНИСОВА Ф.Ш., ЛЕВИТЕС Е.В.**

*Институт цитологии и генетики СО РАН,*

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

### ИМПРИНТИНГ В АГАМОСПЕРМНЫХ ПОТОМСТВАХ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Настоящее время характеризуется огромным вниманием исследователей к широкому классу явлений наследования и изменчивости, классифицируемым как менделевские.

Наряду с цитоплазматическим наследованием к менделевским относится также и наследование эпигенетических изменений, под которыми понимают изменения активности и экспрессии генов, возникающие в процессе индивидуального развития организма, не связанные с нарушением нуклеотидной последовательности ДНК и

сохраняющиеся в ряду клеточных и половых поколений [1]. Среди эпигенетических явлений значительную роль исследователи отводят родительскому импринтингу, при котором экспрессия аллеля зависит от того, какой гаметой, отцовской или материнской, он был привнесен в зиготу. Традиционно исследование импринтинга проводят на полученных половым путем реципрокных гибридах, в которых пара взятых в исследования растений используется одновременно и как отцовское, и как материнское.

Ранее нами было получено доказательство того, что импринтинг может проявляться не только в половых, но и в агамоспермных потомствах, полученных от пыльцестерильных растений сахарной свеклы в беспыльцевом режиме [2]. В этом случае импринтинг означает зависимость экспрессии генов не от родителей, а от прародителей по материнской линии. На основании этого логично использовать термин «импринтинг» без прилагательного «родительский».

В связи с накоплением данных о характере изменчивости при агамоспермии [3] возникла необходимость повторного рассмотрения выявленных ранее фактов импринтинга в агамоспермных потомствах сахарной свеклы.

### **Материалы и методы**

В качестве материала для исследования были взяты реципрокные гибриды, полученные от скрещивания растений из агамоспермных потомств KWS1-5A и КНВС2-10А, различающихся по аллельному составу ферментных локусов. Потомства KWS1-5A и КНВС2-10А были предоставлены С.И. Малецким, Е.И. Малецкой и Р. Крысинским. Гибриды KWS1-5A-1 × КНВС2-10А-4 были обозначены нами цифрой 2, а обратные гибриды КНВС2-10А-4 × KWS1-5A-1 были обозначены цифрой 12. Семена гибридов были посеяны в гидропонной теплице, а выращенные из них корни были проаровизированы и высажены на изолированных участках. Среди гибридов 2 и 12 были обнаружены стерильные, полустерильные и фертильные растения. Все растения, в которых был выявлен даже небольшой процент фертильной пыльцы, были либо удалены с поля, либо помещены под изоляторы. Так, например, было закрыто изолятором растение № 2-2 гибрида KWS1-5A-1 × КНВС2-10А-4 с неисследованным ms-фенотипом, и растение № 12-9 гибрида КНВС2-10А-4 × KWS1-5A-1 с единичными окрашенными пыльцевыми зёрнами. На изолированном участке открытыми были оставлены только растения, которые имели стабильное проявление фенотипа ms0 и ms1 по классификации Оуэна [4]. У одного из полустерильных растений (№ 12-3) для получения агамоспермных семян были кастрированы нераскрывшиеся бутоны с последующей изоляцией веточек пергаментными изоляторами. Все остальные части этого растения были закрыты бязевым изолятором. Таким образом, беспыльцевой режим был обеспечен изолированным положением участка, изоляцией отдельных растений и кастрацией нераскрывшихся бутонов. Для цитологического контроля уровня фертильности-стерильности растений готовили препараты пыльцы, окрашенной кармином.

В качестве маркерных признаков были выбраны изоферментные спектры алкогольдегидрогеназы (ADH1, E.C.1.1.1.1.), малик-фермента (ME1, E.C.1.1.1.40.), изоцитратдегидрогеназы (IDH3, E.C.1.1.1.42.), контролируемые соответственно локусами *Adh1*, *Me1* и *Idh3* [5-7]. Образцы подвергали горизонтальному электрофорезу в 14 % крахмальном геле с последующим гистохимическим окрашиванием электрофореграмм по стандартной методике [6, 8].

У растений, взятых для получения реципрокных гибридов, были определены генотипы по маркерным локусам. Генотипы эти следующие:

KWS1-5A-1 : *Adh1-F/Adh1-S*, *Me1-F/Me1-F*, *Idh3-F/Idh3-S*

КНВС2-10А-4 : *Adh1-F/Adh1-F*, *Me1-F/Me1-S*, *Idh3-F/Idh3-F*

Вероятности сходства и различий соотношений фенотипических классов оценивали по G-критерию [9].

### Результаты и обсуждение

В агамоспермных потомствах реципрокных гибридов был выявлен полиморфизм по всем трем маркерным ферментам ADH1, ME1, IDH3. В табл. 1 показано соотношение фенотипов по ферментным локусам в потомствах, полученных от индивидуальных растений.

Таблица 1

**Соотношение фенотипических классов по маркерным ферментам в агамоспермных потомствах, полученных от реципрокных гибридов: KWS1-5A-1 × KHBC2-10A-4 (гибрид-2) и KHBC2-10A-4 × KWS1-5A-1 (гибрид-12)**

Фермент	№2-2, Ферт.(?) •	№2-5, ms0	№2-9, ms0
	FF-FS-SS	FF-FS-SS	FF-FS-SS
ADH1	16-26-13	46-39-0	13-21-7
ME1	46-9-0	29-29-16	13-26-2
IDH3	25-0-0	38-46-0	37-1-0

Фермент	12-3, кастр, •	12-8, ms1	12-9, ms1, •	12-11, ms1
	FF-FS-SS	FF-FS-SS	FF-FS-SS	FF-FS-SS
ADH1	8-6-3	37-0-0	37-0-0	9-4-0
ME1	17-0-0	29-33-15	9-18-10	8-5-0*
IDH3	7-6-3	15-33-23	8-23-5	7-6-0

• – семена получены под изолятором; \* – два фенотипа – FF и FC объединены в один фенотипический класс FF.

В потомстве гибридного растения № 2-2 были выявлены только два фенотипических класса по ME1. Это может свидетельствовать о том, что потомство растения № 2-2 формировалось путем митотической агамоспермии. Диморфизм представляет собой наглядное проявление менделевской изменчивости, поэтому соотношение фенотипов по ADH1 в данном потомстве также можно рассматривать как результат менделевской изменчивости.

Полученные нами данные по характеру изменчивости в агамоспермных потомствах [3] позволяют утверждать, что даже при соотношениях фенотипических классов, совпадающих с соотношением 1 : 2 : 1, в основе полиморфизма лежит менделевская изменчивость. Именно поэтому полиморфизм ферментов, наблюдаемый в данном эксперименте в других агамоспермных потомствах, рассматривается как проявление менделевской изменчивости.

Для того чтобы сопоставить соотношения фенотипов в прямом и обратном гибридах проведено суммирование только полиморфных соотношений по каждому ферменту в пределах каждой группы потомств. Суммарные соотношения фенотипов по ME1 и IDH3 в реципрокных потомствах, различаются значимо ( $p < 0,05$  и  $p < 0,001$  соответственно) (табл. 2). Представленные факты реципрокных различий в соотношении фенотипов исследованных ферментов можно рассматривать как проявление импринтинга.

Таблица 2

**Сравнение суммарных соотношений фенотипов в агамоспермных потомствах реципрокных гибридов: KWS1-5A-1 × KHBC2-10A-4 (Гибрид-2) и KHBC2-10A-4 × KWS1-5A-1 (Гибрид-12)**

Фермент	Гибрид-2	Гибрид-12	G	P
	FF-FS-SS	FF-FS-SS		
ADH1	75-86-20	17-10-3	2,5324	>0,05
ME1	88-64-18	46-56-25	8,8194	<0,05
IDH3	75-47-0	37-68-31	59,2236	<0,001

P – Вероятность сходства соотношений.

В настоящее время предложена модель механизма, определяющего полиморфизм в потомствах, полученных путем митотической агамоспермии [10, 11]. В основе этой модели лежит предположение об эндоредупликации хромосом в клетках тканей семяпочки и об удалении избыточных копий хроматид из клетки, переходящей к эмбриональному развитию. Согласно предложенной модели потеря избыточных копий хроматид происходит случайным равновероятным образом на основе комбинаторного процесса, в результате которого из множества копий хроматид, присутствовавших в клетке до ее вступления в эмбриогенез, остаются в начавшей эмбриональное развитие клетке (в апозиготе, обозначаемой сокращенно как APZ) только две. В силу того, что в каждой хромосоме эукариот имеется много независимых точек начала эндоредупликации и разные участки одной и той же хромосомы могут иметь разную степень эндоредупликации, предполагается, что потеря избыточного количества ДНК может происходить не целыми хроматидами, а независимо отдельными участками [10, 11].

Соотношение фенотипических классов в агамоспермном потомстве определяется соотношением числа нитей хроматид в районах гомологичных хромосом, несущих аллели гетерозиготного маркерного локуса. Недостаток какого-либо гомозиготного фенотипического класса в агамоспермном потомстве может быть обусловлен тем, что в каждой из клеток, готовящихся к эмбриогенезу (обозначенных как Pro-APZ), соответствующий аллель ферментного локуса присутствует в меньшем числе хроматид. Тот факт, что соотношения фенотипических классов, выявляемые в агамоспермных потомствах реципрокных гибридов, достоверно различаются, позволяет предположить, что аллели маркерных ферментных локусов редуцированы в клетках реципрокных гибридов в разной степени.

Отсутствие достоверных различий по ADH1 у потомств реципрокных гибридов (табл. 1) позволяет сделать вывод о том, что у данной пары гибридных растений достаточно близка степень эндоредупликации соответствующих аллелей локуса *Adh1*.

Предположение о влиянии степени эндоредупликации участков хроматид, несущих аллели маркерных генов, на соотношение фенотипических классов в агамоспермных потомствах хорошо согласуется с выводами о том, что импринтинг представляет собой отражение дозовых взаимодействий геномов и отдельных генов [12, 13].

### **Выводы**

Проведено изучение частот фенотипов ферментов в агамоспермных потомствах, полученных от реципрокных гибридов сахарной свеклы. Выявлены различия в частоте фенотипических классов малик-фермента и изоцитратдегидрогеназы в потомствах реципрокных гибридов, в то время как по алкогольдегидрогеназе достоверных различий не обнаружено. Предполагается, что различия в частоте фенотипических классов в исследованных потомствах представляют собой проявление импринтинга и определяются существующими у реципрокных гибридов различиями в степени эндоредупликации аллелей ферментных локусов в клетках, готовящихся к эмбриогенезу.

### **Литература**

1. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory // *Genes and Development*. - 2002. - vol. 16, № 1. - P. 6-21.
2. Levites E.V., Kirikovich S.S., Denisova F.Sh. Expression of enzyme genes in agamosperous progenies of reciprocal hybrids of sugar beet // *Sugar Tech*. - 2001. vol. 3, № 4. - P. 160-165.

3. *Levites E.V., Kirikovich S.S.* Natural genetic sampling: a new approach to the study of agamospermy in pollen-sterile sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants // Sugar Tech. - 2005. - vol. 7, № 4. - P.145-149.
4. *Owen F.W.* Inheritance of cross- and self-sterility in *Beta vulgaris* L. // J. Agric. Rec. - 1942. - vol. 1. - P.679-698.
5. *Малецкий С.И., Коновалов А.А.* Наследование алкогольдегидрогеназы у сахарной свеклы. Сообщение 1. Анализ отклонения от моногенного расщепления // Генетика. - 1985. - т. 21, № 9. - С. 1527-1540.
6. *Левитес Е.В.* Генетика изоферментов растений. - Новосибирск: Наука. - 1986. - 144с.
7. *Levites E.V., Garifullina F.Sh.* Use of isozymes as genetic markers for identification of sugar beet varieties // Biochemical Identification of Varieties: Materials of the 3th International Symposium ISTA. - Leningrad, USSR. - 1988. P.104-109.
8. *Meizel S., Markert C.L.* Malate dehydrogenase isozymes of the marine snail *Ilyanassa obsoleta* // Arch. Biochem. Biophys. - 1967. - vol. 122. - P. 753-765.
9. *Weber E.* Grundriss der biologischen statistic. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. - 1986. - 652 p.
10. *Levites E.V.* Sugarbeet plants produced by agamospermy as a model for studying genome structure and function in higher plants // Sugar Tech. - 2005. - vol. 7, № 2-3. - P. 67-70.
11. *Levites E.V.* Marker enzyme phenotype ratios in agamospermous sugarbeet progenies as a demonstration of multidimensional encoding of inherited information in plants // on-line: <http://arxiv.org/abs/q-bio/0701027>
12. *Lin B.-Y.* Ploidy barrier to endosperm development in maize // Genetics. - 1984. - vol. 107. - P. 103-115.
13. *Kermicle J.L.* Location, time of action, and dominance relations of an imprintor gene of R-mottled in maize // Modification of Gene Expression and non-Mendelian Inheritance / Eds Ono T., Takaiwa F. Tokio: Nation. Inst. Agrobiol. Res. - 1995. - P. 119-134.

#### **Резюме**

Выявлен импринтинг в агамоспермных потомствах, полученных от реципрокных гибридов сахарной свеклы. Импринтинг проявляется как различия в частоте фенотипических классов в потомствах реципрокных гибридов и определяется существующими у реципрокных гибридов различиями в степени эндоредупликации аллелей ферментных локусов в клетках, готовящихся к эмбриогенезу.

This study identifies imprinting in the agamospermous progenies generated from reciprocal sugar beet hybrids. Imprinting was observed as variations in the frequency of different phenotypes in the progenies of reciprocal hybrids. This was due to variations in the degree of endoreduplication of the enzymatic allele loci, in cells entering embryogenesis.

**КОНОВАЛОВ В.С., ПЕТРЕНКО И.П., ГАВРИЛЕНКО Н.С., БЕЛЫЙ Ю.А., ШИБУНЬКО М.В.**

*Институт разведения и генетики животных УААН,*

*Украина, Научно-методический центр УААН. e-mail:konovalov\_vs@ukr.net*

#### **К ВОПРОСУ О ТЕНДЕНЦИЯХ РАЗВИТИЯ СЕЛЕКЦИОННОГО МЕЛАНИЗМА СРЕДИ ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ СТАД ЧЕРНО-ПЕСТРОГО СКОТА**

На пороге XXI века мы встречаемся с удивительным и поучительным примером саморегуляторного преобразования генофонда высокопродуктивных пород различных видов домашних животных. Наиболее наглядно это выражено у высокопродуктивных стадах голштинской породы.

В рамках обсуждаемой проблемы целесообразно вспомнить, что молочная продуктивность коровы европейского тура ограничивалась необходимостью 800 кг выкормки теленка. Вся остальная энергетика животного шла на обеспечение высокой жизнеспособности и устойчивости в борьбе за выживание в естественной среде его обитания. Темно-коричневая масть европейского тура формировалась под контролем пигментообразующего субгена, отличающегося от субгена современных пород количественной насыщенностью и спецификой взаимодействия генов. За продолжительный период domestikации были созданы десятки пород молочного направления продуктивность которые превышают продуктивность предков не менее чем в 5- 10 раз. При этом черно-пестрый скот наиболее продуктивен и составляет от 60 до 80% поголовья молочного скота развитых стран. Естественно возникает вопрос: *по каким причинам происходит лидирующая дифференциация именно черно-пестрых пород?* Считаем, что этому способствует несколько причин:

1) исключительная биологическая особенность породы – ее пластичность к климатическим и технологическим факторам, которая обеспечивается пульсирующей экспрессией аллелей *spotting* локуса *S* (пегости).

2) интенсивное использование американскими и селекционерами других стран новейших технологических и селекционных идей, применения автоматизированного учета и обработки многофакторной селекционной информации индивидуального и популяционного уровня [1].

Исторически сложилось, что начиная с 1929 года селекционеры голштинской породы активно внедряют методологию отбора и подбора племенных животных по шаблону модельного животного. Основными целевыми признаками являются продуктивность и тип животных. В частности, тип масти характерен для классического гетерозиготного типа-*Ss* (голова, шея, поясница и круп пигментированы). Этот тип лежит и в основе современных методов совершенствования скота. Высокая молочная продуктивность, прекрасные формы телосложения и хорошие функциональные свойства вымени служат основанием для широкого использования голштинов в качестве улучшающей породы во многих странах мира. Особенно в Европе, где черно-пестрый скот и ряд других пород длительное время селектировались на двойную продуктивность-молочную и мясную. Анализируя причины и механизм развития селекционного меланизма в голштинской породе более чем за столетний период ее развития мы пришли к интересному факту – селекционного игнорирования при экстерьерной оценке животного колор-маркеров (фено-индексов) масти. Применяется упрощенная запись в племенной карточке животного - черно-пестрая, красно-пестрая. Считаем, что подобная методика ограничивает поиск скрытых селекционных резервов породы. Как известно, в селекционной работе животноводы различных стран используют различные системы экстерьерно-линейной оценки строения тела коров, вплоть до 29 экстерьерных признаков. Так, их в США – 14, Канаде – 18, Германии – 15, Великобритании – 9, Швеции – 23, Венгрии – 16, Австрии – 21, Дании – 19, Норвегии – 5, России – 17 [2]. При этом характерно, что селекционеры ни в одной из указанных стран не учитывают частоты изменчивости селектируемых пород по такому экстерьерному признаку как масть животного. Считаем, что основной причиной подобной ситуации является более чем столетняя трактовка в традиционных учебниках по зоотехнии, ветеринарии масти как простого качественного признака. Признака позволяющего: 1) отличать одну породу от другой; 2) как описательный маркер животного при его покупке. На самом же деле -современное состояние науки показывает, что это далеко не так. Важно учитывать, что пегость или значительное осветление масти животного свидетельствует о ограничении метаболизма ароматических аминокислот-фенилаланина и тирозина не только как предшественников меланиновых пигментов, но и таких нейромедиаторов как дофамин, адреналин и норадреналин. Таким образом, у высокопродуктивных рецессивных

гомозигот-ss гомеостатические системы организма функционируют в условиях недостаточности синтеза нейромедиаторов, что и снижает сроки их пожизненной эксплуатации. В рамках создания новых украинских пород генетики и селекционеры Института разведения и генетики УААН ведут мониторинг за динамикой влияния колор-маркеров на темпы микроэволюции высокопродуктивных пород домашних животных [3]. Естественно возникает вопрос: чем же обусловлен интерес к селекционному меланизму голштинского скота? Причин здесь несколько: 1) биологическая роль меланиновых пигментов исключительно многообразна. Конструктивный анализ современной литературы показал, что структурно-функциональная специфичность строения колор-маркерной молекулы меланина заключается в том, что этот полимер в своей структуре содержит многочисленные свободные энергетические зоны. Зоны которые позволяют: 1) не только накапливать, но и депонировать внутриклеточную энергию; 2) по принципу "кольчуги" способны адсорбировать соли тяжелых металлов ; 3) быть ловушкой для свободных радикалов, этим самым обеспечивая организму антиоксидантную защиту; 4) рассеивать избыточную солнечную энергию небольшими дозами, обеспечивая биологическим системам радиопротекторную защиту; 5) промежуточные метаболиты меланинового обмена легко соединяются с нуклеиновыми кислотами, гистонами и белками выполняя определенные гомеостатические функции организма в обеспечении старт-спринг моторных нейронов молокообразования и т.д. Оценивая возможные пути дальнейшей микроэволюции домашних животных в новых условиях развития ноосферы важно учитывать, что полимер-меланины являются не только «селективным ситом» для свободных радикалов, но их долгоживущие свободные радикалы могут влиять на темпы спонтанного мутагенеза ускоряя или замедляя эффективность селекционного прогресса. Используемый нами методический подход в изучении процесса формирования селекционного меланизма у высокопродуктивных животных основан на том, что сбалансированный полиморфизм гомеостатичних механизмов животных голштинской породы поддерживается внутривидовой изменчивостью окраски животного (фено- индексами масти ), которые формируются в результате взаимодействия двух главных локусов С (основной ген окраски) и S (ген пегости). При своем взаимодействии аллели этих локусов обуславливают формирование трех типов масти: преимущественно темной доминантной окраски – SS, пегой-кодминантной – Ss и преимущественно светлой – рецессивной – ss. Важно учитывать, что взаимодействие обсуждаемых нами основных локусов С, S (пигментообразующего субгена А,С,В,Р,Д,Е (а-МСГ), I,S,R ) с многочисленными генами-модификаторами и определяет весь спектр многообразия масти пестрых пород скота. Гены – модификаторы выполняют функцию “подгонки” фенотипа особи к конкретному взаимодействию меланин – катехоламинового обмена с реальной ситуацией “генотип-среда”. Вследствие подобного типа взаимодействия в стадах со средней молочной продуктивностью формируются частоты фенотипов с фено-индексами в соотношении 1 – темная: 2 – пестрых: 1 – светлая (т.е 25 % SS : 50 % Ss : 25 % ss=100 %). Многолетние исследования по определению границ стабильности частот аллелей S и s в гетерозиготных популяциях черно-пестрого скота (6) показали, что это соотношение сохраняется: 1) в голштинских стадах американской и канадской селекции на фермах США и Канады (при молочной продуктивности до 7000 кг); 2) так и в стадах как украинской черно-пестрого молочного скота в племязаводах Украины (при продуктивности до 4500 кг). При увеличении молочной продуктивности в голштинских стадах свыше 7000 кг генетическая структура стада постепенно сдвигается в сторону меланизации внешних покровов. Аналогичная картина наблюдается в импортированном голштинском стаде Главного селекционного центра Украины, а также в стадах украинского черно-пестрого скота в племязаводах (молочной продуктивности свыше 5000 кг). Наиболее интенсивно наблюдаемые процессы



меланизации происходят в голштинских стадах с молочной продуктивностью свыше 10000 кг. При этом характерно, что количество светлых коров почти не изменяется и находится в пределах теоретически ожидаемого, т.е. 25 %. Основные изменения происходят за счет гетерозиготных пестрых (т.е. модельных для породы) животных. Их количество может снизиться с 50% до 5 % ,т.е. в десять раз! Наблюдаемые процессы свидетельствуют, что интенсификация процесса молокообразования требует не только увеличения и усиления меланин-катехоламинового обмена организма ( выражающегося в определенном увеличении площади пигментации волосяного покрова или гиперфункции надпочечников у светлых коров) , но и равномерного выделения в кровь катехоламинов. Характерное для гетерозиготных Ss пестрых коров импульсивное накопление катехоламинов и, в частности гормона стресса – адреналина, приводит к подавлению выделения молокообразующих гормонов – окситоцина и пролактина. Установлено, что показатель усредненной корреляционной взаимосвязи промеров вымени, суточного надоя и интенсивности молокоотдачи у голштинских черно-пестрых коров ГСЦ темной масти составил  $r=0,50$ , светлой масти  $r=0,58$ , а у пестрых коров  $r=0,23$  [7]. Оценивая наблюдаемые нами тенденции 15 летнего развития селекционного меланизма в высокопродуктивных стадах голштинского скота очевидно, что в условиях применения различных систем экстерьерно-линейной оценки тела коров ( без учета пульсирующей экспрессии аллелей локуса S) генофонд породы которой «способен» к авторегуляторной стабилизации не только за счет изменения «рубашки» и потемнения копытного рога, но и изменения таких интерьерных показателей как стабильность кариотипа, тенденций в устойчивости к таким инфекционным заболеваниям как лейкоз и бруцеллез и др.

Считаем, что процесс стабилизации (т.е. обеспечения жизнеспособности, плодовитости и стресс-устойчивости и др.) происходит преимущественно за счет включения (пока еще) игнорируемых селекционерами саморегулирующих механизмов в виде меланин-катехоламиновых модуляторов. Обобщение мировой научной литературы: происходящее явление нарастания меланизма голштинского скота не вызывает селекционного интереса к столь разительным переменам в частотах экспрессирующих светлую масть рецессивных аллелей ss даже у селекционеров наиболее развитых селекции молочного скота странах. А ведь это наглядный ответ обмена веществ высокопродуктивных животных на коммерческий интерес заводчиков голштинского скота.

Таким образом, проведенные собственные исследования и обобщение научной литературы свидетельствует о том, что распространение черно-пестрого скота „от Арктики до Антарктиды”, его адаптивного ответа на антропогенные загрязнения промышленных регионов дает селекционерам исключительно широкий диапазон для дальнейшего изучения преобразования генома пестрых пород крупного рогатого скота.

### Литература

1. Динаміка фенотипічної структури чорно-рябої худоби за ознакою масті / В.С.Коновалов // Проблеми індивідуального розвитку сільськогосподарських тварин: Зб. наук. пр. міжнар. конф., присвяч. 90-річ. від дня народж. Заслуж. діяча науки Укр., д-ра с.-г. наук, проф. К.Б. Свечина / Нац. аграр. ун-т. Ін-т розвед. і генет. тварин УААН. Ін-т тваринництва УААН. – К., 1997. – С. 49-50.
2. Генетико-селекційний моніторинг у молочному скотарстві /М.В. Зубець, В.П. Буркат, М.Я. Єфіменко, Б.Є. Подоба, В.С. Коновалов, В.І. Антоненко, М.С. Гавриленко, І.В. Гузев, В.В. Дзіцюк, А.П. Кругляк, Н.Є. Чернякова, М.П. Демчук, В.С. Пахолук, Р.О. Стоянов, Є.Є. Заблудовський; За. ред. В.П. Бурката; Укр. акад. аграр. наук. Ін-т розвед. і генет. тварин. – К.: Аграрна наука, 1999. – 88 с.
3. Оцінка множинної дії алелів локусу S/строкатості/ на ембріональний та постнатальний розвиток молодняку української чорно-рябої молочної худоби / В.С. Коновалов, В.С. Пахолук, Р.І. Баранчук, Р.Д. Радченко, Ю.А. Білий // Вісник

### **Резюме**

Первопричиной развития селекционного меланизма среди высокопродуктивных стад черно-пестрых пород молочного скота - субстратная недостаточность обмена тирозина у рецессивных гомозигот по масти-ss.

Першопричиною розвитку селекційного меланізму серед високопродуктивних стад чорно-рябих порід молочної худоби є субстратна недостатність обміну тирозина у рецесивних гомозигот по масти -ss.

### **КРИПКА А., ЗЕЛЕНАЯ Л.**

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины  
Украина, 03680, Киев, ул. акад. Заболотного, 148*

### **ИССЛЕДОВАНИЕ ТИПА АДАПТИВНОЙ СТРАТЕГИИ РАСТЕНИЙ С РАЗНЫМ ТИПОМ РЕПРОДУКЦИИ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ**

В основе формирования адаптивной стратегии растений лежат особенности генотипа и его взаимодействия с факторами окружающей среды.

Генетическая адаптация легче всего происходит у видов с перекрестным опылением, так как эти организмы образуют большое количество новых генетических комбинаций. Половое размножение повышает адаптируемость растительной популяции, что свидетельствует в пользу преимущества популяций с половым типом репродукции [1,2,3]. Однако в растительном мире широко распространен апомиксис. Чем же объяснить, что, несмотря на все бесспорные преимущества полового размножения, у сотен видов цветковых растений оно заменено апомиксисом? Апомиксис служит прекрасным способом сохранения гетерозисности и благодаря этому жизнеспособности. Любой биотип, обладающий в данных условиях среды преимуществом, может воспроизводиться в массовых количествах. Апомиксис исключает генетическое расщепление, поэтому апомиктические формы образуют клоны, в пределах которых все особи обладают одинаковой генетической конституцией [1,4].

Однако, преимущества, достигнутые в результате апомиксиса, носят несколько односторонний характер. Они благоденствуют лишь пока условия среды остаются для них неизменными. Но в изменившихся условиях апомикты частично вымирают, поскольку не обладают достаточной генетической пластичностью. Если же мы рассмотрим факультативные апомикты, которые могут переходить к половому способу размножения под влиянием стрессовых факторов, то можно предположить, что они будут иметь наиболее широкий диапазон генетической варибельности и будут наиболее адаптированы к изменяющимся условиям среды.

В стрессовых условиях нередко происходит переход от преимущественно бесполого размножения к половому, т.е. влияние факторов внешней среды на генотипическую изменчивость может реализовываться через систему полового размножения.

На территории Чернобыльской зоны отчуждения в условиях хронического облучения произрастают популяции растений с разным типом размножения. В своей работе мы изучали адаптивную стратегию у растений: энотеры двухлетней, зверобоя обычного, ястребинки волосистой.

## Материалы и методы

Семена растений энотеры двухлетней *Onagra biennis* L., зверобоя обычного *Hypericum perforatum* L., ястребинки *Hieracium pilosella* L. были отобраны на территориях с разным уровнем загрязнения: с. Корогод (0,5-1 Ки/км<sup>2</sup>), г. Чернобыль (5 Ки/км<sup>2</sup>), с. Копачи (50 Ки/км<sup>2</sup>), с. Чистогаловка (600 Ки/км<sup>2</sup>) и выращены в лабораторных условиях на чашках Петри.

ДНК выделяли из этиолированных проростков СТАВ - методом [5]. Амплификацию с RAPD - и ISSR- маркерами проводили согласно [6,7].

## Результаты и обсуждения.

Характер изменений показателей выживаемости и энергии прорастания у анализируемых растений зависел от типа репродукции и уровня радиоактивного загрязнения. Было показано, что семена растения ястребинки, отобранные на территориях с повышенным уровнем хронического облучения, характеризовались более низкими темпами прорастания. В случае зверобоя и энотеры наблюдались другие тенденции в изменении показателей энергии прорастания и выживаемости. Эти показатели увеличивались при самых высоких уровнях загрязнения.

Для исследуемых растений рассчитывали коэффициент вариации морфологических признаков (табл.1).

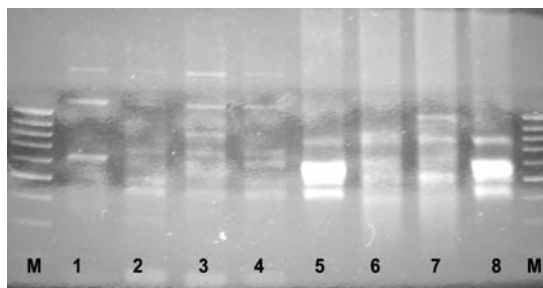
Таблица 1

Коэффициент вариации (%) для травянистых растений из зоны отчуждения  
ЧАЭС

Вид растений	Уровень загрязнения, Ки/км <sup>2</sup>			
	Контроль	5	50	600
Зверобой обычный	28	36	37	42
Энотера двухлетняя	25	30	32	37
Ястребинка волосистая	8	9	10	9

Для энотеры и зверобоя коэффициент вариации (С) был повышенным. При чем для зверобоя он сильно варьировал в зависимости от уровня загрязнения территории прорастания: С (с. Корогод (0,5-1 Ки/км<sup>2</sup>)) - 28%, С (г. Чернобыль (5 Ки/км<sup>2</sup>)) - 36%, С (с. Копачи (50 Ки/км<sup>2</sup>)), - 37%, С (с. Чистогаловка 600 Ки/км<sup>2</sup>)) - 40%, и значительно повышался при высоких уровнях загрязнения. У энотеры наблюдалась такая же тенденция - увеличение коэффициента вариации с увеличением уровня загрязнения С (с. Корогод (0,5-1 Ки/км<sup>2</sup>)) - 25%, С (г. Чернобыль (5 Ки/км<sup>2</sup>)) - 30%, С (с. Копачи (50 Ки/км<sup>2</sup>)), - 32%, С (с. Чистогаловка 600 Ки/км<sup>2</sup>)) - 37%. Для растений ястребинки наблюдались низкие значения коэффициента вариации, кроме того он оставался неизменным не зависимо от уровня хронического облучения.

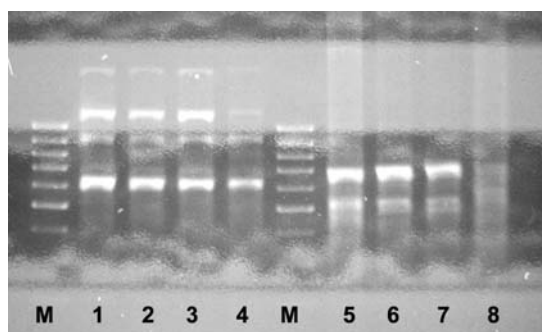
Результаты молекулярно-генетического анализа с использованием ДНК-маркеров выявили высокий уровень полиморфных локусов у растений зверобоя (RAPD-анализ 44%, ISSR-анализ 70%) (рис.1). У растений энотеры процент полиморфных локусов, полученных с использованием ISSR- маркеров, - 56%, при RAPD-анализе полиморфных локусов не наблюдалось (рис.2).



**Рис.1.** Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК растений зверобоя, которые были отобраны на почвах с разным уровнем радиоактивного загрязнения, с декануклеотидными (RAPD) праймерами и праймерами к микросателлитным последовательностям (ISSR) (М -маркер МВ; 1-4 RAPD -PCR: 1 - Контроль, 2 - 5 Ки/км<sup>2</sup> 3- 50 Ки/км<sup>2</sup>, 4- 600 Ки/км<sup>2</sup>; 5-8-ISSR)

Для растений ястребинки из популяций, которые росли на территориях с разным радиоактивным загрязнением, после RAPD- и ISSR- анализа полиморфных локусов не выявлено.

Анализируя результаты, полученные по морфометрическим показателям и результаты молекулярно-генетического анализа, можем сделать вывод о том, что повышение адаптивных свойств у таких растений как энотера (растение с перекрестным опылением) и зверобой (факультативный апомикт) происходит за счет увеличения диапазона генетической вариабельности. Для растений ястребинки (облигатный апомикт) наблюдались наименьшие коэффициенты вариации и отсутствие полиморфных локусов, что может быть одним из объяснений отсутствия адаптивных признаков у растений, которые были подвержены хроническому облучению.



**Рис.2.** Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК растений энотери, которые были отобраны на почвах с разным уровнем радиоактивного загрязнения с декануклеотидными (RAPD) праймерами и праймерами к микросателлитным последовательностям (ISSR) (М -маркер МВ; 1-4 RAPD -PCR: 1 - Контроль, 2 - 5 Ки/км<sup>2</sup> 3- 50 Ки/км<sup>2</sup>, 4- 600 Ки/км<sup>2</sup>; 5-8-ISSR)

Возросшая генетическая изменчивость, наблюдаемая в популяциях *Hypericum perforatum*, которые росли в условиях хронического облучения, вероятно, обусловлена переходом значительной части растений к половому типу репродукции. В условиях стрессового давления процесс адаптации отбирает или благоприятствует развитию таких признаков, которые в наибольшей степени увеличивают шансы на выживание и тем самым на сохранение генетического материала. Адаптация, таким образом, может рассматриваться как процесс, посредством которого генетический материал повышает свои шансы на сохранение в последующих поколениях.

#### Литература

1. Щербаков В.П., 2005. Эволюция как сопротивление энтропии. I. Механизмы видового гомеостаза // Журн. общ. биологии.-2005.- Т.66.- № .4.- С.300-309.

2. Hamilton W.D., Axelrod R., Tanese R. . Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.-1990.- V. 87.- № 9. -P. 3566-3573.
3. Crow J.F., An advantage of sexual reproduction in a rapidly changing environment // J. Hered.-1992.- V. 83.- № 3. -P. 169-173.
4. Robson A.J., Bergstrom C.T., Pritchard J.K., Risky business: Sexual and asexual reproduction in variable environments // J. Theor. Biol.-1999.- V. 197.- № 4.- P. 541-556.
5. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue//BRL Focus.-1990.- Vol.12.-P.13-15.
6. Tsumura Y., Ohba K., Strauss S.H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*)//TAG.-1996.-Vol.92.-P.40-45
7. Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers//Nucleic Acid Research.-1990.-Vol.18.-P.6531-6535

### Резюме

Исследован тип адаптивной стратегии у растений с разным типом репродукции: *Onagra biennis*, *Hypericum perforatum*, *Hieracium pilosella* в условиях хронического облучения. С помощью морфометрического и молекулярно-генетического анализа показано, что повышение адаптивных свойств у таких растений как энотера (растение с перекрестным опылением) и зверобой (факультативный апомикт) происходит за счет увеличения диапазона генетической варибельности.

Досліджено тип адаптивної стратегії у рослин з різним типом репродукції *Onagra biennis*, *Hypericum perforatum*, *Hieracium pilosella* в умовах хронічного опромінення: За допомогою морфометричного і молекулярно-генетичного аналізу показано, що підвищення адаптивних властивостей у таких рослин як енотера (рослина з перехресним запиленням) і звіробій (факультативний апомікт) відбувається за рахунок збільшення діапазону генетичної варіабельності.

The type of adaptive strategy has been investigated among plants with different type of reproduction: *Onagra biennis*, *Hypericum perforatum*, *Hieracium pilosella* under influence of chronic irradiation. It has been shown using morphometric and molecular-genetic analysis, that increasing of adaptive characteristics of such plants as enotera (plant with cross-pollination) and St.-John's wort (optional apomict) takes place due to the increasing of range of genetic variability.

### ЛОГВИНЕНКО Н.С.

Институт цитологии генетики СО РАН,  
Россия, 630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева  
10, e-mail: ninlo@bionet.nsc.ru

### ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ АЛЬДОСТЕРОНОМ ЭКСПРЕССИИ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО НАТРИЕВОГО КАНАЛА (ENaC) И ГЛЮКОКОРТИКОИД-РЕГУЛИРУЕМОЙ КИНАЗЫ-1 (SGK-1) В КЛЕТКАХ ЭПИТЕЛИЯ НЕФРОНА КРЫСЫ.

Одним из важнейших аспектов созревания осморегулирующей функции почки является формирование молекулярных механизмов регуляции транспорта натрия альдостероном в клетках эпителия нефрона. Известно, что в раннем онтогенезе почки незрелорождающих животных, в том числе крыс, нечувствительны к альдостерону.

Тонкие механизмы развития гормональной чувствительности клеток-мишеней в этом периоде изучены недостаточно. Концентрация натрия в главных клетках кортикального сегмента собирательных трубок (CCD), в основном, определяется динамическим равновесием между поступлением натрия из просвета канальца через эпителиальный натриевый канал (ENaC) и выведением его из клетки в интерстиций против градиента с использованием энергии АТФ базолатерально локализованным натриевым насосом (Na,K-АТФаза) (Feraille, Douset 2001, Booth et al, 2002). Глюкокортикоид-регулируемая киназа 1 (SGK-1) принимает участие как в быстрой регуляции функциональной активности преобладающих молекул эпителиального натриевого канала, так и в долговременной геномной регуляции экспрессии ENaC (Pearce and Kleyman, 2007). Ранее нами была обнаружена более низкая экспрессия ENaC и Na,K-АТФаза в почке 10-ти дневных животных, которая хорошо соответствует более низкому уровню внутриклеточной концентрации натрия в главных клетках CCD (Логвиненко 1991, 2004, 2007). Для того чтобы выяснить, участвует ли альдостерон в долгосрочной, геномной регуляции активности эпителиального натриевого канала в незрелой почке 10-дневной крысы, мы провели сравнительное исследование возрастных особенностей индукции альдостероном экспрессии генов альфа субъединицы ENaC и гена киназы SGK-1.

### **Материалы и методы**

Возрастные особенности влияния альдостерона на экспрессию альфа субъединицы ENaC и SGK-1 исследовали в коре почек предварительно адреналэктомированных крыс. Через 1 сутки после адреналэктомии взрослым крысам и через 6 часов 10 дневным крысам внутрибрюшинно вводили альдостерон (5 мкг/100 г веса) из расчета 100 мкл/100 г веса каждые 3 часа. Контрольным адреналэктомированным животным вводили 0.1% спирт в физиологическом растворе в таком же объеме по той же схеме. Животных забивали через 20 мин, 50 мин, 1 ч 20 мин и через 5 ч 30 мин после начала индукции. Количество мРНК альфа-субъединицы ENaC и SGK-1 изучали методом ОТ ПЦР. Выделение суммарной РНК из коркового вещества почки крысы проводили с использованием набора реактивов Rneasy Mini kit (QIAGEN, Germany) согласно прилагаемым протоколам. Использовали последовательность праймеров, опубликованную Muller et al., 2003. Число независимых повторов было 3-5, с тремя параллельными в каждой пробе. В качестве внутреннего стандарта использовали экспрессию гена белка «домашнего хозяйства» глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH) в той же пробе. Статистическую обработку результатов проводили с помощью t-критерия Стьюдента.

### **Результаты и обсуждение**

В первые пять с половиной часов после начала индукции альдостерон (10нМ) не вызывал повышения уровня мРНК альфа-субъединицы ENaC в коре почек 10-ти дневных крысят (Рис.1). В то же время у взрослых, 60-ти дневных животных, наблюдалось увеличение экспрессии этого гена к концу изучаемого периода ( $p < 0.05$ ). Характер изменения уровня мРНК киназы SGK-1 в корковом веществе почки 10-дневных и взрослых, 60-ти дневных крыс отличался от поведения альфа-субъединицы ENaC.

По оси ординат: соотношение  $\alpha$ -ENaC/GAPDH, по оси абсцисс - время в минутах после начала индукции альдостероном (5мкг/100г. веса тела) \* - уровень достоверности ( $p < 0.05$ )

Оказалось, что индукция экспрессии гена SGK-1 имеет схожую временную динамику у животных обеих возрастных групп (Рис.2). Как у 10-ти, так и у 60-дневных животных наблюдалось повышение содержания мРНК киназы SGK-1 уже через 50 минут после введения гормона, которое сохранялось на протяжении всего последующего исследованного периода.

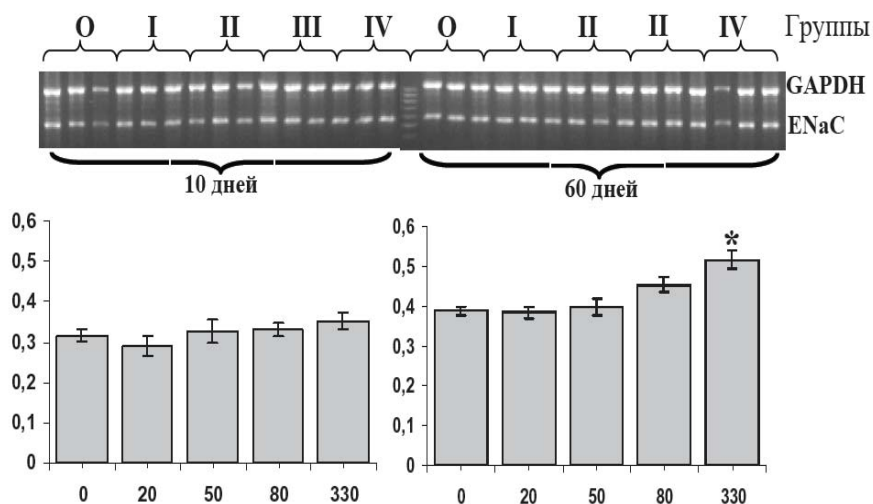
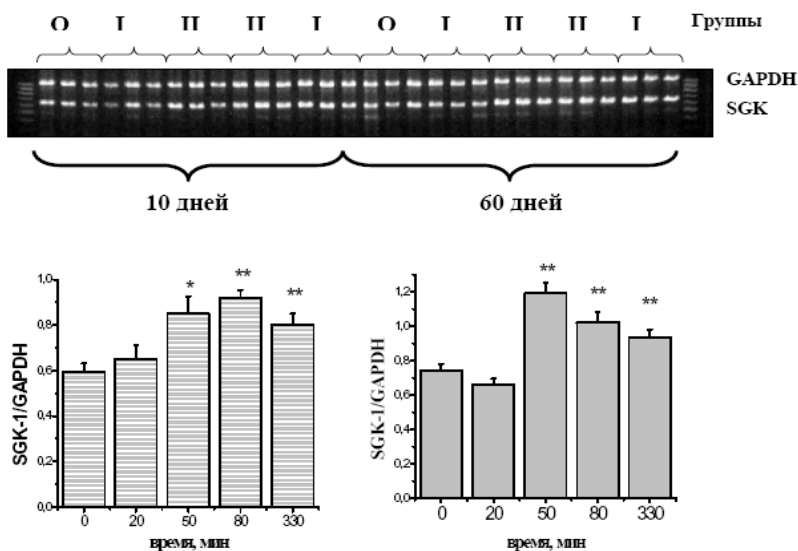


Рис.1. Влияние альдостерона на уровень мРНК  $\alpha$ -ENaC в корковом веществе почки 10-дневных и 60-ти дневных крыс.

Известно, что киназа SGK-1 относится к группе ранних альдостерон индуцируемых генов, активация которых происходит в течение первого часа после начала действия гормона, тогда как ген альфа-субъединицы ENaC относится к группе поздних генов, экспрессия которых повышается через 3-4 часа (Booth et al., 2002). Более раннее созревание регуляции альдостероном активности гена SGK-1, по сравнению с геном альфа-субъединицы ENaC в постнатальном онтогенезе почки крысы может свидетельствовать о начале становления сложных механизмов, сопрягающих функциональную активность этих двух генов. Так, недавно было показано, что SGK-1 опосредует стероидную индукцию  $\alpha$ -субъединицы ENaC (Boyd, Naray-Fejes-Toth, 2005; Zhang et al., 2007). Авторы обнаружили существование ядерного супрессорного комплекса, который гиперметирует гистоновый белок, связанный с промоторной зоной альфа-субъединицы ENaC. Альдостерон ингибирует экспрессию этого комплекса, что снимает блок и активирует транскрипцию альфа-субъединицы натриевого канала. Оказалось, что для того, чтобы реализовалась эта функция альдостерона, необходимо предварительное повышение экспрессии киназы SGK-1, которая фосфорилирует один из белков супрессорного комплекса и таким образом разваливает его, освобождая доступ к промоторной зоне гена альфа-субъединицы ENaC альдостерон-рецепторного комплекса с последующей активацией транскрипции альфа-субъединицы ENaC (Zhang et al., 2007).



Рс.2. Влияние альдостерона на уровень мРНК киназы SGK-1 в корковом веществе почки 10- дневных и 60-ти дневных крыс. По оси ординат: соотношение SGK-1 /GAPDH, по оси абсцисс - время в минутах после начала индукции альдостероном (5мкг/100г. веса тела) \* - уровень достоверности ( $p < 0.05$ ) \*\*- уровень достоверности ( $p < 0.001$ )

Возможно, отсутствие повышения уровня экспрессии гена ENaC ответ на введение альдостерона в почке 10-дневных животных является следствием незрелости, или отсутствия неких молекулярных факторов, способствующих координации функциональной активности и экспрессии мРНК киназы SGK-1 и альфа-субъединицы ENaC (Pearce and Kleyman, 2007). Можно предположить, что обнаруженные нами возрастные особенности индукции альдостероном экспрессии мРНК альфа-субъединицы натриевого канала лежат в основе гормональной резистентности к альдостерону незрелой почки 10-ти дневных крыс. Работа поддержана грантами РФФИ 08-04-00658-а и грантом «Ведущие научные школы» НШ-1515.2003.4.

### Литература

1. Логвиненко Н.С., Хлебодарова Т.М., Соленов Е.И., Иванова Л.Н., Броуде Н.Е., Монастырская Г.С. Гормональная регуляция экспрессии мРНК Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазы в почках крыс в постнатальном онтогенезе// Цитология. 33: 18-25. 1991.
2. Логвиненко Н.С., Хлебодарова Т.М., Соленов Е.И., Иванова Л.Н. Возрастные особенности рецепции альдостерона в дистальных сегментах нефронов крыс и индукции экспрессии Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазы. //Рос. Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова. 90 (3): 375-384.- 2004.
3. Н.С. Логвиненко, Е.И. Соленов, Кабилова Н.О., Каткова Л.Е., Л.Н. Иванова. Возрастные особенности регуляции альдостероном экспрессии и функциональной активности эпителиального натриевого канала в почке крысы. Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. 93(4): 420-428. 2007.
4. Booth R.E, Johnson J.P., Stockand J.D., Aldosterone. Adv. Physiol. Educ. 26: 8-20. 2002.
5. Boyd C, Nbray-Fejes-Tyth A. Gene regulation of ENaC subunits by serum- and glucocorticoid-inducible kinase-1. Am J Physiol Renal Physiol. 288(3):F505-12. 2005
6. Feraille E., Doucet A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. Physiol. Rev. 81(1): 345-418. 2001.
7. Muller O.G., Parnova R.G., Centeno G., Rossier B.C., Firsov D., Horisberger J.D. Mineralocorticoid effects in the kidney: correlation between alphaENaC, GILZ, and Sgk-1 mRNA expression and urinary excretion of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>. J. Am. Soc. Nephrol. 14(5):1107-1115. 2003.
8. Zhang W, Xia X, Reisenauer MR, Rieg T, Lang F, Kuhl D, Vallon V, Kone BC. Aldosterone-induced Sgk1 relieves Dot1a-Af9-mediated transcriptional repression of epithelial Na<sup>+</sup> channel alpha. J Clin Invest. Mar;1 17(3):773-83. 2007. [9] Pearce D, Kleyman TR. Salt, sodium channels, and SGK1. J Clin Invest. Mar;1 17(3):592-5. 2007.

### Резюме

Методом ОТ ПЦР было показано, что уровень мРНК альфа субъединицы ENaC и киназы SGK-1 в почке 10-дневных крыс ниже, чем у взрослых животных ( $p < 0.05$ ). Нами выявлено отсутствие повышения уровня экспрессии гена альфа-субъединицы ENaC и увеличение уровня мРНК киназы SGK-1 в ответ на долговременную индукцию альдостероном (100 мкг/100 г веса) в почке 10-дневных животных, в отличие от взрослых.



Developmental changes of mRNA alpha -subunit ENaC and SGK1 abundance in 10 day and adult rat kidney were investigated by RT-PCR. The level of both genes expression was less in kidney cortex of 10 day rat compared with the adult one ( $p < 0.05$ ). There was no long time genomic effect of the aldosterone induction (5mg/100g) on the mRNA of the alpha-subunit ENaC abundance within 5.5 hours and aldosterone raised mRNA SGK-1 abundance in young rat renal cortex, in contrast to adult rats.

**ЛОГИНОВА Д.Б., ДЕЙНЕКО Е.В.**

*Институт цитологии и генетики СО РАН,*

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

### **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОЗАИЧНОГО ХАРАКТЕРА ПРОЯВЛЕНИЯ МАРКЕРНОГО ГЕНА *nptII* У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА**

При случайном характере интеграции в растительный геном фрагментов экзогенной ДНК перенесенные гены могут попадать в различные районы ядерного генома растений. Характер их проявления в таких случаях будет определяться особенностями организации района интеграции, в связи с этим генетически модифицированные растения могут служить удобными моделями для изучения функционирования перенесенных генов.

В лаборатории биоинженерии растений созданы трансгенные растения табака с мозаичным проявлением маркерного гена *nptII*, определяющего устойчивость к антибиотику канамицину (линия Nu 21), что фенотипически проявлялось в чередовании белых и зеленых секторов на листовых пластинках растений, выращенных на селективной среде с канамицином. Маркерный ген был интегрирован в виде двух тесно сцепленных копий. Мозаичный характер сохранялся у потомков от самоопыления T<sub>1</sub>-T<sub>4</sub>. Отбор по стабильности проявления маркерного гена позволил выделить среди T<sub>4</sub> растений линии, характеризующиеся полной (Nu 21/5-4/1 – зеленый цвет листовых пластинок), либо частичной (Nu 21/6-4/1 - чередование зеленых и белых участков) устойчивостью к антибиотику.

Целью данной работы было изучение особенностей проявления маркерного гена *nptII* у потомков от самоопыления и у гибридов от скрещивания растений линии Nu 21, характеризующихся стабильным и мозаичным проявлением *nptII*-гена.

#### **Материалы и методы**

Исходным материалом для проведения исследований служили потомки 4 поколения (T<sub>4</sub>) от самоопыления табака линии Nu 21 из коллекции лаборатории биоинженерии растений ИЦиГ СО РАН. Растения линии Nu 21/6-4/1 характеризуются высоким процентом появления растений с мозаичным характером проявления маркерного гена *nptII*; окраска листьев - мозаичная (чередование зеленых и белых участков). Растения линии Nu 21/5-4/1 характеризуются стабильной экспрессией маркерного гена *nptII*; окраска листьев - зеленая. В качестве контроля использовались растения нетрансгенной линии SR1.

Трансформацию компетентных клеток *E.coli* штамма XL10 проводили методом теплового шока [1]. Выделение плазмидной ДНК проводили при помощи QIAGEN Plasmid Midi Kit (N.12145) согласно методике производителя. Выделение геномной ДНК из листьев табака проводили по стандартной методике [2] с модификациями. Гибридизацию по Саузерну проводили по стандартной методике [3] с модификациями, радиоактивно меченый зонд получали методом ПЦР.

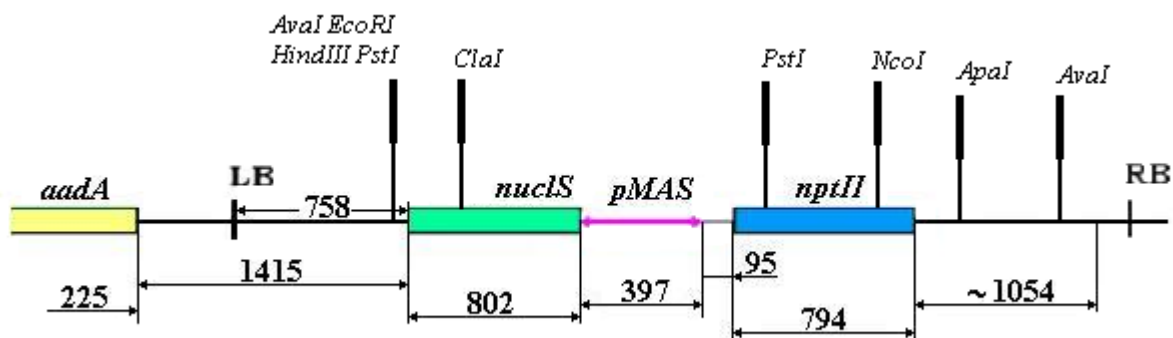
#### **Результаты и обсуждение**

Получены гибриды первого поколения от скрещивания растений линии Nu 21/6 с мозаичным проявлением маркерного гена *nptII* с растениями линии Nu 21/5 с стабильным проявлением гена *nptII*, гибриды первого поколения от скрещивания растений линии Nu 21/5 с растениями контрольной линии SR1 (нетрансгенная) и гибриды первого поколения от скрещивания растений линии Nu 21/6 с растениями контрольной линии SR1.

Анализ гибридов F1 от скрещивания растений линий Nu 21/6 и SR1 показал, что частота появления растений-мозаиков в среднем составляла 42,29% в случае, когда в качестве материнской особи брали растение Nu 21/6 и 53,75% в случае, когда в качестве материнской особи брали растение SR1. Для гибридов от скрещивания растений линий Nu 21/5 и SR1 данная частота составляла 6,81% и 16,70%, соответственно. При реципрокном скрещивании растений линий Nu 21/5 и Nu 21/6 частота появления мозаиков в среднем составляла 62,27% (Nu 21/5 - материнская особь) и 37,58% (Nu 21/6 - материнская особь). Частота появления мозаично окрашенных растений у потомков от самоопыления трансгенных растений табака линий Nu 21/5 и Nu 21/6 в среднем составлял 1,9% и 58,5%, соответственно.

Таким образом, число мозаично окрашенных растений у гибридов от скрещивания растений табака линий Nu 21/5 и SR1 значительно увеличивалось по сравнению с числом потомков от самоопыления растений линии Nu 21/5. Число растений с мозаичным характером проявления маркерного гена *nptII* в гибридах от скрещивания растений табака линий Nu 21/6 и SR1 практически не отличалось от такового у потомков от самоопыления растений линии Nu 21/6. Частота появления мозаиков у гибридов от скрещивания растений линий Nu 21/5 и Nu 21/6 в среднем была ниже, чем у потомков от самоопыления растений линии Nu 21/6, и значительно выше, чем у потомков от самоопыления растений линии Nu 21/5.

Восстановление стабильной экспрессии *nptII*-гена у растений линии Nu 21/5 предположительно могло произойти в результате рекомбинации между двумя копиями Т-ДНК, так как ранее в геномных ДНК трансгенных растений 1-го и 2-го поколений (T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub>), полученных от самоопыления растений линии Nu 21, нами выявлено два фрагмента, предположительно соответствующих двум копиям Т-ДНК [4]. Оба фрагмента наследовались сцепленно среди потомков T<sub>1</sub> и T<sub>2</sub>. Однако данное предположение оказалось несостоятельным, так как Саузерн-блот анализом в геномной ДНК трансгенных растений линии Nu 21/5-4/1 установлено не менее 2-х фрагментов Т-ДНК.



**Рис. 1.** Схема Т-области генетической конструкции рC27-*nuclS* (растение Nu 21):

*aadA*- ген устойчивости к спектиномицину (X12870); *nuclS* - ген секреторной эндонуклеазы *Serratia marcescens*; *nptII* - ген неомизинфосфотрансферазы II *E.coli*; *pMAS*- двунаправленный промотор гена маннопинсинтазы T<sub>i</sub>-плазмиды *A.tumefaciens*; LB, RB - повторы, окаймляющие Т-область T<sub>i</sub>-плазмиды *A.tumefaciens*.

Для получения трансгенных растений линии Nu 21 использована плаزمида рC27-*nuclS*, включающая в Т-области гены эндонуклеазы рестрикции *Serratia*

*marcescens*, неоминифосфотрансферазы II *E.coli* под управлением двунаправленного промотора гена маннопинсинтазы Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*, однако точная нуклеотидная последовательность генов не была определена. Для определения нуклеотидной последовательности области генов было проведено секвенирование области T-ДНК плазмиды pC27-*nuclS*. Методом BLAST по базе данных DDBJ (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp>) выявлена область гомологии нуклеотидной последовательности области T-ДНК с последовательностью MAS промотора (X68599) протяженностью 392 п. н., с геном *nptII* (V00618) протяженностью 794 п.н., и геном *nuclS* (M19495) протяженностью 802 п.н. На рисунке 1 представлена схема T-области генетической конструкции pC27-*nuclS* с сайтами рестрикции. По результатам секвенирования было выявлено наличие некодирующей области длиной 95 п.н. между правой границей области *pMAS* и левой границей гена *nptII*. Также были обнаружены участки нуклеотидной последовательности, гомологичные некодирующим районам Ti плазмиды pTi15955 *A. tumefaciens* (X00493), прилегающие к левой границе гена *nuclS* и правой границе гена неоминифосфотрансферазы II *E.coli*.

На основании полученных ранее результатов о наличии двух близко расположенных встроок T-ДНК в геноме трансгенных растений линий Nu 21/5, Nu 21/6 и известной нуклеотидной последовательности T-ДНК, проведено определение положения 2-х встроок T-ДНК относительно друг друга. Для этого был проведен ПЦР анализ с использованием различной комбинации праймеров, подобранных на границы области T-ДНК. В результате мы получили фрагмент, соответствующей размеру ДНК порядка 2300 п.н., выявление такого фрагмента возможно только в случае прямой ориентации 2-х копий T-ДНК в геноме («голова к хвосту»).

Итак, по результатам ПЦР анализа установлено, что копии T-ДНК в растительном геноме располагаются одна за другой и имеют ориентацию «голова к хвосту» как для растений с канамицин-устойчивым (Nu 21/5-4/1), так и для растений с канамицин-неустойчивым фенотипом (Nu 21/6-4/1).

Известно, что наличие повторенных последовательностей в прямой и обратной ориентации может приводить к замолканию перенесенных генов [5], следовательно, можно предположить, что наличие двух копий T-ДНК в геноме исследуемых трансгенных растений могло послужить причиной замолкания маркерного гена *nptII*.

Одним из предположительных механизмов замолкания может быть метилирование последовательности промотора перенесенных генов [6]. Определение статуса метилирования ДНК канамицин-устойчивых растений линий Nu 21/5-4/1 и Nu 21/6-4/1 проводили методом Саузерн-блот гибридизации с использованием метилчувствительной и метилнечувствительной эндонуклеаз рестрикции *MspI/HpaII*. *HpaII* расщепляет ДНК по неметилированным сайтам, *MspI* - по всем сайтам, независимо от метилирования узнаваемой последовательности. Одинаковая картина гибридизации после расщепления эндонуклеазами рестрикции *HpaII* и *MspI* свидетельствовала об отсутствии метилирования сайтов рестрикции в зеленых растениях исследуемых линий. Однако полученные данные не отвергают гипотезы о замолкании генов посредством метилирования ДНК в трансгенных растениях линии Nu 21/6-4/1. Данная гипотеза будет служить объектом исследований в дальнейшем.

### **Выводы**

Проведен анализ взаимодействия аллелей гена *nptII* в гибридах первого поколения от скрещивания трансгенных растений табака линий Nu 21/5 и Nu 21/6 между собой и с растениями нетрансгенной линии SR1. Показано увеличение числа мозаично окрашенных растений у гибридов от скрещивания растений табака линий Nu 21/5 с растениями нетрансгенной линии SR1, по сравнению с потомками от самоопыления растений линии Nu 21/5. Число растений с мозаичным характером проявления маркерного гена *nptII* в гибридах от скрещивания растений табака линий

Nu 21/6 и SR1 практически не отличалось от такового у потомков от самоопыления растений линии Nu 21/6. Частота появления мозаиков у гибридов от скрещивания растений линий Nu 21/5 и Nu 21/6 в среднем была ниже, чем у потомков от самоопыления растений линии Nu 21/6, и значительно выше, чем у потомков от самоопыления растений линии Nu 21/5.

Методом Саузерн-блот гибридизации подтверждено наличие не менее двух встроок Т-ДНК в геном растений линии Nu 21/5-4/1.

Определена последовательность нуклеотидов области Т-ДНК плазмиды pC27-*nuclS*, подобраны праймеры для анализа района интеграции трансгена у растений линии Nu21 на основе амплификации последовательностей с неизвестной первичной структурой. По результатам анализа установлено, что последовательности двух Т-ДНК ориентированы «голова к хвосту» (в виде повторенных фрагментов в прямой ориентации), и расположены одна за другой, возможно, без включения участка растительной ДНК между ними.

Показано отсутствие метилирования последовательности *pMAS* Т-ДНК в зеленых растениях трансгенной линии Nu 21/5, и Т-ДНК зеленых листьев растений линии Nu 21/6 в районе сайта рестрикции эндонуклеаз *HpaII/MspI*.

### Литература

1. Гловер Д. Клонирование ДНК. Методы. - М.: Мир, - 1988. – с.
2. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Molecular Biology. - 1985. - V. 5. - P. 69-76.
3. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning: A Laboratory Manual. - New York. - Cold Spring Harbor Laboratory Press. - 1982.
4. Маренкова Т.В., Дейнеко Е.В., Шумный В.К. Мозаичный характер проявления гена *nptII* у трансгенных растений табака Nu 21 // Генетика. - 2007. - Т. 43, №7. - С.1-11.
5. Wang M.B., Waterhouse P.M. High-efficiency of a  $\beta$ -glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is independent of DNA methylation // Plant Molecular Biology. - 2000. - V. 43. - P.67-82.
6. Haque A.K., Yamaoka N., Nishiguchi M. Cytosine methylation is associated with RNA silencing in silenced plants but not with systemic and transitive RNA silencing through grafting // Gen. - 2007. - V. – 396, №2. - P.321-331

### Резюме

Подтверждено наличие не менее двух инсерций Т-ДНК в геном растений линии Nu 21. Исследован характер взаимодействия аллелей гена *nptII* у гибридов 1 поколения от скрещивания трансгенных растений табака линий Nu 21/5 и Nu 21/6 между собой и с растениями нетрансгенной линии SR1. Определена последовательность нуклеотидов области Т-ДНК плазмиды pC27-*nuclS*. Показано, что копии Т-ДНК в растительном геноме имеют ориентацию «голова к хвосту» и расположены одна за другой. Показано отсутствие метилирования последовательности *pMAS* Т-ДНК в зеленых листьях растений трансгенных линий Nu 21/5 и Nu 21/6 в районе сайта рестрикции эндонуклеаз *HpaII/MspI*.

Presence of no less than two T-DNA insertions into line Nu 21 plant genome was confirmed. Interaction character between *nptII* gene alleles was analyzed in Nu 21/5, Nu 21/6 lines 1 generation crossing hybrids and in Nu 21/5, SR1 (wild-type line) and Nu 21/6, SR1 1 generation crossing hybrids. Plasmid pC27-*nuclS* T-DNA part sequence was determined. It was shown that T-DNA copies are located one after another and have orientation “head to tail”. It was also determined that T-DNA *pMAS* sequence aren't

methyated on endonucleases *HpaII/MspI* restriction sites in green leaves of Nu 21/5 and Nu 21/6 line transgenic plants.

**МИРОСЬ Е. Л.<sup>1</sup>, КОЗЕРЕЦКАЯ И. А.<sup>2</sup>, АНДРИЕВСКИЙ А. М.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,  
Украина, 65026, Одесса, ул. Дворянская, 2, e-mail: [www.mel1982@mail.ru](mailto:www.mel1982@mail.ru)

<sup>2</sup>Киевский национальный университет имени Т. Г. Шевченко,  
Украина, 01033, Киев, ул. Владимирская, 64

## **ПОЛИМОРФИЗМ И ЭКСПРЕССИЯ КАРБОКСИЭСТЕРАЗ У САМЦОВ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ ЗОНЫ ОТЧУЖДЕНИЯ**

В природных условиях живые организмы подвергаются комплексному влиянию факторов окружающей среды физической и химической природы, которые в сочетании с радиацией могут приводить к новым неожиданным биологическим эффектам. [1].

Как отмечается в ряде работ [2, 3], многие протеолитические и эстеразные ферменты, выполняя в организме важную роль поддержания физиологического баланса свободных и связанных органических кислот, могут демонстрировать адаптационные возможности организма [4]. К сожалению, показатели фенотипического фенотипа у отдельных видов организмов, обитающих в экстремальных условиях, практически не изучены. В связи с этим, данная экспериментальная работа проводилась с целью исследовать полиморфизм и экспрессию основных ферментов карбоксиэстеразной системы у дрозофил взятых из регионов, характеризующихся разным уровнем радиации в зоне отчуждения [5]. В задачи данного исследования входило изучить экспрессию карбоксиэстераз у самцов *Drosophila melanogaster* Чернобыльской зоны отчуждения.

### **Материалы и методы**

Материалом исследований служили линии дикого типа *Drosophila melanogaster*, которые были отобраны из природных популяций Чернобыльской зоны отчуждения: *Чернобыльская 1* (г. Чернобыль; уровень радиации 50 мкР/ч), *Чернобыльская 2* (г. Полеское; уровень радиации 50 мкР/ч), *Чернобыльская 3* (водоём-охладитель ЧАЭС; уровень радиации 2 100мкР/ч). В качестве объекта сравнения использовали лабораторную линию дикого типа *Одесская 1* (г. Одесса; уровень радиации соответствует норме).

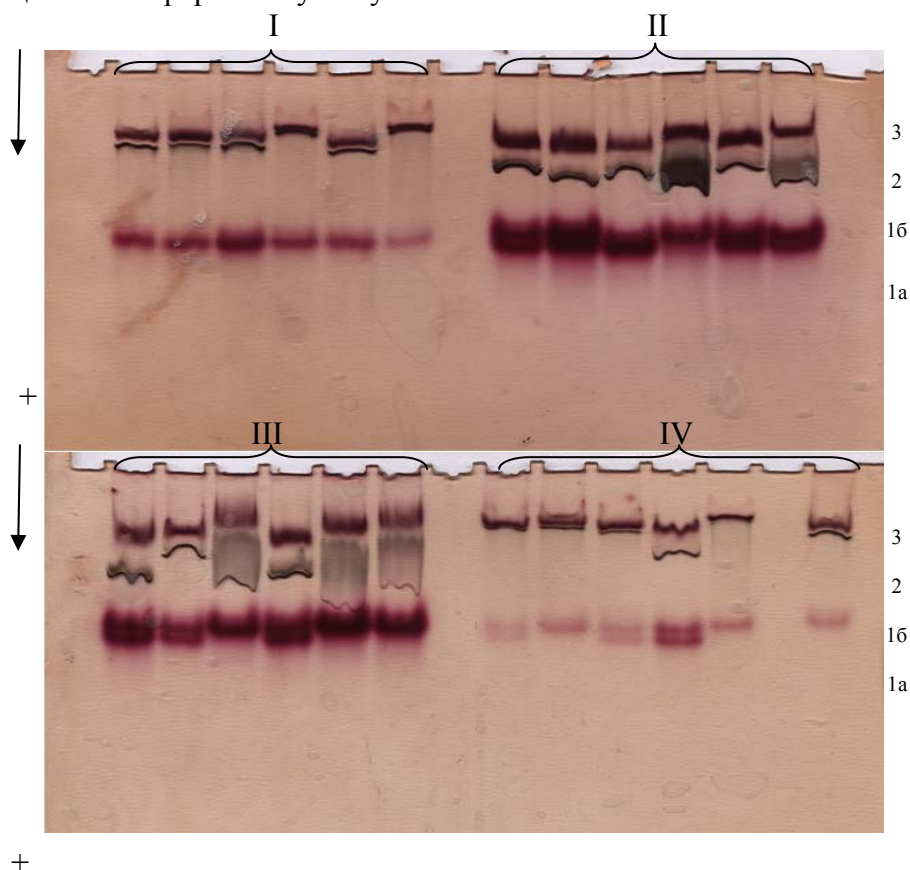
Линии разводили и поддерживали при одинаковых условиях: в темноте при постоянной температуре 25 °С на стандартной питательной среде [6].

Для определения ферментативной экспрессии карбоксиэстераз [7] готовили экстракты тканей отдельно взятых самцов имаго (предварительно наркотизированных диэтиловым эфиром) в 10 мкл 0,1 М глицин-NaOH буфера рН 9,0 с 1 % тритона X-100. Гомогенаты тканей центрифугировали на холоде при 10 000 g в течение 15 мин, после чего надосадочные жидкости отбирали и смешивали с 5 мкл 0,01 % раствора бромфенолового синего, приготовленного на 60 % растворе сахарозы. Полученные ферментсодержащие экстракты подвергали щелочному электрофорезу в 10 % полиакриламидном геле. После электрофоретического разделения гелевые блоки с локализованными в них ферментами отмывали в дистиллированной воде и выдерживали 10 мин в нейтральном буфере. Далее гелевые пластины инкубировали 20 мин при 25 °С в 25 мл 0,1 М трис-глицинового буфера рН 7,4, содержащего по 12 мг α- и β-нафтилацетатов и 25 мг соли диазония — прочного синего. Реакцию ферментативного расщепления субстратов

останавливали заливкой гелей кипящей дистиллированной водой. Отмытые пластины гелей сканировали во влажном состоянии при высокой степени разрешения (300 dpi), а их цифровые изображения сохраняли в формате BMP. Созданные сканограммы денситометрировали с помощью специальной компьютерной программы «АнаИС» (Поджарский М. А., Рыбалка Д. Г., 2004 г.). Полученные данные по оптической плотности ( $\Delta Do$ , относительные единицы) для каждой фракции карбоксиэстераз использовали для нахождения среднего значения —  $\overline{\Delta Do}$  и стандартной ошибки —  $m$ . Достоверность наблюдаемых различий в активности карбоксиэстераз оценивали с помощью критерия Стьюдента [8]. Статистическую обработку первичных данных осуществляли с помощью компьютерной программы "Excel".

### Результаты и обсуждение

Из приведенных на рис. 1 электрофореграмм видно, что самцы всех изучаемых популяций характеризуются наличием карбоксиэстераз, представленных 2 – 4 изоформами ферментов отличающихся друг от друга различным уровнем экспрессии. В изучаемых природных популяциях встречаются как гомо- так и гетерогенные формы по локусу  $\beta$ -специфичной эстеразы, что выражается в наличии соответствующих аллозимов у представителей тех или иных генотипических классов. В контрольном варианте рецессивная форма отсутствует.

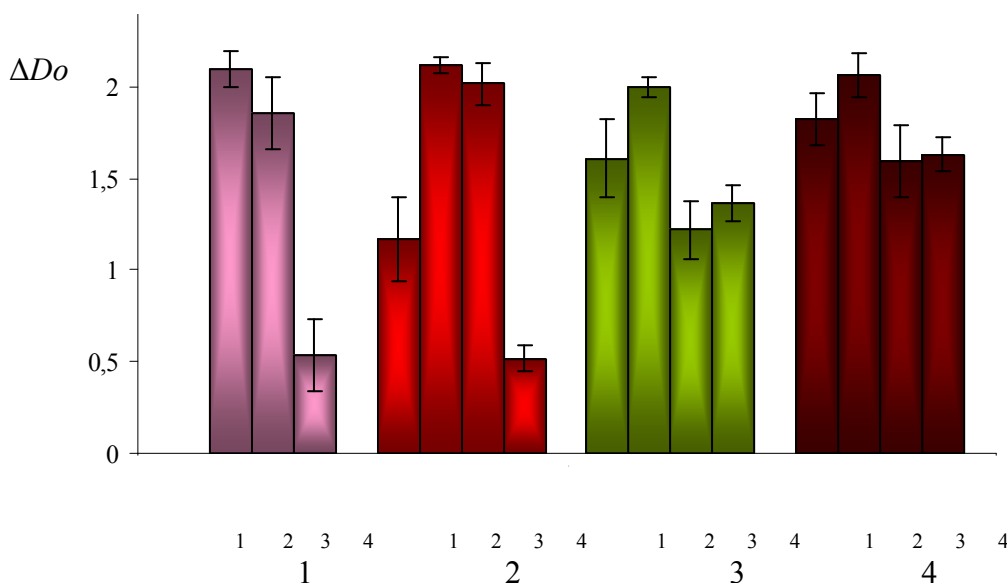


**Рис. 1.** Спектр карбоксиэстераз самцов имаго, принадлежащих разным популяциям *Drosophila melanogaster*:

I – лабораторная популяция *Одесская 1*, II – природная популяция *Чернобыльская 1*, III – природная популяция *Чернобыльская 2*, IV – природная популяция *Чернобыльская 3*; 1a – F-аллозим  $\beta$ -специфичной эстеразы, 1b – S-аллозим  $\beta$ -специфичной эстеразы, 2 – ацетилэстераза, 3 – ацетилхолинэстераза. Стрелками указано направление движения ферментов в ходе электрофореза.

Компьютерная денситометрия позволила дать количественную оценку уровню экспрессии каждой отдельно выявленной фракции, что характеризует уровень активности ферментов. Наглядно, результаты экспрессии карбоксиэстераз по четырем

формам ферментов у самцов имаго изучаемых популяций дрозофил представлены на рисунке 2.



**Рис. 2.** Экспрессия карбоксиэстераз самцов имаго, принадлежащих разным популяциям *Drosophila melanogaster*:

По оси x: 1 – F-аллозимы β-специфичной эстеразы, 2 – S-аллозимы β-специфичной эстеразы; 3 – ацетилэстеразы; 4 – ацетилхолинэстеразы; 1 – самцы лабораторной популяции *Одесская 1*, 2 – природная популяция *Чернобыльская 1*, 3 – природная популяция *Чернобыльская 2*, 4 – природная популяция *Чернобыльская 3*; по оси y: оптическая плотность ( $\Delta Do$ , относительные единицы), отражающая уровень экспрессии ферментов.

Максимальный уровень экспрессии ферментов наблюдается у самцов популяций *Чернобыльская 1*, минимальный – *Чернобыльская 3*. Следует отметить, что β-специфичные эстеразы (как F-, так и S-аллозимы), в отличие от ацетилэстераз и ацетилхолинэстераз, оказались наиболее подверженными действию экстремального фактора (в данном случае, повышенному уровню радиации). Так, относительная активность ( $\Delta Do$ ) S-аллозимов самцов популяции *Чернобыльская 1* составила  $2,12 \pm 0,04$ ,  $\Delta Do$  S-аллозимов самцов популяции *Чернобыльская 3* составила  $0,52 \pm 0,07$ , при среднем значении экспрессии тех же форм β-эстеразы самцов линии *Одесская 1*, равная  $1,17 \pm 0,23$ . Тогда как, различия  $\Delta Do$  ацетилэстераз изучаемых популяций составила: *Одесская 1* –  $1,60 \pm 0,21$ ; *Чернобыльская 1* –  $1,99 \pm 0,05$ ; *Чернобыльская 2* –  $1,22 \pm 0,16$ ; *Чернобыльская 3* –  $1,36 \pm 0,09$ .

Межпопуляционные отличия, которые мы наблюдаем в экспрессии исследуемых ферментов, по всей видимости, обусловлены генетическими особенностями мух, которые складываются под влиянием факторов внешней среды.

### Выводы

1. Популяции *Drosophila melanogaster* Чернобыльской зоны отчуждения, характеризуется разной экспрессивностью карбоксиэстераз, связанной с уровнем радиации в местах, где были взяты исходные родительские формы.

2. β-специфические эстеразы проявляют большую чувствительность к изменениям окружающей среды: при уровне радиации 50 мкp/ч наблюдается достаточно высокая активность аллозимов этих ферментов, при 2 100 мкp/ч – экспрессия S- и F-аллозимов оказывается максимально заниженной. Ацетилэстеразы и ацетилхолинэстеразы самцов соответствующих популяций проявляют относительную устойчивость.

### Литература



1. Голуб Н. Я., Черник Я. I. Мутації, індуковані рентгенівським опроміненням та деякими хімічними реагентами, що змінюють тривалість життя *Drosophila melanogaster* // *Цитология и генетика*, 2008. – Т. 42, №1. – С. 37 – 44.
2. Андриевский А. М., Кучеров В. А., Тоцкий В. Н., Деркач Е. В. Онтогенетические особенности экспрессии карбоксиэстераз у *Drosophila melanogaster* // *Вісник ОНУ*, 2005. – Т. 10. – Вип. 5. – С. 26 – 33.
3. Тоцкий В. Н., Хаустова Н. Д., Андриевский А. М., Гандирук Н. Г., Белова Г. И., Есеркепова Е. В. Экспрессивность ген-энзимных систем и показатели жизнеспособности в онтогенезе инбредных линий и гибридов дрозофилы // *Генетика*, 1990. – Т. 26, № 10. – С. 1791 – 1799.
4. Андриевский А. М. Половой диморфизм по экспрессии эфиров карбоновых кислот в популяциях *Drosophila melanogaster* // *Вісник ОНУ*, 2006. – Т. 11, Вип. 9. – С. 7 – 17.
5. Андриевский А. М., Кучеров В. А., Кундиева Е. П. Полове различия карбоксиэстераз у *Drosophila melanogaster* дикого типа // *Вісник ОНУ*, 2006. – Т. 11, Вип. 6. – С. 26 – 31.
6. Медведев Н. Н. Практическая генетика. – Москва: Наука, 1966. – 238 с.
7. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. – М.: Мир, 1982. – Издание в 3-х томах. – Т. 1. – 389с.
8. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшая школа, 1973. – 320 с.

### Резюме

Анализировали многообразие и экспрессию молекулярных форм карбоксиэстераз у самцов природных популяций *Drosophila melanogaster*, взятых из Чернобыльской зоны отчуждения. Во всех природных популяциях установлен полиморфизм по локусу  $\beta$ -специфической эстеразы. Показаны межпопуляционные различия в экспрессии основных форм изучаемых ферментов. Обсуждается вопрос зависимости экспрессии ферментов карбоксиэстеразной системы от уровня радиации в ареалах обитания исследуемых групп дрозофил.

Аналізували різноманіття та експресію молекулярних форм карбоксиестераз у самців природних популяцій *Drosophila melanogaster*, взятих із Чорнобильської зони відчуження. В усіх природних популяціях встановлень поліморфізм по локусу  $\beta$ -специфічної естерази. Показані міжпопуляційні відмінності в експресії основних форм досліджуваних ферментів. Обговорюється питання залежності експресії ферментів карбоксиестеразної системи від рівня радіації в ареалах проживання досліджуваних груп дрозофіл.

A variety and expression of molecular forms of carboxyesterases in males from natural populations of *Drosophila melanogaster* taken from the Chernobyl zone of alienation have been analyzed. A polymorphism in  $\beta$ -specific esterase's locus has been revealed in all of natural populations. Interpopulation distinctions are shown in expression of basic forms of the studied enzymes. The question about dependence level of enzymes expression of carboxyesterases system from the level of radiation in the natural habitats of dwelling in the investigated groups of *Drosophila*.

### ОСЬКИНА И.Н., ПРАСОЛОВА Л.А.

*Институт цитологии и генетики СО РАН, пр. акад. Лаврентьева, 10,  
Новосибирск, 630090, E-mail: oskina@bionet.nsc.ru*

### АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ ВОЗНИКНОВЕННЯ БЕЛОЙ ПЯТНИСТОСТИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДОМСТИКАЦИИ

Одной из особенностей формообразовательного процесса у животных при повторении одной и той же эволюционной ситуации является сходный характер



изменений, возникающих у представителей разных систематических групп. Ярким примером может служить конвергентный характер морфофизиологических преобразований домашних животных. Так, депигментация участков мехового покрова или белая пятнистость часто наблюдается у домашних и лабораторных животных и является проявлением мутаций генов, которые ответственны за скорость миграции и дифференцировки меланобластов из нейрального креста [1]. Согласно одному из положений концепции отбора Д.К. Беляева, морфофизиологическое сходство при эволюционном преобразовании поведения при domestikации животных может быть обусловлено не только генетической общностью, но и однонаправленным изменением регуляторных систем организма при одном и том же векторе отбора [2]. В ходе многолетнего эксперимента по отбору разных животных (серебристо-черная лисица, норка, серая крыса) на социальную адаптацию к условиям неволи и близкому контакту с человеком были продемонстрированы однонаправленные изменения поведения и некоторых морфологических признаков. Одним из первых морфологических изменений у всех животных экспериментальной domestikации была депигментация определенных участков кожно-мехового покрова [3]. У серебристо-черных лисиц – это полудоминантная мутация “*Star*”, возникающая с высокой частотой в domestikируемой популяции [4]. В domestikируемой популяции серых крыс также возрастает частота возникновения и экспрессия депигментации, детерминируемой полурецессивной мутацией *hooded*, которая у гетерозигот приводит к возникновению белой пятнистости на вентральной стороне тела [5].

Согласно гипотезе Д. К. Беляева, перенос животных в новую среду обитания и близкий контакт с человеком были стрессующими воздействиями, и на первых этапах domestikации отбор на элиминацию агрессивного поведения к человеку являлся и отбором на стресс-реактивность, вовлекая в сферу своего влияния нервную и эндокринную системы. Самые первые и наиболее глубокие изменения при отборе на domestikацию произошли в функционировании гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системе (ГГНС), как основной системе адаптации и стресса. Отбор привел к ослаблению активности всех звеньев этой системы у всех объектах экспериментальной domestikации [6]. Хорошо известно, что развитие организма в эмбриогенезе невозможно без участия глюкокортикоидных гормонов. Эти гормоны в эмбриогенезе оказывают влияние не только на структурное развитие органов, но также на созревание и “программирование” различных систем [7]. Наши исследования показали, что возникновение белых пегостей у серебристо-черных лисиц, детерминируемых геном “*Star*”, происходит из-за задержки на 1 -2 дня миграции меланобластов в кожу. Аллели локуса *hooded* у крыс также задерживают миграцию меланобластов, в результате этого меланоциты отсутствуют в волосяных фолликулах депигментированных участков [8]. Представляло интерес исследовать содержание глюкокортикоидов во время беременности у domestikируемых серебристо-черных лисиц и серых крыс, а также изучить роль ГГНС в механизмах возникновения депигментации у селекционируемых по поведению животных на примере экспериментальной domestikации дикой серой крысы.

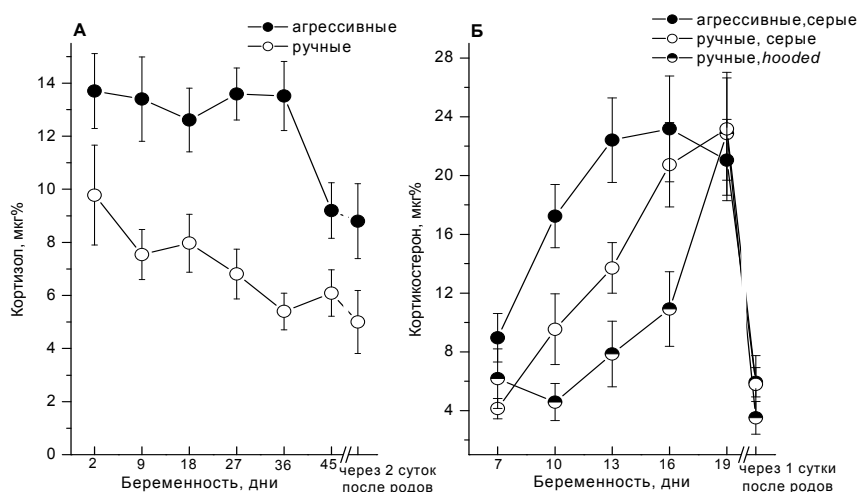
#### **Материалы и методы**

Кровь для последующего определения гормонов была взята в различные сроки беременности у недомestikируемых (агрессивные) и domestikируемых (ручные) лисиц и крыс в различные сроки беременности. На следующем этапе работы изменяли гормональный фон беременных полностью пигментированных серых самок крыс из недомestikируемой популяции. Для этих целей в 1-ом эксперименте на 12 -14 дни беременности самки были стрессированы. В качестве стрессорной стимуляции использовали ограничение подвижности в течение 45 минут 3 раза в день. Во 2-ом эксперименте самкам в эти же сроки беременности вводили подкожно дексаметазон (Sigma) в дозе 50 мкг на крысу или растворитель. У 18 – 20-дневных эмбрионов на

гистологических препаратах оценивалась картина развития меланобластов в коже. А у взрослых потомков этих самок был описан фенотип окраски меха с указанием мест расположения депигментированных участков и исследована реакция ГНС на стресс. Глюкокортикоиды в плазме крови определяли методом конкурентного белкового связывания. Меланобласты в коже выявляли серебрением по Masson.

### Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что содержание глюкокортикоидов в крови во время беременности значительно снижено и у лисиц, и у крыс (рис. 1). При этом у лисиц уровни гормонов в разные сроки беременности незначительно менялись (рис. 1А), а у крыс независимо от типа поведения уровни гормонов повышались к концу беременности. Следует отметить, что у агрессивных крыс уровень кортикостерона в крови начинал увеличиваться с 10 дня, достигая максимальных значений к 13 дню беременности, а у серых ручных крыс – только к 16 дню. У ручных же крыс гомозиготных по гену *hooded* содержание гормона в крови незначительно менялось с 7-го по 16-й дни беременности и резкое повышение происходило только к 19-му дню (рис. 1Б).

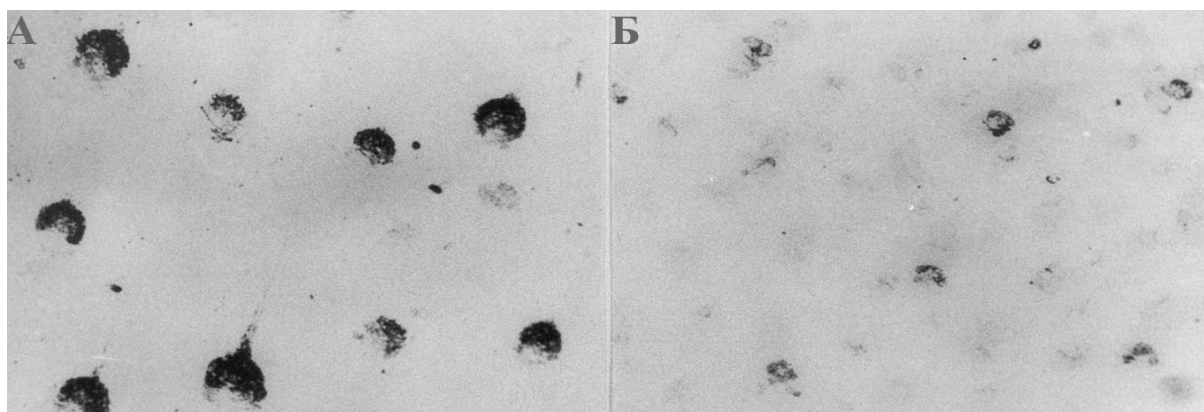


**Рис. 1.** Уровень глюкокортикоидов в крови у серебристо-черных лисиц (А) и крыс (Б) во время беременности

Проведенные нами исследования показали, что эмбриональный механизм специфической пегости на голове у лисиц, детерминируемой геном *S* (*Star*) [4] и на вентральной стороне у диких серых крыс *Agouti*, детерминируемой геном *h* сходен и состоит в задержке миграции меланобластов из нейрального креста в кожу. Таким образом, при отборе животных разных видов (с-ч лисица, дикая серая крыса) на доместикационное поведение отмечаются однонаправленные изменения как в функции ГГНС, так и в проявлении депигментации, обусловленной, по-видимому, одними и теми же механизмами в период эмбрионального развития, а именно - задержкой миграции меланобластов из нейрального креста и связанных с этим задержкой пролиферации и дифференцировки меланобластов.

Рестрикционный стресс на 12 – 14 дни беременности приводил к задержке миграции и дифференцировки меланобластов в коже эмбрионов серых агрессивных крыс. Так, если у 20-дневных плодов контрольной группы крыс в коже головы и шеи хорошо видны не только отдельные меланобласты, но и формирующиеся волосяные фолликулы, в которые меланобласты поступают, то в коже у плодов стрессированных матерей присутствуют, в основном, лишь отдельные меланобласты и первичные волосяные фолликулы еще не сформированы. В результате это приводит к рождению с более высокой частотой, чем в контроле потомков, имеющих на вентральной стороне

депигментированные участки (контрольные потомки – 10%, потомки стрессированных самок – 35%). Кроме того, стрессорная стимуляция на 12 -14 дни беременности вызывает снижение функциональной активности ГГНС у взрослых потомков этих самок. Хорошо известно, что при действии стресса изменяется функционирование многих систем организма, некоторые из них также могут влиять на развитие меланобластов, поэтому в следующем эксперименте агрессивным серым самкам в эти же сроки беременности вводили дексаметазон или физиологический раствор. Введение дексаметазона привело к достоверному снижению уровня кортикостерона у эмбрионов на 18-19 дни беременности, а у взрослых потомков реакция на эмоциональный стресс была снижена почти в полтора раза и сопоставима с реакцией на данное воздействие у ручных животных. Исследования также показали, что степень развития (количество и дифференцировка) меланобластов в коже у эмбрионов экспериментальной группы на 20 день эмбриогенеза значительно ниже, чем у эмбрионов контрольной группы этого возраста и соответствует примерно 18.5 дням эмбрионального развития у контрольной группы (рис.2). Кроме того, среди родившихся потомков, матери которых получали дексаметазон, процент крыс с депигментацией на вентральной поверхности тела возрастал примерно в 4 раза по сравнению с контрольной популяцией.



**Рис. 2.** Влияние введения дексаметазона беременным полностью пигментированным самкам на развитие меланобластов у 20-дневных эмбрионов.

А – контрольная группа, Б – экспериментальная группа.

Таким образом, на основании полученных результатов, можно полагать, что вектор отбора на доместикационное поведение совпадает по направлению с вектором действия глюкокортикоидов на меланогенез в эмбриогенезе и изменение функционального состояния ГГНС может являться одной из причин возникновения депигментаций у животных при отборе на доместикацию. Вероятно, на первых этапах отбора, когда давление стресса было велико, наибольшей приспособленностью к жизни в условиях неволи обладали животные с депигментацией мехового покрова. Показано, что в природных популяциях при возрастании популяционного стресса резко увеличивается численность животных с белой пятнистостью [9]. В последнее время, в литературе высказывается точка зрения, что внешняя среда и сам отбор могут вызывать направленную изменчивость фенотипов [10, 11]. Однако механизмы, вызывающие эту изменчивость, пока недостаточно изучены. Одним из таких механизмов эпигенетических изменений является процесс метилирования ДНК. Не исключено, что глюкокортикоиды играют в этом определенную эволюционную роль, так как они не только участвуют в регуляции многих функций взрослого организма и в «программировании» различных систем в эмбриогенезе, но, как свидетельствуют литературные данные, контролируют метилирование генома [12].

Работа поддержана грантом РФФИ №08-04-01412 и Программой Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов».

### Литература

1. Klungland H., Vage D. Molecular genetics of pigmentation in domestic animals // Current Genomics.- 2000.- Vol. 1. P. 223-242.
2. Беляев Д.К. Проблемы и перспективы исследований по генетике и селекции животных// Генетика.- 1987.- Т. 23. С. 937-946.
3. Трут Л.Н. Некоторые аспекты генетики пегостей серебристо-черных лисиц (*Vulpes vulpes* L.) и взаимоотношения вектора отбора и направления изменчивости.// Проблемы генетики и теории эволюции.- Новосибирск: Наука. -1991. С.- 67-84.
4. Прасолова Л.А., Трут Л.Н. Эффект гена “Star” на скорость миграции меланобластов у эмбрионов серебристо-черных лисиц (*Vulpes vulpes*).//ДАН.-1993.- Т. 329. С. 787-789.
5. Трут Л.Н., Плюснина И.З., Прасолова Л.А., Ким А.А. Hooded аллель и отбор диких серых крыс (*Rattus norvegicus*) по поведению.// Генетика.- 1997.- Т. 33. С. 679-685.
6. Оськина И.Н., Плюснина И.З. Гипофизарно-надпочечниковая система при отборе животных на доместикационное поведение.// Современные концепции эволюционной генетики. Новосибирск: ИЦиГ.- 2000.- С. 327-334.
7. Seckl JR. Glucocorticoids, developmental 'programming' and the risk of affective dysfunction.// Prog. Brain Res.- 2008.- Vol. 167. P. 17-34.
8. Yamamura K. Ogita Z. Markert C. The use of chimeric rats in the analysis of the hooded pigmentation pattern.// In: Genetic approaches to developmental neurobiology. - Berlin: Springer-Verlag.- 1982.- P. 111-120.
9. Потапов М.А., Рогов В.Г., Евсиков В.И. Влияние популяционного стресса на встречаемость водяных полевок (*Arvicola Terrestris* L.) с белыми отметинами.// ДАН.- 1998.- Т. 358.- С. 713-715.
10. Guerrero-Bosagna C., Sabat P., Valladares L. Environmental signaling and evolutionary change: can exposure of pregnant mammals to environmental estrogens lead to epigenetically induced evolutionary changes in embryos?// Evol. Devel.- 2005- Vol. 7. P. 341–350.
11. Rando O., Verstrepen R. Timescales of Genetic and Epigenetic Inheritance.//Cell.- 2007.- Vol. 128. P. 655–668.
12. Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК и эпигенетика.//Генетика. 2006.- Т. 42. С. 1186-1199.

### Резюме

Установлено, что глюкокортикоидные гормоны принимают участие в развитии меланобластов и возникновении депигментации у животных при отборе на доместикационное поведение.

It is shown that the glucocorticoid hormones may be involved in melanoblast development and in the appearance of white spotting in animals selected for domestic behavior.

**ПОТОПАЛЬСЬКИЙ А.І., ЮРКЕВИЧ Л.Н., КАЦАН В.А.**

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,  
Україна, 03143, Київ, проспект академіка Заболотного, 150,  
e-mail: potopalsky@imb.org.ua

## ГОМЕОБОКСНІ ГЕНИ ЯК МОЖЛИВІ МІШЕНІ ДІЇ ЕКЗОГЕННИХ ДНК ПРИ ОТРИМАННІ НОВИХ ФОРМ ЖИТА

Можливість отримання форм рослин зі зміненими спадковими ознаками, в тому числі й селекційно цінними, за допомогою екзогенних ДНК (е-ДНК) була показана ще в 70-х–80-х роках минулого сторіччя [1-5], проте механізми дії екзогенного генетичного матеріалу на геном рослин і по сьогоднішній день є предметом дискусій. Аналізуючи результати досліджень, отримані іншими дослідниками та в нашій лабораторії, можна прийти до висновку, що екзогенні ДНК перш за все впливають на системи регуляції геному хазяїна, які відповідають за адаптацію до змін у довкіллі [6]. Складність і неодноплановість змін, які індукуються е-ДНК, може бути пояснена тим, що мішенню їхньої дії стають ключові регуляторні гени в сигнальних сітках від факторів довкілля та шляхах реалізації відповіді на дію таких факторів. Заслуговує на увагу, що ключові гени сигнальних шляхів від факторів довкілля, а також такі, з якими пов'язані кількісні ознаки, зокрема врожайність рослин, мають, як правило, гомеобоксну природу, а системи регуляції їхньої активності є важливим фактором забезпечення пластичності геному рослин [7-13]. Дуже зручною моделлю для дослідження впливу екзогенних ДНК на гомеобоксні гени могли б стати зернові, в яких механізми адаптації до низьких температур пов'язані з наявністю генів озимості-яровості, які мають гомеобоксну природу і здатні переходити до іншого алельного стану під впливом абіотичних та біотичних стресорів, що здавна використовується в селекції [7-11]. Оскільки в нашій лабораторії значну увагу приділено отриманню перспективних форм зернових, здатних давати високі врожаї в зміненому внаслідок техногенного впливу довкіллі, метою даної роботи є аналіз селекційно цінних змін, отриманих у жита за допомогою е-ДНК, побудова гіпотез у зв'язку з необхідністю більш поглибленого дослідження механізмів впливу е-ДНК на спадковість рослин.

### Матеріали і методи

Для отримання форм жита зі зміненими ознаками при дії нативних екзогенних нуклеїнових кислот (е-ДНК) та модифікованих за допомогою трифункціонального алкілувального агента тіофосфаміду – тіоТЕФА (е-ДНК(т)) нами використане диплоїдне озиме жито Житомирське ( $2n=2x=14$ ). Цей сорт отриманий на Поліській дослідній станції сімейним та груповим добром із жита сорту Поліське, він районований у Житомирській області. Насіння вихідного сорту чистої лінії вихідного сорту жита попередньо пророщували протягом 24 годин та переносили на 24 години у водні розчини е-ДНК та е-ДНК(т), після чого ретельно промивали водою. Були використані нативні та модифіковані тіоТЕФА ДНК тваринного походження: із тімусу теляти (препарат Олайнського заводу,  $M \approx 10 \div 12 \cdot 10^6$  Д), ДНК людини; ДНК рослинного походження – кукурудзи, пирію, гороху, щиріці, люпину, отримані в нашій лабораторії згідно з методикою, описаною раніше [14] з модифікаціями, наведеними в роботах [15,16]. Згідно з даними електрофорезу в гелі агарози,  $M$  використаних нами нативних рослинних ДНК коливалася в межах  $10 \div 15 \cdot 10^6$ . Вміст основної речовини у використаних препаратах ДНК був не меншим від 95 %, концентрація ДНК у розчинах для інфільтрації насіння в різних варіантах досліду перебувала в межах  $100 \div 400$  мкг/мл. У 1-му поколінні, отриманому від рослин, вирощених із обробленого ДНК насіння ( $T_1$ ), враховували наступні параметри: схожість, виживання паростків, появу безхлорофільних паростків. У поколіннях  $T_1$ - $T_3$  відбирали форми, які мали зміни за типом розвитку (озимість-яровість), висотою рослин, будовою колосу та стебла, кущенням, термінами дозрівання зерна та ін. Усі рослини вирощували на ізолюваних ділянках, на суцвіття до зацвітання вдягали пергаментні ізолятори. Обробку насіння озимого жита розчинами препаратів ДНК поєднували із висівом його у весняний період. Для оцінки відмінностей досліджуваних параметрів використано  $t$ -критерій Стьюдента [17].

## Результати та обговорення

Препарати геномної ДНК тваринного та рослинного походження при дії їх на проростаюче насіння спричинили появу форм рослин зі зміненим типом розвитку (табл. 1), але найбільшу ефективність при цьому виявили е-ДНК із тімусу теляти та е-ДНК людини. Високий вихід ярових рослин було отримано також при застосуванні е-ДНК пирію в концентрації 200 мкг/мл. Серед досліджених модифікованих ДНК здатними індукувати появу рослин із яровим типом розвитку виявилися тільки е-ДНК(т) із тімусу теляти, е-ДНК(т) людини та одна із рослинних ДНК – е-ДНК(т) топінambuру. Ярові форми рослин, вирощені з обробленого насіння, виколосилися у період із середини липня до середини вересня й дали фертильне насіння.

Насіння 38 сімей рослин із ярим типом розвитку було висіяне в польових умовах. Серед отриманих рослин виявлено форми зі змінами форми та розмірів листя на ранніх етапах розвитку. У поколінні  $T_1$  рослини сімей від варіантів обробок е-ДНК людини (400 мкг/мл) та е-ДНК пирію (200 мкг/мл) мали довші (на 12,4 та 18,5% відповідно;  $P=0,001$ ) й ширші (на 12,5 та 26,3% відповідно;  $P=0,001$ ) листки та збільшену кількість листків на кущ. Рослинам із сімей від варіантів обробки е-ДНК гороху (100 мкг/мл) було притаманно збільшення ширини листків (на 15,9%;  $P=0,001$ ). ДНК із тімусу теляти (100 мкг/мл) спричинювала появу рослин зі зменшеною довжиною (на 11,3%;  $P=0,01$ ) та збільшеною шириною (на 16,6%;  $P=0,001$ ) листків. У варіанті із застосуванням алкілованої ДНК топінambuру (100 мкг/мл) спостерігали рослини зі зменшеною довжиною та шириною листків (на 17,7% та 30,8% відповідно;  $P=0,001$ ). У поколінні  $T_1$  в деяких варіантах досліду спостерігали появу хлорофілових мутацій. Найбільша їх кількість виявлена при дії препаратами е-ДНК із тімусу теляти, 200 мкг/мл ( $2,08 \pm 1,84\%$ ) та е-ДНК людини, 400 мкг/мл ( $3,3 \pm 2,3\%$ ). Меншу їх кількість виявлено при дії препаратів нативних ДНК рослинного походження ( $1,56 \pm 1,40\%$ ). Хлорофілові мутації були притаманні також наступним поколінням рослин від варіантів обробки насіння е-ДНК із тімусу теляти та е-ДНК людини ( $0,05 \pm 0,002\%$ ). При дії аналогічних е-ДНК(т) хлорофіліві мутації не спостерігали. Не виявлено хлорофілові мутації також у контролі.

У поколінні  $T_0$  у варіанті обробки насіння жита е-ДНК гороху (100 мкг/мл) з частотою  $1,7 \pm 0,7\%$  виявлено рослини зі зміненою структурою колосу (гіллястість типу *compositum*). У поколінні  $T_1$ , отриманому від цих рослин, виявлено також наступні морфологічні зміни: потовщення стебла, збільшення головного колосу; у 2-х із 25 сімей спостерігали успадковування ознаки гіллястості колосу. Потомство цих сімей в  $T_2$  мало жовту соломину, широку листову пластинку, а окремі екземпляри – підвищене продуктивне кушіння.

Утворення значно більшої кількості продуктивних стебел було притаманне деяким рослинам покоління  $T_1$  після дії е-ДНК пирію в концентрації 200 мкг/мл (до 40 стебел на кущ). При дії е-ДНК гороху в концентрації 100 мкг/мл у рослин покоління  $T_1$  спостерігали зменшення висоти стебла в середньому на 18,1% ( $P=0,001$ ), поруч зі збільшенням кількості продуктивних стебел та довжини колосу (на 44,1 та 43,8% відповідно;  $P=0,001$ ). За допомогою е-ДНК із тімусу теляти були індуковані також рослини з гіллястим колосом та розсіченою на вузькі частини листовою пластинкою. Остання ознака була виявлена незалежно в іншій сім'ї покоління  $T_2$  від цього варіанту обробки.

Отже, за допомогою використаних е-ДНК нами отримано рослини жита зі спадковими змінами типу розвитку та одночасними змінами комплексу морфологічних змін, зокрема висоти, форми і розмірів листків та колосся. Обумовленість таких змін можна пояснити тим, що мішенями дії е-ДНК стали важливі гомеобоксні гени, які регулюють процеси розвитку й морфогенезу в рослин, адаптуючи їх до змін у довкіллі. Зокрема, при отриманні ярових форм жита із озимих можливий алельний перехід гена *vrn*, і такий перехід може індукуватись, перш за все, змінами в системі регуляції

геному, яка сприймає сигнали від стресора і стає тригером для запуску роботи систем, які реалізують певний рівень пластичності геному.

Таблиця 1

**Частота появи рослин з яровим типом розвитку в поколінні T<sub>0</sub> після дії нативними та модифікованими екзогенними ДНК на проростаюче насіння озимого жита сорту Житомирське**

Варіант досліджу	Ярових рослин, %		Варіант досліджу	Ярових рослин, %	
	M <sub>i</sub> ±m	M <sub>0</sub> ±m		M <sub>i</sub> ±m	M <sub>0</sub> ±m
Контроль (дистильована вода)	2,00±1,16	2,00±1,16	Той же		
ДНК із тімусу теляти, мкг/мл			ДНК(т) із тімусу теляти, мкг/мл		
100	12,96±4,57	14,37±2,25***	100	8,33±3,56	8,26±2,50*
200	11,66±4,12		200	8,13±3,51	
300	17,24±4,95				
400	15,65±4,58				
ДНК людини, мкг/мл			ДНК(т) людини, мкг/мл		
100	13,84±4,28	14,77±2,37***	100	12,50±4,41	12,50±4,41*
200	16,66±4,80		200	12,50±4,41	
300	14,58±5,08				
400	14,00±4,90				
ДНК гороху, мкг/мл			ДНК(т) гороху, мкг/мл		
100	11,29±2,85	10,56±2,77***	100	5,97±2,89	5,87±2,89
200	9,84±4,00				
ДНК пирію, мкг/мл			ДНК(т) пирію, мкг/мл		
100	4,83±2,72	10,80±2,33***	100	6,89±3,32	3,44±1,41
200	17,0±4,93		200	0	
ДНК нетреби колючої, мкг/мл			ДНК(т) нетреби колючої, мкг/мл		
100	9,52±3,69	8,19±2,01**	100	6,00± 3,35	2,00±1,45
200	10,52±4,06		200	0	
300	4,54±2,56		300	0	
ДНК щиріці, мкг/мл			ДНК(т) щиріці, мкг/мл		
100	10,63±4,49	9,62±2,87**	100	4,00±2,32	4,28±1,71
200	8,62±3,68		200	4,47±2,32	
ДНК топінамбуру, мкг/мл			ДНК(т) топінамбуру, мкг/мл		
100	8,33±3,56	7,82±2,08**	100	6,45±3,11	6,34±1,83*
200	8,00±3,83		200	9,00±3,69	
300	7,14±3,44		300	3,57±2,47	

Примітка. Відмінність від контролю достовірна при: \* – P=0,05; \*\* – P=0,01; \*\*\* – P=0,001.

### Висновки

1. За допомогою препаратів е-ДНК у рослин озимого жита індуковано комплекс спадкових змін, серед яких найважливішими є такі, які є важливими для селекції, зокрема, зміна типу розвитку з озимого на яровий, поява морфологічних змін, які сприяють стійкості до вилягання (зменшення висоти та потовщення стебла) та морфологічних змін, сприятливих для підвищення врожайності жита – збільшення довжини колосся, кількості продуктивних стебел, галуження колоса та ін.
2. Характер змін, отриманих за допомогою е-ДНК у жита, вказує на те, що мішенню дії е-ДНК є, очевидно, гомеобоксні гени, які регулюють тип розвитку та виявлення кількісних ознак, пов'язаних із врожайністю. Такий вплив може реалізуватися як шляхом мутацій таких генів та змін рівня їхньої активності за допомогою систем регуляції геному, відповідальних за адаптацію до змін у довкіллі.

## Література

1. Сиволап Ю.М., Хорошевская Л.П. Эффект введения участков генома ржи растениям ячменя // Цитология и генетика. – 1976. – **10**, № 4. – С. 320-325.
2. Сиволап Ю.М., Образцов И.С., Хорошевская Л.П. Генетический эффект введения ДНК в высшие растения // Республиканский межведомственный сборник “Молекулярная биология”. Киев, 1978. – Вып. 19. – С. 20-27.
3. Картель Н.А. Эффекты экзогенной ДНК у высших растений. – Минск: Наука и техника, 1981. – 143 с.
4. Ларченко Е.А., Моргун В.В. Экспериментальная изменчивость кукурузы. – Киев: Наукова думка, 1993. – 173 с.
5. Потопальский А.И., Кацан В.А., Юркевич Л.Н. Итоги и перспективы получения растений семейства пасленовых с помощью нативных и модифицированных ДНК // Овощеводство и бахчеводство. – 2005. – Т.51. – С. 181-197.
6. Кацан В.А., Потопальський А.І. Екзогенні ДНК можуть впливати на регуляторні системи рослин, відповідальні за адаптацію до змін у довкіллі // Біополімери та клітина. – 2006. – **22**, № 4. – С. 307-316.
7. Trevaskis B., Bagnal D.J., Ellis M.H., Peacock W.J., Dennis E.S. MADS-box genes control vernalization-induced flowering in cereals // PNAS. -2003. - **100**, № 22. – P. 13099-13104.
8. Loukoianov A., Yan L., Blechl A., Sanches A., Dubcovsky J. Regulation of *VRN-1* vernalization genes in normal and transgenic polyploid wheate // Plant Physiol. – 2005. – **138**, № 4. – P. 2364-2373.
9. Kane N.A., Danyluk J., Tardif J., Ouellet F., Laliberte J.-F., Limin A.E., Fowler B., Sarhan F. TaVRT-2, a member of the *StMADS-11* clade of flowering repressors is regulated by vernalization and photoperiod in wheat // Plant Physiol. – 2005. – **138**, № 4. – P. 2354-2363.
10. Fowler D., Breton G., Limin A.E., Mahfoozi S., Sarhan F. Photoperiod and temperature interactions regulate low-temperature-induced gene expression in barley // Plant Physiol. – 2001. – **127**, № 4. – P. 1676-1681.
11. Baga M., Chodaparambil S.V., Limin A.E., Pecar M., Fowler D.B., Chibbar R.N. Identification of quantitative trait loci and associated candidate genes for low-temperature tolerance in cold-hardy winter wheat // Funct. Integr. Genomics. – 2007. – **7**, № 1. – P. 53-68.
12. Komatsuda T., Pourkheirandish M., He S., Azhaguel P., Kanamori H., Perovic D., Stein N., Graner A., Wicker T., Tagiri A., Lundquist U., Fugimura T., Matsuoka M., Matsumoto T., Yano M. Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper 1-class homeobox gene // PNAS. – 2007. – **104**, № 4. – P. 1424-1429.
13. Mallikarjuna Swamy B.P., Narla N. Yield-enhancing quantitative trait loci (QTLs) from wild species // Biotechnology advances. – 2008. – **26**. – P. 106-120.
14. Сквирская Э.Б., Чепинога О.П. Практикум по нуклеопотеидам и нуклеиновым кислотам. – Москва: Высшая школа, 1964. – 214 с.
15. Пацковский Ю.В., Соловьян В.Т., Потопальский А.И., Ткачук З.Ю. Степень алкилирования и физико-химические свойства модифицированных тиофосфамидом ДНК // Республ. межвед. сборник “Молекулярная биология”. – Киев, 1984. – Вып. 37. – С. 44-50.
16. Способ получения дезоксирибонуклеиновой кислоты из растительного сырья: А.с. СССР № 1170871 Т, МКИ С 12 N 15/00, С 07 Н 21/00. / З.Ю. Ткачук, А.И. Потопальский (СССР). – № 2995141; Заявлено 03.10.80 г., А.с. видано 01.04.85.
17. Кокунин В.А. Статистическая обработка данных при малом числе опытов // Укр. биохим. журн. – 1975. – **47**, № 6. – С. 776-790.



## **Резюме**

Для получения новых форм ржи использованы препараты экзогенных ДНК животного и растительного происхождения в диапазоне концентраций 100÷400 мкл/мг. Растворами ДНК обрабатывали прорастающие семена озимой ржи сорта Житомирская. Получены новые формы растений с яровым типом развития и комплексом селекционно ценных изменений, связанных с урожайностью. Предлагается возможный механизм изменения наследственных признаков растений при помощи экзогенных ДНК.

Для отримання нових форм жита використано препарати екзогенних ДНК тваринного та рослинного походження в діапазоні концентрацій 100÷400 мкл/мг. Розчинами ДНК обробляли проростаючи насіння озимого жита сорту Житомирське. Отримані нові форми рослин із яровим типом розвитку та комплексом селекційно цінних ознак, пов'язаних із урожайністю. Пропонується можливий механізм зміни спадкових ознак рослин за допомогою екзогенних ДНК.

The preparation of the exogenic DNAs purified from animals and plants have been used in the concentrations ranging from 100 mcl/mg to 400 mcl/mg to obtaining the new forms of the rye. Germinating seeds of the winter habit rye cultivar Jitomirskaya were treated by the solutions of DNAs. The new forms of plants with spring habit have been obtained, that possessing the complex of the usefull features. The possible mechanism of plant heredity exchanging by using the preparations of exogenic DNAs have been proposed.

## **РАДЧЕНКО О.М.**

*Институт фізіології рослин і генетики НАН України  
Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17*

## **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ СОРТІВ ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ**

Найбільш інформативними маркерами для вивчення геному сортів злаків є молекулярно-генетичні маркери, що базуються на визначенні поліморфних послідовностей ДНК [1,2]. Захист прав селекціонерів потребує необхідності мати чітку систему паспортизації. Традиційно для паспортизації сортів використовуються фенотипові ознаки. На сьогодні паспортизація сортів рослин широко проводиться за допомогою молекулярних маркерів на основі полімеразної ланцюгової реакції. Найбільш зручними молекулярними маркерами для цього є мікросателітні маркери – SSR, які розташовані в різних областях геному і характеризуються високим рівнем поліморфізму та кодомінантним успадкуванням. Нами був використаний SSR-аналіз для паспортизації сортів пшениці селекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України та інших селекційних центрів.

### **Матеріали і методи**

Досліджували 10 сортів озимой м'якої пшениці: Богдана, Крижинка, Подолянка, Володарка, Київська 8, Київська остиста, Українка 0246, Панна, Кавказ, Naphal. ДНК виділяли цетилтриметиламоніум бромідним (СТАБ-методом) [3,4]. У досліді використовували 10 пар праймерів до наступних мікросателітних локусів: Xgwm 3, Xgwm 325, Xgwm 261, Xgwm 18, Xgwm 437, Xgwm 165, Xgwm 357, Xgwm 095, Xgwm 155, Xgwm 186 (табл. 1). Ампліфікацію фрагментів ДНК проводили на ампліфікаторі Терцик (Росія). Електрофорез фрагментів ампліфікації проводили в 2% агарозному гелі при напрузі 500 В протягом однієї або півтори години.

### Результати і обговорення.

Відомо, що вищезазначені мікросателітні локуси розташовані на 10 хромосомах пшениці, п'ять з яких локалізовано в геномі А, один – в В геномі і чотири – D геномі.

Таблиця 1

#### Характеристика 10 мікросателітних локусів

Локус	Хромосома	Кількість алелів	Розмір алелів п.н.
Xgwm 3	3D	3	80-84
Xgwm 18	1B	3	182-190
Xgwm 165	4A	2	192-194
Xgwm 261	2D	4	174-214
Xgwm 325	6D	4	137-150
Xgwm 437	7D	5	98-126
Xgwm 357	1A	4	119-127
Xgwm 095	2A	3	118-122
Xgwm 155	3A	4	141-149
Xgwm 186	5A	3	119-123

В проаналізованих нами локусах виявлено 35 фрагментів ДНК, розміром в межах 80-214 п.н.

Найбільша кількість фрагментів (алелів), розміри яких становлять 98-126 п.н., виявлені в локусі Xgwm 437. З найменшою частотою зустрічались фрагменти 98, 106, 112 п.н. Найчастіше зустрічається фрагмент – 118 п.н., який присутній у сортах: Богдана, Подолянка, Київська остиста, Кавказ, Українка 0246.

У мікросателітному локусі Xgwm 325 виявлено 4 алелі. Найбільш часто зустрічається алель 141 п.н. Алелі 137, 146, 150 п.н., виявлені лише у сортів: Київська остиста і Naphal. У локусі Xgwm 261 виявлено три алелі розміром 174, 192 і 214 п.н; у локусі Xgwm 165 – 192, 194 п.н. Слід зазначити, що алель 194 п.н. виявлений лише у сорту Київська 8, а алель 192 п.н. присутній у інших 9 сортів.

На основі мікросателітного аналізу локусів хромосом складені генотипічні формули сортів пшениці і кожному локусу присвоєно певну літеру латинського алфавіту, а цифровий індекс відповідає розміру фрагменту, виявленого у даному локусі. Так, сорт Подолянка за алельним складом мікросателітних локусів має наступну генетичну формулу:

$$A_{125} B_{122} C_{147} D_{147} E_{121} F_{182} K_{192} L_{80} N_{141} O_{118}$$

У результаті проведених досліджень внутрішньосортний поліморфізм виявлений у досліджених сортів за локусами Xgwm 325, Xgwm 155, Xgwm 261. Міжсортний поліморфізм виявлено за всіма 10 мікросателітними локусами.

Таблиця 2

#### Алельна характеристика мікросателітних локусів

Локус	Розмір алелів (пари нуклеотидів)
-------	-------------------------------------

Xgwm 3	84,82,80
Xgwm 18	190,186, 182
Xgwm 165	194,192
Xgwm 261	214, 192,174
Xgwm 325	150, 146, 141, 137
Xgwm 437	126, 118, 112, 106, 98
Xgwm 357	127,125,121,119
Xgwm 095	122,120,118
Xgwm 155	149,147,143,141
Xgwm 186	123,121,119

Кластерний аналіз за методом Нея [5] надав нам можливість диференціювати сорти озимої пшениці за ступенем генетичної спорідненості, що співпадає з родоводом цих сортів.

#### Література

1. *Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А.* Полиморфизм ДНК в популяционной генетике // Генетика. - 2002. - 38.- №9. - С.1173-1195.
2. *Конарев А.В.* Использование молекулярных маркеров в решении проблем генетических ресурсов растений и селекции // Аграрная Россия. – 2006. - №6.- С.4-23.
3. *Сиволап Ю.М.* Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях. Научно-методическое руководство. Киев. Аграрная наука. 1998. – 156с.
4. *Roder M.S., Korzun B.S. et al.* The physical mapping of microsatellite markers in wheat // Genome. – 1998. – Vol. 41. – P. 278-283.
5. *McIntosh R., Hart G.* Catalogue of gene symbols for wheat // Proc. 9th Intern. Wheat Genetics Symp. – 1998, Saskaton, Canada, vol.5 – P.123-145.

#### Резюме

Проведено вивчення молекулярно-генетичного поліморфізму нових сортів озимої м'якої пшениці селекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України та інших селекційних установ за допомогою мікросателітного аналізу. Електрофоретичні спектри фрагментів SSR-маркерів є унікальні для сортової ідентифікації пшениці.

Проведено изучение молекулярно-генетического полиморфизма новых сортов озимой мягкой пшеницы селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины и других селекционных центров с применением микросателлитного анализа. Электрофоретические спектры фрагментов SSR-маркеров являются уникальными для сортовой идентификации пшеницы

Using the microsatellite analysis the genetics polymorphism in new varieties of winter soft wheat in Institute of physiology of plants and genetics, National Academy Sciences of Ukraine has been studied. Patters SSR-amplicons give the characteristic of a level that allow to high-quality identification wheat.

**СЕРГЕЕВА Ж. Ю.<sup>1</sup>, ГОРЬ Т. Е.<sup>2</sup>, БУРОВА Л. М.<sup>3</sup>, ТОВКАЧ Ф. И.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова,

Украина, 65029, Одесса, ул. Дворянская, 2, e-mail: sergeevazh@gmail.com

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,  
Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 154

<sup>3</sup>Львовский национальный медицинский университет,  
Украина, 79014, Львов, ул. Пекарская, 69

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КРИПТИЧЕСКИХ ПЛАЗМИД *ERWINIA CAROTOVORA*

Одним из наиболее интересных и мало изученных на сегодняшний день явлений, характерных для фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora*, является наличие значительного числа внехромосомных генетических элементов. Большинство из них относится к разряду криптических из-за отсутствия данных относительно их функций и значения в экологии и физиологии ервиний. Поэтому приоритетной задачей является поиск подходов к исследованию эндогенных плазмид *E. carotovora*.

Представленная работа была направлена на поиск приемлемого метода транспозонного мутагенеза эндогенных плазмид с целью установления их роли в экологии важной фитопатогенной бактерии *E. carotovora*.

### Материалы и методы.

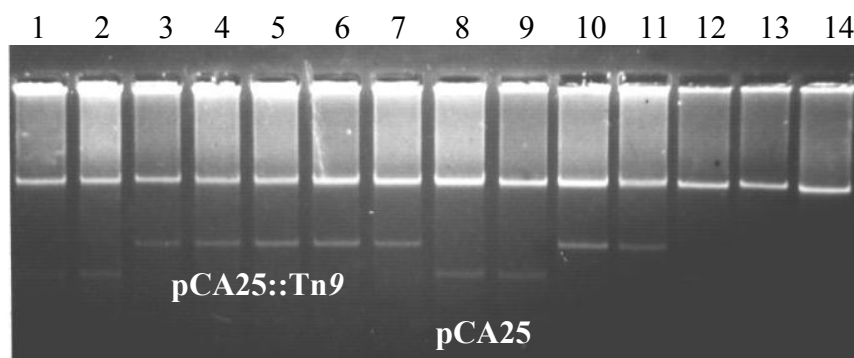
В работе использовали фитопатогены *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc): 48A (pCA25) и 48A Cm<sup>R</sup> – 7/4b (pCA25::Tn9), устойчивый к 100 мкг/мл хлорамфеникола. Методы выделения плазмидных ДНК, их рестрикционный анализ, а также схема внесения транспозона Tn9 в плазмиду pCA25 представлены в предыдущих сообщениях [1, 2].

### Результаты и их обсуждение.

Плазмида pCA25 является хорошо изученным генетическим элементом бактерии *E. carotovora* штамма 48A. Ранее нами было показано, что при взаимодействии с клетками данного штамма с бактериофага P1 *Escherichia coli* осуществляется специализированная трансдукция маркера устойчивости к хлорамфениколу в клетки ервиний с одновременным внесением транспозона Tn9 в плазмиду pCA25 [3]. Нами было получено несколько вариантов плазмиды pCA25::Tn9 (рис. 1). Благодаря использованию большого числа транспозон-меченных клонов мы выявили высокую стабильность плазмиды как в клетках *E. carotovora*, так и в клетках лабораторных штаммов-трансформантов *E. coli* DH1. Излечения клеток от плазмиды не происходило ни в результате обработки SDS, ни с помощью температурных воздействий или обработки этидий бромидом. Также было показано, что транспозон встраивается только в определенный локус на плазмиде pCA25. Аналогичным образом транспозон Tn9 ведёт себя и при встраивании в геном фага λ, у которого обнаружено 3 сайта транспозиции в несущественных областях генома. До сих пор не было выявлено никаких фенотипических признаков, кодируемых плазмидой pCA25. По нашему мнению необычная стабильность наследования плазмиды pCA25 и размер, близкий к таковому кольцевого профага P4 *E. coli* [4], свидетельствует о профаговом происхождении данного генетического элемента *E. carotovora*.

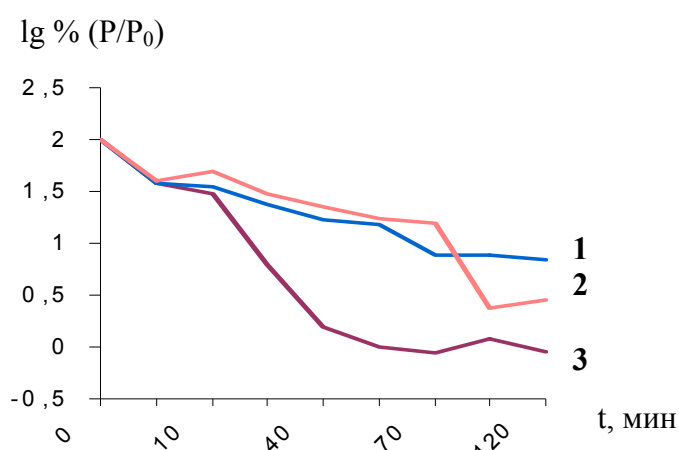
В рамках этого исследования мы расширили набор обнаруженных плазмид *E. carotovora* с целью возможного выявления элементов аналогичных по размеру и природе профаговому элементу pCA25. Изучение 54 штаммов различного происхождения показало, что половина плазмидосодержащих штаммов несет внехромосомные ДНК аналогичные по размеру и сайтам рестрикции для эндонуклеаз *HpaI* и *EcoRV* плазмиде pCA25 (9,8 т.п.н.). Большинство штаммов, несущих внехромосомную ДНК размером 9,8 т.п.н., принадлежат к одной экологической нише (штаммы из российских коллекций). Рестрикционный анализ позволил выявить природные варианты плазмиды, содержащие делеции либо вставки в В-фрагменте *EcoRV*, в который также происходит встраивание транспозона Tn9. Это служит

дополнительным подтверждением наличия на внехромосомной ДНК несущественной области, характерной для профаговых элементов.



**Рис. 1.** Скрининг клонов *E. carotovora subsp. carotovora* 48A Cm<sup>r</sup> с плазмидой pCA25::Tn9.

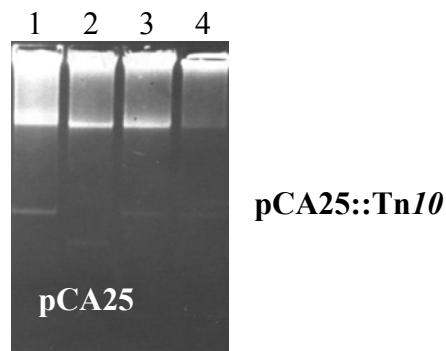
Кроме того, нами было проведено изучение взаимодействия плазмиды pCA25 с бактериофагом P1. Определённый характер этого взаимодействия отражается на адсорбции фага P1 на клетках *E. carotovora*. Фаг P1 нормально адсорбируется на клетках штамма 48А с плазмидой pCA25. Скорость адсорбции увеличивается по мере снижения множественности инфекции. Однако эффективность прикрепления фага P1 к поверхности клеток, которые несут плазмиду pCA25::Tn9 или её делеционный вариант pCA25::ΔTn9, снижается примерно в 2-2,5 раза (рис. 2). В других независимых исследованиях было показано, что, по сравнению со штаммом 48А, фаг P1 значительно менее эффективно адсорбируется на клетках других, восприимчивых к нему, штаммах ервиний. На основе этих данных мы сделали предположение, что плазида pCA25 несет гены, продукты которых влияют на адсорбцию. При этом транспозиция Tn9 частично нарушает экспрессию этих генов в составе транспозонных вариантов, вследствие изменения вторичной и третичной структуры плазмидной ДНК.



**Рис. 2.** Адсорбция фага P1 на клетках *E. carotovora* 48А (pCA25) при множественности инфекции 1,0 фаг на клетку: 1 – *Ecc* 48А-7/4b -18 (pCA25::ΔTn9); 2 - *Ecc* 48А-7/4b (pCA25::Tn9); 3 - *Ecc* 48А(pCA25)

Дальнейшая перспектива исследований предполагает определение размера несущественной области ДНК плазмиды pCA25 и поиск в её составе участка, гомологичного IS1 элементу. Встраивание транспозона Tn9 в плазмиду pCA25 может

происходит за счет рекомбинации между гомологичными участками IS1 последовательности. Для проверки этого предположения мы планируем использовать транспозон *miniTn10* из суицидной плазмиды pLOF *E. coli*, который часто используется как инструмент транспозонного мутагенеза плазмидных и хромосомальных ДНК и несёт маркер устойчивости к канамицину. Он не содержит участков, гомологичных IS1 элементу. Нами уже получены несколько вариантов плазмиды pCA25::*miniTn10* (рис. 3). Планируется провести рестрикционный анализ плазмидной ДНК с целью установления места встраивания транспозона *miniTn10*.



**Рис. 3.** Скрининг клонов *E. carotovora subsp. carotovora* 48A Km<sup>r</sup> с плазмидой pCA25::*miniTn10*.

Таким образом, транспозонный мутагенез криптических плазмид является очень удобным методом для установления их молекулярно-генетической организации и, в последствии, выяснения роли внехромосомных ДНК в экологии важной фитопатогенной бактерии *E. carotovora*.

#### Литература

1. Товкач Ф. И. Выделение и предварительная характеристика криптических плазмид *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2001. – Т.70, № 6. – С. 804-810.
2. Бурова Л. М., Товкач Ф. И. Экспрессия генов профага P1 *Escherichia coli* в клетках фитопатогенных эрвиний // Микробиол. журн. – 2006. – Т. 68, № 2. – С. 39-47.
3. Сергеева Ж. Ю., Бурова Л. М., Товкач Ф. И. Внесение транспозона Tn9 в эндогенные плазмиды *Erwinia carotovora* при лизогенизации клеток колифагом P1 // Микробиол. журн. – 2006. – Т. 68, № 4. – С. 34 – 39.
4. Бурова Л. М., Горб Т. Е., Товкач Ф. И. Природа криптической плазмиды pCA25 *Erwinia carotovora subsp. carotovora* 48A // Микробиол. журн. – 2007. – Т. 69, № 2. – С. 23 – 28.

#### Резюме

На основе транспозонного мутагенеза разработан подход для изучения молекулярно-генетической организации криптических плазмид важной фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora* и выяснения их роли в её экологии.

На основі транспозонного мутагенезу розроблено підхід для вивчення молекулярно-генетичної організації криптичних плазмід важливої фітопатогенної бактерії *Erwinia carotovora* та з'ясування їх ролі в її екології.

A new approach based on transposon mutagenesis was created for study of molecular-genetical organization of cryptic plasmids of important phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora* and identification of their role in its ecology.

СОКОЛОВА Е.И.

Луганский национальный аграрный университет,  
Украина, 91008, г. Луганск, ЛНАУ, e-mail: s-e-i@mail.ru

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАРТИРОВАННЫХ ГЕНОВ *API*, *BP*, *GL1*, *CH5*, *CLV1*, *MIN* *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) НЕУНН. ПО ПРИЗНАКУ «МАССА РАСТЕНИЯ»

Арабидопсис Таля (резушка Таля, *Arabidopsis thaliana*) – небольшое растение сем. Капустные в последнее десятилетие стал известным модельным объектом. Наряду с коротким жизненным циклом и малым числом хромосом, арабидопсис обладает высокой плодовитостью и миниатюрностью, которая позволяет выращивать это растение в лабораторных условиях круглый год [1]. В настоящее время реализуется проект по изучению функций всех генов данного вида (на молекулярном, клеточном, тканевом, организменном и более высоких уровнях). Это новое направление исследований получило название «функциональной геномики» [1]. Для решения данных проблем необходимы сведения об индивидуальном и совместном влиянии всех, но, прежде всего, картированных генов арабидопсиса.

Цель данной работы было изучить степень распространенности взаимодействия и аддитивного действия генов на примере арабидопсиса Таля установить, какие типы взаимодействия встречаются и как часто. Настоящая статья посвящена анализу влияний мутантных аллелей картированных генов арабидопсиса *API*, *BP*, *GL1*, *CH5*, *CLV1*, *MIN* на количественный признак «масса растения».

#### Материалы и методы

Исходной была гомозиготная линия арабидопсиса *Landsberg erecta* (*Ler*). На ее генетической основе получены мутантные чистые линии *ap1-1*, *bp-1*, *chl-1*, *ch5-1*, *clv1-1*, *gll-1* и *min-1* [2]. Семена данных линий любезно предоставлены нам из Ноттингемского центра по сохранению генетической коллекции арабидопсиса (Nottingham Arabidopsis stock centre, NASC). В табл. 1 приведена характеристика изучавшихся линий арабидопсиса.

Таблица 1

Характеристика гомозиготных линий арабидопсиса

Локус (аллель)	Название	Фенотип	Расположение в хромосоме
	<i>Landsberg erecta</i>	Растение зеленого цвета с опушением, лепестки белого цвета, длинные цветоножки, плоды заостренные, направлены косо вверх	
<i>ap1-1</i>	<i>Apetala</i>	Лепестки отсутствуют или рудиментарные	1 – 99.3
<i>bp-1</i>	<i>Brevipedicellus</i>	Короткие цветоножки. Плоды повернуты вниз	4 – 15.0
<i>chl-1</i>	<i>Chlorina</i>	Желто-зеленое растение	1 – 58.4
<i>ch5-1</i>	<i>Chlorina</i>	Желто-зеленое растение	5 – 42.5
<i>clv1-1</i>	<i>Clavata</i>	Булавовидные стручки	1 – 110
<i>gll-1</i>	<i>Glabra</i>	Отсутствие опушения на листьях и стебле, ярко-зеленые листья	3 – 46.2
<i>min-1</i>	<i>Miniature</i>	Полукарлик; бледно-зеленые листья	5 – 89.6

В лаборатории светокультуры Луганского национального аграрного университета путем искусственного скрещивания и последующего отбора в F<sub>2</sub> были получены димутантные линии *ap1-1, bp-1*; *ap1-1, chl-1*; *ap1-1, gll-1*; *bp-1, ch5-1*; *bp-1, clv1-1*; *bp-1, gll-1*; *bp-1, min-1*; *ch5-1, clv1-1* и *ch5-1, gll-1*. Димутантные линии сочетают

в себе оба качественных признака (например, у линии *ch5-1,clv1-1* растение желто-зеленого цвета, стручки булавовидной формы).

В первом эксперименте изучали плейотропное действие картированных генов *CH5* и *CLV1* на массу растения. Измерения массы растений проводили отдельно у каждого растения при раскрытии первого бутона.

Растения всех четырех линий (*Ler*; *ch5-1*; *clv1-1*; *ch5-1,clv1-1*) выращивали одновременно в одном ящике в почвенной культуре при полной рендомизации [3]. Таким образом, мы располагали всеми четырьмя возможными гомозиготными генотипами, образующимися при комбинации аллелей *CH5*, *ch5-1*, *CLV1* и *clv1-1*. Растения были посажены квадратным способом на расстояниях, исключающих конкуренцию между ними. Освещение было круглосуточным. При такой организации эксперимента мы могли оценить только так называемые гомозиготно-гомозиготные взаимодействия, которые и представляют интерес в синтетической селекции самоопылителей.

Исследуемые мутантные аллели являются рецессивными по отношению к аллелям дикого типа (*ch5-1* < *CH5*, *clv1-1* < *CLV1*). Ранее было установлено, что если по качественному признаку наблюдается полное доминирование, то такое же полное генотипическое доминирование бывает и по всем тем количественным признакам, на которые плейотропно влияет исследуемый ген. Среднее фенотипическое значение генотипа *CH5CH5CLV1CLV1* оказывается таким же, как и других генотипов с общей формулой *CH5-CLV1-*: генотипа *ch5-1ch5-1CLV1CLV1* – как всех генотипов с формулой *ch5-1ch5-1CLV1-*; генотипа *CH5CH5clv1-1clv1-1* – как генотипов *CH5-clv1-1clv1-1* [4].

Растения чистых линий выращивали в соотношении 1 *CH5CH5CLV1CLV1* (*Landsberg erecta*) : 1 *ch5-1ch5-1CLV1CLV1* (первый мутант): 1 *CH5CH5clv1-1clv1-1* (второй мутант): 1 *ch5-1ch5-1clv1-1clv1-1* (двойной рецессив). Объективно сравнивая эти гомозиготные линии, делали заключения о характере совместного действия генов. Аналогичным образом изучали действие других генов.

При обработке результатов использовали как обычные математико-статистические методы [5], так и недавно предложенный нами метод количественной оценки эпистаза [6]. Обработку производили на персональном компьютере по программам, разработанным в Луганском национальном аграрном университете.

#### Результаты и обсуждение

В табл. 2 приведены статистики первого порядка гомозиготных линий *Ler*; *ch5-1*; *clv1-1*; *ch5-1,clv1-1* по признаку «масса растения».

Таблица 2

Элементарные статистики гомозиготных линий *Ler*; *ch5-1*; *clv1-1*; *ch5-1,clv1-1*

Линия	Объем выборки	Среднее фенотипическое значение и его ошибка	Дисперсия	Коэффициент вариации, %
<i>Ler</i>	45	86.91±3.34	502.45	25.79
<i>ch5-1</i>	39	56.67±5.00	975.18	55.11
<i>clv1-1</i>	41	66.78±3.07	386.23	29.43
<i>ch5-1,clv1-1</i>	44	58.75±2.78	338.94	31.34

Как видно из табл. 2, выборки были большие (39 и больше растений каждой линии), что позволяет надежно оценить параметры совокупностей. Изменчивость в чистых линиях, а в таких линиях она исключительно средовая, была высокой во всех линиях (коэффициент вариации более 25%).

Оценить совместное действие генов позволяет предложенный недавно новый метод оценки эпистаза, доложенный на VII съезде Украинского общества генетиков и



селекционером им. Н.И. Вавилова (Крым, 2002) и опубликованный в работе [6]. Он основывается на вычислении эпистатического отклонения  $i^{ab}$  и его статистической ошибки  $s_i^{ab}$ .

Эпистатическое отклонение значения признака димутантной линии от того значения, которое ожидается при аддитивном действии генов, можно определить по формуле:  $i^{ab} = AABB + aabb - aaBB - AAbb$ . В нашем случае  $i^{ab} = 22.21 \pm 7.30$  мг.

Достоверность эпистаза устанавливается с использованием упрощенного t-критерия, равного частному от деления генетического параметра, взятого по модулю, на его ошибку репрезентативности ( $t = 22.21 / 7.30 = 3.04$ ). Если значение t больше или равно двум, то параметр, как у нас, считается значимым. Знак  $i^{ab}$  указывает на направление эпистаза. В нашем случае имеет место положительный эпистаз. Относительная оценка силы эпистаза  $I = i^{ab} / AABB$  ( $I = 25.56\%$ ).

Результаты этого и других экспериментов представлены в табл. 3.

Таблица 3

№ п/п	Комбинация аллелей	Наличие взаимодействия	Описание совместного действия генов
1	<i>ap1-1</i> и <i>bp-1</i>	+	положительный эпистаз
2	<i>ap1-1</i> и <i>ch5-1</i>	+	положительный эпистаз
3	<i>ap1-1</i> и <i>gll-1</i>	-	на изучаемый признак влияет только один ген ( <i>GL1</i> )
4	<i>bp-1</i> и <i>ch5-1</i>	+	отрицательный эпистаз
5	<i>bp-1</i> и <i>chl1-1</i>	+	положительный эпистаз
6	<i>bp-1</i> и <i>gll-1</i>	-	аддитивное действие генов
7	<i>bp-1</i> и <i>min-1</i>	+	положительный эпистаз
8	<i>chl1-1</i> и <i>gll-1</i>	-	аддитивное действие генов
9	<i>ch5-1</i> и <i>chl1-1</i>	+	положительный эпистаз
10	<i>ch5-1</i> и <i>gll-1</i>	+	отрицательный эпистаз

Как видно из табл. 3, взаимодействие генов – распространенное явление в количественной генетике растений. По одному признаку (масса растений) наблюдаются разные типы взаимодействий – как положительный, так и отрицательный эпистаз (табл. 3).

Встречаются также случаи, когда взаимодействие генов отсутствует. Сюда относятся как случаи, когда на изучаемый признак влияет только один ген (понятно, что взаимодействие генов будет отсутствовать), так и случаи, когда наблюдается аддитивное действие генов, когда эффекты обоих генов суммируются.

Таким образом, если два последних случая исключить, из 10 рассмотренных случаев совместного действия генов в 7 случаях наблюдали взаимодействие генов, в 2 случаях аддитивное действие генов, в 1 случае влиял только один ген.

#### Выводы:

1. Взаимодействие генов у арабидопсиса по признаку «масса растения» – распространенное явление.
2. У арабидопсиса встречаются разные типы совместного действия генов – как эпистаз, так и аддитивное действие генов.
3. Направление эпистаза может быть разным – как положительным, так и отрицательным.

#### Литература

1. Ежова Т.А., Лебедева О.В., Огаркова О.А. и др. *Arabidopsis thaliana* – модельный объект генетики растений. – М.: МАКС Пресс, 2003. – 220 с.
2. Seed List. The Nottingham Arabidopsis stock centre. – Nottingham: The Univer. of Notting., 1994. – 147 p.

3. Соколов І.Д., Шеліхов П.В., Соколова Т.І. та ін. Генетика. Практикум. – 4-е вид., виправлене та допов. К.: Арістей, 2003. – 176 с.
4. Брусенцова М.Ю. Спадкування плейотропних кількісних ефектів при тригибридному схрещуванні *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.: Автореф. дис. ... кан. биол. наук: 03.00.15/ ВИР РАСХН. С.-Петербург, 1996. - 18 с.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. школа, 1990. – 351 с.
6. Сыч Е.И. Новый метод оценки взаимодействия генов в количественной генетике растений // Збірн. наук. праць Луганського НАУ. – 2003. - № 22 (34). – С. 65-71.

### Резюме

Изучали взаимодействие картированных генов арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) *API*, *BP*, *GLI*, *CH5*, *CLVI* и *MIN* по признаку «масса растения». При совместном действии генов наблюдали как взаимодействие, так и аддитивное действие генов.

Вивчали взаємодію картованих генів арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) *API*, *BP*, *GLI*, *CH5*, *CLVI* та *MIN* за ознакою «маса рослин». При спільній дії генів спостерігали як взаємодію, так і адитивну дію генів.

The interaction of the mapped genes *API*, *BP*, *GLI*, *CH5*, *CLVI* and *MIN* of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh was studied according to the trait «the weight of plants». At joint action of genes we observed both their interaction and additive action of genes.

**ТИТОК М.А., БУЛЫГА И. М., ВАСИЛЕНКО С.Л.**

*Белорусский государственный университет,*

*Беларусь, 220030, Минск, пр-т Независимости, 4, e-mail: titok@bsu.by*

## ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ БИОДЕГРАДАЦИОННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ У ПРИРОДНЫХ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS*

Горизонтальный перенос генов биодegradации, приводящий к распространению признаков утилизации органических соединений внутри и между микробными сообществами, осуществляется за счет конъюгационного переноса D-плазмид. Транспозонная организация катаболитных оперонов предполагает, что входящие в их состав гены, обладая высокой степенью пластичности, могут распространяться среди бактериальных популяций, повышая адаптивные свойства микроорганизмов. Рекомбинационные события, обеспечивающие транспозицию мобильных генетических элементов, а также факторы внешней среды и различное генетическое окружение могут приводить к изменению генетической организации детерминант деградации органических соединений. В этом плане определенный интерес представляют гены *nahAc* и *nahG*, входящие соответственно в состав «верхнего» и «нижнего» *nah*-оперонов и детерминирующие ферменты с широкой субстратной специфичностью. Об эволюционных преобразованиях данных генетических детерминант могут свидетельствовать мутационные изменения, в результате которых образуются полиморфные локусы, а также наличие дублированных генов, дивергенция которых способствует возникновению новых ферментативных активностей. Наличие определенных сочетаний генетических детерминант в составе различных бактериальных репликонов может являться результатом рекомбинационных событий, приводящих к модификационной изменчивости генетического материала. Понимание процессов и закономерностей, лежащих в основе преобразований систем

биодegradации, способствует пониманию возможных путей их эволюции и создает предпосылки для их практического использования, в частности, целенаправленного создания эффективных экологически безопасных технологий очистки окружающей среды и микробиологического синтеза биотехнологически значимых соединений.

Целью настоящей работы явился анализ нуклеотидных последовательностей генов с широкой субстратной специфичностью *nahAc* и *nahG*, определяющих синтез ключевых ферментов деградации нафталина (соответственно нафталин-1.2-диоксигеназы и салицилат-1-гидроксилазы) и особенностей их распространения среди природных нафталинутилизирующих бактерий *Pseudomonas*, выделенных из загрязненных природных источников на территории Беларуси.

#### **Материалы и методы**

В работе использовали 102 штамма нафталинутилизирующих бактерий, выделенных из загрязненных нефтепродуктами почв на территории Беларуси, а также типовые штаммы *Pseudomonas* (Всесоюзная Коллекция Микроорганизмов и Вирусов, Москва, Россия).

**Среды.** Бактерии выращивали в минимальной среде M9 [1]. Источником углерода служил нафталин в концентрации 100 мкг/мл.

**Выделение тотальной ДНК** осуществляли с использованием саркозидового метода [2].

**Физиолого-биохимические тесты** для определения видовой принадлежности выделенных бактерий, проводили согласно [3].

**Полимеразную цепную реакцию (ПЦР)** проводили с использованием набора реактивов TaKaRa Ex TaqTM (Япония).

Для амплификации генов 16S рНК, большой субъединицы нафталин-1.2-диоксигеназы (*nahAc*) и салицилат-1-гидроксилазы (*nahG*), а также *rep*-генов плазмид IncP-7 и IncP-9 использовали, соответственно, олигонуклеотидные праймеры: 8f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') и 1492r (5'-TAC GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-3'); Ac149f (5'-CCC YGG CGA CTA TGT-3') и Ac1014r (5'-CTC RGG CAT GTC TTT TTC-3'); *shc1\_up* (5'-CGG CKT THG GTG ARG TCG GTG C-3') и *shc1\_lo* (5'-GGC GAG GAA RTA GGC GTC CTC AAG 3'), *rep7f* (5'-CCC TAT CTC ACG ATG CTG TA-3') и *rep7r* (5'-GCA CAA ACG GTC GTC AG-3'), *repF* (5'-CCA GCG CGG TAC WTG GG-3') и *repR* (5'-GTC GGC AIC TGC TTG AGC TT-3').

Для получения ампликонов генов 16S рНК размером 1484 п.н., гена *nahAc* размером 865 п.н. и *rep*-генов плазмид IncP-7, IncP-9 размером 398 п.н. и 524 п.н., соответственно, использовали режимы амплификации, предложенные в работах [4-**Ошибка! Источник ссылки не найден.**]. Для получения специфических продуктов ПЦР гена *nahG* размером 893 п.н. использовали модифицированный в ходе выполнения работы режим амплификации: 94°C – 5 мин (1 цикл); 94°C – 30 сек, 64°C – 30 сек, 72°C – 1.5 мин (7 циклов); 94°C – 30 сек, 68°C – 30 сек, 72°C – 1.5 мин (23 цикла), 72°C – 10 мин (1 цикл).

**Рестрикцию продуктов амплификации** осуществляли с помощью ферментов *MspI*, *RsaI*, *HaeIII* в условиях, рекомендованных фирмой изготовителем (Fermentas, Литва). В качестве реперной ДНК для определения размеров фрагментов использовали синтетические DNA Ladder Mix и 100-bp DNA Ladder (Fermentas, Литва).

**Электрофоретический анализ** проводили согласно [1].

#### **Результаты и обсуждение**

Из различных загрязненных нефтепродуктами почв на территории республики Беларусь было изолировано более 100 штаммов бактерий, способных утилизировать в качестве единственного источника углерода и энергии нафталин. На начальном этапе работы из клеток всех изолированных бактерий выделяли тотальную ДНК, которую вносили в качестве матрицы в полимеразную цепную реакцию. При этом использовались праймеры, обеспечивающие амплификацию детерминант *nahAc* и

*nahG*, генов 16S рРНК, а также *rep*-генов плазмид группы IncP-7 и IncP-9. Полученные специфические продукты амплификации подвергали рестрикции мелкощепящими рестриктазами *HaeIII*, *MspI* и *RsaI*.

Рестрикционный анализ продуктов амплификации генов *nahAc* и *nahG*, показал, что природные нафталинутилизирующие бактерии содержат известные типы генов *nahAc* (AN10, C18 и A88) и *nahG* (NAH7, AN10, pDTG1 и KF715) [5-6]. В пределах типа C18 гена *nahAc* впервые обнаружен полиморфизм (обозначены как типы C18\_V1, C18\_V2 и C18\_V3). Кроме того, описана новая последовательность гена *nahG* (обозначена как тип AL10), а для 35 штаммов показано сходство рестрикционных профилей ампликонов гена *nahG* с типом A88 в случае рестриктазы *MspI* и с типом NAH7 в случае рестриктазы *RsaI* (обозначены как тип A88-NAH7). Было установлено, что среди нафталинутилизирующих бактерий, выделенных на территории Беларуси, преобладают гены *nahAc*-типа C18\_V1 (36 штаммов) и A88 (35 штаммов), реже встречаются типы C18\_V2 (19 штаммов) и AN10 (9 штаммов), а тип C18\_V3 выявлен только для двух проанализированных штаммов. Наиболее распространенными типами *nahG*-гена среди нафталинутилизирующих бактерий белорусской коллекции являются типы pDTG1 (37 штаммов), A88-NAH7 (35 штаммов) и NAH7 (19 штаммов). Реже встречались типы KF715 (7 штаммов), AN10 (2 штамма) и AL10 (2 штамма).

Анализ полученных данных позволил установить, что различные типы генов *nahAc* и *nahG* встречаются в определенных сочетаниях. В частности, типы A88, C18\_V1, C18\_V2 и C18\_V3 гена *nahAc* соответственно совместно наследуются с типами A88-NAH7, pDTG1, NAH7 и AL10 гена *nahG*. Исключение составляет тип AN10 гена *nahAc*, сочетающийся с двумя близкородственными последовательностями *nahG*-гена типа AN10 и KF715 [6]. Несмотря на высокую консервативность аминокислотных последовательностей ключевых ферментов метаболизма нафталина *NahAc* и *NahG*, наличие нуклеотидных замен в детерминируемых их генах свидетельствует о происходящих в природе процессах дивергенции. Сопряженный характер наследования определенных типов генетических детерминант может быть обусловлен рекомбинационными перестройками, приводящими к локализации в одном репликоне адаптированных относительно друг друга нуклеотидных последовательностей, обеспечивающих их нормальную функциональную активность.

На основании физиолого-биохимической характеристики и рестрикционного анализа продуктов амплификации генов 16 S РНК большинство выделенных нафталинутилизирующих бактерий было отнесено к группе флюоресцирующих псевдомонад, а именно *P. fluorescens* (49 штаммов) и *P. putida* (31 штамм). Бактерии *Pseudomonas* не синтезирующие флюоресцирующий пигмент, были отнесены к *P. stutzeri*, *P. species* V4 (5 штаммов) *P. species* V2 (13 штаммов) и *P. species* V3 (1 штамм). При этом не было выявлено каких-либо закономерностей, свидетельствующих о взаимосвязи определенных типов детерминант *nahAc* и *nahG* с типом бактериального хозяина.

Проведенный в данной работе ПЦР-анализ с последующей рестрикцией продуктов амплификации, позволил выявить четыре типа плазмидных репликонов, два из которых являются наиболее многочисленными (53 штамма) и принадлежат к группе IncP-9 ( $\delta$ - и  $\zeta$ -подгруппа), четыре штамма (AL1, AL2, AL9, AL38) содержат плазмиды группы IncP-7, два штамма (AL3, AL43) несут бирепликонные плазмиды IncP-7/IncP-9 ( $\delta$ - подгруппа). Для большого числа штаммов (45 штаммов) не было получено продуктов амплификации с использованными праймерами. При сравнении типов плазмидных репликонов с типами последовательностей генов *nahAc* и *nahG* выявились некоторые особенности. Оказалось, гены *nahAc* и *nahG* в комбинации C18\_V2/NAH7 выявляются в штаммах, содержащих только плазмиды  $\zeta$ -подгруппы IncP-9, тогда как другие сочетания данных детерминант встречаются в клетках, несущих плазмиды

группы IncP-9 ( $\delta$ -подгруппа), IncP-7 или другие типы репликонов, которые в свою очередь могут отличаться между собой.

На основании полученных данных можно предположить существование связи между типами детерминант *nahAc* и *nahG* и особенностями организации содержащих их репликонов. В отличие от известных, только у плазмид  $\zeta$ -подгруппы IncP-9 *nah*-опероны локализованы в области конъюгационного переноса между генами *tra* и *mpf* [8]. Нарушения данного локуса за счет рекомбинационных перестроек, возникающих при встраивании генетического материала, в том числе генов биodeградации, должны приводить к элиминации плазмид из бактериальной популяции. Кроме того, в отличие от внехромосомных генетических элементов других классификационных групп, *nah*-гены входят в состав транспозона (Tn4655), не содержащего гена *tnpA*, детерминирующего синтез белка транспозиции [9], что должно затруднять или снижать вероятность его перемещения в естественной среде обитания. Таким образом, обнаружение только определенных типов детерминант *nahAc* (C18\_V2) и *nahG* (NAH7) в составе плазмид  $\zeta$ -подгруппы IncP-9 может свидетельствовать в пользу их более консервативной организации по сравнению с репликонами других классификационных групп.

Тем не менее, гены *nahAc* и *nahG*, входящие в состав двух *nah*-оперонов, в целом характеризуются высокой степенью консервативности. Одиночные замены нуклеотидов, присутствующие в данных локусах, не приводят к смене функций. Определенные комбинации данных детерминант в составе одного репликона могут лишь свидетельствовать о сопряженном характере их изменений и являться результатом ограниченного числа рекомбинационных перестроек. Эволюционные преобразования систем биodeградации должны быть связаны с возникновением дупликаций определенных *nah*-генов с последующей их дивергенцией. В пользу этого свидетельствуют данные о присутствии дополнительных генов, детерминирующих ферменты с широкой субстратной специфичностью в составе плазмидных [7, 10] и хромосомных геномов.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы INTAS 01-2383, гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований Б04М-116 и задания 1.08 ГППИ «Новые биотехнологии».

#### Литература

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир. 1984.- 480с.
2. Riele H., Michel B., Ehrlich S.D. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1986.- vol. 8, № 8.- P.2541-2545.
3. Смирнов В.В., Куприянова Е.А. 1990. Бактерии рода *Pseudomonas*. – Киев.- 1990.- 262с.
4. Weisburg W.G., Barnes S.M., Pelletier D.A. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol.- 1991.-vol. 173, № 2.- P.697-703.
5. Ferrero M., Llobet-Brossa E., Lalucat L. et al. Coexistence of two distinct copies of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas* strains isolated from the western Mediterranean region // Appl. Environm. Microbiol.- 2002.- vol. 68, № 2.- P.957–962.
6. Измалкова Т.Ю., Сазонова О.И., Соколов С.Л. и др. Разнообразие генетических систем биodeградации нафталина у штаммов *Pseudomonas fluorescens* // Микробиология.- 2005.- vol. 74, № 1.- P.60–68.
7. Li, W., Shi, J., Wang, X., Han, Y. et al. Complete nucleotide sequence and organization of the naphthalene catabolic plasmid pND6-1 from *Pseudomonas* sp. strain ND6 // Gene.- 2004.- vol. 336, № 2.- P.231–240.
8. Sota M., Yano H., Ono A. et al. Genomic and functional analysis of the IncP-9 naphthalene-catabolic plasmid NAH7 and its transposon Tn4655 suggests catabolic gene spread by a tyrosine recombinase // J Bacteriol.- 2006.- vol. 188, № 11.- P.4057–4067.

9. Tsuda M., Iino T. Naphthalene degrading genes on plasmid NAH7 are on a defective transposon // Mol. Gen. Genet.- 1990.- vol. 223, № 1.- P.33–39.

10. Bosch R., Moore E.R., Garcia-Valdes E. et al. NahW, a novel, inducible salicylate hydroxylase involved in mineralization of naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10 // J. Bacteriol.- 1999.- vol. 181, № 8.- P.2315–2322.

### **Резюме**

В результате анализа природных репликонов выявлены уникальные сочетания генов *nahAc* и *nahG*, обеспечивающих синтез ключевых ферментов катаболизма нафталина. Определенные комбинации исследованных детерминант входят в состав разных репликонов за исключением типа C18\_V2/NAH7, характерного для бактерий, содержащих плазмиды ζ-подгруппы IncP-9.

У винику аналізу природних репліконів виявлені унікальні поєднання генів *nahAc* і *nahG*, забезпечуючих синтез ключових ферментів катаболізму нафталіна. Певні комбінації дослідованих детермінант входять до складу різних репліконів, за виключенням типу C18\_V2/NAH7, характерного для бактері, що містять плазмиди ζ-підгрупи IncP-9.

Analysis of genetic determinants *nahAc* and *nahG*, coding for key enzymes in naphthalene catabolism, showed that these genes occur in unique matches. Combinations of the genes *nahAc* and *nahG* are included in different replicons excluding C18\_V2/NAH7 type, which is typical of bacteria, containing ζ-subgroup IncP-9 plasmids.

### **ТОЦКИЙ В.Н., ХАУСТОВА Н.Д., БЕЛОКОНЬ С.В.**

*Одесский национальный университет им. И.И.Мечникова,*

*Украина, 65026, Одесса, ул. Дворянская, 2, e-mail: caphgen@ukr.net*

### **ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ И ГЕННЫЙ БАЛАНС**

Накопленные экспериментальные данные дают основания считать, что межлинейные и популяционные отличия адаптивных реакций на конкретные неблагоприятные условия среды в значительной степени связаны с множественным аллелизмом определенных структурных генов, имеющих то или иное отношение к механизмам устойчивости [1 – 3]. Из серии множественных аллелей в ответ на отрицательное влияние среды в популяции отбирается именно та структурная разновидность гена, которая при данных условиях имеет селективное преимущество [4 – 6]. Очевидно, в каждом локусе хромосом при определенных условиях существования генотипа преимущественно должны находиться лишь определенные аллели генов, способные при данных условиях оптимально взаимодействовать и поддерживать генный баланс. Таким образом, под влиянием экологических факторов в генотипах особей популяции формируются определенные совокупности коадаптированных аллелей, названные [7, 8] адаптационными комплексами генов (АКГ), которые определяют устойчивость особей к различным факторам среды.

Понятно, что любые манипуляции с геномом, направленные на создание нового исходного материала для селекции, приводят к существенным перестройкам генного баланса и, следовательно, к определенным изменениям адаптивной способности синтезированных генотипов. Бурное развитие генетической инженерии, интенсивное использование в селекции методов хромосомной и геномной инженерии, приведшее к созданию множества интрогрессивных форм, вызвало необходимость изучения

особенностей адаптации таких генотипов к условиям окружающей среды, их продуктивной способности, а иногда и экологической безопасности.

К сожалению, влияние модификаций генотипов на их приспособленность и на общий генный баланс остается мало изученным. Исходя из этого, на кафедре генетики ОНУ проводят исследования по определению роли отдельных аллелей генов в формировании адаптивной способности и продуктивности популяций, а также изучают влияние определенных перестроек генотипов на экспрессию исследуемых аллелей.

#### **Материалы и методы**

Для исследований использовали мутантные линии *Drosophila melanogaster* (*cn*, *vg*), мух дикого типа (*C-S*), искусственно созданные популяции (*cn'* и *vg'*), которые в дальнейшем культивировали в условиях действия определенных селективных факторов (гипертермии, повышенного содержания этанола в корме, поздней кладки яиц), а также мух с искусственно модифицированными генотипами. Модификацию генотипов исследуемых мух производили путем насыщающих скрещиваний [9] и реципрокного замещения хромосом с помощью балансерной линии *Sy/Pm;D/Sb* [10]. Показатели относительной приспособленности, отдельных её компонент (плодовитости, продолжительности жизни, теплоустойчивости и устойчивости к голоданию), а также аллозимной принадлежности, активности и термостабильности алкогольдегидрогеназы (АДГ) определяли общепринятыми методами [11 – 15].

#### **Результаты и обсуждение**

Теоретически можно ожидать, что искусственное объединение в генотипе аллельных и неаллельных генов различного происхождения может существенно влиять на структуру и функцию АКГ и, следовательно, на адаптивный потенциал таких генотипов. Эта гипотеза экспериментально подтвердилась при изучении особенностей ген-энзимной системы АДГ в опытах с использованием лабораторных линий *Drosophila melanogaster*, которые существенно различались по показателям приспособленности – плодовитости, продолжительности жизненного цикла, устойчивости к гипертермии, другим неблагоприятным условиям [11, 17]. Высокий адаптивный потенциал имели мухи дикого типа линии *C-S* и мутанты *cn*. Выяснилось, что мухам этих линий свойственна высокая плодовитость, довольно успешная выживаемость взрослых особей при условиях жесткой гипертермии (41 °С на протяжении 15 мин) и др. В противоположность этому мутанты *vg* были менее плодовитыми, более чувствительными к высокой температуре и при стандартных условиях содержания имели более короткие сроки жизни. Исследование физико-химических свойств АДГ у мух указанных линий показало, что мухи дикого типа и мутанты *cn* являются гомозиготами по *S*-аллелю гена *Adh*, а мутанты *vg* – гомозиготами по *F*-аллелю [12]. В опытах на экспериментальных популяциях дрозофилы установили, что *S*- и *F*- аллели *Adh* имеют разную селективную ценность в условиях отбора на задержку старения, устойчивость к гипертермии и этанолу [4 – 7].

В указанных экспериментах использовали исходных линейных мух *cn* и *vg*, а также искусственно созданные экспериментальные популяции *cn'* и *vg'*. Для получения последних, мутантов *cn* и *vg* скрещивали между собой и среди особей F<sub>2</sub> отбирали сегрегантов, фенотипически идентичных родительским формам (*cn'* и *vg'*). Отобранных мух в дальнейшем культивировали в условиях действия определенных селективных факторов. Оказалось, что популяции таких мух (*cn'* и *vg'*) существенно изменяют генетическую структуру (частоту генотипов и соответствующих аллельных генов) при действии на них различных селективных факторов. Отбор на задержку старения и устойчивость к гипертермии приводит к увеличению в популяции частоты *S*-аллеля, а генотипическая адаптация к этанолу – к увеличению частоты *F*- аллеля *Adh*. При этом генотипическая среда влияет главным образом на интенсивность отбора аллельных вариантов *Adh*, в то время как направление отбора определяется действующим селективным фактором [7].

Следует учесть, что структурные особенности генотипов имеют чрезвычайно важное значение как для отбора определенных аллелей генов, так и для экспрессии их в условиях адаптации организмов и популяций [16]. Изменение структуры генотипа может существенно влиять на показатели приспособленности и функциональные свойства ген-энзимных систем даже при условии сложившегося аллельного контроля указанных систем.

Есть основания считать, что в процессе филогенетической адаптации в генотипах накапливаются не только определенные аллельные гены функционирующих белков, но и соответствующие гены, которые обуславливают посттрансляционную модификацию указанных генных продуктов. Именно к такому выводу приводят опыты с реципрокным замещением хромосом [14, 18, 19] у особей линий *C-S* и *vg*, отличающихся аллельным контролем АДГ и типами аллозимов в тканях. Оказалось, что особенности АДГ у исследованных мух зависят не только от аллельного контроля этого фермента, но и от генотипической среды, в которую попадают гены *Adh<sup>F</sup>* и *Adh<sup>S</sup>*. Выяснилось [14, 18], что в условиях перmissive гипертермии возможна модификация свойств *F*-аллозима у мух *vg*, вследствие чего этот *F*-аллозим по своим характеристикам уподобляется *S*-аллозиму (уменьшается активность и увеличивается теплоустойчивость белка).

Результаты опытов с проведением насыщающих скрещиваний дают основание считать, что мутанты *cn* (гомозиготы *Adh<sup>S</sup>Adh<sup>S</sup>*) и *vg* (гомозиготы *Adh<sup>F</sup>Adh<sup>F</sup>*) обладают различными механизмами модификации АДГ. При идентичных условиях существования генотипы, гомозиготные по аллельным генам *Adh<sup>F</sup>* или *Adh<sup>S</sup>*, способны модифицировать свойства АДГ в разных направлениях [20, 21].

Таким образом, при изучении приспособленности и функционального состояния ген-энзимной системы АДГ у *Drosophila melanogaster* установлено, что определенные варианты реципрокного обмена хромосомами между мухами с высокой и низкой адаптивной способностью, а также продолжительные беккроссы с одновременным отбором по маркерному аллелю гена приводят к существенным изменениям исследуемых признаков. На основании проведенных исследований можно утверждать, что любые искусственные перестройки генотипа могут существенно влиять на жизнеспособность и адаптивные возможности организма. Причиной указанных сдвигов можно считать нарушения структуры АКГ, вызванные введением в генотип некоадаптированных аллелей, нарушающих общий генный баланс.

### **Выводы**

Адаптация популяций дрозофилы к условиям внешней среды обеспечивается не только отбором селективно ценных аллелей структурных генов ферментов, но и генов – модификаторов генных продуктов. Вследствие этого у особей популяции формируются специфические относительно селективных факторов совокупности коадаптированных аллелей – адаптационные комплексы генов (АКГ).

Искусственные перестройки генотипа (замещение генотипа и отдельных хромосом) могут существенно влиять на жизнеспособность и адаптивные возможности организма. Причиной указанных сдвигов можно считать нарушения структуры АКГ, вызванные введением в генотип некоадаптированных аллелей, изменяющих общий генный баланс.

### **Литература**

1. Айала Ф., Кайгер Д. Современная генетика. – М.: Мир, 1987. – Т. 1. – 295 с.
2. Жученко А.А. Экологическая генетика культурных растений. – Кишинев: Штиинца, 1980. – 583 с.
3. Тоцький В.М. Генетика. – Одесса: Астропринт, 2002. – 709 с.
4. Тоцький В.М., Хаустова Н.Д. Ген-энзимна система алкогольдегідрогенази дрозофіли за умов адаптації до підвищеної температури та спирту // Мол. генет. та біофізика. – 1992. – Вип.17. – С. 17 – 21.



5. Хаустова Н.Д., Тоцкий В.Н. Алкогольдегидрогеназа и адаптация к этанолу у дрозофилы // Генетика. – 1990. – Т. 26, № 8. – С. 1427 – 1434.
6. Хаустова Н.Д. Локус *Adh Drosophila melanogaster* в условиях отбора на задержку старения // Генетика. – 1995. – Т. 31, № 5. – С. 646 – 651.
7. Тоцкий В.Н., Хаустова Н.Д., Стрельцова Н.А. Полиморфизм алкогольдегидрогеназы и генотипическая адаптация *D. melanogaster* к действию селективных факторов // Цитология и генетика. – 1995. – Т. 29, № 6. – С. 54 – 60.
8. Тоцкий В.Н., Хаустова Н.Д., Алишбли Н.М., Сечняк А.Л. Генетико-биохимические механизмы онтогенетической и филогенетической адаптации // Цитология и генетика. – 2002. – Т. 36, № 3. – С. 69 – 75.
9. Моргун С.В., Левчук Л.В. Пристосованість *Drosophila melanogaster* за штучних змін генотипів // Вісник Одеського державного університету. – 1999. – Т. 3. – Вип. 4. – С. 36 – 40.
10. Luckinbill L.S., Graves J.L., Reed A.H., Koetsawang S. Localizing genes that defer senescence in *Drosophila melanogaster* // Heredity. – 1988. – V. 60, № 3. – P. 367 – 374.
11. Хаустова Н.Д., Тоцкий В.М. Пристосованість мутантів *vg Drosophila melanogaster* і генетична структура штучних популяцій, що містять маркерний ген // Вісник Одеського національного університету. – 2004. – Т. 9. – Вип. 5. – С. 153 – 158.
12. Хаустова Н.Д. Адаптивний гетерозис и выражение гена *Adh* у дрозофилы: Автореф. дис. ...канд. биол. наук. – Харьков. – 1988. – 16 с.
13. Белоконь С.В., Хаустова Н.Д., Тоцкий В.Н. Локус *Adh* и приспособленность мутантов *sn* и *vg* в экспериментальных популяциях *Drosophila melanogaster* Meig. // Цитология и генетика. – 2007, № 2. – С. 24 – 29.
14. Левчук Л.В., Тоцкий В.М. Заміщення хромосом і пристосованість генотипів *Drosophila melanogaster* // Цитология и генетика. – 1998. – Т. 32, № 2. – С. 42 – 48.
15. Хаустова Н.Д., Моргун С.В. Ген-энзимная система АДГ и приспособленность мутантов *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 1999. – Т. 35, № 5 – С. 600 – 605.
16. Тоцкий В.Н., Хаустова Н.Д., Левчук Л.В., Моргун С.В. Генотипические основы низкой жизнеспособности мутантов *vestigial Drosophila melanogaster* // Генетика. – 1998. – Т. 34, № 9. – С. 1233 – 1238.
17. Белоконь С. В., Хаустова Н. Д., Бондаренко И. А. Приспособленность мутантов *sn* и *vg* в лабораторных популяциях *Drosophila melanogaster*// Вісник Одеського національного університету. – 2006. – Т. 11. – Вип. 9. – С. 121 – 127.
18. Тоцкий В.Н., Хаустова Н.Д., Моргун С.В., Левчук Л.В. Ген-энзимная система алкогольдегидрогеназы при замещении хромосом и других изменениях генотипа у *Drosophila melanogaster* // Укр. биохим. журн. – 1998. – Т. 70, № 5 – С. 42 – 51.
19. Левчук Л.В. Пристосованість генотипів *Drosophila melanogaster* за штучного заміщення хромосом: Автореф. дис. ...канд. біол. наук. – Одеса. – 2000. – 20 с.
20. Нассер Мох'д Юсеф Ал-Шиблі Пристосованість і частота кросинговеру у мутантів *Drosophila melanogaster* залежно від віку та штучних перебудов генотипу: Автореф. дис. ...канд. біол. наук. – Одеса. – 2003. – 17 с.
21. Білоконь С.В. Мутації *sn* і *vg*, локус *Adh* і пристосованість генотипів *Drosophila melanogaster* Meig.: Автореф. дис. ...канд. біол. наук. – Одеса. – 2007. – 21 с.

### Резюме

Обобщены результаты исследований генетических механизмов онтогенетической и филогенетической адаптации. На примере популяций дрозофилы показано, что адаптация к условиям внешней среды сопровождается формированием у особей специфических относительно селективных факторов совокупностей коадаптированных аллелей – адаптационных комплексов генов (АКГ), влияющих на общий генный баланс организмов.

Узагальнено результати власних досліджень по вивченню генетичних механізмів онтогенетичної і філогенетичної адаптації. На прикладі популяції дрозофіли показано, що адаптація до умов зовнішнього середовища супроводжується формуванням у особин специфічних щодо селективних чинників адаптаційних комплексів генів (АКГ), які визначають адаптаційний потенціал генотипів за конкретних умов існування.

Results of the scientific research of genetic mechanisms of ontogenetic and philogenetic adaptation are summarized. The evidence are presented that in the adaptation of *Drosophila melanogaster* to environmental conditions the sets of coadaptation alleles – adaptation complexes of genes (ACG), which are specific to the selective factors, are formed in persons of the population.

**ХАУСТОВА Н.Д., БЛОКОНЬ С.В., ТОЦЬКИЙ В.М.**

*Одеський національний університет ім. І.І.Мечникова,*

*Україна, 65026, Одеса, вул. Дворянська, 2, e-mail: [caphgen@ukr.net](mailto:caphgen@ukr.net)*

### **ПРИСТОСОВАНІСТЬ МУТАНТІВ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ЗА ШТУЧНОГО ЗАМІЩЕННЯ ХРОМОСОМ**

Широке застосування в генетиці індукованого мутагенезу, впровадження генно-інженерних та інших біотехнологічних методів збуджує інтерес до проблеми вивчення адаптивних здатностей генетично модифікованих генотипів. В усіх випадках, коли гени взаємодіють у зміненому генетичному середовищі, це може істотно впливати на реалізацію генетичної інформації, включаючи становлення таких складових пристосованості як плодючість, життєздатність, тривалість життя та ін. Слід зазначити, що вивчення функцій окремих генів у зміненому генофоні сприяє поглибленню і конкретизації відомих теорій і гіпотез про коадаптовані гени [1, 2], компенсаційні [3] та адаптаційні [4] комплекси генів тощо. На жаль, інформації про те, як впливають на зазначені блоки і комплекси генів природні і штучні перебудови генотипів, дуже мало. Спрогнозувати ці можливі зміни при створенні нових генотипів важливо, але дуже складно, бо на сьогодні спільний вплив окремих алелів генів власних і чужорідних хромосом на пристосованість штучно синтезованих генотипів залишається мало з'ясованим. Дані про негативний вплив гібридного дисгенезу, а також деяких маркерних мутацій [5] на адаптивний потенціал організмів добре відомі, але вони не систематизовані й не вирішують проблему в цілому.

Таким чином, вивчення пристосованості та її складових на об'єктах із штучно зміненими генотипами, що є метою даної роботи, являє собою актуальну і практично важливу проблему.

#### **Матеріали і методи**

Досліди провадили на лінійних та експериментально отриманих формах *Drosophila melanogaster* із заміщеними хромосомами. Із вихідних лабораторних ліній (*C-S*, *cn*, *vg* і *b cn vg*) спершу отримували інбредні лінії шляхом довготривалого (понад 20 поколінь) інбридингу. Заміщення хромосоми 1 у вихідних мутантів на відповідну хромосому мух дикого типу (*C-S*) здійснювали за схемою [6].

Пристосованість лінійних мутантів та мух з модифікованими генотипами оцінювали, визначаючи основні компоненти цієї ознаки: реальну плодючість, тривалість життя, а також здатність виживати в екстремальних умовах (за гіпертермії та у відсутності корму). Реальну плодючість оцінювали по кількості нащадків (імаго) однієї пари мух, що утримувалася в пробірці (20 мл) протягом трьох діб [7]. Для визначення здатності мух виживати в умовах гіпертермії їх прогрівали 15 хв при 41 °С

( $Lt_{50}$  для мух дикого типу), після чого через добу вираховували відношення (відсоток) живих мух до загального числа прогрітих [8]. Виживання досліджуваних дрозофіл в умовах голоду визначали, утримуючи мух у пробірках без корму і підраховуючи через кожні 3 години живих комах. Результати виражали кількістю годин, необхідних для загибелі 50% особин. Тривалість життя комах за утримання їх на стандартному середовищі визначали в днях, на які випадала загибель 50% мух [9]. Математичну обробку отриманих результатів провадили загальноновизнаними методами варіаційної статистики [10].

### Результати та обговорення

Внаслідок проведених експериментів встановлено, що досліджувані лінії мух за станом окремих компонентів пристосованості (плодючості, теплостійкості, тривалості життя тощо) можна поділити на добре пристосованих (*C-S*, *cn*) і погано пристосованих (*vg*, *b cn vg*). Найкраще пристосованими виявилися мухи дикого типу *C-S*. Їх плодючість, виживання в умовах гіпертермії, а також тривалість життя за стандартних умов утримання були досить високими і в подальших дослідженнях використовувалися як контроль. Близькими до мух *C-S* за показниками пристосованості виявилися мутанти *cn*. Найнижчий рівень пристосованості за більшістю показників цієї ознаки виявлено у мух *vg* і *b cn vg* (табл.).

Таблиця

Показники пристосованості вихідних ліній дрозофіли і форм з експериментально модифікованими генотипами

Досліджувані генотипи	Плодючість, кількість нащадків однієї батьківської пари	Тривалість життя за стандартних умов утримання ( $Lt_{50}$ ), дні	Тривалість життя за умов голодування ( $Lt_{50}$ ), години	Теплостійкість, %
<i>C-S</i>	49,01 ± 3,21	11,99 ± 0,85	42,98 ± 2,21	50,08 ± 1,32
<i>cn</i>	46,92 ± 3,65	11,24 ± 0,56	36,04 ± 1,51*	51,18 ± 1,45
<i>vg</i>	32,72 ± 2,09*	6,38 ± 0,26*	58,20 ± 2,22*	28,82 ± 0,98*
<i>b cn vg</i>	23,87 ± 1,15*	6,31 ± 0,57*	42,02 ± 1,74	42,95 ± 1,80*
<i>cn</i> (1 <i>C-S</i> )	42,02 ± 3,34	11,76 ± 1,01	37,83 ± 1,82	44,99 ± 1,76*#
<i>vg</i> (1 <i>C-S</i> )	32,35 ± 2,07*	10,00 ± 0,78#	38,94 ± 2,09#	24,71 ± 1,05*#
<i>b cn vg</i> (1 <i>C-S</i> )	24,20 ± 1,71*	7,34 ± 0,66*	47,31 ± 1,67*#	50,29 ± 1,37#

Примітки: \* - достовірно в порівнянні з мухами *C-S* ( $p < 0,05$ )

# - достовірно в порівнянні з відповідною мутантною лінією ( $p < 0,05$ )

Виразна негативна дія мутації *vg* виявлялась за ознакою плодючості – показником, який в першу чергу обумовлює відносну пристосованість популяції. Крім того, мухи, що мали цю мутацію, були більш чутливими до гіпертермії і виявляли скорочені строки життя за нормальних умов утримання. В той же час мутація *vg* виявилась корисною за повного голодування дрозофіли. Як видно з таблиці, мухи, що утримують мутацію *vg*, у відсутність корму виживають значно краще, ніж мухи лінії *cn*, і не поступаються за цією ознакою мухам дикого типу *C-S*. Позитивний вплив мутації *vg* в умовах голоду, можливо, пояснюється тим, що у відсутність корму у мутантів

зменшується ймовірність накопичення токсичних попередників пурина, синтез якого у цих мух порушений [11].

Є підстави вважати, що штучні втручання в структуру генотипів, включаючи заміщення хромосом, можуть призводити до істотних змін генного балансу, а отже, і пристосованості створених генотипів. Зменшення пристосованості синтезованих генотипів може пояснюватись як порушенням взаємодії генів, так, можливо, і несумісністю внесених генів з цитоплазмою донора [12].

Із наведених даних видно, що за введення в каріотип мух *sn* хромосом лінії дикого типу спостерігається зменшення теплостійкості мух. Заміщення хромосоми 1 мух *vg* на гомологічну хромосому мух дикого типу призводить до погіршення їх теплостійкості і стійкості до голодування.

В той же час матеріали таблиці свідчать про те, що структурні перебудови генотипу мутантів *b sn vg* шляхом введення в нього чужорідного генетичного матеріалу не тільки не призводять до погіршення показників пристосованості мух, але і поліпшують їх стійкість до екстремальних умов (голодування, гіпертермії). Можна припустити, що суміщення в одному генотипі генів мутанта *b sn vg*, який відзначається низькою життєздатністю, з генами мух лінії *C-S* виявляє позитивний вплив на окремі складові пристосованості мутантних особин завдяки високому адаптивному потенціалу генів дикого типу. Можливо, з цієї ж причини заміщення хромосоми 1 у короткоживучих мух *vg* на гомологічну хромосому мух дикого типу призводить до підвищення тривалості їх життя за стандартних умов утримання.

Найменш мінливим в умовах дослідів виявився найважливіший показник пристосованості – плодючість особин. Мутанти із заміщеною хромосомою мали таку ж плодючість, як і мухи вихідних мутантних ліній, незалежно від рівня цієї ознаки у останніх. Зрозумілим є той факт, що заміщення хромосоми 1 у добре пристосованих мух лінії *sn* на гомологічну хромосому так само добре пристосованих мух дикого типу не призвело до зміни їх плодючості. У модифікованих мутантів – *vg* (1 *C-S*) і *b sn vg* (1 *C-S*) – також не виявлено зміни плодючості порівняно з показниками цієї ознаки у вихідних лінійних мутантів. Якщо припустити, що головною причиною низької плодючості мух, мутантних по локусу *vg*, є плейотропний вплив маркерної мутації [11 – 16], то стає зрозумілою відсутність істотного ефекту на цей показник введених у генотип інших генів дикого типу.

Таким чином, наведені дані переконують у тому, що поєднання в каріотипі хромосом різного походження само по собі може спричинити значні, як негативні, так і позитивні зміни окремих показників пристосованості. Поява чужих хромосом у каріотипі може призводити до змін адаптивної здатності організму не тільки завдяки введенню в генотип чужорідних алельних генів, але й у зв'язку із змінами генного балансу при заміщенні хромосом. Спрямованість і рівень цих змін залежать від рівня коадаптованості генів і збалансованості геномів донора і реципієнта.

### **Висновки**

Поєднання в каріотипі дрозофіли хромосом різного походження спричиняє значні як негативні, так і позитивні зміни пристосованості, які залежать від генотипу досліджуваних особин.

Внесення чужорідних хромосом у каріотипи мутантів супроводжується достовірними зрушеннями показників теплостійкості, стійкості до голоду та тривалості життя особин в окремих варіантах досліду, але не впливає на показник реальної плодючості досліджуваних мух.

### **Література**

1. Айала Ф., Кайгер Д. Современная генетика. – М.: Мир, 1987. – Т. 1. – 295 с.
2. Жученко А.А. Экологическая генетика культурных растений. – Кишинев: Штиинца, 1980. – 583 с.

3. Струнников В.А., Маресин В.М., Степанова Н.Л. Селекция *Drosophila melanogaster* на комбинационную способность // Цитология и генетика. – 1986. – Т. 20, № 1. – С. 3 – 10.
4. Тоцький В.Н., Хаустова Н.Д., Алишбли Н.М., Сечняк А.Л. Генетико-биохимические механизмы онтогенетической и филогенетической адаптации // Цитология и генетика. – 2002. – Т. 36, № 3. – С. 69 – 75.
5. Soliman M.N. Effect of Ebony and Yellow mutants of *Drosophila melanogaster* on adult survival and alcohol dehydrogenase activity // Gerontology (Schweiz). – 1987. – Vol. 33, № 2. – P. 57 – 63.
6. Luckinbill L.S., Graves J.L., Reed A.H., Koetsawang S. Localizing genes that defer senescence in *Drosophila melanogaster* // Heredity. – 1988. – V. 60, № 3. – P. 367 – 374.
7. Хаустова Н.Д. Локус *Adh* *Drosophila melanogaster* в условиях отбора на задержку старения // Генетика. – 1995. – Т. 31, № 5. – С. 646 – 651.
8. Некрасова А.В., Шахбазов В.Г. Длительность онтогенеза и возрастные изменения плодовитости и теплоустойчивости *Drosophila melanogaster* в связи с эффектом гетерозиса // Цитология и генетика. – 1981. – Т. 15, № 3. – С. 49 – 53.
9. Dorado D., Barbancho M. Differential responses in *Drosophila melanogaster* to environmental ethanol: modification of fitness components at *Adh* locus // Heredity. – 1984. – Vol. 53, № 2. – P. 309 – 320.
10. Плохинский Н.А. Алгоритмы биометрии. – М.: Изд-во МГУ, 1980. – 150 с.
11. Williams J.A., Bell J.B., Carrol S.B. Control of *Drosophila* wing and halter development the nuclear vestigial gene product // Gene and Develop. – 1991. – Vol. 5, № 12 B. – P. 2481 – 2495.
12. Кирпиченко Т.В., Страшнюк В.Ю., Воробьева Л.И., Шахбазов В.Г. Влияние генотипа на экспрессивность признака *vestigial* и степень политении хромосом *Drosophila melanogaster* Meig. // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 12. – С. 1621 – 1625.
13. Хаустова Н.Д., Тоцький В.М. Пристосованість мутантів *vg* *Drosophila melanogaster* і генетична структура штучних популяцій, що містять маркерний ген // Вісник Одеського національного університету. – 2004. – Т. 9. – Вип. 5. – С. 153 – 158.
14. Хаустова Н.Д., Тоцький В.М. Пристосованість мутантів *vg* *Drosophila melanogaster* і генетична структура штучних популяцій, що містять маркерний ген // Вісник Одеського національного університету. – 2004. – Т. 9. – Вип. 5. – С. 153 – 158.
15. Тоцький В.Н., Хаустова Н.Д., Левчук Л.В., Моргун С.В. Генотипические основы низкой жизнеспособности мутантов *vestigial* *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 1998. – Т. 34, № 9. – С. 1233 – 1238.
16. Левчук Л.В., Тоцький В.М. Заміщення хромосом і пристосованість генотипів *Drosophila melanogaster* // Цитология и генетика. – 1998. – Т. 32, № 2. – С. 42 – 48.

### Резюме

Досліджували стан компонентів пристосованості у вихідних лінійних мутантів (*cn*, *vg*, *b cn vg*) і у експериментально отриманих форм *Drosophila melanogaster*, які несуть хромосому 1 мух дикого типу (*C-S*). Встановлено, що штучне об'єднання у генотипі хромосом різного походження може спричиняти значні, як негативні, так і позитивні зміни пристосованості, що суттєво впливає на адаптивний потенціал особин.

Изучено состояние компонентов приспособленности у исходных линейных мутантов и у экспериментально полученных форм *Drosophila melanogaster*, несущих хромосому 1 мух дикого типа. Установлено, что искусственное объединение в генотипе

хромосом разного происхождения может вызывать как негативные, так и позитивные изменения приспособленности, существенно влияя на адаптивный потенциал особей.

The state of fitness components for different mutant lines (*cn*, *vg*, *b cn vg*) *Drosophila melanogaster* upon carried out modification of the genotype are studied. It was determined that displacement of the mutant's chromosome 1 on a homologous chromosome of flies *C-S* leads to improve the separate studied parameters of fitness components for the mutants are obtained.

**ШИЛИНА Ю.В.<sup>1</sup>, ГУЩА Н.И.<sup>1</sup>, ДЯЧЕНКО А.И.<sup>1</sup>, МОЛОЖАВАЯ О.С.<sup>2</sup>, ОВСЯННИКОВА Л.Г.<sup>1</sup>, ДМИТРИЕВ А.П.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Украина, 003680, Киев, ул. Заболотного, 148, e-mail: j.shilina@gmail.com

<sup>2</sup>Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, Украина, 003022, Киев, пр. Глушкова 2

### **ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ КАК АДАПТИВНАЯ РЕАКЦИЯ У БАКТЕРИЙ**

Техногенные изменения окружающей среды вызывают множественные модификации свойств микробиоты – стимуляцию развития патогенных микроорганизмов, изменение их персистентных характеристик, приобретение ими способности поражать неспецифических хозяев [1]. В основе таких изменений лежит способность микроорганизмов к адаптации. Так, в настоящее время патогенность и ее качественную характеристику вирулентность рассматривают как функцию способности бактерий адаптироваться к организму хозяина [2].

Адаптация как процесс приспособления патогенных микроорганизмов к действию экзогенных стрессовых факторов может достигаться либо путем изменения параметров внешней среды (подавление защитных реакций хозяина, повышение доступности веществ хозяина как источников питания) либо путем изменения параметров внутренней среды (стимуляции репарационных систем патогена, экспрессии различных факторов патогенности (экзоферментов, токсинов) и др.).

В основе процессов приспособления микроорганизмов к условиям абиотической среды и организма хозяина лежит регуляция экспрессии их генов и генных комплексов. Известно, что клетки микроорганизмов могут специфически распознавать различные метаболиты хозяина, что является сигналом для активации их генов вирулентности. На экспрессию отдельных генов или их комплексов у патогенных бактерий оказывает влияние ряд факторов: температура, концентрация в среде различных органических и неорганических компонентов (различные олигосахаридные соединения, неорганические ионы  $Fe^{3+}$ ,  $Ca^{2+}$ ), осмолярность среды, pH,  $pO_2$ ,  $pCO_2$ , концентрация бактериальных клеток (регуляция через медиаторы «эффекта кворума») [3, 4]. Распознавание химических сигналов происходит благодаря наличию у бактерий специфических рецепторов, связанных с системами трансдукции сигналов для активации транскрипции генов. Считается, что физические факторы действуют на бактерии также через соответствующие рецепторы непосредственно или путем изменения химического состава среды [2].

При достижении стрессовыми факторами определенного дозового порога они могут оказывать неспецифическое повреждающее воздействие на клетки, в частности, на их ДНК. При этом разные факторы могут вызывать сходные нарушения. Клетки способны реагировать на повреждения ДНК и запускать системы их репарации.

Важным свойством неспецифических патогенов, способных поражать широкий круг хозяев и выживать во внешней среде, является высокий уровень развития их регуляторных и защитных систем. Полагают, что под факторами патогенности (вирулентности) следует подразумевать не только «специализированные» биомолекулы (например, известные факторы патогенности – ферменты, токсины) и системы микроорганизмов, определяющие реализацию патогенных свойств, но также системы и факторы, повреждение которых приводит к снижению жизнеспособности микроорганизмов (даже непатогенных) [3]. Для фитопатогенов, способных выживать во внешней среде, отмечена важная роль систем репарации ДНК, в частности, системы SOS-репарации [5].

SOS-репарация относится к глобальным регуляторным системам бактерий и одной из ее функций является репарация ДНК. Показано, что *RecA*-зависимой SOS-системе принадлежит также важная роль в проявлении патогенности у микроорганизмов. Данные литературы свидетельствуют о существовании связи патогенности с функционированием локуса *recA* у *Vibrio cholerae* (биотипы classical и El Tor), энтерогеморагенной *E. coli O157:H7* и фитопатогенных бактерий *X. campestris pv. campestris* NRRL и B1459 [6]. Индукторами SOS-системы являются такие ДНК-повреждающие агенты как митомицин С (образование сшивок ДНК-ДНК, двойных разрывов ДНК), налидиксовая кислота (ингибирует активность ДНК-гиразы, ответственной за конформацию ДНК), ионизирующее и УФ-излучение и др. К сигналам, вызывающим индукцию SOS-системы относят 1-нитевые и 2-х нитевые разрывы ДНК, одноцепочечную ДНК, изменение конформации ДНК, накопление отдельных нуклеотидов и др.

Целью данной работы является рассмотрение механизмов неспецифического повышения вирулентности и агрессивности патогенных бактерий как проявления их адаптивного ответа на действие повреждающих факторов разной природы.

Данные ряда исследований свидетельствуют о возможности *RecA*-опосредованной регуляции при действии ДНК-повреждающих агентов экспрессии таких факторов патогенности, как пектинлиаза, липополисахарид и пиоцианин.

Известно, что наиболее простой способ преодолеть клеточный иммунитет – убить клетки хозяина [7]. Пектинолитические ферменты являются токсичными для растительных клеток и прямо или опосредовано вызывают их гибель [8]. Таким образом, интенсивное образование пектинолитических ферментов вызывает быструю гибель растительных клеток и препятствует развитию защитных реакций у растений.

Пектинлиаза является единственным ферментом, способным гидролизовать без предварительного воздействия других ферментов высокоэтерифицированные растительные пектины [9]. Пектинлиазу считают главным ферментом, ответственным за мацерацию тканей картофеля [10]. Патогенность дефицитных по синтезу пектинлиазы мутанты *Erwinia carotovora subsp. carotovora 71* была сниженной [11]. Установлено, что пектинлиаза образуется при действии на бактериальные клетки ДНК-повреждающих факторов. Описано стимуляция синтеза пектинлиазы у *Erwinia carotovora* при действии налидиксовой кислоты, митомицина С, УФ-излучения, у *Erwinia chrysanthemi* и *Pseudomonas marginalis* – при обработке митомицином С [12]. Нами показана возможность стимуляции пектинолитической активности *Erwinia carotovora subsp. carotovora* при действии ионизирующего излучения [13]. Все эти факторы одновременно являются индукторами SOS-ответа. Активация SOS-системы при действии митомицина С не оказывала влияния на активность других пектинолитических ферментов – пектатлиаз и пектинметилэстеразы [14]. В свою очередь, активность пектинлиазы, в отличие от пектатлиаз, не реагировала на присутствие в среде пектина и его производных [14].

Синтез пектинлиазы контролируется при участии двух регуляторных генов *rdgA* и *rdgB* [11]. *RdgB* является ДНК-связывающим белком и взаимодействует с промотором

гена пектинлиазы, активируя его транскрипцию, а RdgA функционирует как репрессор rdgB. Экспрессия гена пектинлиазы запускается в результате RecA-опосредованного расщепления репрессора RdgA.

На формирование способности к сопряженной экспрессии ферментов репарации и пектинолизиса у бактерий вероятно оказало влияние присутствие в тканях растений ДНК-повреждающих агентов, которые могут выступать в качестве индукторов пектинлиаз у *Erwinia* [15].

На возможность участия SOS-системы в регуляции структуры и функции липополисахарида (ЛПС) указывают также данные о влиянии ее индуктора - налидиксовой кислоты на транскрипцию генов у *Salmonella enterica typhimurium ATCC14028* [16]. При этом наблюдалась репрессия транскрипции генов «островков патогенности», индукция генов систем эффлюкса, связанных с лекарственной полирезистентностью, липопротеинов внешней мембраны и генов, связанных с регуляцией длины цепей ЛПС. Как известно, ЛПС относится к основным компонентам внешней мембраны клеток грамотрицательных бактерий и является одним из факторов их вирулентности (эндотоксины) с выраженной плеiotропностью действия на организм хозяина. Молекулы ЛПС состоят из трех разных компонентов: липида А, ковалентного соединенного с гетерополисахаридным компонентом, представленным олигосахаридом кора и O-специфическими полисахаридными цепями.

ЛПС является иммуномодулятором и может проявлять иммуносупрессивную активность. Инъекция мышам эндотоксина *Salmonella typhi* за 1-2 дня до введения антигена (эритроцитов овцы) подавляла образование антител [17]. Подавление иммунного ответа ЛПС может быть связано с его цитотоксическим действием на лимфоциты.

Обработка растений ЛПС из разных бактерий предотвращала развитие реакции гиперчувствительности, индуцированной другими элиситорами, подавляла экспрессию ферментов биосинтеза элиситоров (фенилаланинаммонийлиазы, изофлавоноредуктазы), стимулировала образование салициловой кислоты у растений-хозяев и нехозяев, в ряде случаев индуцировала окислительный взрыв у клеток растений, формирование кальциевого сигнала, изменения в процессах фосфорилирования белков [18]. Дефекты ЛПС у представителей видов *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, обуславливали частичную или полную потерю вирулентности [19]. Супрессорный эффект ЛПС проявлялся в отношении всех клеточных процессов, связанных с формированием ответной реакции растений на элиситоры, что указывает на раннюю интерференцию действия ЛПС с процессами сигнальной трансдукции или взаимодействия с базовыми элементами путей сигнальной трансдукции, ответственных за активацию защитных генов [18]. Известно, что ингибирование процессов, связанных с самими ранними сигнальными каскадами при индукции защитных реакций используется многими патогенами в качестве эффективного механизма супрессии.

На возможность RecA-опосредованной регуляции структуры и функции ЛПС указывают также данные об участии SOS-системы в регуляции такого распространенного у грамотрицательных бактерий явления как диссоциация. Данное явление заключается в одновременном существовании в естественных популяциях бактерий одного вида трех фенотипических вариантов (S-, R- и M-форм), которые спонтанно переходят друг в друга. Этот переход связан с блокировкой определенных этапов биосинтеза ЛПС. В клетках S-форм ЛПС включает полный набор структурных элементов, тогда как у R-форм синтезируется ЛПС, в котором отсутствуют O-специфические цепи и/или часть кора. Фенотипическое переключение у возбудителя коричневой пятнистости шампиньона *Pseudomonas tolaasii* от 116S- к 116R-форме обусловлена обратимой 661-bp дубликацией киназного домена регуляторного локуса pheN и является RecA-зависимым процессом [20].



У энтеропатогенных *E. coli* и *S. flexneri* большая плаزمида вирулентности pINV способна к обратимой интеграции-эксцизии с разной точностью при участии гесА-зависимых механизмов. Известно, что гены инвазивности *inv* у шигелл играют определенную роль в экспрессии биологической активности ЛПС, обратимо активируя ЛПС, который при этом проявляет иммуносупрессивную активность [21].

Установлено, что обработка неактивного ЛПС-содержащего фильтрата культуры R-формы бактерий редокс-системой приводит к появлению иммуносупрессивной активности, которая проявлялась ЛПС в S-форме. Этот процесс активации ЛПС в результате химической редокс-обработки (с использованием 0,1 М 2-меркаптоэтанола) сходен с активацией бактериального ЛПС в организме хозяина и имеет обратимый характер [22]. Нами также показано влияние окислительно-восстановительной обработки препаратов ЛПС разных бактерий на их токсичность по отношению к растениям табака [23].

Можно предположить, что некоторые патогенные бактерии могут использовать структурно-функциональные модификации ЛПС как для реализации патогенного потенциала в организме чувствительного хозяина, так и для перехода к стадии резервации для выживания в устойчивых организмах животных и растений и во внешней среде.

Об участии SOS-системы в регуляции экспрессии пиоцианина свидетельствуют данные о возможности индукции его синтеза налидиксовой кислотой [24]. Пиоцианин (1-гидрокси-5-метилфеназин) является пигментом из группы феназинов, синтезируемых бактериями *Pseudomonas aeruginosa* и другими флуоресцирующими видами *Pseudomonas*. Его относят к факторам вирулентности *P. aeruginosa*. Пиоцианин вызывает разные патологические эффекты у про- и эукариотических организмов, что указывает на существование эволюционно консервативных физиологических мишеней его действия [25]. Показано, что пиоцианин подавляет пролиферацию лимфоцитов [26]. Пролиферация лимфоцитов в ответ на антиген обычно является проявлением клеточного иммунитета. Ингибирование пролиферации лимфоцитов и, соответственно, клеточно-опосредованного иммунитета способствует становлению и прогрессии инфекции, вызванной *P. aeruginosa* [26]. Синтез пиоцианина и других феназинов *P. aeruginosa* необходим для развития симптомов заболевания у растений и гибели нематоды *Caenorhabditis elegans* [27]. Его цитотоксическое действие обусловлено образованием активных форм кислорода ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ).

Таким образом, накопленные к настоящему времени результаты исследований свидетельствуют, что у ряда бактерий возможна стимуляция экспрессии факторов патогенности в ответ на ДНК-повреждающее действие различных стрессоров. Для факторов вирулентности, регулируемых таким способом, характерны неспецифическая цитотоксичность и супрессивное действие на защитные системы хозяина, независимо от его таксономического положения. Ввиду этого существует потенциальная опасность преодоления такими патогенами существующих видовых барьеров и появления новых заболеваний, что особенно вероятно при комбинированном действии различных стрессовых факторов и в экологически неблагоприятных условиях.

#### **Литература**

1. Крыленков В.А., Власов Д.Ю. Санитарно-эпидемиологические последствия антропогенной модификации микроорганизмов в урбанизированной среде обитания человека // Инфстрой. – 2004. - № 4 (16). - С. 22-34.
2. Домарадский И.В. Вирулентность бактерий как функция адаптации // Журн. микробиол.- 1997.- № 4.- С. 16-20.
3. Анисимов А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 1. // Молекул. генетика. – 2002. – № 3. – С. 3-23.

4. *Mekalanos J.J.* Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. // *J. Bacteriol.* - 1992. – 174. – P. 1-7.
5. *Kim J.J., Sundin G.W.* Regulation of the *ruAB* mutagenic DNA repair operon of *Pseudomonas syringae* by UV-B (290 to 320 nanometers) radiation and analysis of *ruAB*-mediated mutability in vitro and in planta // *J. Bacteriol.* – 2000. - 182, № 21. - P. 6137-6144.
6. *Шиліна Ю.В., Гуца М.І., Дмитрієв О.П., Кутлахмедов Ю.О., Моложова О.С., Домбровська І.В.* Проблема модифікації патогенності мікроорганізмів в антропогенно змінених екосистемах // *Агроекол. журн.* – 2006. – № 2. – С. 48-58.
7. *Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Двавадия В.Г., Багирова С.Ф.* Общая и молекулярная фитопатология. – М.: Изд-во общества фитопатологов, 2001. – 302 с.
8. *Basham, H.G., Bateman D.F.* Killing of plant cells by pectic enzymes: the lack of direct injurious interaction between pectic enzymes or their soluble reaction products and plant cells. // *Phytopathology.* - 1975. – 65. – P.141-153.
9. *Alana A., Alkorta I., Dominguez J.B., Llana M.J, Serra J.L.* Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1990. - 56. – P. 3755-3759.
10. *van den Broek L.A. M., den Aantrekker E. D., Voragen A.G.J., Beldman G., Vincken J.-P.* Pectin Lyase is a Key Enzyme in the Maceration of Potato Tuber // *J. Sci. Food Agric.* – 1997. – 75. – P. 167-172.
11. *Liu Y., Cui Y., Mukherjee A., Chatterjee A.K.* Activation of the *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectin lyase structural gene *pnlA*: a role for *rdgB*. // *Microbiology.* - 1997. – 143. – P. 705–712.
12. *Sone H., Sugiura J., Itoh Y., Izaki K., Takahashi H.* Production and Properties of Pectin Lyase in *Pseudomonas marginalis* Induced by Mitomycin C // *Agric. Bio. Chem.* – 1988. - 52 (12). – P. 3205-3207.
13. *Шиліна Ю.В., Міхєєв О.М., Гуца М.І.* Дія гострого гамма-опромінення на аресивність та виживання бактерій *Erwinia carotovora* // *Науковий вісник УжНУ. Серія: Біологія.* -2001.- Випуск № 10. - С. 150-152.
14. *Hugouvieux-Cotte-Patiat N., Dominguez H., Robert-Baudou J.* Environmental Conditions Affect Transcription of the Pectinase Genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937 // *J. Bact.* – 1992. - Vol. 174, N 23. - P. 7807-7818.
15. *Tsuyumu S., Funakubo T., Hori K. et al.* . Presence of DNA Damaging Agents in Plants as the Possible Inducers of Pectin Lyases of Soft-Rot *Erwinia* // *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.* - Vol. 51, N 3. - P. 294-302.
16. *Dowd S.E., Killinger-Mann K., Blanton J., San Francisco M., Brashears M.* Positive Adaptive State: Microarray Evaluation of Gene Expression in *Salmonella enterica* Typhimurium Exposed to Nalidixic Acid // *Foodborne Pathogens and Disease.* – 2007. - 4(2). – P. 187-200.
17. *Schwab J.H.* Suppression of the Immune Response by Microorganisms // *Bact. Rew.* – 1975. - Vol. 39, N 2. - P. 121-143.
18. *Tellström V., Usadel B., Thimm O., Stitt M., Kuster H., Niehaus K.* The Lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* Suppresses Defense-Associated Gene Expression in Cell Cultures of the Host Plant *Medicago truncatula* // *Plant Physiology/* - 2007. - Vol. 143. – P. 825–837.
19. *Kingsley M.T., Gabriel D.W., Marlow G.C., Roberts P.D.* The *opsX* Locus of *Xanthomonas campestris* Affects Host Range and Biosynthesis of Lipopolysaccharide and Extracellular Polysaccharide // *J. Bact.* – 1993. Vol. 175, N 18. - P. 5839-5850.
20. *Sinha H., Pain A., Johnstone K.* Analysis of the Role of *recA* in Phenotypic Switching of *Pseudomonas tolaasii* // *J. Bact.* – 2000. - Vol. 182, N 22. – P. 6532–6535.
21. *Шиліна Ю.В., Моложова О.С.* Модифікації ліпополісахаридів як один із способів адаптації клітин патогенних бактерій та їх популяцій до дії біотичних та абіотичних факторів середовища // *Цитологія і генетика.* - 2004. - № 2. - С. 65-80.

22. Борисова Е.В., Бондаренко В.М., Борисов В.А. Иммуносупрессивное действие различных фракций липополисахарида *Salmonella typhimurium* // Журн. микробиол. - 1997. - № 5. - С. 120-123.
23. Моложжава О.С., Шиліна Ю.В. Фітотоксичність модифікованих ліполісахаридів бактерій // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія. – 2007. – Вип. 2 (11). – С. 76-82.
24. <http://fr.wikipedia.org>
25. Ran H., Hassett D.J., Lau G.W. Human targets of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2003. – Vol. 100, N 24. – P. 14315–14320.
26. Sorensen R.U., Klinger J.D., Cash H.A., Chase P.A., Dearborn D.G. In vitro inhibition of lymphocyte proliferation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments. // Infect. Immun. - 1983. – 41. – P. 321-330.
27. Mavrodi, D.V., Bonsall R.F., Delaney S.M., Soule M. J., Phillips G., Thomashow L.S. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // J. Bacteriol. - 2001. – 183. – P. 6454–6465.

### **Резюме.**

В огляді розглянуто механізми експресії факторів патогенності з точки зору адаптивної відповіді бактерій та роль SOS-системи репарації в цих процесах. В якості прикладів наведені механізми експресії таких факторів вирулентності, як пектинліаза, ліпополісахарид та піоціанін.

В обзоре рассмотрены механизмы экспрессии факторов патогенности с точки зрения адаптивного ответа бактерий и роль SOS-системы репарации в этих процессах. В качестве примеров приведены механизмы экспрессии таких факторов вирулентности, как пектинлиаза, липополисахарид и пиоцианин.

The mechanisms of pathogenicity factors expression are considered from the point of view the adaptive answer of bacteria and role of SOS-repair system in these processes. For examples the mechanisms of expression of such factors of virulence, as pectinlyase, lipopolysaccharide and pyocyanine are examined.

**ЩЕРБАКОВА О.В., МОГИЛЯК І.І., МАТІЙЦІВ Н.П., МАКСИМІВ Д.В.,  
ЧЕРНИК Я.І.**

*Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна e-mail: oksana\_kysla@yahoo.com*

### **ЗМІНИ У ТКАНИНІ МОЗКУ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНОГО МУТАНТА 4.14 DROSOPHILA MELANOGASTER В НОРМІ ТА ЗА УМОВ ГІПЕРОКСІЇ**

На даний час відомо багато захворювань нервової системи людини, які пов'язані з ураженням структур головного мозку. Існує чимало гіпотез щодо виникнення кожного конкретного захворювання, однак жодна з них остаточно не пояснює ні етіології, ні патогенезу розвитку нейродегенерації. Подібні процеси описані в багатьох тварин. Дослідження на модельних об'єктах, таких як *Drosophila melanogaster*, дають можливість виявити генетичні і молекулярні механізми виникнення дегенерацій, а також сприяють пошуку фармакологічних засобів, спрямованих на усунення причин їх розвитку. Метою роботи було дослідити вплив гіпероксії на розвиток і природу нейродегенеративних процесів у мутанта з ураженням тканини мозку 4.14. *D.melanogaster*.

### Матеріали та методи.

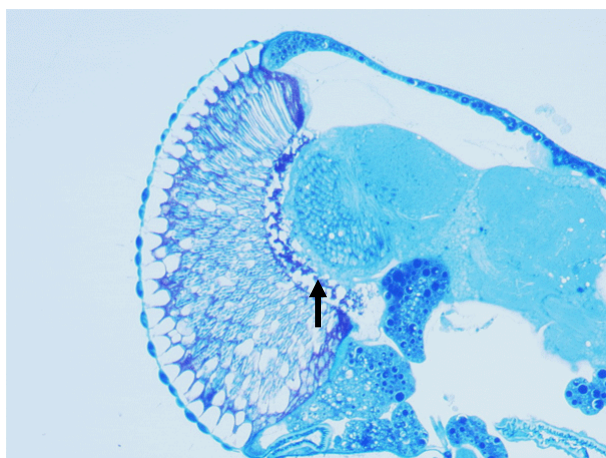
В роботі були використані лінії нейродегенеративних мутантів, отримані індукцією етилметансульфонатом; делеційні лінії з Bloomington Stock Center (США): 3340 Df (3R) e-R1 Ki [1] / TM3 Sb [1] Ser [1] 093B06-07, 093D02; 1931 Df (3R) by 10 red [1] e [1] / TM3 Sb [1] Ser [1] 085D08-12, 085E07-F014; 3013 Df (3R) e-BS2 rsd [1] / TM3 Sb [1] 093C03-06, 093F14-094A01; 3011 Df (3R) Cha7 red [1] / TM6B Tb [1] 090F01-F04, 091F05; музейна лінія *loechrig*; контролем слугувала лінія дикого типу *Oregon*.

Гістологічні препарати зрізів головного мозку для світлової та електронної мікроскопії готували за стандартною методикою [2]. Фарбування тканини мозку антитілами проводили згідно протоколів [7].

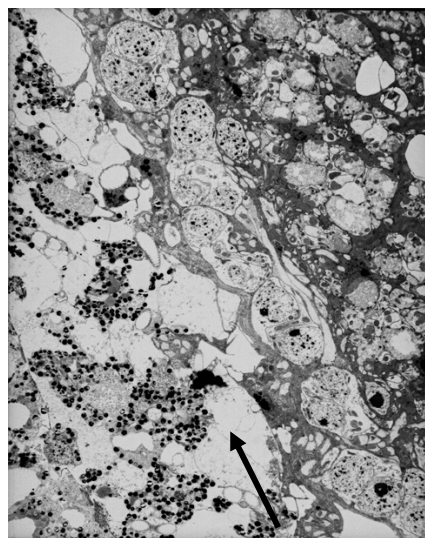
### Результати та обговорення.

Оксидативний стрес є однією з причин виникнення дегенеративних процесів [4], тому колекцію нейродегенеративних мутантів тестували на стійкість до високих концентрацій кисню (гіпероксії). Більшість мутантних ліній в умовах гіпероксії показували подібні з контролем показники виживання. Після виготовлення гістологічних препаратів серед досліджуваних мутантів, у яких проявлялася слабка дегенерація мозку, було виявлено лінію 4.14. зі значними змінами в структурі мозкової тканини. За нормальних умов перші ознаки дегенерації у мутантів 4.14. з'являлися після 20 дня життя імаго і найбільш значна вакуолізація спостерілася у центральних ділянках мозку. Показники кривих виживання даних мутантів до 40 дня залишалися на рівні контролю, проте після 45 дня всі особини даної лінії гинули (контрольні особини гинули після 70 днів життя). В умовах гіпероксії мутант прожив 6 днів, а на 4-5 день виявлялися пошкодження всієї тканини мозку (окремі вакуолі), значна дегенерація в кортексі ламіни – «розбухання» нейронів та глії (що є ознакою некрозу), а також дегенерація клітин субретинальної глії (Рис.1). Зовні морфологія ока мутантів 4.14 виглядала нормальною, проте при аналізі зрізів ока мух після гіпероксії при світловій та електронній мікроскопії виявляли значну вакуолізацію ретини, дегенерацію рецепторних клітин, порушення в будові пігментних клітин.

Для виявлення причин нейродегенерацій проводили фарбування тканини мозку антитілами. Фарбування антитілами 24B10 показало часткове відмирання фоторецепторних аксонів R7-R8, антитілами anti-elav - зменшення кількості нейронів в ділянці ламіни. Використання антитіл до активної каспази 3 виявило її присутність у клітинах кортексу ламіни та центральної частини мозку, що свідчило про проходження апоптичних процесів.



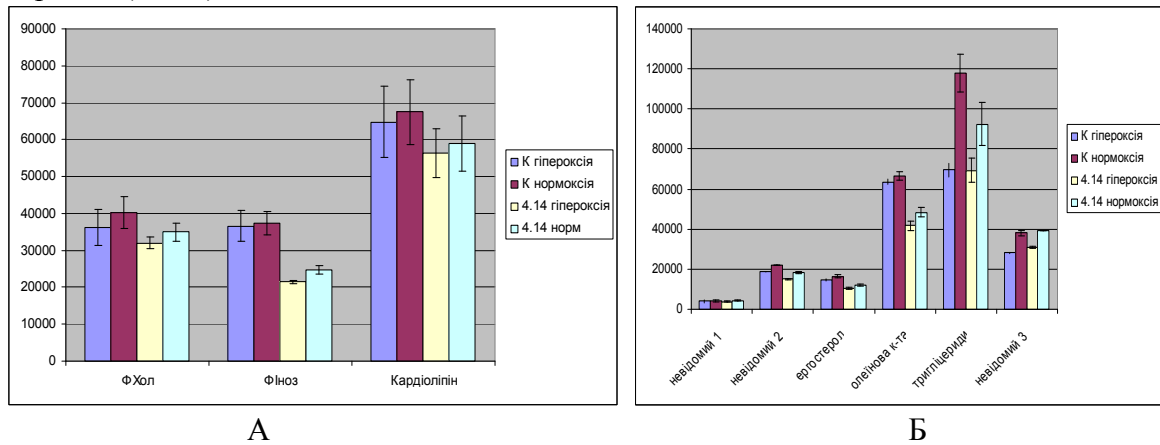
А



Б

**Рис.1** Фенотиповий прояв тканини мозку в районі оптичних долей мутанта 4.14 після гіпероксії. Дегенерація клітин субретинальної глії (вказано стрілкою). А. Світлова мікроскопія (18x40). Б. Електронна мікроскопія ( x1600)

З літератури [1] відомо, що одними з мішеней дії кисневих радикалів є ліпіди. Відбувається їх пероксидація, ушкодження мембран та апоптоз. Оскільки ліпіди беруть участь у побудові цитоскелету, мембран, а також в рецептор-опосередкованій передачі сигналів зміна їх кількості та перерозподіл компонентів може бути причиною виникнення дегенеративних процесів. За допомогою методу тонкошарової хроматографії в особин лінії 4.14. дослідили вміст різних фракцій ліпідів. Виявили зниження рівнів ергостеролу та фосфатидилінозиту порівняно з контролем за нормальних умов та зниження вмісту всіх фракцій фосфоліпідів і стеролів після гіпероксії (Рис.2).



**Рис.2.** Вміст ліпідів в К – контрольна лінія, М – мутанти 4.14. А. Фосфоліпіди, Б. Стероли

Використовуючи лінії з делеціями в ділянках хромосоми, де локалізовані відомі нейродегенеративні мутанти, досліджувана мутація лінії 4.14. була картована в цитологічному районі 93C3-F14 третьої хромосоми. У цьому ж районі в положенні 93C1-93C3 групою авторів [6] була локалізована нейродегенеративна мутація *loechrig* (*loe*). Автори вказують, що основною причиною появи дегенеративних змін у даного мутанта є порушення метаболізму холестеролу, що узгоджується з одержаними нами результатами по дослідженню спектру ліпідів у мутанта 4.14. Однак, поява мутантного фенотипу в особин лінії *loe* спостерігалася на 7-й день життя імаго, в той час як у особин лінії 4.14 – на 20-й день. За умов гіпероксії у мутантів *loe* посилювалася вакуолізація тканини мозку, але не виявлялася дегенерація в кортексі ламіни, характерна для лінії 4.14. Можна припустити, що досліджувана мутація лінії 4.14. призвела до появи нового алеля *loe*, або виникла в іншому гені даного цитологічного району. Для підтвердження цього припущення проводяться молекулярні дослідження.

Таким чином, показано, що в умовах гіпероксії у нейродегенеративного мутанта 4.14. відбувається дегенерація в кортексі ламіни та субретинальній глії. Імуногістохімічні дослідження виявили відмирання фоторецепторних аксонів R7-R8 та зменшення кількості нейронів в ділянці ламіни. Порушення метаболізму ліпідів у даного мутанта може бути причиною появи нейродегенерацій.

### Література

1. Adibhatla R.M., Hatcher J.F. Role of lipids in brain injury and diseases // *Future Lipidol.* – 2007. – V.2(4). – P.403-422.
2. Ashburner M. *Drosophila: a laboratory manual* // Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory. – 1989. – P. 179-189.
3. Botella J.A., Ulschmid J.K., Gruenewald C., Kretschmar D., Schneuwly S. The *Drosophila* carbonil reductase sniffer prevents oxidative stress-induced neurodegeneration // *Current Biol.* – 2004. – V.14. – P.782-786.

4. *Ischiropoulos H., Beckman J.S.* Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect or association? // *J. Clin. Invest.* – 2003. – V.15. – P.163-169.
5. *Kanazawa I.* How do neurons die in neurodegenerative disease? // *Trends in Mol. Med.* – 2001. – Vol.1, №8. – P.339-344.
6. *Tschaeppe J-A, Hammerschmiedl C., Muehlig-Versenl M., Athenstaedt K., Daum G., Kretschmar D.* The neurodegeneration mutant loechrig interferes with cholesterol homeostasis and Appl processing // *EMBO Jour.* – 2002. – V.21, №23. – 6367-6376.
7. *Sullivan W., Ashburner M., Hawley R.S.* *Drosophila* Protocols // Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2000. – 697p.

### **Резюме**

В результаті дії ЕМС був отриманий мутант 4.14 *D.melanogaster* з дегенерацією тканини мозку, мутація локалізована в цитологічному районі 93С3-F14 третьої хромосоми. В умовах гіпероксії в цих мутантів показана дегенерація в кортексі ламіни та субретинальній глії. Фарбування антитілами виявило відмирання фоторецепторних аксонів R7-R8 та зменшення кількості нейронів в ділянці ламіни. Порушення метаболізму ліпідів у даного мутанта може бути причиною появи нейродегенерацій.

С помощью химического мутагенеза получен мутант 4.14 *D.melanogaster* с дегенерацией структур мозга; мутация локализована в цитологическом районе 93С3-F14 3-ей хромосомы. После гипероксии в мутантов 4.14. фиксировались дегенерации в кортексе ламины и субретинальной глии. Проведено иммуногистохимические исследования ткани мозга. Нарушения в метаболизме липидов в этих мутантов могут быть одной из причин развития нейродегенераций.

Using chemical mutagenesis neurodegenerative mutant 4.14 of *D.melanogaster* was obtained; mutation was localized in cytological region 93С3-F14 of the 3<sup>rd</sup> chromosome. Under hyperoxia these mutants showed severe degeneration of lamina cortex. Immunohistochemical staining showed degeneration of photoreceptor axons R7-R8 and neurons of lamina region. In this mutant, probably, lipid metabolism disturbance is one of the reasons of neurodegeneration appearance.

**ЯЦЕНКО А.С.<sup>1</sup>, КУЧЕРЕНКО М.М.<sup>1</sup>, ЩЕРБАТА Г.Р.<sup>2</sup>, РУОХОЛА-БЕЙКЕР Х.<sup>2</sup>, ГОЛУБ Н.Я.<sup>1</sup>, МАКСИМІВ Д.В.<sup>1</sup>, ЧЕРНИК Я.І.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Львівський національний університет імені Івана Франка, вул.Грушевського, 4, Львів 79005, Україна e-mail: anubius81@gmail.com*

<sup>2</sup> *Department of Biochemistry, University of Washington, Box 357350, Seattle, WA 98195, USA e-mail: hannele@u.washington.edu*

### **ДИСТРОФІН ТА ДИСТРОГЛІКАН Є НЕОБХІДНИМИ ДЛЯ ФУНКЦІОНУВАННЯ М'ЯЗІВ ТА ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ПОЛЯРНІСТІ ФОТОРЕЦЕПТОРНИХ АКСОНІВ ГОЛОВНОГО МОЗКУ У DROSOPHILA MELANOGASTER**

Дистрофін та дистроглікан є центральними компонентами, які входять до складу дистрофін-глікопротеїнового комплексу (ДГК), що забезпечує структурну роль зв'язку білків зовнішньоклітинного простору, таких як ламінін, агрін і перлекан з компонентами цитоскелету. Втрата взаємозв'язку між компонентами комплексу призводить до розвитку м'язових дистрофій <sup>1</sup>. Розроблені і вивчені на сьогоднішній день моделі м'язової дистрофії дали змогу виявити загальні процеси патологій <sup>2</sup>.



Незважаючи на це, відсутність чіткого розуміння функції ДГК у специфічних тканинах і його регуляції не дає змоги розробити ефективної стратегії лікування міопатій, які і досі відносяться до категорії невиліковних. Висока гомологія основних компонентів ДГК у людини і дрозофіли дає підстави вважати, що основні функції цього комплексу збереглись впродовж еволюції. Будучи зручним об'єктом генетики *Drosophila melanogaster* може бути використана для проведення генетичного скринінгу різних компонентів, що входять до складу ДГК. Як модельний еукаріотичний організм дрозофіла має низку переваг для вивчення молекулярно-генетичних механізмів розвитку м'язових дистрофій, із подальшою інтерпретацією результатів у людини.

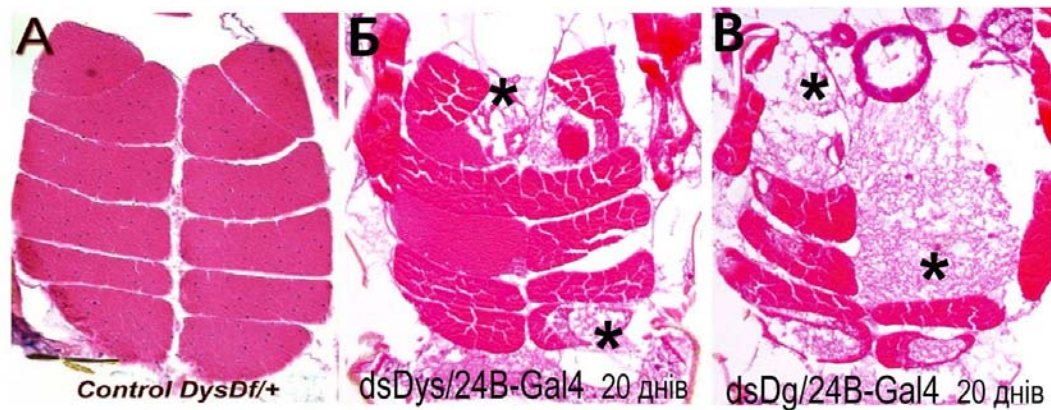
#### **Матеріали і методи**

**Мутантні лінії *Drosophila melanogaster*, використані у роботі.** Лінії мух *Drosophila melanogaster* утримувалися при температурі 25 °С на стандартному середовищі, що складалось з кукурудзяного борошна, дріжджів та агару. У проведеній роботі були використані наступні лінії: для отримання мутантних клонів за геном дистроглікану у мозку личинок: *hsFLP; FRT42D Ubi-GFP/CyO* та *eyFLPGMR-lacZ; FRT42D I(2)cl-R111/CyO*, *Gal4-elav* (колекція дрозофіли, м.Блумінгтон, США); *Df(3R)Dl-X43/TM3,Tb,Sb* з делецією гена дистрофіну, у тексті позначена під назвою *DfKX43* (колекція дрозофіли, м.Блумінгтон, США); *Dys<sup>8-2</sup>/TM3,Sb* з гіпоморфним алелем дистрофіну, отримана в результаті транспозиції мобільного генетичного елемента *EP(3)<sup>3397</sup>* (<http://engels.genetics.wisc.edu/Pelements/index.html>); для негативної регуляції дистрофіну – трансгенна лінія *pUASdsDysC-term* (лінії - *dsDysC-term*, *tg5*, *tg6*); для тканинно-специфічної активації трансгенних конструктів були використані наступні лінії: у клітинах фоторецепторів – *w<sup>+</sup>*; *GMR-Gal4*, у клітинах мезодерми – *w<sup>+</sup>*; *24B-Gal*. Усі лінії для специфічної експресії були отримані з колекції дрозофіли (м.Блумінгтон, США). Імуногістохімічні фарбування проводились за стандартною методикою описаною раніше <sup>9</sup>.

#### **Результати та обговорення**

**У мутантів за генами дистрофіну та дистроглікану порушена локомоторна функція.** Відомо, що у людей втрата компонентів дистрофін-дистрогліканового комплексу призводить до регресії м'язів і до зниження тривалості життя <sup>1</sup>. Цікаво було дослідити, чи подібні процеси відбуваються у дрозофіли. З цією метою ми перевірили локомоторну функцію у мух із негативною регуляцією дистрофіну та дистроглікану згідно методики, яка використовувалась у подібних дослідженнях <sup>2</sup>. Локомоторну активність визначали у мух. Для кількісної інтерпретації локомоторної активності визначали день, коли спостерігалось її зниження на 50 відсотків. У експериментах ми використали комбінацію трансгенів і транскрипційного активатора *24B-Gal4*, який специфічно експресується у тканинах мезодермального походження, тим самим забезпечуючи негативну регуляцію дистрофіну та дистроглікану у м'язовій тканині. У особин зі зниженою експресією дистрофіну та дистроглікану в м'язах (*dsDysC-term/24B-Gal4*, *dsDysN-term/24B-Gal4*, *dsDg30A/24B-Gal4*) було відзначено швидке зниження локомоторної активності порівняно з контролем (*pUASpGFP/24B-Gal4*). Таким чином, на основі отриманих результатів можна стверджувати, що дистрофін і дистроглікан відіграють важливу роль у забезпеченні локомоторної функції дрозофіли.

**Залежна від віку дегенерація м'язів у мутантів за генами дистрофіну та дистроглікану.** Для пояснення отриманих результатів по дослідженню локомоторної активності мутантів за генами дистрофіну та дистроглікану (*dsDg30A* або *dsDys/P-tub-Gal4*, *Dys<sup>8-2</sup>/KX43*), нами було проаналізовано морфологічні зміни у м'язовій тканині комах, використовуючи гістологічні методи.

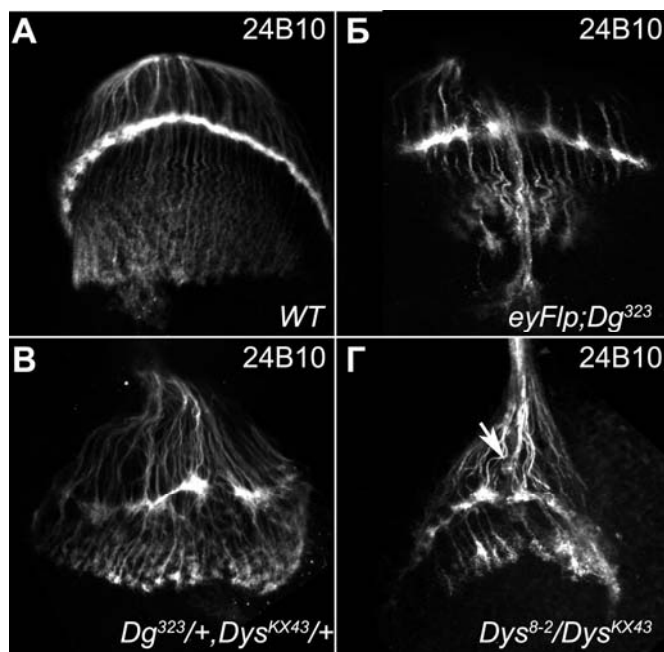


**Рис.1.** Гістологічні зрізи м'язів у мух дикого типу та мутантів за дистрофіном та дистрогліканом.

На основі аналізу гістологічних зрізів м'язів грудей показано залежну від віку дегенерацію м'язів, що корелює з попередньо отриманими результатами щодо зниженої у цих мутантів локомоторної активності. Аналіз зрізів із використанням конфокальної та світлової мікроскопії виявив порушення клітинної організації м'язів у мутантів порівняно з м'язами мух дикого типу. На зрізах виявлені численні пошкодження м'язової тканини. У мух дикого типу літальні м'язи мають чітко організовану структуру м'язових волокон та периферійно розташовані ядра (рис. 1 А). У мутантних особин 20-денного віку зі зниженим рівнем дистрофіну *dsDys/24B-Gal* (рис.1 Б) та зі зниженим рівнем дистроглікану *dsDys/24B-Gal4* (рис.1.В) спостерігались значні порушення структури м'язових волокон, вакуолізація і повна відсутність окремих м'язів. Опираючись на одержані результати можна зробити висновок, що, у дрозофіли, як і у людини, для забезпечення нормальної роботи м'язів упродовж життя є необхідним нормальне функціонування дистрофін-дистрогліканового комплексу.

**Дистрофін та дистроглікан необхідні для забезпечення полярності фоторецепторних аксонів мозку під час личинкової стадії.** Око дрозофіли побудоване за фасетковим типом і складається з ~800 омаїдій, кожна з яких містить вісім різних типів фоторецепторних нейронів R-типу, що проєктують свої аксони у дві чітко визначені ділянки мозку під час розвитку нервової системи на пізніх стадіях личинки. Аксони нейронів типу R1-R6 інервують поверхневі шари ламіни, формуючи структуру lamina plexus, натомість аксони нейронів типу R7 та R8 мігрують через ламіну в глибші шари медули<sup>4,5,6,7</sup> (рис.1 А). Характер формування та міграції аксонів фоторецепторів проходить на пізніх стадій розвитку личинки, розтягування ж ретинальних ділянок з формуванням тіл омаїдій відбувається під час метаморфозу<sup>8</sup>. Для того, щоб визначити, на якій саме стадії втрата дистроглікану призводить до появи мутантного фенотипу у фоторецепторних нейронах, ми індукували клоноутворення специфічно в очах (*eyFLP; FRT42D Dg<sup>323</sup>/FRT42D(12)cl-R11*) з подальшим препаруванням головного мозку личинок на пізніх стадіях розвитку. Для візуалізації аксонів нейронів R-типу використано специфічні





**Рис.2** Фарбування аксонів фоторецепторів головного мозку у клітин дикого типу (WT) та мутантів за дистрогліканом та дистрофіном.

моноклональні антитіла 24B10. У мозку мух дикого типу аксони фоторецепторів формують термінуючий сайт у вигляді півкола (рис.2 А). Гістохімічне фарбування мозків, у яких були присутні популяції клітин з повною втратою дистроглікану, виявило, що негативна регуляція цього білка не супроводжується порушеннями формування аксонів нейронів R-типу. Однак, в результаті детального аналізу прогресії цих відростків у глибші шари мозку показано, що за відсутності дистроглікану у 85% нейронів порушена нормальна термінація аксонів у ділянках оптичних долей (рис.2 Б). Більшість таких аксонів мігрувала у правильному напрямку в зоні ламіни, але з формуванням аномальних згустків у ділянці lamina plexus. Подібний фенотип був виявлений нами і у випадку мутантів за дистрофіном (рис.2 Г;  $Dys^{8-2}/KX43$ ) у 67-75 % випадків аксони термінувались аномально у ділянці lamina plexus з формуванням пропусків у зоні термінації, з відхиленнями від нормального шляху та з утворенням скупчень аксонів у нехарактерних ділянках, де мала б відбуватись термінація. Аналіз термінації аксонів у ділянках мозку показав, що одночасне зниження експресії дистрофіну та дистроглікану призводить до подібних порушень у термінації аксонів фоторецепторних клітин у ділянці lamina plexus (рис. 2 В;  $Dg^{323}/+, KX43/+$ ). Разом з тим жодних значних змін не було виявлено у гетерозиготних мух лише за геном дистроглікану ( $Dg^{323}/+$ ) або лише за геном дистрофіну ( $Dys^{8-2}/+$ ).

Таким чином, отримані нами результати свідчать про можливість використання дрозофіли як зручного генетичного об'єкту для вивчення структури, функції та регуляції компонентів ДГК. В роботі вперше показано, що крім класичної дегенерації м'язів взаємодія між дистрофіном і дистрогліканом є необхідною для забезпечення полярності аксонів фоторецепторів.

#### Література

1. Cohn R.D., Campbell K.P. Molecular basis of muscular dystrophies // Muscle Nerve. 2000. N23 P. 1456 – 1461.
2. Winder, S.J. The complexities of dystroglycan. Trends Biochem Sci. 2001 26, 118-124.
3. Benzer S Behavioral mutants of Drosophila isolated by countercurrent distribution. Proc Natl Acad Sci 1967 58: 1112–1119

4. *Perez, S.E. & Steller, H.* Migration of glial cells into retinal axon target field in *Drosophila melanogaster*. *J Neurobiol.* 1996. 30, 359-373.
5. *Tessier-Lavigne, M. & Goodman, C.S.* The molecular biology of axon guidance. *Science.* 1996. 274, 1123-1133.
6. *Clandinin, T.R. & Zipursky, S.L.* Making connections in the fly visual system. *Neuron.* 2002 35, 827-841.
7. *Ruan, W., Long, H., Vuong, D.H. & Rao, Y.* Bifocal is a downstream target of the Ste20-like serine/threonine kinase misshapen in regulating photoreceptor growth cone targeting in *Drosophila*. *Neuron.* 2002 36, 831-842.
8. *Izaddoost, S., Nam, S.C., Bhat, M.A., Bellen, H.J. & Choi, K.W.* *Drosophila* Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres. *Nature.* 2002 416, 178-183 2002.
9. *Shcherbata HR, Yatsenko AS, Patterson L, Sood VD, Nudel U, et al.* Dissecting muscle and neuronal disorders in a *Drosophila* model of muscular dystrophy. *Embo J.* 2007 26: 481-493.

### **Резюме**

У проведених дослідженнях вивчалися білки дистрофін та дистроглікан, які є основними компонентами дистрофін-глікопротеїнового комплексу *Drosophila melanogaster*. У отриманих мутантів втрата дистрофіну та дистроглікану призводила до зниження локомоторної активності, дегенерації м'язів та порушення полярності аксонів фоторецепторів.

В проведених дослідженнях изучались белки дистрофин и дистрогликан, которые являются основными компонентами дистрофин-гликопротеинового комплекса *Drosophila melanogaster*. У полученных мутантов потеря дистрофина и дистрогликана вызывала снижение локомоторной активности, дегенерацию мышц и нарушение полярности аксонов фоторецепторов. Сходные фенотипы были описаны при мышечных дистрофиях человека.

We have studied dystrophin and dystroglycan – highly conserved components of Dystrophin glycoprotein complex (DGC) in *Drosophila melanogaster*. Dystrophin and dystroglycan mutants in *drosophila* showed decreased climbing ability, muscle degeneration and disruption of axon guidance which resemble human case of muscular dystrophy.

**DMYTRUK K.V., DMYTRUK O.V., SIBIRNY A.A.**

*Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Department of molecular genetics and biotechnology, Drahomanov Street 14/16, Lviv 79005, Ukraine, e-mail : dmytruk@cellbiol.lviv.ua*

### **CONSTRUCTION OF URICASE-OVERPRODUCING STRAINS OF THE METHYLOTROPHIC YEAST *HANSENULA POLYMORPHA***

Uric acid is an end product from purine derivatives in human metabolism. The assay of uric acid in body fluids (e.g., serum and urine) is a clinically valuable diagnostic indicator [1]. The presence of elevated uric acid levels is a sign of gout, hyperuricemia, or Lesch-Nyhan

syndrome [2]. Similarly, elevated uric acid levels are related to other conditions including increased alcohol consumption, obesity, diabetes, high cholesterol, kidney disease, and heart diseases. Many epidemiological studies have suggested that serum uric acid is also a risk factor for cardiovascular disease [3].

Uricase (urate-oxygen oxidoreductase; urate oxidase, EC 1.7.3.3), is an enzyme in the purine degradation pathway and catalyzes the oxidation of uric acid in the presence of oxygen as an oxidizing agent, producing allantoin and CO<sub>2</sub> as oxidation products of uric acid and hydrogen peroxide as a reduction of O<sub>2</sub>. Uricase does not require any cofactor for the enzymatic oxidation, therefore, is widely used for the enzymatic determination of uric acid to diagnose gout and mentioned above diseases and conditions.

The methylotrophic thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* is one of the most important industrially applied non-conventional yeasts [4]. The utility of *H. polymorpha* in the production of recombinant therapeutic proteins as well as source and producer of technical enzymes has been well established [4]. Microbial sensors for alcohols, formaldehyde and L-lactate assays based on the employment of yeast cells *H. polymorpha* were constructed [5, 6, 7].

In this report we describe the construction of strains of *H. polymorpha* overproducing own uricase on the base of previously selected strain of *H. polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*) [5]. The optimal cultivation conditions for maximal yield of the target enzyme were found.

## Materials and methods

### *Strains and media*

Cultivation of the *H. polymorpha* CBS4732 (*leu2-2*) [8] and C-105 (*gcr1 catX*) [5] were performed in flasks on a shaker (200 rpm) at 37 °C in a medium containing (g L<sup>-1</sup>): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 3.5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1.0; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O - 0.5; CaCl<sub>2</sub> - 0.1; yeast extract - 6. A glucose (20 g L<sup>-1</sup>) was used as a carbon source. For induction of uricase the cells from the mid-exponential growth phase were washed once in the mineral medium and transferred to the shake flask cultures supplemented with 4 g L<sup>-1</sup> uric acid as the carbon source. C-105 (*gcr1 catX*) was grown on YPS at 37 °C and used as a recipient for transformation experiments. For the selection of yeast transformants on YPS, 0.5–1.5 mg mL<sup>-1</sup> of the antibiotic G418 was added. The *Escherichia coli* strain DH5α (Φ80*dlacZ*ΔM15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ(*lacZYA-argF*)U169) was used as a host for propagation of plasmids. The strain DH5α was grown at 37 °C in LB medium as described previously [9]. Transformed *E. coli* cells were maintained on a medium containing 100 mg L<sup>-1</sup> ampicillin.

### *Plasmid construction and molecular techniques*

The *H. polymorpha* uricase gene with terminator region and alcohol oxidase gene promoter were amplified from the genomic DNA of *H. polymorpha* strain CBS4732 using the corresponding pairs of primers Ko189 5'-CAA TCT AAA GTA CAA AAA CAA AGG TAC CAT GGC TGT CCT GCA ATC GTC-3' (*KpnI*) / Ko190 5'-CCG GGA TCC TAC TCT TTG ATT GCC TCC-3' (*Bam*HI) and Ko184 5'-CGC GGA TCC CCA TCG AAT GTA ATG AGC-3' (*Bam*HI) / Ko188 5'-GAC GAT TGC AGG ACA GCC ATG GTA CCT TTG TTT TTG TAC TTT AGA TTG-3' (*KpnI*). Primers Ko184 and Ko190 were used for obtaining of the ~ 2.3 kb fragment containing the *H. polymorpha* uricase gene with terminator region driven by the alcohol oxidase gene promoter by overlap PCR. This fragment was treated with restriction endonuclease *Bam*HI and cloned into the *Bam*HI linearized and dephosphorylated plasmid pGLG61 [10], resulting in the recombinant constructs pGLG61\_UOX.

Standard cloning techniques were applied [9].

### *Urate oxidase assay*

Urate oxidase activity in cell extracts was determined spectrophotometrically by following the decrease of the absorbance at 293 nm in an assay mixture containing 0.1 mM

uric acid in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.9) [11]. The reaction was started with cell extract addition.

Strains with elevated UOX enzyme activity were screened by a plate patch assay, on the basis of visualization of UOX activity by the rate of hydrogen peroxide formation in reaction with urate as monitored by the peroxidative oxidation of *o*-dianisidine in the presence of peroxidase resulted purple colour of patches. For this purpose, the transformants formed were patched onto agar mineral medium plates supplemented with glucose. After 18 h of incubation at 37 °C, the plates were overlaid with 9 ml of the urate oxidase activity assay mixture, containing 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.9), 0.7% (wt/vol) agar, digitonin (1 mg·mL<sup>-1</sup>), *o*-dianisidine (0.5 mg·mL<sup>-1</sup>), peroxidase Sigma RZ 1.1 (0.13 mg·mL<sup>-1</sup>), and uric acid (0.1 mM). The overlying assay mixture was allowed to set, and the plates were incubated at 37 °C for up to 1 h. Patches that stained purple faster, were selected.

All assay experiments were repeated at least twice.

### Results and discussion

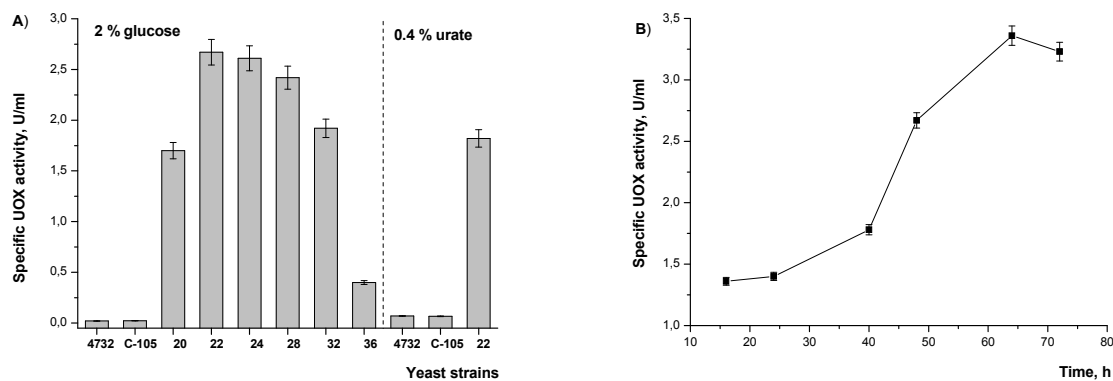
The recombinant plasmid pGLG61\_UOX was transformed to the recipient strain *H. polymorpha* C-105 (*gcr1*, *catX*). The transformants were grown on YPS medium in the presence of increasing concentrations of G418. The highest concentration of G418 which allow the transformants to growth was 1 mg mL<sup>-1</sup>. The presence of the expression cassette in the stable transformants was examined by diagnostic PCR using primers Ko184/Ko190 and genomic DNA of stable transformants as a template. Fragments of predictable size (~2.3 kb) were obtained (data not shown).

Parental strain C-105 has impairment in glucose catabolite repression of AOX synthesis resulting induction of AOX in a glucose containing growth medium [5]. Stable transformants bearing UOX under control of AOX promoter with increased UOX enzyme activity were screened by a plate patches assay in solid glucose containing medium as described in the Material and methods section. Finally, six positive recombinant strains (20, 22, 24, 28, 32 and 36) which stained more intensive in the presence of 0.1 mM uric acid were selected.

The level of UOX activity in cell-free extracts of the selected strains was measured. Recombinant strains were cultivated in glucose containing medium. As shown in Fig. 1 A, UOX activity of the selected strains was ranged between 0.4 and 2.67 U ml<sup>-1</sup>, while the initial strain *H. polymorpha* C-105 at the same growth conditions had barely perceptible enzyme activity. For induction of uricase the cells of C-105 were cultivated in urate containing medium. UOX activity of C-105 cultivated under inducing conditions was 0.067 U ml<sup>-1</sup>. Thus the best strain 22 showed forty-fold higher UOX activity as compared to the initial strain.

The dependence of UOX activity of strain 22 from growth phase represented on Fig. 1 B. The maximal level of UOX activity in cell-free extracts occurred on 64 h of cells cultivation and reached to 3.36 U ml<sup>-1</sup>. Obtained results are in good arrangement with the dynamics of AOX activity in C- 105 during cultivation on the same medium. The peak of AOX activity observed on 50-60 h of cells cultivation (unpublished data).

Although constructed strains are significantly inferior to commercial available procedures of recombinant uricase from *E. coli* or *Saccharomyces cerevisiae* in productivity [12, 13], the genetic background makes constructed strains an ideal biorecognition element for the construction of microbial urate-selective amperometric biosensor. Block in catalase activity provides the generation of hydrogen peroxide as a result of urate oxidation that could be easily detected amperometrically. The impairment in the glucose repression of constructed strains possessed overproduction of UOX in a low-priced glucose-containing growth medium. Currently, the cells of constructed UOX-overproducing strain 22 extensively investigated for further utilization as biorecognition element for the construction of microbial urate-selective amperometric biosensor.



**Figure 1.** A) Specific UOX activity in cell-free extracts of the initial strains and the recombinant strains grown in media supplemented with 2% glucose or 0.4% urate during. B) Time profile of UOX activity in cell-free extracts of the recombinant strain 22 in the dynamics of the yeast growth.

### Conclusions

Strain of *H. polymorpha* overproducing own UOX have been constructed. Genomic integration of expression cassette of uricase gene under the control of the strong *H. polymorpha* AOX promoter resulted increasing the UOX activity up to 3.36 U ml<sup>-1</sup>. A method for preliminary screening of the recombinant strains with an increased UOX activity in permeabilized cells was developed. The conditions for strain cultivation were optimized to ensure the maximal synthesis of the target enzyme. The constructed strain may be used for the development of microbial urate-selective amperometric biosensor.

### References

1. Bhargava A.K., Lai H., Pundir C.S. Discrete analysis of serum uric acid with immobilized uricase and peroxidase // J. Biochem. Biophys. Methods.- 1999.-vol. 39, P.125–136.
2. Zen J.M., Hsu C.T. A selective voltammetric method for uric acid detection at Nafion-coated carbon paste electrodes // Talanta- 1997.-vol. 46, P.1363–1369.
3. Inoue K., Namiki T., Iwasaki Y., Yoshimura Y., Nakazawa H. Determination of uric acid in human saliva by high-performance liquid chromatography with amperometric electrochemical detection // Journal of Chromatography- 2003.-vol. 785, P.57–63.
4. Gellissen G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts // Appl. Microbiol. Biotechnol.- 2000.-vol. 54, P.741-750.
5. Gonchar M.V., Maidan M.M., Moroz O.M., Woodward J.R., Sibirny A.A. Microbial O<sub>2</sub>- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-electrode sensors for alcohol assays based on the use of permeabilized mutant yeast cells as the sensitive bioelements // Biosens. Bioelectron.- 1998.- vol. 13, P.945-952.
6. Khlopova M., Kuznetsov B., Demkiv O., Gonchar M., Csoregi E., Shleev S. Intact and permeabilized cells of the yeast *Hansenula polymorpha* as bioselective elements for amperometric assay of formaldehyde // Talanta- 2007.- vol. 71, P.934–940.
7. Smutok O., Dmytruk K., Gonchar M., Sibirny A., Schuhmann W. Permeabilized cells of flavocytochrome b2 over-producing recombinant yeast *Hansenula polymorpha* as biological recognition element in amperometric lactate biosensors // Biosens Bioelectron.- 2007.- vol. 23, P.599-605.
8. Lahtchev K.L., Semenova V.D., Tolstorukov I.I., van der Klei I., Veenhuis M. Isolation and properties of genetically defined strains of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* CBS4732 // Arch. Microbiol.- 2002.- vol 177, P.150–158.
9. Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York.- 1989.

10. Sohn J., Choi E., Kang H., Rhee J., Agaphonov M., Ter-Avanesyan M., Rhee S. A dominant selection system designed for copy-number-controlled gene integration in *Hansenula polymorpha* DL-1 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*- 1999.- vol. 51, P.800–807.
11. Veenhuis M., Hoogkamer-Te Niet M.C., Middelhoven W.J. Biogenesis and metabolic significance of microbodies in urate-utilizing yeasts // *Antonie Van Leeuwenhoek*-1985.-vol. 51, P.33-43.
12. Li J., Chen Z., Hou L., Fan H., Weng S., Xu C., Ren J., Li B., Chen W. High-level expression, purification, and characterization of non-tagged *Aspergillus flavus* urate oxidase in *Escherichia coli* // *Protein Expr. Purif.*- 2006.- vol. 49, P.55-59.
13. Leplatois P., Douarin B., Loison G. High-level production of a peroxisomal enzyme: *Aspergillus flavus* uricase accumulates intracellularly and is active in *Saccharomyces cerevisiae* // *Gene*- 1992.- vol. 122, P.139-145.

### Abstract

Strains of *Hansenula polymorpha* overproducing own uricase (UOX) have been constructed. Uricase gene under the control of the strong *H. polymorpha* alcohol oxidase promoter was multicopy integrated to the recipient strain *H. polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*). The recombinant producer characterized by a forty-fold increased UOX enzyme activity (up to 3.36 U ml<sup>-1</sup> in cell-free extract) compared to the initial strain.

Сконструированы штаммы *Hansenula polymorpha* с усиленной экспрессией собственной уриказы. Ген уриказы под контролем сильного промотора гена алкогольоксидазы *H. polymorpha* введён в геном реципиентного штамма *H. polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*). Рекомбинантный штамм характеризировался сорокакратным увеличением активности уриказы (3.36 МЕ мл<sup>-1</sup> в бесклеточных экстрактах) в сравнении с исходным штаммом.

Сконструйовані штами *Hansenula polymorpha* з посиленою експресією власної урікази. Ген урікази під контролем сильного промотора алкогольоксидази *H. polymorpha* було введено в геном реципієнтного штаму *H. polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*). Рекомбінантний штаб характеризувався підвищенням активності урікази в 40 разів (3.36 МЕ мл<sup>-1</sup> в безклітинних екстрактах) у порівнянні з вихідним штамом.

**OLENKINA O.M., OLENINA L. V., LAVROV S.A., KLENOV M. S., GVOZDEV V.A.**  
*Department of Animal Molecular Genetics, Institute of Molecular Genetics,*  
*Kurchatov sq., 2, Moscow, 123182, Russia; e-mail: [olenkina@img.ras.ru](mailto:olenkina@img.ras.ru)*

### ANALYSIS OF TESTIS - EXPRESSED *STELLATE* GENES PROMOTER REGION IN *D. melanogaster*

The first described case of a natural RNA-mediated silencing found to be necessary for male fertility maintenance was discovered in *Drosophila* (Aravin et al., 2001). In wild-type testes, hyperexpression of tandemly repeated X-linked *Stellate* genes is prevented by homologous, bidirectionally transcribed Y-linked *Suppressor of Stellate* repeats (*Su(Ste)*), and deletion of *Su(Ste)* leads to abnormalities of spermatogenesis (Palumbo et al., 1994). In the *Drosophila* germline, selfish genetic elements, such as retrotransposons and repetitive sequences, are suppressed by rasiRNAs (Vagin et al., 2006). However, a little is known about classical transcription regulation of the *Stellate* genes. The expression of the *Stellate* genes is restricted to *D. melanogaster* testes. The transcription start site was determined in (Livak,

1990) by primer extension experiments. Sequence in -30 region upstream transcription start has shown no TATA-element similarity, so the *Stellate* gene promoter appears to be TATA-less but initiator-containing one. As we have shown earlier (Aravin et al., 2001) a 134 bp-long region containing *Stellate* initiator site is sufficient for high-level expression of transgene reporter *LacZ* in testes of *cry<sup>1</sup>* males. This result provides a strong evidence for a presence of *cis*-regulatory sites within this region. In this article, we present our analysis of the promoter region of the *Stellate* genes.

### Materials and methods

**Reporter construction design.** For PCR amplification, a plasmid template containing 6 full-length *Stellate* genes was used. PCR amplifications of *Stellate* regulatory sequences with primers, generating a duplex with 5' overhangs containing sites for XbaI and BamHI, and ligation in pCaSpeR- $\beta$ -gal vector opened with XbaI and BamHI, were performed as in Aravin et al., 2001.

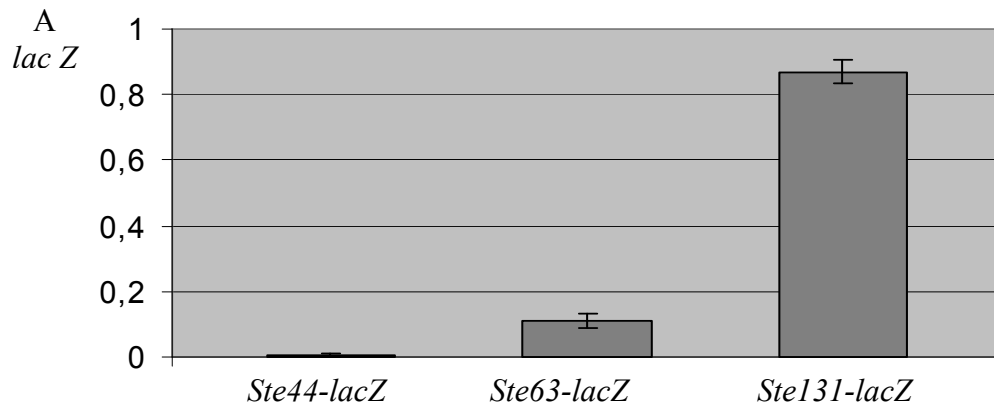
**Drosophila strains, transformation, and genetic crosses.** Flies were reared on standard medium at 25°C. P-element-mediated germline transformation of *Df(1)w<sup>67c23(2)</sup>y* embryos was performed according to standard protocol (Rubin and Spradling, 1982). The number of insertions in genome was estimated by Southern blot. The strain with deletion of the bulk of *Su(Ste)* repeats on the Y chromosome was *cry<sup>1</sup>Y*, described in Palumbo et al., 1994. To produce males carrying the *cry<sup>1</sup>Y* chromosome, *Df(1) w<sup>67c23(2)</sup>y* females were crosses to *X/cry<sup>1</sup>B<sup>s</sup>Yy<sup>+</sup>* males.

**Testis nuclear extract preparation.** It was prepared as in (Dignam et al., 1983) with minor modifications.

**Electromobility shift assay.** The binding probes were terminally [<sup>32</sup>P]-labeled with T4 polynucleotide kinase. Testis nuclear extract 10-15 micrograms was incubated for 20 min at room temperature with 0.3-0.6 pmol of labeled oligonucleotide. All binding reaction were carried out in 20 mM HEPES pH7.6, 50-60 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 5% glycerol, 20 ng/ $\mu$ l poly(dI-dC), 0.1 ng/ $\mu$ l heparin in total volume of 15  $\mu$ l. DNA-protein complexes were resolved by 5% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis in 0.75xTris-borate-EDTA buffer with 2.5% glycerol at 8°C.

### Results and discussion

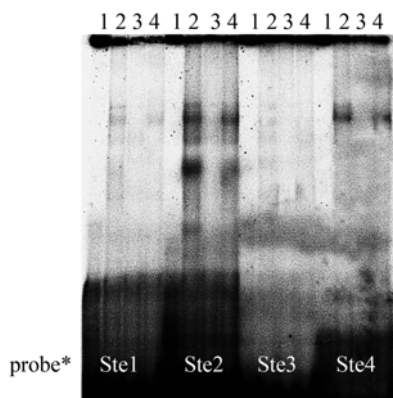
**Determination of 5' border of proximal promoter region of *Stellate* genes.** General approach taken to determine upstream borders of gene transcription-control regions involves creating a set of 5'-deleted reporter constructs. It was previously shown that *lacZ* reporters driven by 5' *Stellate* fragments carrying the *Ste225-lacZ* and *Ste131-lacZ* constructs were sufficient to provide high-level expression of  $\beta$ -galactosidase in *cry<sup>1</sup>Y* males testes (Aravin et al., 2001). 134 bp 5'-fragment of *Stellate* heterochromatin gene contains 33 bp of 5'-transcribed region from ATG start codon, and promoter-proximal region lying 101 bp upstream of the start site. To determine whether the 134 bp fragment can be account as minimal promoter region of the *Stellate* genes, we constructed two additional 5'-deletion mutant constructs of *Stellate* promoter-proximal region *Ste63-lacZ* and *Ste44-lacZ* with *lacZ*-reporter gene, and established the transgenic fly lines by P-element-mediated germline transformation. Both mutant constructs also contained 33 bp of 5'-transcribed region of *Stellate* gene sequence downstream from the ATG start codon fused with *lacZ* gene and untranscribed 5' upstream fragments of *Stellate* heterochromatin gene of 30 bp or 11 bp, respectively. Analysis of  $\beta$ -galactosidase activity in dissected testes from the *cry<sup>1</sup>* males revealed that  $\beta$ -galactosidase expression of the *Ste63-lacZ* was significantly weaker than that of the *Ste131-lacZ* (fig.1).



**Figure 1.** Activity of  $\beta$ -galactosidase expressed in testes of *D. melanogaster* under control of the *Stellate* promoter sequences of different sizes.

The *Ste44-lacZ* construct did not show  $\beta$ -galactosidase activity and did not differ markedly from control fly lines, which were used for P-element transformation. In our experiments, only flies bearing the *Ste131-lacZ* construct allowed high-level expression of the lacZ reporter in testes. As a result, we consider the fragment of 134 bp (-101 bp upstream and +33 bp downstream transcription start site) to be a minimal promoter region of the *Stellate* genes, which is sufficient for their correct testes-specific transcription. We suppose that the short 71 bp fragment (from -101 bp to -30 bp) shared by the *Ste131-lacZ* and the *Ste63-lacZ* constructs contains a *cis*-acting protein-binding control element, or a few elements, which regulate *Stellate* gene transcription in testes.

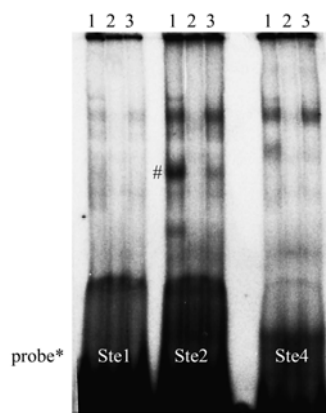
*Identification of cis-acting elements within Stellate promoter.* To solve the question which *cis*-acting elements for testes-specific transcription are present in *Stellate* promoter, electromobility shift assay was performed. We used four 5'-radiolabeled oligonucleotides in 27-37 bp encompassing the minimal promoter of 134 bp and named Ste1, Ste2, Ste3 and Ste4 as probes. We observed three specific DNA-protein complexes formed with Ste1, Ste2, and Ste4 oligonucleotides, respectively, after their incubation with testis nuclear extract (fig.2). In all of these cases, 50-fold excess of unlabeled specific oligonucleotide was able to compete for binding, whereas nonspecific was not. The signal intensity of binding complexes decreased reproducibly in next array: Ste2 > Ste4 > Ste1. Within Ste2 we found palindrome hexanucleotide sequence CACGTG. Sequence CANNTG is well known as transcription control element named E-box (Atchley et al., 1997; Ledent and Vervoort, 2001). We aligned Ste1 and Ste4 oligonucleotides using Ste2 as a template and found that both of them contained degenerated E-box sequences: CATCTG and CAAGTG, respectively.



**Figure 2.** Electromobility shift assay. 1- without extract; 2, 3, 4- with testis nuclear extract; 3- in presence of 50-fold excess of unlabeled specific oligonucleotide; 4- in presence of 50-fold excess of unlabeled nonspecific oligonucleotide.



To verify if this testes-specific protein factor binds just E-box in the Ste2 sequence, we performed gel shift assay with mutated Ste2 oligonucleotide, Ste2mut, where E-box CACGTG sequence was replaced by GGCTAT. Using Ste2mut as radiolabeled probe with testis nuclear extract abolished the gel shift (data are not shown). These observations suggest that the gel shift complex of Ste2 oligonucleotide is determined by the E-box motif. We also have noted that all three complexes run shifted probes in gel nearly with the same mobility. To confirm that all three oligonucleotides Ste1, Ste2 and Ste4 bind the same factor, we designed cross-competition assay. We assumed that the unlabeled Ste2 oligonucleotide containing the perfect E-box would compete with all E-box-containing oligonucleotides for the E-box binding factor, whereas Ste2mut would not. Actually, we observed that the 70-fold molar excess of unlabeled Ste2 competed effectively for complex formation with all three radiolabeled oligonucleotides, however the same excess of unlabeled Ste2mut did not affect the binding (fig. 3). Therefore, we determined three *cis*-acting motifs within minimal *Stellate* promoter to be E-boxes and detected the single protein factor from testis nuclear extract interacting with them *in vitro* in our experiments.



**Figure 3.** Cross-competition shift assay. Testis nuclear extract was incubated with oligonucleotide probes. 1- without competitors; 2- in presence of 70-fold excess of unlabeled Ste2 oligonucleotide; 3- in presence of 70-fold excess of unlabeled Ste2mut oligonucleotide. #-unspecific binding.

*Discussion.* The most of genes are transcribed during the organism life cycle according to the environmental conditions and in certain cell types and organs. The changing set of transcription factors provides control of place, time, and level of transcription for every particular gene. The composition of transcription factors binding sites (*cis*-regulatory regions) near a gene is the major determinants of its expression. The binding sites comprise a small part of nucleotides within promoter region. This fraction ranges from 10-20% within well-studied regulatory regions (Wray et al., 2003). Some genes analyzed to date, expressing only during *Drosophila* spermatogenesis, have extremely short regulatory regions located near basal promoter (Santel, 2000; Blumer et al., 2002). Here we determined a fragment of 134 bp as a minimal promoter region of the *Stellate* genes, which is sufficient for their correct testes-specific transcription. We identified three *cis*-regulatory sites within this minimal *Stellate* promoter *in vitro*. These *cis*-regulatory sites are known as E-boxes. The perfect E-box CACGTG is located from -47 bp to -42 bp upstream transcription start site of the *Stellate* gene. It resides within the promoter fragment of 71 bp which has been shown above to be responsible for the high-level expression of the reporter gene. E-box regulatory sites have been identified in a lot of promoter and enhancer elements. The E-box motif is known as cognate recognition sequence for basic helix-loop-helix (bHLH) superfamily of transcriptional regulatory proteins that are found in organisms ranging from yeast to humans.

According to our data, we can expect that the protein which binds to the E-boxes in our experiments also belongs to the bHLH superfamily.

### Conclusions

We determined fragment of 134 bp (-101 bp upstream and +33 bp downstream transcription start site) to be minimal promoter region of the testis-expressed *Stellate* genes in *D. melanogaster*. We also identified three *cis*-regulatory sites within it to be E-boxes and showed that all of them interacted with the same DNA-binding factor from testis nuclear extract.

### References

1. *Aravin A.A. et al.* Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline//*Curr.Biol.*-2001.-v.11(13).-P.1017-1027.
2. *Palumbo G et al.* Genetic analysis of *Stellate* elements of *Drosophila melanogaster*//*Genetics.*-1994.-v.138.-P.1181-1197.
3. *Vagin V.V. et al.* A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline//*Science.*-2000.-v.313(5785).-P.320-324.
4. *Livak K.* Detailed structure of the *Drosophila melanogaster stellate* genes and their transcripts//*Genetics.*-1990.-v. 124(2).-P.303-316.
5. *Rubin G. and Spradling A.* Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors//*Science.*-1982.-v.218.-P.348-353.
6. *Dignam J.D. et al.* Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei//*Nucleic Acid Res.*-1983.-v.11.-P.1475-1489.
7. *Atchley W. and Fitch W.* A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors//*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*-1997.-v.94(10).-P.5172-5176.
8. *Ledent V. and Vervoort M.* The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis//*Genome Res.*-2001.-v.11(5).-P.754-770.
9. *Wray GA et al.* The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes//*Mol. Biol. Evol.*-2003.-v 20(9).-P.1377-1419.
10. *Santel A et al.* The initiator element of the *Drosophila*  $\beta$ 2tubulin gene core promoter contributes to gene expression in vivo but not required for male germline specific expression//*Nucleic Acid Res.*-2000.-v.28.-P.1439-1446.
11. *Blumer N et al.* A new translational repression element and unusual transcriptional control regulate expression of don juan during *Drosophila* spermatogenesis//*Mech. Dev.*-2002.-v.110.-P.97-112.

### Abstract

Here we present our analysis of a promoter-proximal region of *Stellate* genes expressed in *D. melanogaster* germline. We determined the minimal core promoter of *Stellate* genes using the series of deletion transgene constructs. We analyzed this region by gel shift assay and revealed three E-box sites which bound to the protein factor from testis nuclear extract.

Здесь мы представляем наш анализ промоторной области генов *Stellate*, экспрессирующихся в герминальных клетках *D.melanogaster*. Мы определили минимальный коровый промотор с помощью делеционных трансгенных конструкций. Мы проанализировали его с помощью гель-шифта и выявили три E-бокса, связывающихся с белковым фактором из ядерного экстракта семенников.

Тут ми представляємо наш аналіз промоторної ділянки генів *Stellate*, що експресується в гермінальних клітинах *D.melanogaster*. Ми визначили мінімальний коровий промотор за допомогою делеційних трансгенних конструкцій. Ми проаналізували його за допомогою гель-шифту та виявили три ділянки так званих E-боксів, що зв'язуються з білковим фактором з ядерного екстракту семенників.

## ГЕНЕТИКА ЛЮДИНИ ТА МЕДИЧНА ГЕНЕТИКА

**БАРИЛЯК І.Р., НЕУМЕРЖИЦЬКА Л.В., ЄВТУШОК Л.Є., ШКАРУПА В.М.**

*Науковий центр радіаційної медицини АМН України*

*040050, Київ, вул. Мельникова, 53*

### **ОЦІНКА ВРОДЖЕНИХ ВАД РОЗВИТКУ В ПІВНІЧНО-ЗАХІДНОМУ РЕГІОНІ УКРАЇНИ**

Останнім часом в Україні спостерігається зростання частоти вроджених вад розвитку та спадкової патології. Однією з причин цього є екологічне неблагополуччя, забруднення довкілля шкідливими чинниками хімічної та фізичної природи, нераціональне харчування, надмірне вживання алкоголю тощо [1]. Очевидно, важливу роль у цьому процесі відіграють фактори Чорнобильської катастрофи, проте достовірних даних щодо останнього на сьогодні ще не існує.

В зв'язку з цим принципово важливим є впровадження принципів генетичного моніторингу, які дають можливість налагодження попередження вад розвитку з врахуванням стану довкілля.

На сьогодні така система найкраще функціонує у Рівненській та Волинській областях, оскільки вона використовує досвід багатьох країн світу та базується на реєстрі новонароджених, реєстрі вроджених вад розвитку [2,3].

#### **Матеріал та методи**

Матеріалами для виконання дослідження слугували звіти обласних медико-генетичних центрів (форма №49 – здоров., затверджена наказом МОЗ України від 16.06.93 за №141), а також даними акушерсько-гінекологічної та патанатомічної служб. Аналіз стану навколишнього середовища проводився за матеріалами Наукового центру радіаційної медицини АМН України, Держкомстату України [4-6].

#### **Результати та обговорення**

За статистичними матеріалами обласної медико-генетичної консультації Рівненської області нами було проаналізовано частоту вроджених вад розвитку в області за період з 1997 по 2006 роки. Результати аналізу цих патологій в Україні представлені в таблиці 1. Середні показники частоти ВВР по області за вказаний період коливалися в межах від 31,7 до 50,2 хворих на 1 000 н/н. Аналіз динаміки змін частоти ВВР показав, що за період з 1997 по 2001 роки частота цих патологій в області залишалась приблизно на однаковому рівні (коливання в межах 28,4-33,8 хворих на 1000 н/н), проте він перевищував середню частоту ВВР по Україні (26,0). З 2002 по 2004 роки в області спостерігалось значне збільшення частоти ВВР, пік зростання припадав на 2004 рік (50,2 хворих на 1000 н/н відповідно). У наступні роки відмічалась тенденція до зменшення частоти вроджених вад розвитку серед новонароджених (37,7, 35, та 36,7 хворих/1 000 н/н), але частота цих патологій залишалась значно більшою, ніж в середньому по Україні та в цій області за період з 1997 по 2001 роки [7].

Привертає увагу те, що за кожен рік дослідженого періоду частота ВВР у Рівненській області значно перевищувала середню частоту ВВР по Україні. Так, середня частота ВВР по області за період 1997–2006 рр. в 1,41 рази перевищує середнє значення частоти ВВР по Україні (36,7 та 26,0 на 1 000 н/н відповідно). А у 2004 році вона перевищувала середнє значення частоти ВВР по Україні в 1,93 рази.

Отримані дані базуються на середніх показниках досліджуваних патологій по області в цілому. Для виявлення можливих відмінностей в розподілі цих патологій на рівні районів було проведено аналіз частоти вроджених вад серед новонароджених за районами області. Результати представлені в таблиці 2.

Частота вроджених вад розвитку в різних районах області за досліджуваний період досить сильно відрізняється. Найменша частота ВВР в середньому за цей період відмічалась у Рокитнівському районі – 6,6-24,6 хворих на 1 000 н/н, а найбільша – у Дубровицькому – 40,5–88,9 на 1 000 н/н, при середньому показнику цієї патології по

області 36,7 на 1 000 н/н. У Володимирецькому, Корецькому, Костопільському районах частота ВВР була нижчою за середній по області рівень.

Таблиця 1

**Частота вроджених вад розвитку в Рівненській області по роках**

Роки	Частота ВВР (на 1000 н/н)
1997	34,6
1998	33,8
1999	28,4
2000	31,7
2001	32,6
2002	39
2003	44,3
2004	50,2
2005	37,7
2006	35
У середньому	36,7

Таблиця 2

**Показники частоти ВВР в адміністративних районах Рівненської області по роках**

Район	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Березнівський	54,7	63,3	48,7	41,3	40,2	38,4	57,8	77,6	67,0	51,9
Володимирецький	11,9	10,0	15,9	18,6	16,3	16,6	17,4	18,0	33,4	46,7
Гоцанський	20,0	13,4	15,4	52,5	50,3	54,3	41,8	56,5	44,3	67,9
Дубенський	34,4	23,3	25,6	51,8	40,9	43,0	30,0	34,0	29,8	23,9
Дубровицький	72,8	88,9	77,4	40,5	54,7	59,8	66,4	86,3	65,0	63,7
Демидівський	14,8	14,3	5,7	31,9	51,4	47,1	75,8	107,0	24,7	40,9
Зарічненський	66,3	19,3	22,2	11,2	6,8	6,8	17,1	35,6	18,3	21,2
Здолбунівський	17,4	28,8	5,4	19,8	18,1	17,3	37,1	32,5	45,6	13,7
Корецький	21,6	31,5	14,3	4,9	27,5	30,4	34,8	43,0	18,4	17,6
Костопільський	28,2	11,7	20,8	11,4	17,5	17,4	19,6	25,7	13,5	13,0
Млинівський	17,9	18,5	20,4	33,8	14,3	15,4	51,5	45,6	44,3	23,9
Острозький	17,4	20,9	37,0	42,3	75,4	74,0	74,9	63,7	35,0	31,3
Радивилівський	74,6	91,2	73,3	60,2	30,4	101,0	126,5	138,4	92,1	71,4
Рівненський	6,7	5,2	8,1	19,9	26,7	43,3	27,5	10,7	23,3	8,7
Рокитнівський	6,0	7,8	7,9	16,5	6,7	24,6	17,7	13,3	16,2	17,6
Сарнівський	65,5	55,3	40,3	38,6	48,1	38,0	35,7	37,9	43,3	31,1
м. Рівне	58,3	67,7	45,1	44,0	29,3	35,8	22,1	27,2	27,0	50,5

Вищий за середній по області рівень частоти ВВР спостерігався у Гоцанському, Березнівському, Сарнівському районах, в м. Рівне. Показники частоти ВВР в цих районах в 1,7–1,82 раза перевищували середній по області рівень. Особливу увагу привертає те, що навіть у районах, де частота ВВР є нижчою за середній показник по області, вона все ж залишається на високому рівні порівняно з аналогічним по Україні.

Подібні дані отримані і при аналізі частоти вроджених вад розвитку у Волинській області. За статистичними матеріалами обласної медико-генетичної консультації Волинської області нами було проаналізовано частоту вроджених вад розвитку в області за період з 1996 по 2005 роки. Результати аналізу та порівняння із середнім значенням цих патологій в Україні представлені в табл. 3. Середні показники частоти ВВР по області за вказаний період коливалися в межах від 33,13 до 46,03 хворих на 1 000 н/н. Аналіз динаміки змін частоти ВВР показав, що за період з 1996 по 2003 рік спостерігалось поступове збільшення частоти цих патологій в області, причому піки зростання припадали на 1998 та 2003 роки. (45,50 та 46,03 хворих на 1 000 н/н відповідно). У 2004 році відмічалася тенденція до зменшення частоти вроджених вад розвитку серед новонароджених (33,13 хворих/1000 н/н), але у 2005 році частота патологій зростала до 37,32 на 1 000 н/н.

Таблиця 3

**Частота вроджених вад розвитку у Волинській області по роках**

Роки	Новонароджених	ВВР	Частота ВВР, хворих/1 000 нн
1996	13 468	449	33,34
1997	12 897	439	34,04
1998	12 615	574	45,50
1999	11 798	488	41,36
2000	12 042	506	42,02
2001	11 403	485	42,52
2002	11 780	483	40,65
2003	11 883	547	46,03
2004	12 468	413	33,13
2005	12 756	476	37,32
Всього	123 110	4860	39,48

Привертає увагу те, що за кожен рік дослідженого періоду частота ВВР у Волинській області значно перевищувала середню частоту ВВР по Україні. Так, середня частота ВВР по області за період з 1996–2005 рр. в 1,52 рази перевищує середнє значення частоти ВВР по Україні (39,48 та 26,0 на 1 000 н/н відповідно). А у 1998 та 2003 роках вона перевищувала середнє значення частоти ВВР по Україні в 1,75 та 1,77 рази.

Аналіз проведених досліджень показав, що, як правило, найбільша частота ВВР спостерігається в районах з високим рівнем хімічного забруднення: від 45,2 до 56,6 – у Волинській області (при середній частоті 38,7/1000 новонароджених), від 23,6 до 85,9 – у Рівненській (середня – 36,7/1000 новонароджених).

Щодо впливу радіаційних чинників Чорнобильської катастрофи, то, за даними проведеного дослідження, в обстежених областях частота вроджених вад розвитку не залежала від рівня радіоактивного забруднення. Разом з тим, найчастіше досліджувана патологія мала місце в районах з комбінованим впливом чинників хімічного та радіоактивного забруднення.

**Висновки**

Встановлено, що у Волинській і Рівненській областях рівень вроджених вад розвитку значно перевищує середньо державний і залежить від стану довкілля в цих областях (хімічного та комбінованого радіоактивного і хімічного забруднення).

### **Література.**

1. *Баріляк І.Р.* Проблеми профілактики спадкової патології та вроджених вад розвитку // Журнал АМН України. – 2003. – Т.4, №; – С.656-667.
2. *Баріляк І.Р.* Генетичний моніторинг і його роль у профілактиці спадкової патології та природжених вад розвитку у дітей // Пед., акуш. та гінек. – 1999, №4. – С.147.
3. Introduction of international standarts and birth defect surveillane in Ukraine / I Intern.Symp. on Prevention and Epidemiology of Congenital malformations (15-16 Sept, 2000). – Cardiff, 2000. – P.78-79.
4. Атлас радіоактивного забруднення України. – К.: Мін. надзв. сит. України, 2002. – 24с.
5. Довкілля України, Стат. Зб., Держкомстат України. – К., 2004. – 264с.
6. Населення України, 2000р. Статистичний щорічник. – К.: Держкомстат України, 2004. – 208с.
7. Надання медико-генетичної допомоги в Україні. – К.: Міністерство охорони здоров'я України, Центр медичної статистики МОЗ України, 2002. – 84 с.

### **Резюме**

Проаналізовано частоту вроджених вад розвитку в Рівненській та Волинській областях на обласному та районних рівнях за період з 1997 по 2006 роки. Встановлено, що у зазначених областях рівень вроджених вад розвитку значно перевищує середньодержавний і залежить від стану довкілля в цих областях (хімічного та комбінованого радіоактивного і хімічного забруднення).

Проанализирована частота врождённых пороков развития в Ровенской и Волынской областях на областном и районном уровнях за период с 1997 по 2006 год. Установлено, что в указанных областях уровень врождённых пороков развития значительно превышает средний по стране и зависит от состояния окружающей среды в этих областях (химического и комбинированного радиоактивного и химического загрязнения).

Frequency of congenital developmental anomalies in the Rivno and Volynsk areas at regional levels for the period with 1997 for 2006 is analysed. It is established, that in the specified areas the level of congenital developmental anomalies considerably exceeds average on the country and depends on a condition of an environment in these areas (chemical and combined radioactive with chemical pollution).

### **БАРИЛЯК І.Р., ШКАРУПА В.М.**

*Науковий центр радіаційної медицини АМН України  
Україна, 040050, Київ, вул. Мельникова, 53*

### **ТЕОРЕТИЧНІ МОДЕЛІ В АНАЛІЗІ ДОЗОВИХ ЗАЛЕЖНОСТЕЙ МУТАГЕННОЇ ДІЇ МІТОМІЦИНУ С В ДОСЛІДАХ НА ALLIUM SERA L.**

Аналіз дозових залежностей цитогенетичних пошкоджень при дії радіації і хімічних мутагенів є важливим джерелом як для вивчення природи взаємодії пошкоджуючого агенту з клітиною, так і для з'ясування механізмів формування аберацій хромосом. Раніше нами було показано, що при апроксимації експериментальних даних залежностей концентрація – кластогенний ефект мітоміцину С, найбільш адекватно крива доза-ефект описується поліномом четвертого ступеню [1]. Побудова рівнянь регресії значно полегшує аналіз результатів, оскільки можливо абстрагуватися від випадкових помилок [2]. Однак вони носять описовий характер, очевидно, що параметри, які входять в ці рівняння є емпіричними і інтерпретація їх

біологічного змісту є проблематичною [3].

Тому для розуміння природи взаємодії мутагену з клітиною необхідним є намагання знайти функцію, яка показувала б, виходячи із загальних уявлень про характер взаємодії, залежність виходу пошкоджень від дози. По експериментальним даним можна підібрати коефіцієнти цієї функції, причому вони повинні мати певний біологічний зміст [3]. Метою роботи було визначення такого роду функцій для опису виходу аберантних клітин при дії алкілюючого мутагену – мітоміцину С за умов його пролонгованої дії в клітинах апікальної меристеми *Allium sera L.*

### Матеріали і методи

Експериментальні результати цитогенетичної дії мітоміцину С в клітинах кореневої меристеми *Allium sera L.* були отримані в попередніх дослідженнях [1]. Для аналізу дозових залежностей були використані теоретичні моделі, розроблені Чеботарьовим А.Н. і співавт. та Яковенко К.Н і співавт. для пояснення дозових залежностей цитогенетичних ефектів “одноцентрових” та “багатоцентрових” хімічних мутагенів [3-5].

$$\text{модель №1: } dA/dC = -KA, \quad (1)$$

$$\text{модель №2: } dA/dC = -KCA, \quad (2)$$

$$\text{модель №3: } dA/dC = -K(C + C_0)A, \quad (3)$$

$$\text{модель №4: } d\lambda/dC = KC(\mu - \lambda)^2, \quad (4)$$

де  $A$  – частка нормальних клітин;  $C$  – концентрація мутагену;  $K$  – коефіцієнт пропорційності, який визначає ефективність мутагену;  $\lambda$  – інтенсивність проникнення мутагену в клітину;  $\mu$  – інтенсивність інактивації мутагенного ефекту; біологічний зміст параметру  $C_0$  полягає в тому, що при  $C_0 \leq 0$ , існує поріг дії мутагену.

Рішеннями цих моделей є функції:

$$\rho = 1 - e^{-(KC + \alpha)}, \quad (\text{експонента}) \quad (5)$$

$$\rho = 1 - e^{-(KC^2/2 + \alpha)}, \quad (\text{S-подібна крива}) \quad (6)$$

$$\rho = 1 - e^{-(K_1 C + \alpha)^2}, \quad K = 2K_1^2, \quad C_0 = \alpha/K \quad (\text{S-подібна крива}) \quad (7)$$

$$\rho = C^2 / \alpha + KC^2, \quad (\text{гіпербола}) \quad (8)$$

де  $\rho$  – частка аберантних клітин;  $e^{-\alpha}$  – частка нормальних клітин при спонтанному мутагенезі для функцій (1) і (2),  $e^{-\alpha^2}$  – для функції (3); функція (4) передбачає нульовий рівень спонтанного мутагенезу.

### Результати та обговорення

Відповідно до гіпотези про “одноцентрові” та “багатоцентрові” мутагени, дозові залежності для перших адекватно описуються функцією (7), а для других – функціями (5) і (8) [2]. Для аналізу залежності частки аберантних клітин від концентрації мітоміцину С за умов його пролонгованої дії в клітинах *Allium sera L.* були використані функції (5) – (8). В таблиці 1 наведені очікувані результати по виходу аберантних клітин на основі вищевказаних моделей та порівняння їх з експериментальними даними. За результатами експериментів *in vitro* в культурі лімфоцитів людини, мітоміцин С відноситься до “одноцентрових” мутагенів [3,6]. Тому ми очікували відповідності дозових залежностей наших експериментальних даних моделі, рішенням якої є функція (7). Проте, як видно з таблиці 1, в усьому діапазоні діючих концентрацій мутагену, жодна з досліджених моделей не описує адекватно дозову залежність виходу аберантних клітин.

Таблиця 1

### Результати аналізу дії різних концентрацій мітоміцину С на клітини апікальної меристеми *Allium sera L.* (в усьому діапазоні концентрацій)

Концентрація, $\cdot 10^{-5} \text{M}$	Вибірка, клітин	Кількість аберантних ана-телофаз, %				
		Емпірична	Очікувана по моделі			
			№1	№2	№3	№4
0	1096	1,28	5,13	11,89	9,34	0
0,01495	1604	3,37	45,75	58,995	33,01	3,15

0,02991	1224	5,39	45,81	58,996	33,06	9,59
0,1495	1637	11,12	46,27	58,997	33,46	27,78
0,2991	1278	15,73	46,83	59,00	33,97	29,53
0,7477	1460	21,99	48,49	59,04	35,47	30,06
1,495	1419	40,59	51,13	59,20	37,99	30,15
2,991	842	62,35	56,03	59,64	43,04	30,164
5,980	850	92,09	64,39	61,49	52,92	30,169
7,477	324	86,42	67,96	62,83	57,65	30,170
11,96	177	88,20	76,65	68,10	70,41	30,170
14,95	43	90,70	81,09	72,29	77,50	30,170
23,92	21	85,71	89,96	84,98	91,62	30,171
29,91	13	84,62	93,41	91,15	96,23	30,171
Статистичні показники						
$\chi^2$	-	-	160,48	236,15	140,32	723,94
df	-	-	12	12	12	12
P	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

В моделі № 4, очікуваний рівень аберантних клітин співпадає з експериментальним лише при дії мутагену у найменшій концентрації. Хоча модель №4 і описує вихід кривої доза-ефект на “плато”, проте він відбувається вже при досягненні 30% рівню аберантних клітин. Крім того, ця модель не описує S-подібної дозової залежності, яка мала місце в експерименті [1]. Очевидно, що мутагенна дія мітоміцину С в клітинах *Allium* *cepa* L. обумовлена іншими закономірностями реалізації первинних пошкоджень ДНК у аберації хромосом ніж покладеними в основу моделі №4. Основним недоліком моделей № 1-3 в усьому діапазоні діючих концентрацій мутагену є надзвичайно високий очікуваний рівень аберантних клітин при дії низьких та середніх концентрацій мутагену.

В наших дослідженнях дозова залежність виходу аберантних клітин від концентрації мітоміцину С була подібна до дії мутагену в лімфоцитах периферійної крові людини *in vitro* лише в діапазоні до виходу кривої доза-ефект на “плато” [3,6]. В експериментах *in vitro* не було виявлено виходу дозової кривої на “плато”. Слід зазначити, що при цьому використовувались концентрації мутагену, які не призводили до значного зменшення мітотичної активності. Неадекватність очікуваної відповідності моделі №3 експериментальним даним в усьому діапазоні діючих концентрацій обумовлена тим, що вона не враховує значного зменшення виходу аберантних клітин при досягненні певної критичної концентрації мутагену. Тому додатково ми провели кількісний аналіз дозових залежностей дії мітоміцину С в діапазоні до виходу кривої на “плато”. Результати представлені в таблицях 2 і 3.

Таблиця 2

**Результати аналізу дії різних концентрацій мітоміцину С на клітини апікальної меристеми *Allium* *cepa* L. (в діапазоні концентрацій до виходу кривої на “плато”)**

Концентрація, $\cdot 10^{-3}$ мМ	Вибірка	Кількість аберантних ана-телофаз,%				
		Емпірична	Очікувана по моделі			
			№1	№2	№3	№4
0,001495	1604	3,37	– 0,02	16,51	8,48	3,18
0,002991	1224	5,39	0,39	16,52	8,66	8,63
0,01495	1637	11,12	5,09	16,63	10,19	19,06
0,02991	1278	15,73	10,65	17,01	12,24	19,81
0,07477	1460	21,99	25,45	19,61	19,22	20,034
0,1495	1419	40,59	44,87	28,20	32,71	20,066



0,2991	842	62,35	69,86	54,39	60,57	20,074
0,598	850	92,09	90,99	92,55	93,08	20,076
Статистичні показники						
$\chi^2$	-	-	74,61	26,78	6,486	373,91
df	-	-	7	7	7	7
P	-	-	<0,0001	0,0004	0,484	<0,0001

Таблиця 3

**Параметри моделей, що описують концентраційні залежності дії мітоміцину С (в діапазоні концентрацій до виходу кривої на “плато”)**

Модель	$\alpha$	K	$\rho_{0T}$	$\rho_{0e}$	$R^2$	Adjusted $R^2$	RMSE
№1	-0,043	3,319	-4,40	1,28	0,9918	0,9904	0,0308
№2	0,1267	20	11,90	1,28	0,9556	0,9482	0,0716
№3	0,3027	1,094	8,60	1,28	0,9863	0,9840	0,0398
№4	0,0299	1,075	0	1,28	0,9333	0,9223	0,0877

$\rho_{0T}$  – очікуваний по моделі спонтанний рівень аберантних клітин;

$\rho_{0e}$  – експериментальний спонтанний рівень аберантних клітин

Як видно з таблиць 3 та 4, дозові залежності кількості аберантних клітин від концентрації мутагену в діапазоні до виходу емпіричної кривої на “плато” адекватно описує модель №3. Коефіцієнт K, який визначає ефективність індукції аберантних клітин мітоміцином С у *Allium* сера L. дорівнює 1,094. Важливим наслідком проведених експериментів є те, що для мітоміцину С показано відсутність порогу дії мутагену в клітинах *Allium* сера L. Це впливає з аналізу отриманих параметрів моделі. Як вже зазначалося, біологічний зміст параметру  $C_0$  в моделі №3 полягає в тому, що значення  $C_0 \leq 0$  обумовлені порогом дії мутагену. Оскільки отримані значення параметрів  $\alpha$  і K є більшими нуля, а  $C_0 = \alpha / K$ , то  $C_0 > 0$ .

Разом з тим, необхідно відмітити, що в наших дослідженнях, як і в експериментах *in vitro* при дії мітоміцину С та іншого “одноцентрового” алкілюючого мутагену – тіофосфаміду, ця модель дає завищений рівень спонтанної частоти аберантних клітин [3,6]. Як видно з таблиці 3, теоретично очікувана частота аберантних клітин при нульовій концентрації мітоміцину С дорівнює 8,6%, порівняно з 1,28% в експерименті. Для тіофосфаміду, в дослідженнях *in vitro*, очікуваний спонтанний рівень аберантних клітин становив 5,7% та 12,3% при дії мутагену на стадіях  $G_0$  та  $G_2$  відповідно [3,4]. Слід зазначити, що інші розглянуті моделі дають ще більш істотні розходження з експериментом. На нашу думку, модель №3 не враховує процесів, які обумовлюють зменшення мутагенної ефективності при збільшенні концентрації мутагену, що в кінцевому результаті призводить до виходу кривої доза-ефект на “плато”. Ймовірно, що емпірично зафіксований рівень частоти аберантних клітин є меншим, ніж реально індукований. Особливо ця різниця збільшується при зростанні концентрації мутагену. Тому, внаслідок заниженої частоти аберантних клітин при високих концентраціях мітоміцину С, апроксимація експериментальних даних в моделі №3 призводить до завищення спонтанного рівню мутагенезу.

Для багатьох мутагенів (в тому числі з алкілюючим механізмом дії) характерними є криві доза-ефект з виходом на “плато” або  $\cap$ -подібного типу. Зокрема, при дії мітоміцину С на протязі 2 годин на стадії S в клітинах *Sterpis capilaris* крива дозових залежностей мала “плато”, [7]. Такі закономірності можуть бути обумовлені інтерфазною загибеллю та затримкою мітозу пошкоджених клітин, інгібуванням формування видимих перебудов з первинних пошкоджень. Тому адекватний аналіз залежностей доза-ефект при дії хімічних мутагенів потребує розробки теоретичних моделей, які б враховували також вищевказані процеси.

### Висновки

Встановлено, що залежність концентрація – частота аберантних клітин за умов пролонгованої дії мітоміцину С в клітинах *Allium* сера L. задовільно описується теоретичною моделлю, характерною для “одноцентрових” хімічних мутагенів:  $dA/dC = -K(C + C_0)A$ , лише в діапазоні до виходу кривої на “плато”. Коефіцієнт регресії, який визначає ефективність індукції аберантних клітин мітоміцином С дорівнює 1,094. Теоретично обґрунтовано відсутність порогу кластогенної дії мітоміцину С на клітини кореневої меристеми *Allium* сера L. Висловлено припущення, що для аналізу дозових залежностей цитогенетичної дії хімічних мутагенів, необхідним є розробка теоретичних моделей, які враховують також процеси інтерфазної загибелі та затримки мітозу пошкоджених клітин.

#### Література:

1. Шкарупа В.М., Бариляк І.Р. Кількісний аналіз цитогенетичних ефектів, індукованих мітоміцином С. Характеристика дозових залежностей // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2007 (подано до друку).
2. Lovell D.P. Dose-response and threshold-mediated mechanisms in mutagenesis: statistical models and study design // *Mut. Res.* – 2000. – Vol. 464, № 1. – P.87-95.
3. Бочков Н.П., Чеботарев А.Н. Наследственность человека и мутагены внешней среды. – М.: Медицина, 1989. – 270 с.
4. Чеботарев А.Н., Яковенко К.Н. Математическое моделирование зависимости цитогенетического эффекта от концентрации мутагена // *Генетика.* – 1974. – Т. 10, № 8. – С. 150-157.
5. Яковенко К.Н., Ажаев С.А., Бочков Н.П. Цитогенетический эффект производных этиленimina в культуре лимфоцитов человека. Сообщение 2. Математическая модель действия разных концентраций дипина и фотрина // *Генетика.* – 1974. – Т. 10, № 11. – С. 138-146.
6. Щеглова Е.Г., Чеботарев А.Н. Сопоставление уровня сестринских хроматидных обменов и хромосомных аберраций, индуцированных химическими мутагенами *in vitro* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 1983, № 11. – С.93-95.
7. Дубинина Л.Г., Курашова З.И. Мутагенез, индуцированный митоміцином С // *Генетика.* – 1986, Т. 22. – № 10. – С. 2444-2451.

#### Резюме

Досліджували відповідність експериментальних даних дозових залежностей цитогенетичної дії мітоміцину С (в діапазоні концентрацій  $0,015 \cdot 10^{-5} \text{M}$  –  $29,91 \cdot 10^{-5} \text{M}$  за умов пролонгованої дії мутагену) в клітинах *Allium* сера L. існуючим теоретичним моделям. Показано, що крива доза - мутагенний ефект в діапазоні до виходу кривої на “плато”, адекватно описується моделлю притаманною для дії “одноцентрових” мутагенів:  $dA/dC = -K(C + C_0)A$ , рішенням якої є функція  $p = 1 - e^{-(K_1 C + \alpha)^2}$ . Де А – частка нормальних клітин, р – частка аберантних клітин, С – концентрація мутагену, К,  $K_1$  і  $\alpha$  – коефіцієнти. Визначено коефіцієнт ефективності індукції аберантних клітин мітоміцином С (1,094) та показано відсутність порогу дії мутагену в клітинах *Allium* сера L. Завищений очікуваний рівень спонтанного мутагенезу та неадекватність опису дії високих концентрацій мутагену (при виході кривої на “плато”) в цій моделі обумовлені тим, що вона не враховує зменшення мутагенної ефективності на одиницю дози при збільшенні концентрації мітоміцину С. Висловлено припущення, що для аналізу дозових залежностей цитогенетичної дії хімічних мутагенів, необхідним є розробка теоретичних моделей, які враховують також процеси інтерфазної загибелі та затримки мітозу пошкоджених клітин.

Исследовали соответствие экспериментальных данных дозовых зависимостей цитогенетического действия митоміцина С в клетках *Allium* сера L. существующим

теоретическим моделям. Показано, що діапазон до вихода кривої дозових залежностей дії митомицину С на "плато", адекватно описується моделлю, характерною для дії "одноцентрових" мутагенів:  $dA/dC = -K(C + C_0)A$ , рішенням якої є функція  $\rho = 1 - e^{-(K_1 C + \alpha)}$ . Де А – частка нормальних клітин,  $\rho$  – частка аберантних клітин, С – концентрація мутагену, К і  $\alpha$  – коефіцієнти. Визначено коефіцієнт мутагенної ефективності (К = 1,094) митомицину С і показано відсутність порога дії мутагену в клітках *Allium cepa* L. Завищений очікуваний рівень спонтанного мутагенезу за цією моделлю обумовлено тим, що вона не враховує зменшення мутагенної ефективності при збільшенні концентрації митомицину С. Висказується припущення, що для адекватного аналізу дозових залежностей цитогенетичного дії хімічних мутагенів, необхідна розробка теоретических моделей, які б враховували такі процеси як інтерфазна гибель і затримка мітозу пошкоджених клітин.

Investigated correspondence of experimental data dose-response dependences of cytogenetic action of mitomycin C in cells *Allium cepa* L. to existing theoretical models. It is shown, that a range up to an output of a that dose-response dependences of action mitomycin C on "plateau", it is adequately described by model, characteristic for action "monocentric" mutagens:  $dA/dC = -K(C + C_0)A$ , which decision is function  $\rho = 1 - e^{-(K_1 C + \alpha)}$ . Where А - a share normal cells;  $\rho$  - a share aberrant cells; С - concentration of mutagen; К,  $K_1$  and  $\alpha$  - coefficients. It is certain coefficient mutagenic efficiency (К = 1,094) of mitomycin C and absence of a threshold of action mutagen in cells *Allium cepa* L is shown. The overestimated expected level spontaneous mutagenesis on this model is caused by that it does not consider reduction of mutagenic efficiency at increase in concentration mitomycin C. It is supposed, that for the adequate analysis dose-response dependences cytogenetics actions of chemical mutagens, development of theoretical models which would consider such processes as interphase destruction and a mitosis arrest the damaged cells is necessary.

**БОДНАР Л. С.<sup>1</sup>, БЕЛЯЄВА В. В.<sup>1</sup>, ГОРБУЛІНСЬКА С. М.<sup>1</sup>, ФЕДИНЯК А. В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка,  
79005, м. Львів, вул. Грушевського 4

<sup>2</sup>Клініка репродуктивної медицини «ІНТЕРСОНО», м. Львів

### **СКРИНІНГ ПРИРОДНИХ ЗРАЗКІВ ВОДИ ЧЕРВОНОГРАДСЬКОГО ГІРНИЧО - ПРОМИСЛОВОГО РЕГІОНУ НА ІНДУКЦІЮ СОМАТИЧНИХ МУТАЦІЙ ТА РЕКОМБІНАЦІЙ НА *DROSOPHILA MELANOGASTER***

Проведене генотоксикологічне обстеження зразків води з природних водойм Червоноградського гірничо-промислового району Львівської області на індукцію соматичних мутацій та рекомбінацій у *Drosophila melanogaster*. Виявлена тенденція до зменшення мутагенності у зразках води, відібраних з річок Тисмениця, Солокія, Дністер, Західний Буг починаючи з 1997 – 2006 роки.

Для генотоксичного аналізу використовуються різні методи, в тому числі на індукцію як генних мутацій, так і хромосомних аберацій з використанням еукаріотичних та прокаріотичних організмів. Метод індукції соматичних мутацій і рекомбінації на *Drosophila melanogaster* використовується, в основному, для дослідження зразків на канцерогенність. Метод базується на проходженні в соматичних клітинах процесу, аналогічного мейотичному кросинговеру або соматичної рекомбінації. Принцип методу полягає в тому, що у мух, гетерозиготних по одному чи декількох рецесивних генах під дією мутагенів виникають мозаїчні плями – ділянки тканин, на яких проявляється дія цих генів, в той час, як оточуючі ділянки мають нормальний фенотип. Всі клітини особин марковані певними рецесивними генами, що

як правило визначають колір тіла і очей, форму щетинок і крил у дрозюфілі. Внаслідок гетерозиготності самок  $F_1$ , прояв цих генів не спостерігається. При проходженні соматичної рекомбінації рецесивні гени переходять в гомозиготний стан і стають видимі – зміна форми або кольору щетинок, крил, очей і тіла. В залежності від місця розриву хромосоми виникають клітини різних генотипів і, відповідно, з'являється мозаїчність різних типів [1, 5, 10]. Практична цінність даного методу полягає у тому, що він дозволяє виявити мутаційні зміни, що відбулися в генах соматичних клітин, а отже дозволяє вловити початкові незворотні зміни клітинного геному, що призводить до переходу клітини-мішені в стан, передуючий злоякісній трансформації [8, 9].

### **Матеріали та методи**

Матеріалом для генотоксичних досліджень служили зразки води, відібрані з рік: р. Тисмениця, яка забруднюється промисловими стоками міст Дрогобича, Борислава, Стебника і є найбільш забрудненою річкою в басейні Дністра; р. Дністер (1993, 1997, 1998, 2006), притока р. Сівка (1998, 2002р.); р. Західний Буг, куди зливаються промислові стоки з міст Сокаля, Червонограду, та північно-східної частини Львова (1997, 1998, 2005); р. Солокія – притока Західного Бугу (1996, 1997, 1998, 2005); притока р. Солокія (1997, 1998, 1999, 2005);

Видобуток вугілля в Червоноградському гірничо - промисловому районі Львівської області в кінці дев'яностих років досяг 12 млн. т. на рік, супроводжувався винесенням на поверхню землі великої кількості (біля 100 млн. м<sup>3</sup>) вуглевмісних порід та великим шахтним водовідливом. За даними “ЗахідУкргеології” [4], з цими забруднювачами пов'язана наявність в водоносних горизонтах токсичних і потенційно токсичних металів, фенолів, нафтопродуктів, поліакриламідів. Виявлене також загальне хімічне забруднення територій Червоноградського району важкими металами та елементами I та II класу небезпечності (миш'яком, ртуттю, кадмієм, стронцієм, фосфором, кобальтом тощо), в концентраціях, що значно перевищують ГДК [2, 6].

Метод індукції соматичних мутацій і рекомбінацій проводили на двох системах схрещувань. Перша – мозаїчна система yellow + / + singed. Друга мозаїчна система – yellow white cut forked / + + + +.

Рівень рекомбінаційної активності зразка визначали, досліджуючи гетерозиготних за рецесивним маркером самок:

$$\% \text{ рек} = \frac{\text{кількість самок з соматичними мутаціями}}{\text{загальна кількість самок}} \times 100 \%$$

Паралельно різним дослідним варіантам проводився контрольний. В якості контролю використовували дистильовану воду. Статистичну обробку даних проводили за критерієм оцінки достовірності між процентними характеристиками двох альтернативних сукупностей за Ст'юдентом порівнюючи спонтанний рівень мутабельності з рівнем, індукованим досліджуваним зразком [1, 3].

### **Результати та обговорення**

Для аналізу впливу стічних вод на водні басейни Червоноградського гірничо-промислового району було проаналізовано на генотоксичну активність зразки води, відібрані з р. Тисмениця. Для з'ясування того факту, чи володіють зразки води з р. Тисмениця рекомбіногенною активністю, було проведено тест на індукцію соматичних мутацій і рекомбінацій на *D. melanogaster* в системі  $y^{++}/w^{sn}$ . Проведений аналіз свідчить про те, що в тесті на соматичні мутації і рекомбінації зразки води з р. Тисмениця не проявляли рекомбіногенної активності. Кількість соматичних мозаїків була в межах спонтанного фону мутування.

Здатність зразків води, відібраних з р. Західний Буг, р. Соколія та притоки р. Соколія, викликати соматичні мутації і рекомбінацію вивчали на *D. melanogaster* в системі  $y^w \text{ ct } f / + + + +$ . Рекомбіногенною активністю володіли зразки води з р. Західний Буг (м. Червоноград), відібраний в серпні 1996 року – тут виявлено  $1,14 \pm 0,28\%$  соматичних мозаїків, тоді як в контролі, лише  $0,36 \pm 0,21\%$ , та у жовтні 1997 –

1,13±0,29% соматичних мозаїків при 0,40±0,18% в контролі. Серед мозаїків в основному спостерігали фенотиповий прояв гену *f*. Зразок води з річки Західний Буг (м. Сокаль) також проявляв мутагенну активність у жовтні 1997 року.

Загалом при аналізі всіх досліджуваних зразків спостерігалася тенденція до зменшення індукції соматичних мутацій і рекомбінації у зразках води з Червоноградського гірничо-промислового регіону починаючи з 1997 до 2006 років. Проте, що стосується зразків води з річки Солокія та її притоки, то тут мутагенний ефект в тесті на індукцію соматичних мутацій і рекомбінацій виявлений лише у зразку, відібраному з р.Солокія у 2005 році. Мутагенний ефект виявлений також в зразку, відібраному з р. Дністер у 2005 році, тут виявлено 1,43± соматичних мозаїків, тоді як в контролі 0,07±. Серед мозаїків в основному спостерігали фенотиповий прояв гену *st*

Був проведений хімічний аналіз води з р. Західний Буг (2002 р.) поблизу м. Сокаль на наявність у воді важких металів та фенолів. Важких металів не виявлено, однак концентрація фенолів становила 0,995 мг/л при ГДК у питній воді 0,001 мг/л. Відомо, що при дії фенолів значно збільшується рівень хромосомних аберацій [7]. В ана-телофазному тесті нами не виявлено підвищення хромосомних аберацій при дії даного зразка на геном *A. cerea*, проте вода з р. Західний Буг (м. Сокаль,) володіла підвищеною мітотичною активністю, яка проявлялася у “затримці” клітин на стадії профазі.

### Висновки

Проведений скринінг на індукцію соматичних мутацій і рекомбінацій з використанням тест-об'єкту *Drosophila melanogaster* зразків води, відібраних з природних водойм річок Західний Буг, Тисмениця, Дністер та Солокія Червоноградського гірничо-промислового регіону в 1997 – 2006 роках. Показано, що критерій мутагенності з використанням даної тест – системи є особливим параметром оцінки забруднення води, що дозволяє вловити початкові незворотні зміни в геномі соматичних клітин, передуючи злоякісній трансформації. Найотруйнішими забруднювачами довкілля в результаті функціонування гірничо-добувної промисловості вважають важкі метали, 1,2 – 5,6 дибензотрацен, 3,4 – бензпірен та інші, які є канцерогенними компонентами нафти і вугілля. У 2005 році мутагенний ефект в тесті на індукцію соматичних мутацій і рекомбінацій був виявлений у зразках води, відібраних з р. Солокія та з р. Дністер. Проте, починаючи з 1997 – 2006 роки загалом спостерігається тенденція до зменшення індукції соматичних мутацій та рекомбінацій при обстеженні води з водних басейнів Червоноградського гірничо-промислового регіону. що ми пов'язуємо із частковою зупинкою робіт на вуглезбагачувальному комплексі, зменшенням обсягів видобутку вугілля, закриттям деяких шахт.

### Література

1. Белоконь Е.М. Генетический эксперимент в исследованиях на дрозофиле. – Львов.- 1979. – 108 с.
2. Грушко Я.М. Вредные органические соединения в промышленных сточных водах. – Москва:- 1982. -- 215 с.
3. Деркач М.Б., Гумецький Р.Я., Чабан М.Є. Курс біометрії – Львів. - 1974. – С. 28--31.
4. Екологія Львівщини 1994. – Львів. - 1995 - 43 с.
5. Медведев Н.Н. Практическая генетика.- Москва. - 1968. - С.158 - 176
6. Сьякте Т.Г., Сьякте Н.И. Химические соединения повреждающие ДНК. – Рига. - 1991. - 152 с.
7. Hoffman C.R. Overview of genetic toxicology // Genet. toxicol: Arg. Prespect. proc. Symp. Dawis Calif. New York. London. – 1990. – P. 5—27.
8. Lindsley D.L., Grell E.H. Genetic variations of *D. melanogaster*// W. Carnegic. Inst. Wash Hubl. 1968. – P. 6—21.
9. Wang Y.Y., Flessel C.P., Williams L.R. et al. Evaluation of guidehines for preparing wastewater samples for Ames testing // In short-term bioassays in the analysis of complex

environmental mixtures V Plenum Press, New York. – 1987. – p. 67-87.

10. *Wurgler F.E., Vogel E.W.* In vivo mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster* // In. de Serres F.J., ed., *Chemical Mutagens* – vol.10. - New York, 1986. – P. 1-72.

### Резюме

Проведено генотоксикологическое исследование образцов воды из природных водоемов Червоноградского горно-промышленного района Львовской области на индукцию соматических мутаций и рекомбинаций у *Drosophila melanogaster*. Выявлена тенденция к уменьшению мутагенности в образцах воды, отобранных из рек Тисменица, Солокия, Днестр, Западный Буг начиная с 1997 – 2006 года.

The genetic toxicological investigation of water samples from rivers of the Chervonograd Mining District of Lviv Region in order to induce somatic mutations and recombination in *Drosophila melanogaster* was carried. The tendency to minimization of mutagenity in the samples of water, having been taken from rivers Solokia, Dnister and Zakhidnyj Bug from 1997 till 2006 year.

**ВАСИНСКАЯ<sup>1</sup> О.А., ЛАВРЯШИНА<sup>2</sup> М.Б., УЛЬЯНОВА<sup>2</sup> М.В., БАЛАНОВСКИЙ<sup>1</sup> О.П., ДИБИРОВА<sup>1</sup> Х.Д., ПШЕНИЧНОВ<sup>1</sup> А.С., ПОЧЕШХОВА<sup>3</sup> Э.А., КУЗНЕЦОВА<sup>1</sup> М.А., ФРОЛОВА<sup>1</sup> С.А., ОРЛОВ<sup>1</sup> А.И., ПУЗИНА<sup>1</sup> Т.А., БАЛАНОВСКАЯ<sup>1</sup> Е.В.,**

<sup>1</sup>ГУ Медико-Генетический научный центр РАМН, г. Москва, Россия

<sup>2</sup>Кемеровский государственный университет, г. Кемерово, Россия

<sup>3</sup>Кубанская государственная медицинская академия, г. Майкоп, Россия

[olga.vasinskaja@rambler.ru](mailto:olga.vasinskaja@rambler.ru)

## **УНИКАЛЬНОСТЬ ГЕНОФОНДА ШОРЦЕВ ПО СПИД-ПРОТЕКТОРНОМУ ГЕНУ CCR5del32 В КОНТЕКСТЕ НАСЕЛЕНИЯ ЕВРАЗИИ**

Культурное и этническое многообразие народов Евразии формировалось многие тысячелетия под влиянием различных факторов: миграции, завоеваний, изоляции, окружающей среды, и это, в свою очередь, не могло не сказаться на генофонде народов. Большой интерес представляет изучение генофонда народов Южной Сибири, в том числе шорцев. Территориально, основные зоны компактного проживания шорцев располагаются вблизи путей крупнейших известных миграций и переселений народов Евразии, и этим обусловлено разнообразие этнических компонентов, связанных с этногенезом шорцев. В настоящее время считается, что шорцы – потомки местных самодийских и угорских племен, смешавшихся с группами тюркоязычных племён, мигрировавших на территорию современной Кемеровской области в период господства тюрок в Центральной Азии и на Алтае-Саянском нагорье (Тюркский, Уйгурский, Кыргызский каганаты, середина VI – начало X века) [9].

По лингвистической классификации шорцев относят к алтайской языковой семье. По антропологической классификации шорцев принято относить к уральскому типу большой монголоидной расы [1]. Но по ряду морфологических и краниологических признаков шорцы полностью не укладываются в рамки ни уральского, ни южносибирского антропологических типов [6]. Считается, что из всех народов Алтае-Саянского нагорья шорцы наиболее европеоидны. Эта точка зрения, оформившаяся в области физической антропологии, сегодня получает серьёзное подтверждение методами молекулярной генетики: у шорцев обнаружена высокая частота мутации в гене CCR5del32, характерная для народов Европы.

Несмотря на то, что интерес к СПИД-протекторному гену CCR5 изначально

носил чисто медицинский характер, оказалось, что его географическое распределение характеризуется столь четкими закономерностями, что он стал интенсивно применяться для решения популяционно-генетических задач. В медицинском аспекте этот ген интересен тем, что он обеспечивает генетически обусловленную устойчивость к ВИЧ-инфекции. В гене CCR5 обнаружена делеция размером 32 п.н. в позиции 794-825, что приводит к сдвигу рамки считывания и выпадению десяти аминокислотных остатков, и в результате транслируется функционально неактивный рецептор. У гомозигот по делеции 32 п.н. (генотип CCR5del32/CCR5del32) развитие инфекционного процесса при ВИЧ-1 невозможно, и вероятность развития СПИДа у лиц с таким генотипом резко снижена. У гетерозигот по делеции (CCR5/CCR5del32) инфекционный процесс протекает медленно, что приводит к замедленному развитию клинической картины СПИДа.

Полиморфизм данного гена обнаруживает выраженную этническую, популяционную и географическую специфичность. Выявлена четкая закономерность распределения частот мутаций, как по России, так и в мировом масштабе. Частота CCR5del32 максимальна на севере Европы (на побережьях Балтийского и Белого морей), и во всех направлениях от этой зоны частота плавно снижается [3]. Частота делеции в гене CCR5 колеблется около 0.09 в европейских популяциях [11]. У народов юга Европы и Индии частота CCR5del32 значительно ниже (0.02-0.05), а в Юго-Восточной Азии этот аллель практически не встречается. Исходя из такого четкого евразийского тренда, частота мутации в Сибири должна быть низкой, что мы и наблюдаем на примере алтайцев ( $q=0.01$ ), казахов ( $q=0.01$ ) [10], тувинцев ( $q=0.006$ ) [12], якутов ( $q=0.01$ ) [4]. Однако, вопреки евразийскому тренду изменчивости, в Западной Сибири у шорцев обнаружен второй мировой максимум частоты мутации CCR5del32, который составляет 0.16 ( $N=146$ ) [10].

Нами проанализирована большая выборка шорцев (157 человек), причем в трех неметисированных популяциях шорцев - Усть-Анзасские, Усть-Кабырзинские и Таштагольские шорцы ( $N=120$ ) частота мутантного гена оказалась ещё выше ( $q=0.20$ ). Для проверки уникальности генофонда шорцев мы провели сравнительный анализ шорцев как с генофондами отдельных народов – алтайцы ( $q=0.01$ ), казахи ( $q=0.01$ ) - так и с группами народов, относящихся к одной языковой ветви: угры ( $q=0.09$ ), [7], самодийцы ( $q=0.02$ ), восточные финны ( $q=0.10$ ), тюрки степей ( $q=0.08$ ), тюрки Кавказа ( $q=0.06$ ) [4].

Анализ генетических расстояний и графика многомерного шкалирования показывает, что шорцы отличаются от всех сравниваемых групп (рис. 1). При этом генетическое расстояние от шорцев до алтайцев максимальное, не смотря на то, что географически эти народы проживают в непосредственной близости.

Это заставляет перейти нас к вопросу: каково же разнообразие частот гена CCR5del32 в популяциях самих шорцев? Мы изучили четыре популяции шорцев: Усть-Анзасские шорцы (35 человек), Усть-Кабырзинские шорцы (53 человека), Кызыл-Шорские шорцы (37 человек) и шорцы г. Таштагола (32 человека).

Максимальная частота ( $q=0.23$ ) наблюдается в группе Усть-Анзасских шорцев. Территориально это группа наиболее изолирована от других популяций, в том числе и от русских. Частоты делеции CCR5del32 у Усть-Кабырзинских и шорцев г. Таштагола составляют соответственно  $q=0.17$  и  $q=0.19$ . Минимальная частота мутации по гену CCR5del32 наблюдается в южной Кызыл-Шорской популяции (0.12). Это можно объяснить смешением с русским населением. Так как в ареале Кызыл-Шорской популяции обнаружены месторождения полезных ископаемых, то их освоение привело к интенсивной миграции русского населения. Поэтому при расчете средних частот делеции CCR5del32 у шорцев Кызыл-Шорская популяция была исключена.



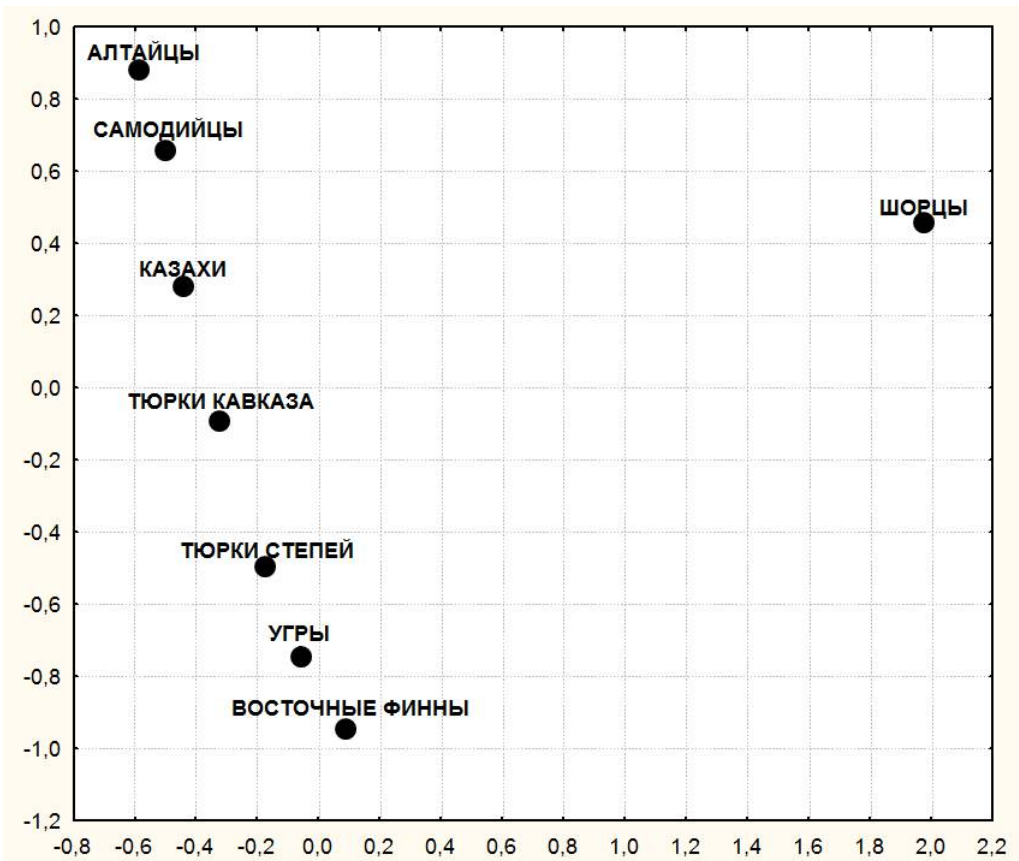


Рис. 1. График многомерного шкалирования генетических расстояний между шорцами и другими популяциями Евразии

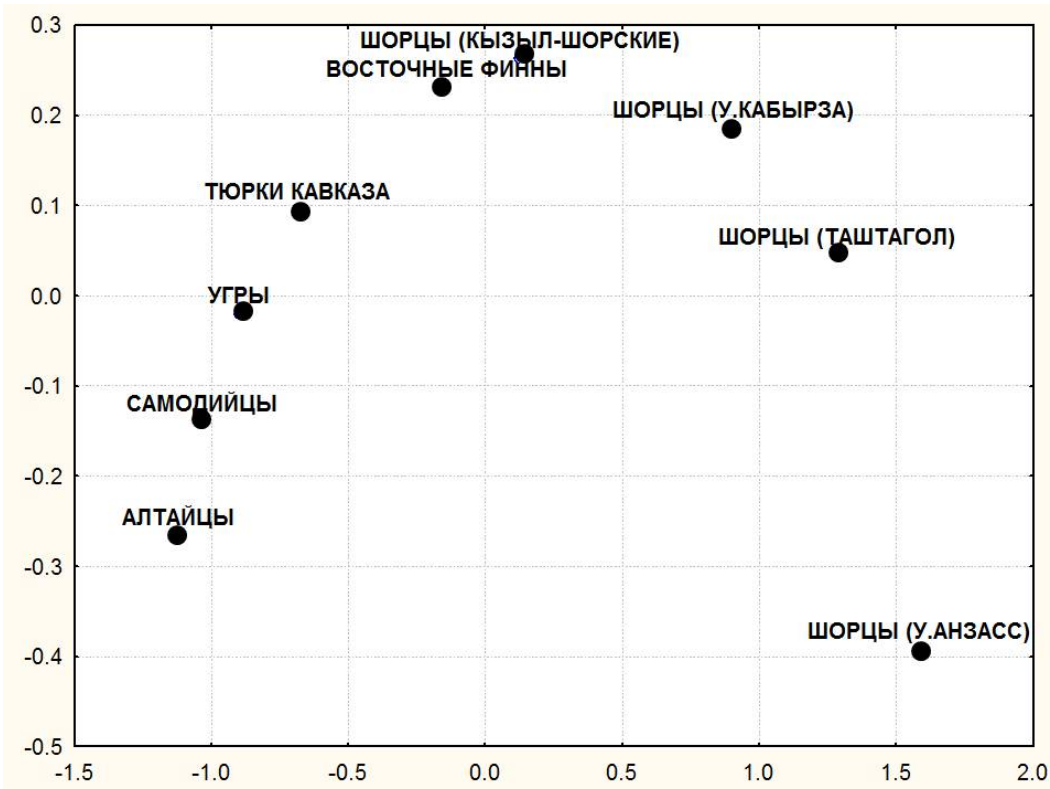


Рис. 2. График многомерного шкалирования генетических расстояний между четырьмя популяциями шорцев

На графике многомерного шкалирования (рис. 2), где представлены все 4



шорские популяции, мы обнаруживаем значительное генетическое разнообразие шорцев по гену CCR5del32. Шорцы У. Кабырзы, Таштагола и У. Анзасса объединяются в один кластер. Таким образом шорцы генетически неоднородны, что подтверждается данными этнографии [8].

Однако не стоит интерпретировать полученные данные результаты как высокую защищенность шорцев от СПИДа. Как сказано выше, инфекционный процесс не развивается только у индивидов, у которых эта мутация встречается в гомозиготном состоянии. Ожидаемое число таких гомозигот в популяциях русских в среднем колеблется от 0.2% до 2% [2;5;12], а у шорцев их частота лишь не намного выше (3.1%).

Проведенное исследование указывает на необходимость детального изучения народов Алтае-Саян. Однако уже сейчас можно говорить о наличии второго мирового максимума частоты СПИД протекторного аллеля CCR5del32 в этом регионе.

**Работа проведена при поддержке грантами РФФИ и РГНФ.**

### ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев В.П. Историческая антропология и антропогенез. - М.: Наука - 1989. - 446 с.
2. Асеев М.В., Шави А., Дин М., Баранов В.С. Популяционные особенности частот мутации гена хемокинового рецептора SKR-5, определяющего чувствительность к вирусу СПИДа // Генетика. - 1997. - Т. 33. - С. 1724-1726.
3. Балановская Е.В., Балановский О.П. Русский генофонд на Русской равнине. – М. Луч - 2007.- 416 с.
4. База данных ALFRED <http://alfred.med.yale.edu/>
5. Казенова Е.В., Аронс Э., Селимова Л.М. и др. Сравнительный анализ распространения мутантного аллеля гена, кодирующего хемокиновый рецептор CCR5, среди инфицированных и не инфицированных ВИЧ-1 лиц в России // Вопр. вирусол. - 1998. - № 1. - С.30-32.
6. Кимеев В.М. Этническая история шорцев XVII-XIX вв. Шорский национальный природный парк: Природа, люди, перспективы. ИУ и У СО РАН Кемерово - 2003. – 123 с.
7. Кузнецова Т.Н., Ромащенко А.Г., Юдин Н.С, Куликов И.В., Устинов С.Н., Гырголькау Л.А., Дамба Л.Д., Кончук Ч.Д., Максимов В.Н., Найкова Т.М., Потапова Т.А., Кобзев В.Ф., Воевода М.И. Полиморфизмы экспрессирующихся в макрофагах генов C-FMS и CCR5: частотные распределения аллелей и генотипов в некоторых этнических группах Северной Азии // Генофонд населения Сибири.- Новосибирск.- 2003.- С. 48-53.
8. Народы России: энциклопедия / Под ред. В.А.Тишкова – М.: Большая Российская энциклопедия. – 1994.- 479 с.
9. **Рогинский Я.Я.** Левин М.Г. Антропология. - М.: Изд-во МГУ, 1978. - 528 с.
10. Шахтшнейдер Е.В., Юдин Н.С., Дамба Л.Д., Губина М.А., Максимов В.Н., Барабаш О.Л., Огарков М.Ю., Поликутина О.М., Казачек Я.В., Куликов И.В., Устинов С.Н., Баум В.А., Кобзев В.Ф., Ромащенко А.Г., Воевода М.И. К вопросу об этнических характеристиках ядерного и митохондриального генофондов шорцев // Генофонд населения Сибири.- Новосибирск.- 2003.- С. 48-53.
11. Martinson J.J., Chapman N.H., Rees D.C. et al. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion // Nature Genetics. - 1997. - V.16. - P. 100-103.
12. Yudin N.S., Vinogradov S.V., Potapova T.A. et al. Distribution of CCR5-delta 32 gene deletion across the Russian part of Eurasia // Hum. Genet. – 1998. - Vol.102. - P. 695-698.

### РЕЗЮМЕ

*В данной работе освещается вопрос об одном из двух мировых максимумов частоты делеции в гене CCR5, обнаруженном у шорцев. Проводится анализ частоты делеционного аллеля CCR5del32 у представителей разных языковых групп.*

*This study is dedicated to one out of a two world maximums of the frequency of the CCR5del32 deletion. This maximum was found in population of Shorians. Here we perform the analysis of the frequency distribution of the deletion allele among different linguistic groups.*

**ВІШТАК Н.В., ГНАТЕЙКО О.З.**

*ДУ "Інститут спадкової патології АМН України",  
Україна, 79000, м.Львів, вул.М.Лисенка 31а, e-mail:nataliyavishtak@rambler.ru*

### **ДОСЛІДЖЕННЯ АЛЕЛЬНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ ГЛУТАТІОН-S-ТРАНСФЕРАЗ У ДІТЕЙ, ЩО ПРОЖИВАЮТЬ В УМОВАХ ЗАБРУДНЕНОГО ДОВКІЛЛЯ**

Диференційна чутливість різних осіб до середовищних факторів в залежності від індивідуальних спадкових особливостей зводиться до адаптивного процесу чи, навпаки, до дезадаптації, що супроводжується проявом мультифакторіальних захворювань, що виникають в результаті таких контактів.

Фактори зовнішнього середовища, що діють на організм поділяються на природні і штучні, біотичні і абіотичні. До відносно «нових» середовищних факторів варто віднести ксенобіотики – чужорідні для нормального метаболізму речовини з потенціальним біологічним ефектом (десятки тисяч хімічних сполук, включаючи ліки).

Інформація про внесок пропорцій генного різноманіття на різних рівнях ієрархічної структури груп світового народонаселення свідчить про те, що основна його доля припадає на внутрішньо популяційний рівень [1,2]. Цим фактом пояснюються істотні відмінності в реакції окремих людей на тиск одного і того ж середовища.

Алелі ряду локусів, які знаходяться в нормальному поліморфному стані в природньому середовищі проживання людських популяцій, можуть стати «патологічними» в інших умовах, що міняються під впливом антропогенних факторів[3].

Більшість ксенобіотиків, які потрапляють в організм, не мають прямої деструктивної дії, проте її набувають метаболіти, що утворюються в процесі системної біотрансформації – послідовного ензимного перетворення жиророзчинних сполук у полярні водорозчинні метаболіти, які легко елімінуються. Система ферментів, що приймають участь у цьому процесі носить назву детоксикаційної і поділяється на три фази : фазу активації ксенобіотиків ( I ), фазу детоксикації (нейтралізації) ксенобіотиків ( II ) та фазу елімінації ( III ) [4].

Головною функцією II фази біотрансформації є нейтралізація метаболітів, що володіють токсичними властивостями, які утворились внаслідок дії ферментів фази I. Ключову роль серед сполук, що беруть участь в цій фазі відіграють ферменти глутатіон-S-трансферази (GSTs). Детоксикація за допомогою глутатіону забезпечує резистентність клітин до дії вільних радикалів, перекисного окислення ліпідів, алкілування білків та сприяє попередженню пошкодження ДНК [5,6].

Синтез глутатіонтрансфераз контролюється генами різних хромосом. В кожному з них виявлені поліморфізми, які суттєво впливають на їх функції. Серед чотирьох класів GSTs важливу роль у детоксикації відіграють глутатіон-S-трансферази GSTM1 та GSTT1. Вважається, що саме ці гени задіяні в патогенезі різноманітних онкопатологій і виступають в якості модифікаторів і факторів ризику при захворюваннях, пов'язаних з несприятливою дією факторів зовнішнього

середовища[7,8].

Екологічна ситуація в нашій державі характеризується наявністю територій з підвищеним рівнем радіації після Чорнобильської катастрофи, а також зон з високими концентраціями хімічних чинників антропогенного походження. Все це створює реальну загрозу для здоров'я людей і, насамперед, дітей, які в силу своїх анатомо-фізіологічних особливостей є більш чутливими до дії ксенобіотиків.

Зважаючи на все вище викладене, дослідження поліморфізму генів, що кодують ферменти системи детоксикації набуває першочергового значення для оцінки ризику захворюваності та прогнозування характеру перебігу екологічно детермінованої патології у дітей, що постійно проживають на забруднених територіях [9].

На території Івано-Франківської області знаходяться три райони з високим рівнем забруднення довкілля – Галицький, Долинський і Снятинський. У першому інтенсивність забруднення зумовлена викидами в атмосферу Бурштинської ГЕС. Щільність викидів становить 212,4 т на 1 км<sup>2</sup>. Снятинський р-н належить до зони радіаційного забруднення після аварії на Чорнобильській АЕС. Долинський р-н забруднений продуктами переробки нафтохімічної промисловості, розвиненої на території району [10].

Метою роботи було встановлення розподілу алельного поліморфізму генів GSTM1 і GSTT1, що кодують глутатіон-S-трансферази у дітей з несприятливих регіонів для використання даних маркерів у прогнозуванні важкості перебігу екопатологічних станів.

### **Матеріали і методи**

В нашому дослідженні обстежували чотири групи дітей, що проживають в Івано-Франківській області.

Першу дослідну групу (ГГ) склали 67 дітей із хімічно забрудненого регіону (Галицький район). Другу дослідну групу (СГ) склали 66 дітей з регіону з підвищеним рівнем радіаційного фону (Снятинський район). Третю групу склали 53 дитини з Долинського району (нафта і нафтопереробна промисловість) (ДГ). Четверта група (контрольна) репрезентує 90 дітей, що проживають в визнаних екологічно чистими регіонах Івано-Франківської області (Верховинський і Городенківський райони) (КГ).

Діти були віком від 6 до 16 років. Усі діти оглядалися педіатрами-спеціалістами і проводилось УЗД внутрішніх органів.

При порівнянні досліджуваних і контрольної груп по віку і частоті спадкової обтяженості відмінностей не виявлено, що вказує на правомірність порівняння генетичних показників в цих групах.

Для проведення генотипування брали венозну кров в пробірки з ЕДТА. Виділення ДНК проводили, використовуючи комерційні набори ООО «Лаборатория Изоген», (Москва, РФ).

Поліморфні варіанти генів GSTM1 і GSTT1 пов'язані з протяжною делецією (до 10 т.п.н.), яка призводить до повної відсутності продукту гена і, відповідно, до порушення метаболізуючої функції.

Присутність чи відсутність нульового алеля GSTM1 GSTT1 визначали за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції [11]. ПЛР проводили за допомогою термоциклера Терцик («ДНК-технология», Росія).

Отримані фрагменти розділяли в 2 % агарозному гелі з подальшим фарбуванням бромистим етидієм і візуалізацією фрагментів в УФ-промінні.

Гомозиготи і гетерозиготи по функціональному алелю « + » визначали за наявністю на електрофореграмах продукту ампліфікації розміром 470 п.н. для GSTT1 і 271 п.н. для GSTM1. Відсутність відповідного фрагменту вказувала на гомозиготність особи по делеції гена. В якості внутрішнього контролю використовували фрагмент гена альбуміну (330 п.н.).

## Результати та обговорення

У групах дітей із забруднених регіонів відмічено високу частоту скарг, характерних для синдрому загальної інтоксикації.

Для виявлення факторів, які пов'язані з розвитком мультифакторіальних соматичних захворювань при дії генотоксичних чинників було проведено дослідження алельного поліморфізму генів GSTM1 і GSTT1, які продукують детоксикаційні ензими. Результати проведеного генотипування представлені у таблиці.

Таблиця

**Розподіл «нульових» варіантів генів GSTT1 і GSTM1 у обстежених дітей**

Групи дітей	Кількість, n	Генотип GSTM1« – »		Генотип GSTT1« – »		Генотип GSTM1«←» + GSTT1«←»	
		n	Частота, %	n	Частота, %	n	Частота, %
ГГ(Галицький район)	67	30	45	14	21	7	11
СГ(Снятинський район)	66	30	45	21	32	15	23
ДГ(Долинський район)	53	18	34	10	19	4	8
КГ(Контрольна група)	90	35	39	25	28	13	15

У 21 % дітей з групи ГГ виявлено подвійний алель GSTT1 « – », подвійний алель GSTM1 « – » у 45 %. Поєднання подвійних «нульових» алелів обох генів зареєстровано в 11 % випадків. У групі з радіаційно контрольованого району СГ подвійний алель GSTT1 « – » виявлено у 32 % дітей, GSTM1 « – » у 45 % обстежуваних, а поєднання обох «нульових» варіантів генів – у 23 %. В групі ДГ (Долинський район) частота встановленого генотипу GSTM1 « – » становила 34 %, алель GSTT1 « – » виявлено у 19 % дітей, а наявність делетованих алелів обох генів встановлено у 8 % осіб.

В контрольній групі КГ розподіл алелів був слідуєчим : генотип GSTM1 « – » виявлено у 39 % осіб, генотип GSTT1 « – » встановлено у 28 % обстежених, генотип GSTM1 « – » + GSTT1 « – » – у 15 % осіб.

Частота рестрації подвійних делетованих алелів генів GSTM1 і GSTT1 в осіб усіх груп не відрізнялась від літературних даних про частоту нефункціональних «нульових» алелів цих генів у кавказькій популяції [4].

Обстежувані групи (ГГ, СГ, ДГ) ми поділили за важкістю перебігу захворювань : 1)легший перебіг (глибина ураження і кількість виявлених захворювань мінімальні); 2)важчий перебіг (глибший ступінь ураження і залучення в патологічний процес більшої кількості органів і систем).

При аналізуванні отриманих генотипів дітей з поділених груп ми встановили наступну картину у відсотковому відношенні : діти, у яких зафіксований легший характер перебігу захворювання були гомозиготними носіями делетованих алелей генів GSTM1 і GSTT1 у 53 % та 35 % відповідно. А при констатації важчого перебігу нами було відмічено 46 % подвійної делеції гена GSTM1 і 42 % гена GSTT1.

Отримані результати свідчать про те, що у дітей, які постійно проживають на техногенно-забруднених територіях і які є носіями нефункціональних алелів генів GSTT1 і GSTM1, збільшується ризик захворювань, спричиненими впливом дії на організм ксенобіотиків. Перспективи подальших досліджень пов'язані з пошуком нових маркерів екологічної дезадаптації, а саме : визначення поліморфних варіантів окремих генів, що належать до першої фази системи біотрансформації для встановлення взаємодії між обома фазами детоксикації і шляхів корекції екопатологічних станів.

## Висновки

У роботі досліджено розподіл генотипів у дітей, які постійно перебувають у контакті з генотоксичними чинниками (проживають в умовах радіаційно і хімічно забрудненого довкілля). У дітей, в яких встановлений різний ступінь важкості протікання екологічно детермінованої патології виявлено зростання частоти гомозиготного носійства делетованих алелів гена GSTT1.

## Література

1. *Nei M.* Analysis of gene diversity in subdivided populations // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1973. V. 70.
2. *Lewontin R.C.* The genetic basis of evolutionary chance. N.Y.; London: Columbia Univ. Press, 1974. 351.
3. *Kelada S.N., Eaton D.L., Wang S.S. et al.* The role of genetic polymorphisms in environmental health // Environmental Health Perspectives. V. 111. № 81. P. 1055-1064. 645.
4. *Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В.* Геном человека и гены предрасположенности (Введение в предиктивную медицину). Санкт-Петербург: «Интермедика», 2000. 272с.
5. *Спицын В.А., Цыбикова Э.Б., Агапова Р.К. и др.* Влияние наследственных факторов на переносимость хирургических операций у больных раком легкого // Генетика 1996. Т. 32. № 5. С. 691-701.
6. *Mace, K., Bowman, E. D., Vautravers, P., Shields, P. G., Harris, C. C., and Pfeifer, A. M.* Characterization of xenobiotic-metabolizing enzyme expression in human bronchial mucosa and peripheral lung tissues. Eur. J. Cancer, 34: 914–920, 1998.
7. *Rollinson S, Roddam P, Kane E, et al.* Polymorphic variation within the glutathione S-transferase genes and risk of adult acute leukaemia. Carcinogenesis. 2000;21:43-47
8. *Rebbeck T.R.* Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 6: 733-743, 1997.
9. *Трахтенберг И.М.* Приоритетные аспекты фундаментальных исследований в токсикологии // Тез. докл. 1 съезда токсикологов Украины. – К., 2001. – С. 5-6.
10. *Довкілля Івано-Франківщини: Статистичний збірник / За ред. Л.О.Зброй.* – 2004. – 133 с.
11. *Arand M., Muhlbauer R., Hengstler J. et al.* Multiplex Polymerase chain Reaction for the Glutathione S-Transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms // Analytical Biochemistry. – 1996. – № 236. –Р. 184-186.

## Резюме

Вивчено алельний поліморфізм генів GSTM1, GSTT1 II фази біотрансформації ксенобіотиків серед дітей, що проживають на територіях, забруднених генотоксичними чинниками. Дослідження показало, що маркером схильності до розвитку і важкості перебігу соматичних захворювань можна вважати генотип GSTT1 « – ».

Изучен аллельный полиморфизм генов GSTM1, GSTT1 II фазы биотрансформации ксенобiotиков среди детей, проживающих в условиях загрязненной окружающей среды. Проведенное исследование показало, что маркером предрасположенности к развитию и тяжести течения заболеваний можно считать генотип GSTT1 « – ».

Authors studied genes polymorphism of GSTM1, GSTT1, which participate in II phase of xenobiotics transformation, in children which live on polluted territories. The study showed that genotype GSTT1 « – » could be estimated as marker of predisposition to development and more severe course of ecologically caused disease.

**ВОРОБЬЕВА Л. И., ВДОВИЧЕНКО Н.И., МИКУЛИНСКИЙ Ю. Е.,  
КУЛЬШИН В.Е.**

## **ИЗУЧЕНИЕ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ GSTP1, RASSF1A, APC ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Рак предстательной железы (РПЖ) занимает одно из ведущих мест среди злокачественных новообразований у мужчин. Обычно смерть от данного заболевания является следствием поздней его диагностики. В этой связи существует настоятельная необходимость в разработке методов диагностики ранних стадий опухоли. Разработанные до настоящего времени диагностические тесты на рак предстательной железы не обладают достаточно высокой чувствительностью и специфичностью. В качестве основного диагностического теста в настоящее время используется количественное определение в сыворотке крови простатического специфического антигена (ПСА). Однако ПСА не является строго специфичным маркером для рака простаты, повышение его уровня также может наблюдаться при доброкачественной гиперплазии и простатите [1,2].

В последнее десятилетие было установлено, что в многостадийном процессе образования опухолей нарушение функций клеточных генов может происходить не только в результате генетических событий, но и в результате эпигенетических изменений, в том числе локального гиперметилирования ДНК. Метилирование вовлечено в такие фундаментальные процессы жизнедеятельности клетки, как регуляция экспрессии генов и поддержание стабильности генома.

Аберрантному метилированию в опухолевых клетках подвергаются специфические последовательности – CpG-островки, ассоциированные с 5' регуляторными районами многих генов. В нормальных клетках большинство CpG-островков не метилировано, а их метилирование в опухолевых клетках, как правило, сопровождается подавлением транскрипции соответствующего гена, наследуемой при делении клетки. В последнее время разработаны методы идентификации гиперметилированных районов ДНК, основанные на дифференциальном статусе метилирования CpG-островков в нормальных и опухолевых клетках [3,4].

Цель данной работы состояла в исследовании статуса метилирования промоторов генов, ассоциированных с развитием РПЖ, экспрессия которых может быть подавлена вследствие нарушения метилирования ДНК.

### **Материалы и методы**

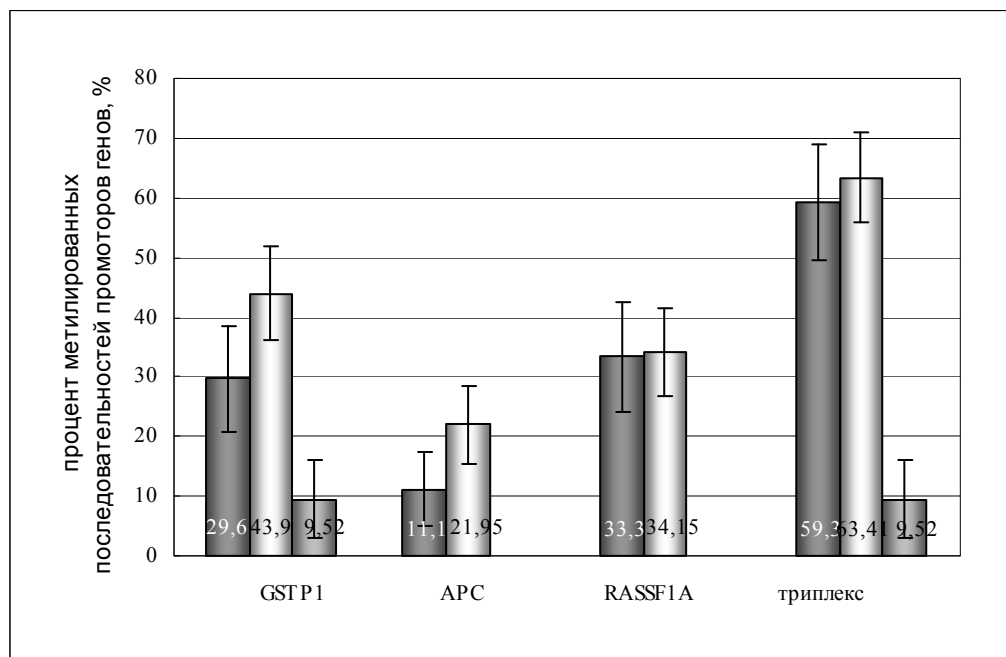
Объектом исследования служила сыворотка крови мужчин в возрасте 56-78 лет. Количество обследуемых составило 89 человек. Для определения концентрации общего ПСА сыворотки крови, а также свободного ПСА (свПСА) использовались иммуноферментные тест-системы. Статус метилирования промоторов генов определяли с помощью метода метил-специфической ПЦР (МС-ПЦР). Принцип данного метода состоит в том, что в ходе обработки выделенной из сыворотки крови пациента ДНК бисульфитом натрия, неметилированный цитозин превращается в урацил, а метилированный цитозин не модифицируется. Затем ДНК амплифицируется с помощью ПЦР, используя две пары праймеров, одна из которых специфична к метилированной ДНК, другая – к неметилированной ДНК. После амплификации обработанной ДНК в продукте ПЦР происходит замена урацила на остаток тимина, в то время как метилированный остаток цитозина остается остатком цитозина [5].

Полученные результаты оценивались по критерию Фишера.

### **Результаты и обсуждение**

Для исследования связи уровня метилированных последовательностей промоторов генов с развитием рака предстательной железы обследуемые мужчины были разделены на три клинические группы по уровню ПСА в сыворотке крови. В

первую группу (а) со значениями ПСА более 20 нг/мл были объединены больные раком предстательной железы; во вторую экспериментальную группу (b) с ПСА 10 - 20 нг/мл - больные с гиперплазией и возможным раком простаты; в третью группу (с) вошли клинически здоровые мужчины с ПСА до 2 нг/мл.



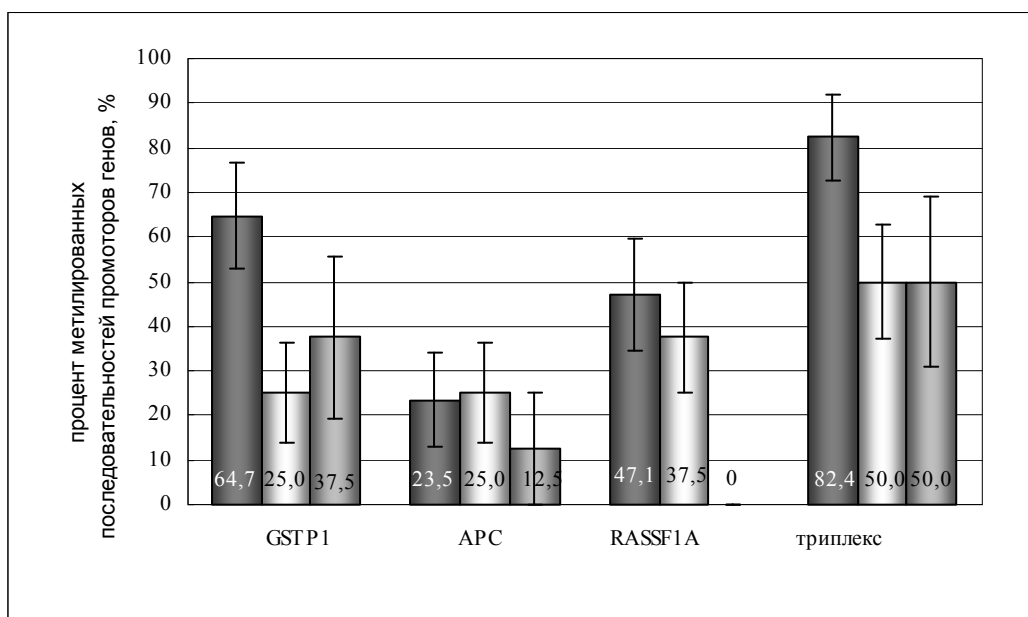
**Рис.1** Сравнение уровня метилированных последовательностей промоторов генов в трех клинических группах: а – б – с –

Установлено (рис.1), что для всех трех генов наблюдается значительный процент метилирования промоторных областей в первых двух группах в отличие от группы здоровых мужчин. Суммарный процент по трем генам составил 59,3% в первой группе, 63,4% во второй группе и 9,5% в третьей группе. Полученные результаты в указанных группах достоверно отличаются от контрольных показателей третьей группы ( $P < 0,01$ ), за исключением гена GSTP1, который проявил низкую специфичность, т.к. метилированные последовательности промотора этого гена обнаруживаются и в группе здоровых мужчин. Полученные данные не позволяют выделить больных с гиперплазией и больных раком простаты, т.к. различия между первой и второй группой не достоверны.

Мы также проанализировали уровень метилирования данных генов в подгруппах с различным отношением свободного ПСА к общему ПСА (рис.2); исследования проводили на сыворотке крови пациентов второй группы (b) с уровнем ПСА 10-20 нг/мл. На основании данного теста мы выделили три подгруппы: I) содержание свПСА до 10% (рак предстательной железы); II) 10-15% свПСА («серая зона»); III) 16-25% свПСА (доброкачественная гиперплазия простаты).

В подгруппе (I) уровень метилирования промотора гена GSTP1 значительно выше, чем в подгруппе (II) ( $P < 0,05$ ), что может быть использовано для дифференциальной диагностики гиперплазии и рака в «серой зоне». Для двух других генов не было обнаружено достоверных отличий в подгруппах (I) и (II). Суммарный процент метилирования промоторов трех генов для данной подгруппы максимальный и составляет 82,4%.

В подгруппе (III) наблюдается низкий процент метилирования промоторных областей всех трех генов. Сравнивая результаты подгрупп (I) и (II) с подгруппой (III) достоверную разницу можно утверждать только для гена RASSF1A ( $P < 0,01$ ), что может использоваться для дифференциальной диагностики простаты.



**Рис.2** Уровень метилированных последовательностей промоторов генов у мужчин с гиперплазией и возможным раком предстательной железы (ПСА 10 - 20 нг/мл): I – ■; II – □; III – ▨

В работе [6] обследовали образцы тканей у 53 пациентов с первичным РПЖ и образцы неопухолевых тканей простаты. Было показано, что гиперметилование CpG островков генов GSTP1, APC и PTGS2 значительно выше в образцах РПЖ (71-91%) и может служить отличительным признаком между РПЖ и неопухолевой тканью простаты (например, гиперплазией простаты). Уровень метилирования двух генов (GSTP1, APC) коррелировал со стадией опухоли, уровнем дифференцировки по Глиссону и распространением опухоли за пределы простаты, но не с уровнем ПСА, что согласуется с полученными нами результатами.

Анализ уровня метилирования гена RASSF1A в [6] показал положительный результат в 28% случаев при доброкачественной гиперплазии, которая может представлять собой неагрессивную раннюю форму рака. В нашем исследовании в группе пациентов с гиперплазией и возможным РПЖ уровень метилирования RASSF1A оказался выше (34,2%).

В работе [7] исследовали ткань простаты 55 мужчин после простатэктомии и 35 мужчин с негативной биопсией простаты. Гиперметилование CpG островков промоторной области гена GSTP1 определяли используя метил-чувствительные рестриктазы. У мужчин с негативной биопсией простаты не было обнаружено гиперметилования указанной области в свободной ДНК сыворотки крови. В группе мужчин с локализованным РПЖ и у больных с метастазами было обнаружено гиперметилование в 12% и 28% случаев соответственно ( $P = 0,003$ ). Был сделан вывод, что гиперметилование островков промотора гена GSTP1 может служить сывороточным биомаркером для обнаружения РПЖ и метастазов. В нашем исследовании метилированные последовательности промотора гена GSTP1 обнаруживаются и в группе здоровых мужчин, что возможно связано с использованием различных методов для определения метилирования.

### Выводы

Полученные нами данные показывают возможность применения метода МС-ПЦР при диагностике РПЖ. Мы предполагаем, что при расширении панели генов-кандидатов для анализа метилирования можно значительно увеличить диагностическую чувствительность и специфичность метода. Внедрение нового метода в клиническую практику обеспечит возможность отбора людей, подвергающихся



повышенному риску развития РПЖ, а наблюдение за их состоянием позволит обнаруживать опухоли на ранних стадиях развития и проводить своевременную и, соответственно, более эффективную терапию.

#### **Литература**

1. *Воробьев А.В.* Скрининг мужского населения, стандартное обследование пациентов, классификация рака предстательной железы // Практическая онкология. – 2001. – №2. – С.8-16
2. Алгоритм ранней диагностики рака предстательной железы // Урология и нефрология. – 2003. – №9. – С.3-16
3. *Walsh C.P., Xu G.L.* Cytosine methylation and DNA repair // *Curr. Top Microbiol. Immunol.* – 2006. – Vol.301. – P. 283-315
4. *Mann J.R., Szabo P.E., Reed M.R., Singer-Sam J.* Methylated DNA sequences in genomic imprinting // *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* – 2000. – Vol.10(3-4). – P.241-257
5. *Hajkova P., El-Maarri O., Engemann S. et al.* DNA-Methylation Analysis by the Bisulfite-Assisted Genomic Sequencing Method // *Methods in Molecular Biology.* – 1998. – Vol.200. – P.143-154
6. *Bastian P.J., Ellinger J., Wellmann A.* Diagnostic and Prognostic Information in Prostate Cancer with the Help of a Small Set of Hypermethylated Gene Loci // *Clinical Cancer Research.* – Vol. 11. – P.4097-4106
7. *Bastian P.J., Palapattu G.S., Lin X., Yegnasubramanian S.* Preoperative serum DNA GSTP1 CpG island hypermethylation and the risk of early prostate-specific antigen recurrence following radical prostatectomy // *Clin Cancer Res.* – 2005. – Vol.11(11). – P.4037-4043
8. *Liu L., Yoon J.H., Dammann R., Pfeifer G.P.* Frequent hypermethylation of the RASSF1A gene in prostate cancer // *Oncogene.* – 2002. – Vol.21(44). – P.6835-6840

#### **Резюме**

Исследовали статус метилирования промоторов генов, изменения в экспрессии которых ассоциированы с развитием рака предстательной железы. Полученные данные показывают возможность применения метода метил-специфической ПЦР при диагностике рака простаты.

Вивчали статус метилування промоторів генів, зміни в експресії яких пов'язані з розвитком раку передміхурової залози. Отримані дані показують можливість використання метода метил-специфічної ПЛР при діагностиці раку простати.

We have investigated methylation status of the promoters of genes which expression is associated with prostate cancer development. Our data suggest the potential significance of the method methylation-specific PCR in the prostate cancer diagnostics.

#### **ГЕНИК-БЕРЕЗОВСЬКА С.О.**

*Институт спадкової патології АМН України  
Україна, 79000, Львів, МСП-169, вул.Лисенка 31а,  
e-mail: root@ihp.lviv.ua*

### **АНАЛІЗ ЕФЕКТИВНОСТІ ВИКОРИСТАННЯ РЕГІОНАЛЬНОГО РЕЄСТРУ ПРИРОДЖЕНИХ ВАД РОЗВИТКУ СЕРЕД НОВОНАРОДЖЕНИХ У ПОЛОГОВИХ ЗАКЛАДАХ ЛЬВІВСЬКОЇ ОБЛАСТІ ДЛЯ УДОСКОНАЛЕННЯ МЕДИКО-ГЕНЕТИЧНОГО КОНСУЛЬТУВАННЯ НАСЕЛЕННЯ**

Проблема вродженої та спадкової патології, в першу чергу природжених вад розвитку (ПВР) та аномалій, хромосомних та поширених моногенних захворювань, продовжує залишатися в ряді найбільш актуальних, незважаючи на значні успіхи у

вивченні генетичних основ їх виникнення та поширення в популяції. За останнє десятиліття ця проблема набула серйозного медико-соціального значення по ряду причин. По-перше, суттєво зросла питома вага ПВР в структурі причин перинатальної та неонатальної захворюваності і смертності. По-друге, не знижується показник дитячої інвалідності, яка в більшості випадків зумовлена природженою та спадковою патологією, причому по показнику втрачених років життя ПВР і спадкові хвороби займають одне із перших місць, залишивши після себе серцево-судинні, онкологічні та інші широко поширені соматичні захворювання. Крім того, лікування хворих з природженою патологією тривале і складне, необхідна медико-педагогічна корекція дефектів та соціальна допомога дітям-інвалідам, що вимагає значних економічних затрат [1, 2, 3].

Із 1998 року в Україні створено Український Альянс для профілактики природжених вад розвитку, який впроваджує в життя Українсько-Американську програму профілактики природжених вад розвитку, використовуючи кращі світові досягнення у цій галузі. В 2001 році Українсько-Американська програма профілактики ПВР стала членом International Clearinghouse [4].

В деяких країнах впроваджується підхід, в основі якого лежить комплекс заходів по “периконцепційній профілактиці”, метою яких є зниження ризику зачаття хворої дитини. Показами для периконцепційної профілактики є : 1) наявність в сім’ї ризику по ПВР- дефекти нервової трубки, щілина губи та піднебіння, атрезії та інші; 2) не виношування вагітності, народження дітей із гіпотрофією; 3) цукровий діабет; 4) хронічна соматична патологія у одного із подружжя; 5) робота одного із подружжя на виробництві та контакт із забруднювачами, що підпадають під токсико-генетичне нормування [5].

Мета роботи – порівняння репродуктивного, генетичного анамнезу, особливостей перебігу даної вагітності у жінок, які народили дітей з ПВР та контрольної групи, оцінка ризику виникнення ПВР серед новонароджених.

#### **Матеріали і методи**

Об’єкт дослідження – випадки природжених вад розвитку у новонародженихпологових установах Львівської області.

Методи та об’єм дослідження – збір та аналіз клініко-епідеміологічних і медико-статистичних даних з джерел первинної документації про дітей, які народились в 2002-2007 роках із ПВР методом “випадок-контроль” шляхом заповнення реєстраційних карт в пологових установах Львівської області. На кожен випадок ПВР заповнено “Карту реєстрації дитини з вродженою аномалією” та, в якості контролю 1-2 “Карти реєстрації здорової доношеної дитини” на здорову доношену дитину цієї ж статі, народжену в найкоротший проміжок часу від дитини з вадою розвитку.

Заповнено 345 карт на дітей із ПВР та 358 карт на здорових дітей. Створено базу ПВР у форматі Excel. За рекомендаціями європейського реєстру [12] брались до уваги наступні вади: аненцефалія, spina bifida, енцефалоцеле, гідроцефалія, анотія, мікротія, щілина піднебіння (без щілини губи), щілина губи (із або без щілини піднебіння), атрезія стравоходу, атрезія прямої кишки, агенезія нирок, редуційні вади кінцівок, полідактилія, омфалоцеле, гастрошизис, дефекти черевної стінки, діафрагмальна кила, транспозиція магістральних судин, гіпоплазія лівих відділів серця, синдром Дауна, МПВР, мікроцефалія, ариненцефалія / голопрозенцефалія, анофтальмія, мікрофтальмія, атрезія хоан, атрезія або стеноз тонкого кишківника, гіпоспадія, невизначена стать, епіспадія, екстрофія сечового міхура, кистозна хвороба нирок, трисомія 13, трисомія 18.

Отримані дані стандартизовані згідно Міжнародної статистичної класифікації хвороб та споріднених проблем охорони здоров’я десятого перегляду (МКХ – 10) та оброблено методами варіаційної статистики за допомогою пакету програм “Statistica та Microsoft Excel – 2000: визначали середнє арифметичне значення (М), відхилення від

середнього арифметичного значення ( $m$ ), співвідношення шансів (odds ratio – OR), довірчий інтервал співвідношення шансів (Exp).

Шляхом проспективного та ретроспективного аналізу медичної документації пологових установ Львівської області проведено аналіз факторів ризику виникнення ПВР серед новонароджених методом “випадок – контроль” за 2002-2006 роки та 8 місяців 2007 року. За даний період заповнено 345 карт на дітей із природженими вадами розвитку та 358 карт на здорових дітей.

#### **Результати та обговорення**

В групі ПВР перша вагітність закінчилася артіфіціальним абортom у 5,8% випадків, в контрольній групі – в 2,6% випадків. Загалом в досліджуваній групі артіфіціальних абортів було у 10,2% випадків, в контрольній – 6,1% ( $P>0,05$ ).

Самовільним викиднем закінчилося 32 вагітності в досліджуваній групі, з них 29 – викидні першого триместру, що становить 8,4% випадків, в контрольній групі самовільний викидень був у 30-ти випадках, з них в першому триместрі – у 23-ох випадках - 6,4% ( $P>0,05$ ).

Серед матерів групи ПВР померлі діти були у 10-ти випадках, що складає 2,8%, в контрольній групі – у 5-ти випадках, що становить 1,3%. Мертвонародження спостерігалися у 12-ти випадках (3,4%) досліджуваної групи та в 1-му випадку (0,27%) контрольної групи ( $P<0,05$ ).

Регулярне вживання гормональних контрацептивів спостерігалось в 1,1% випадків групи ПВР та в 0,8% випадків контрольної групи ( $P>0,05$ ).

Порівняння питомої ваги анемії протягом вагітності в досліджуваній та контрольній групах представлено в таблиці 1

Під час вагітності анемія була у 41,2% випадків досліджуваної групи та 41,0% – контрольної групи ( $P>0,05$ ). Ризик народження дитини (odds ratio – OR) з ПВР при анемії у матері складає 0,97 при довірчому інтервалі (0,33; 2,53).

Порівняння питомої ваги гестозу першої половини вагітності в досліджуваній та контрольній групах представлено в таблиці 2.

Гестоз першої половини вагітності у матерів був у 32,6% випадків досліджуваної групи та 31,8% – контрольної групи ( $P>0,05$ ). Ризик народження дитини (OR) із ПВР при гестозі першої половини вагітності становить 1,1 при довірчому інтервалі (0,44; 2,54).

Порівняння питомої ваги гестозу другої половини вагітності в досліджуваній та контрольній групах представлено в таблиці 3.

Гестоз другої половини вагітності у матерів був у 34,5% випадків досліджуваної групи та 32,7 % – контрольної групи ( $P>0,05$ ). Ризик народження дитини (OR) із ПВР при гестозі другої половини вагітності становить 1,0 при довірчому інтервалі (0,55; 2,62).

Двічі до 28 – ми тижнів вагітності УЗ дослідження було проведено у 44,3% випадків групи ПВР та у 50,0% – контрольної групи ( $P>0,05$ ).

Вроджені аномалії при проведенні УЗД виявлено у 45-ти випадках, що становить 13,0%.

Діагностовано 14 випадків spina bifida, 11 – синдроми МПВР; по 1-му випадку менінгоенцефалоцеле, омфалоцеле, атрезії тонкого кишківника, кистозної хвороби нирок, голопрозенцефалії, вродженого гідронефрозу та синдрому Дауна; по 2 випадки гідроцефалії та агенезії нирок; по 3 випадки атрезії стравоходу, гіпоплазії лівих відділів серця та діафрагмальної киля та у 4-ох випадках спостерігався гастрошизис.

При порівнянні генетичного анамнезу матерів досліджуваної групи вроджені аномалії виявлено у 5-ти випадках: 3 – природжений вивих стегна, двобічний, 1 – природжений коксартроз кульшових суглобів, косозміщений таз, 1 - полідактилія. У контрольній групі спостерігалось 7 випадків природжених вад розвитку: 5 – природжений вивих стегна, двобічний, 1 – додаткова нирка, 1 – щілина губи.

Серед близьких родичів групи ПВР вроджені аномалії виявлено у 3-ох випадках – 1 - природжена вада розвитку системи кровообігу, неуточнена (у брата матері досліджуваної групи), 1 випадок – spina bifida, 1 випадок – гіпоспадія. В контрольній групі природжених аномалій та генетичних порушень у близьких родичів не спостерігалось.

В обох групах шлюб не був кровноспоріднений.

Таким чином, зареєстровано більшу кількість випадків мертвонароджень (3,4%) у жінок групи ПВР, ніж у жінок контрольної групи (0,27% випадків). Отже, враховуючи вказані особливості репродуктивного анамнезу та перебігу вагітності і пологів, спостерігається статистично значима різниця досліджуваної групи матерів ( $P < 0,05$ ) з контрольною.

Таблиця 1

**Порівняння питомої ваги анемії протягом вагітності матерів дітей з ПВР та контрольної групи**

Анемія	Випадки ПВР		Контрольна група	
	Кількість	Питома вага %	Кількість	Питома вага %
Присутні	142	41,2	147	41,0
Відсутні	162	46,9	163	45,5
Невідомо	41	12,0	48	13,5

Таблиця 2

**Порівняння питомої ваги гестозу першої половини вагітності матерів дітей з ПВР та контрольної групи**

Гестоз першої половини вагітності	Випадки ПВР		Контрольна група	
	Кількість	Питома вага %	Кількість	Питома вага %
Присутні	112	32,6	114	31,8
Відсутні	193	55,9	218	61,0
Невідомо	40	11,5	26	7,2

Таблиця 3

**Порівняння питомої ваги гестозу другої половини вагітності матерів дітей з ПВР та контрольної групи**

Гестоз другої половини вагітності	Випадки ПВР		Контрольна група	
	Кількість	Питома вага %	Кількість	Питома вага %
Присутні	119	34,5	117	32,7
Відсутні	184	53,2	194	54,2
Невідомо	42	12,3	47	13,1

**Висновки**

1. Не виявлено статистично значимої різниці щодо відсотку артифіціальних абортів (10,2%), самовільних викиднів (8,4%), померлих дітей (2,8%) у матерів досліджуваної групи ( $P > 0,05$ ) в порівнянні з контрольною (6,1%, 6,4% та 1,3% відповідно).

2. Виявлено статистично значиму різницю ( $P < 0,05$ ) щодо відсотку мертвонароджень, (3,4%) у матерів, які народили дитину з природженою вадою розвитку порівняно із жінками контрольної групи (0,27%) відповідно.

3. Порівнюючи особливості перебігу вагітності, не виявлено статистично значимої різниці щодо анемії, гестозу першої та другої половини вагітності, імунного конфлікту між матір'ю і плодом, рентгенорадіологічного обстеження, ультразвукового дослідження, фізичної та психічної травми, ускладнених та патологічних пологів у жінок групи ПВР в порівнянні з контрольною ( $P > 0,05$ ).

4. Ризик народження дитини з ПВР при анемії у матері складає 0,97 при довірчому інтервалі (0,33; 2,53). Ризик народження дитини із ПВР при гестозі першої половини вагітності становить 1,1 при довірчому інтервалі (0,44; 2,54). Ризик народження дитини із ПВР при гестозі другої половини вагітності становить 1,0 при довірчому інтервалі (0,55; 2,62).

Впровадження моніторингу ПВР дозволяє визначити рівень поширеності природженої патології серед новонароджених. Отримані дані свідчать про необхідність подальшого моніторингу природжених вад розвитку серед новонароджених та дитячого населення з метою оцінки та попередження факторів ризику виникнення ПВР.

### Література

1. Чебан В.І. Вроджені вади розвитку як показник порушень популяційного репродуктивного розвитку // Буковинський медичний вісник. – 2003. – Т. 7, №2. – С.200–203.
2. Поширеність генетичної патології серед живонароджених в Україні / О.І. Тимченко, В.В.Єлагін, В.О. Галаган та ін. // ПАГ. – 2001. – №5. – С. 5–8.
3. Тимченко О.І., Єлагіна В.В. та інші Генетична обумовленість здоров'я // Матеріали 4 конгресу неонатологів України “ Актуальні проблеми неонатології” - Київ – 2006.- с.158-160.
4. [http://www. ibis – birthdefects.org/start/uabdp.htm](http://www.ibis-birthdefects.org/start/uabdp.htm)
5. Наследственные и врожденные болезни: вклад в детскую заболеваемость и инвалидность, подходы к профилактике / Л.П. Андреева, Н.П.Кулешов, Г.Р. Мутовин, и др.// Педиатрия, журнал имени Г.Н.Сперанского.- 2007.- № 3.- С. 8-14.

### Резюме

Проведен анализ пренатальных факторов риска у женщин, родивших детей с врожденными пороками развития в г. Львове и Львовской области за 2002-2007 гг. Выявлено статистически значимую разницу ( $P<0,05$ ) по мертворождениях (3,4%) у матерей исследуемой группы сравнительно с женщинами контрольной группы (0,27%).

Проведено аналіз пренатальних факторів ризику у жінок, які народили дітей із природженими вадами розвитку у м.Львові та Львівській області за 2002-2007 рр. Виявлено статистично вірогідну різницю ( $P<0,05$ ) по мертвонародженнях (3,4%) у матерів досліджуваної групи порівняно із жінками контрольної групи (0,27%).

The analysis of prenatal risks factors among womens, which gave birth to newborns with congenital malformations in Lviv and Lviv district during 2002-2007 was carried out.

The statistically significant increase ( $P<0,05$ ) in stillborns (3,4%) among mothers of examined group comparatively to control group (0,27%) was revealed.

**ГУЛЬКО Т.П.<sup>1</sup>, ТОПОРОВА Е.К.<sup>1</sup>, СУХОРАДА Е.М.<sup>1</sup>, РУБАН Т.А.<sup>1</sup>,  
АЛЕКСЕЕВА Т.А.<sup>2</sup>, ПРОДОВ Д.М.<sup>1</sup>, КОРДЮМ В.А.<sup>1</sup>**

*1 - Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,  
ул. Заболотного, 150,г. Киев.*

*2 - Институт Металлофизики им. В.Г. Курдюмова НАН Украины,  
бул. Вернадского, 16, Киев.*

### **ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ УГЛЕРОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ КАК МАТРИКСОВ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ В СИСТЕМАХ IN VITRO И IN VIVO**

Благодаря развитию новой области клинической медицины - тканевой инженерии - технологии scaffold приобретают все большую актуальность и широкое применение в регенеративной медицине. При этом часто используются комбинации живых клеток и поддерживающей структуры, которая и называется scaffold. Сам

процесс тканевой инженерии заключается в том, что ткани могут быть взяты у человека, размножены, высеяны на матрикс из определенного биоматериала с целью формирования тканевой конструкции, которая затем может быть пересажена этому же человеку в качестве замещающей ткани или пораженного органа. Основные принципы данного подхода заключаются в разработке и применении при имплантации в поврежденный орган или ткань носителей из биodeградирующих материалов. Однако существует проблема биологической совместимости материалов, используемых сегодня в качестве матриксов. Происходит отторжение многих искусственных материалов, несмотря на постоянное применение химических иммунодепрессантов. Необходим поиск новых инертных и биосовместимых материалов. Особый интерес представляют углеродные материалы, которые достаточно совместимы с живым организмом [1]. Их получают термической обработкой химических или природных органических волокон (чаще всего используются вискозные), при которой в веществе остаются в основном атомы углерода (99%). Углеродные материалы уже сейчас интенсивно используются в адсорбционной терапии — гемосорбции (очистка крови, лимфы от токсических веществ), энтеросорбции (лечение желудочно-кишечных заболеваний, аллергии, диабета), а также аппликационной сорбции (использование волокнистых тканей из углеродных адсорбентов в качестве аппликационного и перевязочного материала при лечении ран, ожогов и трофических язв). Адсорбционные свойства углеродных материалов позволяют расширить возможности использования их в клинической практике для регенерации поврежденной ткани или органа, в частности в качестве матриксов для выполнения задач тканевой инженерии [2].

В данной работе показаны возможности применения углеродных материалов различной структуры для scaffold технологий при имплантации в биологические объекты. Изучено поведение иммобилизованных клеток на нерастворимых углеродных материалах различной структуры (волокнистая ткань, шарики, нити, электропроводящей саже в виде нанотрубок) в системах *in vitro*, исследована судьба имплантационных биоматериалов в организме модельных животных.

### Материалы и методы

В экспериментах использованы стабильные рекомбинантные клеточные линии, экспрессирующие маркерный зеленый флуоресцентный белок медузы (СНО-K1egfp) и инсулин человека (СНО-K1hins) (3,4). Культивирование клеток проводили в среде DMEM (Sigma, США). Жизнеспособность клеток определяли методом МТТ (фирма Sigma, США). В качестве матриксов для иммобилизации клеток использовали активированные углеродные материалы различной структуры: сферический углеродный сорбент марки СКН, углеродное волокно, полученное методом карбонизации ацетатного волокна и многостенные углеродные нанотрубки (сажа) производства ООО ТМСпецмаш, Киев, Украина. Характеристики материалов представлены в таблице 1.

Таблица 1. Физические характеристики углеродных материалов

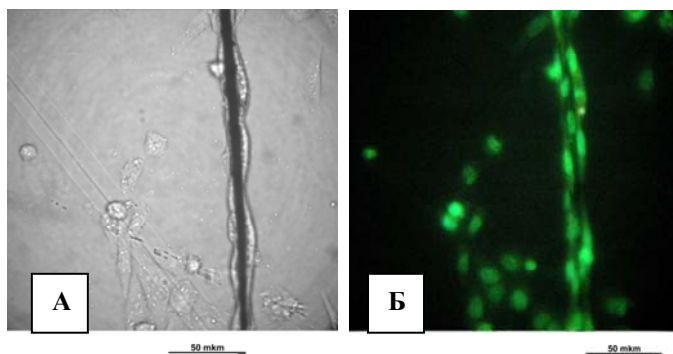
Матрикс	Насыпная плотность г/мл	Сорбционная емкость по $\text{CH}_3\text{I}$ г/г	Объем сорбционных пор $\text{см}^3/\text{г}$	Удельная поверхность $\text{м}^2/\text{г}$	Удельное сопротивление Ом.см
Углеродное волокно	0,3	2,96	0,6-1,5	480-800	04.июн
Углеродный сорбент СКН	0,48-0,5	1,23	0,56	550	-
Углеродные нанотрубки	0,015-0,04	-	-	200-400	0,5-0,1

После культивирования матрицы с клетками или без них трансплантировались под брюшину или вшивались в разрез открытой раны модельным животным.

Эксперименты *in vivo* проводили на самцах мышей линии C57BL/6j массой 18 – 20 г. (6). Все манипуляции с животными проводили с использованием седативных и анестезирующих препаратов в соответствии с ветеринарным законодательством. На один показатель в эксперименте использовали образцы от трех животных. Функциональную активность инсулинпродуцирующих клеток в составе биоинженерных конструкций *in vivo* исследовали на мышинной модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета. По окончании экспериментов проводился гистологический и цитологический анализ имплантов.

## Результаты и обсуждение

Использованные нами углеродные материалы сходные по природе, но имеющие различные физические характеристики, по-разному вели себя по отношению к клеткам линии CHO-K1 и эмбриональным фибробластам мыши в системах *in vitro* и *in vivo*. При изучении адгезионной активности клеток в отношении к представленным углеродным материалам наблюдалась разная степень иммобилизации клеток из-за отличий между типами материалов по сорбционной активности, что, по-видимому, связано с различной степенью пористости поверхностей исследуемых материалов [3]. Самый высокий потенциал к клеточной адгезии в системах *in vitro* наблюдался у волокнистой углеродной ткани, для которой такие параметры, как объем сорбционного



пространства пор (0,6–1,5 см<sup>3</sup>/г) и удельная поверхность пор (450–800 м<sup>2</sup>/г) значительно выше чем у других типов исследуемых материалов [3]. Волокнистая ткань оказалась самой оптимальной структурой для иммобилизации клеток и длительного удержания их на своей поверхности. Углеродные материалы с другими физическими характеристиками в дальнейших

исследованиях практически не использовались из-за низких количественных показателей иммобилизации клеток на их поверхности и трудностей пространственной инвазии клеток. Культивированные эпителиеподобные (CHO-K1, CHO-K1egfp, CHO-K1ins) клетки, а также культивируемые эмбриональные фибробласты мыши достаточно быстро адгезируются к углеродному волокну и активно пролиферируют (рис. 1, 2).

Рис.1. Иммобилизация клеток CHO-K1egfp на углеродных волокнах (1 сутки)

А – микрофотография клеток в проходящем свете

Б - флуоресценция белка EGFP

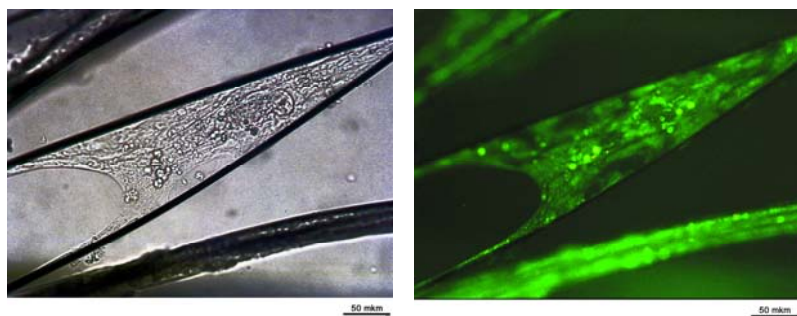


Рис.2. Пролиферация культивируемых эмбриональных фибробластов мыши, экспрессирующих флуоресцирующий белок EGFP, на углеродных волокнах (14 суток).

А – микрофотография клеток



в проходящем свете

Б - флуоресценция белка EGFP

В экспериментах с культивируемыми клетками и при имплантации углеродных волокон с иммобилизованными клетками изучали токсичность, изменение структуры материала в зависимости от окружающей среды и биосовместимость импланта с тканями организма. В процессе трансплантации под брюшину или ушивания в разрез раны кусочков углеродных волокон без клеток (или с клетками СНО-К1 или мышинными фибробластами, генетически маркированными EGFP) были выявлены особенные свойства исследуемых материалов, дающие большое преимущество этому материалу. Углеродные волокна оказались очень удобным в обращении матриксом, поскольку во время операции можно было легко и свободно манипулировать размерами, объемом импланта и его формой, что не наблюдалось при использовании углеродных материалов другой структуры. Из-за легкости и эластичности волокнистого углеродного материала имплант с клетками или без них можно легко разместить или распределить под брюшиной либо по длине разреза открытой раны, а его форма быстро адаптируется к окружающим структурам (мышцам, органам). Помещенные под брюшину углеродные волокна в большинстве случаев хорошо самофиксировались, поэтому дополнительного подшивания не требовалось. Исключительно важным достоинством углеродных волокон является их высокая инертность и гибкость, этот материал не токсичен и, как показал гистологический анализ имплантированных биоматриков и прилегающих тканей, не вызывает воспалительной реакции организма, т.е. в высокой степени биосовместим (рис.3).

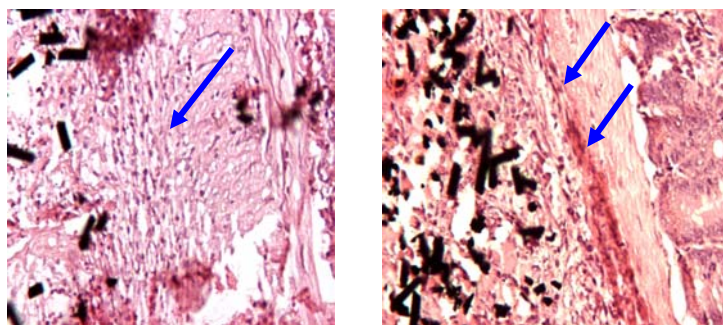


Рис.3. Гисто-морфологический анализ места имплантации матриков под брюшину мыши.

А- . формирование спаечного образования брюшины, нейтрофилы и макрофаги малочислены, новообразованная соединительная ткань бедна сосудами и фибробластами,

показано отсутствие раздражения брюшины используемыми волокнами. Окраска: гематоксилин-эозин, объектив 20х, окуляр 10х. Б- формирование спаечного образования брюшины, стрелками показано образование соединительнотканной капсулы, включающей в себя имплантированные волокна, с развивающейся соединительной тканью. Окраска: гематоксилин-эозин, объектив 40х, окуляр 10х.

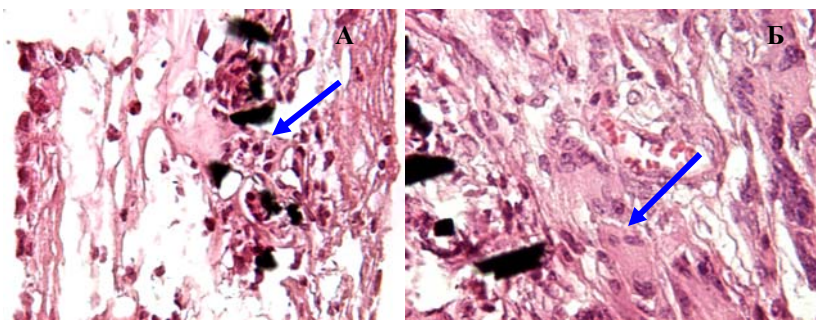
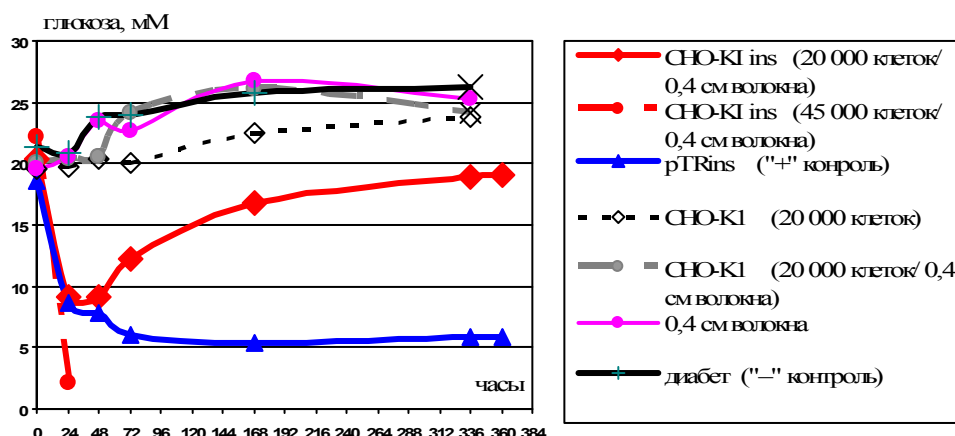


Рис.4. Гисто-морфологический анализ биоимплантов через 4 суток после операции. Окраска: гематоксилин-эозин, Объектив 40х, окуляр 10х.

На рисунке 4 представлены микрофотографии поперечных гистологических срезов имплантированных волокон с клетками эпителиального происхождения (СНО-К1) . На фотографии А видно формирование колоний эпителиоцитов, мигрировавших с нитей в формируемое спаечное образование брюшины, а также выявлен переход эпителиальных клеток с нитей на сформированное спаечное образование (фото Б )



Функциональную активность клеток, перенесенных в организм животных на углеродном волокне, мы изучали на модели стрептозотоцинового диабета с использованием клеточной линии стабильных трансформантов, экспрессирующих инсулин человека.



человека.

Рис.5.Содержание глюкозы в кровиэкспериментальныхдиабетическихмышей.

Модельные животные были разделены на 7 групп, на момент формирования в группы подбирали животных с аналогичным уровнем глюкозы в крови, так что группы не отличались по среднему показателю. Мониторинг гликемии проводили ежедневно, уровень глюкозы в крови мышей натощак измеряли глюкометром. В одном эксперименте внутрибрюшинно модельным животным имплантировали матрицы с иммобилизованными клетками CHO-K1ins, матрицы с иммобилизованными клетками CHO-K1, матрицы без клеток и клетки CHO-K1ins. В качестве положительного контроля диабетическим животным в паренхиму печени вводили препарат рекомбинантной ДНК, содержащей ген препроинсулина человека (7). Результаты эксперимента представлены на рисунке 5.

У всех животных, которые были задействованы в опытах, послеоперационный период протекал спокойно без каких-либо видимых негативных изменений. Животные наблюдались ежедневно в течение достаточно длительного времени. В течение первой недели после операции отмечалось умеренное заживление раны, а к началу второй — исчезновение всяких следов покраснения в области швов, да и самого шва практически не было видно. Результаты подшивания имплантов под брюшину или ушивания в разрез открытой раны нами были оценены как удовлетворительные. При исследовании самих имплантов и окружающих их тканей не было замечено ни очагов некроза, ни каких-либо следов воспалительного процесса, что является обязательным условием успешного приживления импланта.

## Выводы

1. Метод электронной микроскопии показал, что поверхность волокнистых углеродных материалов имеет объем сорбционного пространства пор (0,6–1,5 см<sup>3</sup>/г) и удельную поверхность пор (450–800 м<sup>2</sup>/г) значительно более высокую, чем у других типов исследуемых материалов [3]. Волокнистая ткань оказалась самой оптимальной структурой для иммобилизации клеток и длительного удержания их на своей поверхности. Пониженная способность к иммобилизации клеток на поверхности и затрудненная пространственная инвазия клеток ограничивают применение углеродных материалов другой структуры в биологических системах.
2. Углеродное волокно является гибким, эластичным, удобным в употреблении материалом, не токсичным для клеток, инертным для тканей хозяина при имплантации в организм. Такие волокнистые матрицы со стволовыми клетками можно использовать в создании биологических конструкций для дальнейшей трансплантации в организм с целью восстановления поврежденной ткани или органа.
3. Гистологический и цитологический анализы имплантов углеродное волокно-клетки

после длительного нахождения в организме животных подтвердили отсутствие какого-либо рода воспалительных процессов.

4. Углеродные волокна перспективны для выращивания тканей *in vitro*. По сравнению со многими современными материалами, применяемыми в качестве имплантов, высокая механическая прочность, гибкость, простота условий стерилизации и хранения, малый вес углеродных материалов, делают их оптимальными для производства биологических конструкций с дальнейшей трансплантацией в живой организм.

### Литература

1. . *Перепелкин К. И*, Углеродные волокна. – Москва. – Мир. – 1987.- 215 с.
2. *Васильев Ю. А.*, Углеродные материалы в медицине. – Москва. – Мир. – 2001.- 187 с..
3. *Кордюм В.А., Топорова Е.К., Окунев О.В., Похолоенко Я.А., Сухорада О.М., Рубан Т.А., Андриенко В.И., Иродов Д.М.* Новая множественно маркированная линия клеток – производная от СНО-К1.-Биополимери і клітина. 2002.-Т.19.-№3.- С.252
4. *О.Топорова, Т.Титок, Т.Рубан, Н.Suchorada, D.Irodov, V.Kordium.* Human preproinsulin gene delivery into mammalian liver cells *in vivo*. Journal of artificial orga-ns.2004.- V.27.№7.P.608
5. *Mikhailovsky S. V. and Alexeeva T. A.* , Bioselective medical activated carbons-are they real?// ACS.- 2001.- P. 42-44.
6. *Титок Т.Г., Гулько Т.П., Топорова О.К., О.М., Кордюм.* Дозо-зависимые особенности развития СТЦ-индуцированной модели диабета 1-го типа у животных. Зб. наук. праць: Фактори експериментальної еволюції організмів.-2006.-Т.3.-С.649-653
7. *Olena Toporova, Tamara Titok, Tamara Gulko, Vitaly Kordium* . Experimental gene therapy for Type 1 diabetes. Abstract Book XIV An-nual Congress of European Society of Gene Therapy.-2006.-P.56

### Резюме

В данной работе изучены возможности использования активированных углеродных материалов различной структуры (волокна, нити, шарики, многостенные углеродные нанотрубки) для иммобилизации клеток млекопитающих различного видового и тканевого происхождения с целью имплантации в организм. Представленные результаты исследований позволяют говорить о перспективности использования активированных углеродных волокнистых структур для scaffold технологий в регенеративной медицине.

В цьому дослідженні були вивчені можливості використання активованих вуглецевих матеріалів різної структури (волокна, нитки, кульки, вуглецеві нанотрубки) для іммобілізації клітин ссавців різного видового та тканинного походження з метою імплантації в організм. Наведені результати досліджень дозволяють говорити про перспективність використання активованих вуглецевих волокнистих структур для scaffold технологій у регенеративній медицині.

The possibilities of the use of the different structure activated carbon materials ( fibers, spheres, sponges and ash) for immobilization mammal cells of different specific and tissue origin with the aim of implantation in an organism. The presented results allow to talk about perspective of the use the activated carbon fibers for scaffold technologies in regenerative medicine

### ДИБИРОВА Х.Д.

Государственное учреждение Медико-генетический научный центр РАМН, Россия, Москва, Москворечье, 1.

[hadizha-dibirova@mail.ru](mailto:hadizha-dibirova@mail.ru)

## ЕСТЬ ЛИ У НАРОДОВ КАВКАЗА ПОЛИМОРФИЗМ ПО СПИД-ПРОТЕКТОРНОМУ ГЕНУ CCR5del32?

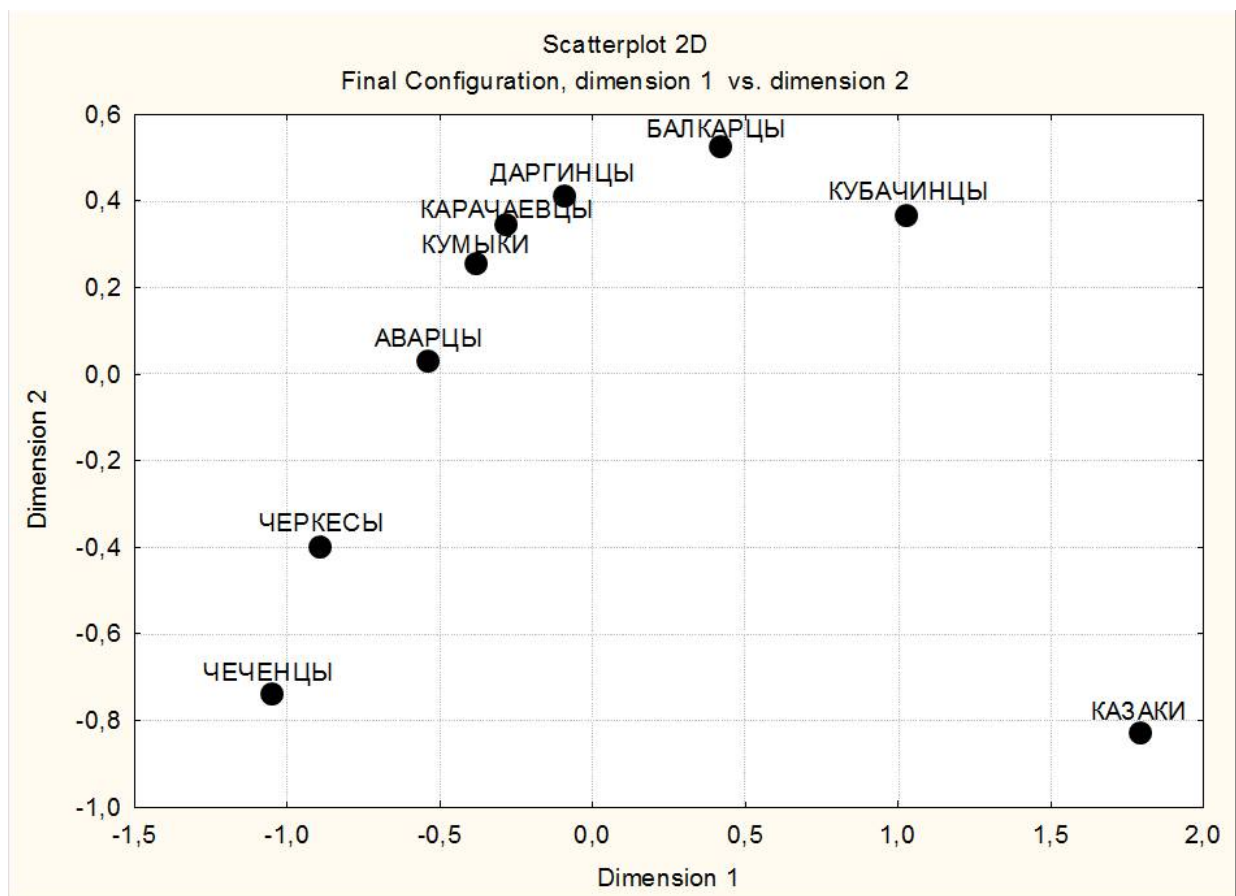
В последние десять лет делеция 32 нуклеотидов в гене рецептора хемокинов (CCR5del32) привлекает большое внимание исследователей. Мутация CCR5del32 определяет устойчивость к ВИЧ-1 инфекции: гомозиготы по этой мутации почти полностью устойчивы к инфицированию ВИЧ-1. Вирус использует хемокиновый рецептор для проникновения в клетку. Мутация приводит к отсутствию рецептора на поверхности клетки, что препятствует проникновению вируса. В то время как гомозиготы обладают почти полной устойчивостью, у гетерозиготных пациентов СПИД все-таки развивается, но медленнее, на два-три года позже, чем обычно [Zimmerman et al., 1997; Galvani and Novembre, 2005].

Аллель, несущий мутацию CCR5del32, встречается главным образом у европейцев, и имеет максимальную частоту ( $q=0.19$ ) [Балановская, Балановский, 2007], на севере Европы (на побережьях Балтийского и Белого морей), во всех направлениях от этой зоны частота плавно снижается. За пределами Европы мутация встречается с низкими частотами ( $0 < q < 0.02$ ) в смежных регионах (Северная Африка, Ближний Восток, Средняя Азия), но практически отсутствует ( $q=0.00$ ) в более отдаленных от Европы регионах: в Африке южнее Сахары, Восточной и Юго-Восточной Азии, в коренном населении Америки [Balanovsky et al., 2005]. Таким образом, было обнаружено важное свойство этого полиморфизма – расово-диагностическое, так как встречаемость аллельных вариантов маркера существенно различается в популяциях разных рас.

Кавказ, находясь на стыке Европы и Азии, всегда являлся зоной многосторонних контактов между народами Передней Азии и Восточной Европы. Северный Кавказ относится к регионам, через которые с глубокой древности проходили многие племена – от киммерийцев и скифов до тюркских племен позднего средневековья. Часть из них смешивалась с коренным населением Кавказа, порой приводя к возникновению новых этнических общностей [Народы мира, 1988]. В результате этих многочисленных миграций на Кавказе представлено три больших языковых семьи – северокавказская, алтайская, индоевропейская – представители которых обследованы нами по СПИД-протекторному гену CCR5del32.

В наших данных северокавказская семья представлена абхазами (N=86), адыгейцами (N=398), кабардинцами (N=118), черкесами (N=73), аварцами (N=118), даргинцами (N=113), кубачинцами (N=56), чеченцами (N=84). Алтайская семья представлена кумыками (N=224), балкарцами (N=93), карачаевцами (N=142), ногайцами (N=490). Индоевропейская семья представлена кубанскими казаками (N=138). Для получения достоверных результатов в ходе экспедиционных работ, в выборку включались не родственные между собой люди, бабушки и дедушки которых относились к данному этносу и проживали в сельских популяциях.

Достоверность полученных нами результатов подтверждается их согласованностью с имеющимися в литературе данными о трех этносах Кавказа: адыгейцах ( $q=0.04$ , N=434), даргинцах ( $q=0.06$ , N=220), карачаевцах ( $q=0.07$ , N=214) [База данных ALFRED <http://alfred.med.yale.edu/>].



**Рис. Дифференциация народонаселения Кавказа по СПИД-протекторному аллелю CCR5del32 (график многомерного шкалирования генетических расстояний).**

Несмотря на то, что изученные нами 13 народов Кавказа относятся к разным лингвистическим семьям и чрезвычайно подразделены географически, частоты мутантного аллеля варьируют в очень узком диапазоне ( $0.02 < q < 0.09$ ). Минимальная частота делеционного аллеля CCR5del32 встречена нами у чеченцев ( $q=0.02$ ), максимальная – у кубачинцев ( $q=0.09$ ). Однако другие народы Дагестана, которые обычно генетически значительно отличаются друг от друга, по гену CCR5del32 обнаружили удивительное сходство и между собой, и со среднекавказской частотой ( $q=0.04$ ): у аварцы  $q=0.05$ , у даргинцев  $q=0.04$ . И лишь один из народов Дагестана – кубачинцы – характеризуется значительным увеличением частоты мутантного аллеля ( $q=0.09$ ). Несмотря на то, что по частоте делеции кубачинцы сближаются с кубанскими казаками ( $q=0.12$ ) и другими русскими популяциями ( $q=0.11$ ), причиной такого повышения частоты CCR5del32 является не метисация с русскими популяциями, а дрейф генов. Кубачинцы являются уникальным примером одноаульного этноса – практически все кубачинцы Дагестана (1500 человек) проживают в ауле Кубачи. Браки у кубачинцев заключаются внутри этноса, что обуславливает значительный дрейф генов в столь изолированной популяции, который и мог привести к повышению частоты аллеля CCR5del32.

На графике многомерного шкалирования народы Кавказа сгруппированы в плотное облако, на периферии которого находятся кубачинцы, а кубанские казаки (проживающие в республике Адыгея) находятся на значительном удалении от всех популяций коренного населения Кавказа – как Западного, так и Восточного.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что полиморфизм гена CCR5del32 на Кавказе варьирует в достаточно узких пределах,

несмотря на лингвистическую и географическую подразделенность кавказских популяций.

Работа проведена при поддержке грантами РФФИ и РГНФ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Балановская Е.В., Балановский О.П. Русский генофонд на Русской равнине. – М.:Луч. - 2007.- 416 с.
2. База данных ALFRED <http://alfred.med.yale.edu/> .
3. Народы мира: историко-этнографический справочник. Главный редактор Ю.В.Бромлей. – М.: Советская энциклопедия. - 1988.-624с.
4. Balanovsky O, Pocheshkhova E, Pshenichnov A, Solovieva D, Kuznetsova M, Voronko O, Churnosov M, Tegako O, Atramentova L, Lavryashina M, Evseeva I, Borinska S, Boldyreva M, Dubova N, Balanovska E. Is spatial distribution of the HIV-1-resistant CCR5Delta32 allele formed by ecological factors? //Journal of Physiological Anthropology and Applied Human Sciences. 2005 Jul;24(4):375-382.
5. Zimmerman P.A., Wieseman M., Spalding T., Boatman B.A., Nutman T.B. A new intercellular adhesion molecule-1 allele identified in West Africans is prevalent in African-Americans in contrast to other North American racial groups // Tissue Antigens. -1997. -N 50(6). - P.654-656.
6. Galvani, Novembre. The evolutionary history of the CCR5-Delta32 HIV-resistance mutation // Microbes Infect. 2005.- N 7(2).- P. 302-309.

#### РЕЗЮМЕ

*По частоте делеции CCR5del32 изучено 13 народов Кавказа, относящихся к трем крупным лингвистическим семьям: северо-кавказской, индоевропейской и алтайской. По частоте CCR5del32 народы Кавказа объединяются в единую группу. Среди изученных кавказских народов только кубачинцы приближаются к индоевропейским народам по частоте аллеля CCR5del32.*

*13 peoples of Caucasus representing three linguistic families (North-Caucasian, Indo-European and Altaic) have been genotyped for CCR5del32 deletion. Peoples of Caucasus have similar frequencies of CCR5del32 compared with Indo-Europeans. Among the Caucasic peoples studied, only Kubachinians have a frequency of CCR5del32 more close to that of Indo-Europeans.*

**КОВАЛЕВА В.И., БАГАЦКАЯ Н.В., ДЕМЕНКОВА И.Г., НЕФИДОВА В.Е.**

*Государственное учреждение «Институт охраны здоровья детей и подростков АМН Украины», Украина, 61153, Харьков, пр. 50-летия ВЛКСМ, 52-А, E-mail: deminn@ukr.net*

#### ОЦЕНКА МУТАГЕНЕЗА У ДЕТЕЙ, РОЖДЕННЫХ В СЕМЬЯХ ЛИКВИДАТОРОВ АВАРИИ НА ЧАЭС

Одной из причин ухудшения демографической ситуации в Украине является повышение уровня загрязненности окружающей среды, в частности, вследствие аварии на Чернобыльской АЭС. Наиболее опасным последствием техногенного экологического риска является переход геномной нестабильности в половых клетках родителей, индуцированной сублетальными дозами ионизирующей радиации, в соматические клетки потомков [3, 5]. В последние годы в радиобиологических исследованиях установлено, что помимо прямых мутагенных эффектов, ионизирующая

радиация приводит к индукции в потомках облученных многократно поделившихся клеток геномной нестабильности в виде различных нарушений генетического аппарата (разрывов ДНК, структурных aberrаций хромосом, генных мутаций, сестринских хроматидных обменов (СХО), анеуплоидий, полиплоидии) [7, 8, 11].

Известно, что для трансформации нормальной клетки человека в злокачественную необходимо 6-8 последовательных мутационных изменений, которые могут происходить как в соматических, так и в половых клетках. Мутации, возникшие в половых клетках, передающиеся потомкам, обуславливают наследственную предрасположенность к онкозаболеваниям в родословных на протяжении многих поколений [1, 2].

Цитогенетические исследования, как составная часть системы медицинского контроля за лицами, пострадавшими в результате ядерных аварий, выполняются с конца 60-х годов прошлого века и могут служить основанием для прогнозирования отдельных неблагоприятных стохастических эффектов облучения. В качестве специфического цитогенетического биомаркера радиационного воздействия на человека используется частота стабильных и нестабильных aberrаций хромосомного типа [10].

В последнее время наиболее актуальными и активно изучаемыми являются так называемые «дисгеномные эффекты», в частности, скрытая генетическая нестабильность, которая проявляется повышением чувствительности генома к дальнейшему действию различных мутагенов. Феномен геномной нестабильности характеризуется предрасположенностью к мультифакториальным заболеваниям, формированием вариантов с множественными аномалиями, повышением частоты возникновения хромосомных aberrаций и мутаций микросателлитассоциированных фракций ДНК [9].

Снижение генотоксических эффектов происходит благодаря развившейся в процессе эволюции системе естественной клеточной защиты. Целостность и стабильность наследственных структур поддерживается матричными процессами, среди которых большое значение имеет репарация ДНК. Уровень повреждения генома зависит от его способности репарировать изменения, постоянно возникающие в результате внешних воздействий на организм [1].

Для определения репарационной активности генома информативным является тест на чувствительность хромосом клеток к генотоксическому эффекту ряда мутагенов, таких как блеомицин, митомицин С и др. *in vitro* [1, 6]. Использование провокационного мутагенеза позволило выявить скрытую нестабильность генома лимфоцитов периферической крови, что проявлялось как повышением частоты aberrаций хроматидного типа, неспецифичных для радиационного действия *in vitro*, так и неадекватной реакцией на тестирующую мутагенную нагрузку. Это может быть отражением генетически обусловленных или радиационно модифицированных возможностей организма детей, проживающих в населенных пунктах Украины с различной экологической обстановкой.

Вместе с тем, вопрос о последствиях облучения родителей, принимавших участие в ликвидации последствий аварии на ЧАЭС для их потомства, остается недостаточно изученным.

Это явилось основанием для изучения спонтанного уровня хромосомных повреждений в лимфоцитах периферической крови у детей, родители которых являлись ликвидаторами аварии на ЧАЭС, а также проведения исследования с помощью провоцирующего мутагенеза (дополнительной обработки культур *in vitro* мутагеном-провокатором блеомицином) для выявления лиц мутационного риска.

#### **Материалы и методы**

Цитогенетическое исследование выполнено у 21 пробанда, рожденного от отцов-ликвидаторов аварии на ЧАЭС (основная группа), и у 8 практически здоровых

детей (контрольная группа), обследованных в лаборатории медицинской генетики ГУ «ИОЗДП АМН Украины». Культивирование лимфоцитов периферической крови проводили стандартным методом [12]. Культивировали лимфоциты периферической крови в 3 мл среды RPMI, содержащей 15% эмбриональной телячьей сыворотки, 17 мкг/мл ФГА (Sigma, США), 0,25мл цельной крови в течение 72 часов. На 67 –м часу инкубации в культуру вводили блеомицин в конечной концентрации 3 мкг/мл на 5 часов до снятия культуры. За 3 часа до фиксации в культуру добавляли колхицин в конечной концентрации 7,5 мкг/мл.

Анализировали по 100 метафаз от каждого ребенка в соответствии с общепринятыми требованиями. Учитывали все типы повреждений хромосом за исключением ахроматических (пробелов). У детей, рожденных от отцов-ликвидаторов аварии на ЧАЭС, проанализировано 3369 (1785 до мутагенной нагрузки и 1584 после) метафазных пластинок. У детей контрольной группы проанализировано 1573 (808 до мутагенной нагрузки и 769 - после) метафаз.

### **Результаты и обсуждение**

Результаты цитогенетических исследований показали, что хромосомные aberrации (ХА) присутствовали как в клетках здоровых детей, так и в клетках детей, рожденных от отцов-ликвидаторов аварии на ЧАЭС. У детей контрольной группы спонтанный уровень aberrаций находился в пределах  $0,99 \pm 0,35\%$ , а у детей основной группы -  $2,63 \pm 0,38\%$ , что превышало частоту ХА в контроле ( $p < 0,001$ ) в 2,6 раза.

В контрольной группе до мутагенной нагрузки встречались только aberrации двух типов: одиночные и парные фрагменты, с частотой  $0,62 \pm 0,28$  и  $0,37 \pm 0,21$  aberrаций на клетку соответственно.

У пробандов основной группы регистрировались aberrации нескольких типов – одиночные и парные фрагменты, нерасхождение и преждевременное расхождение сестринских хроматид, дицентрики, разрывы по центромере и полиплоидные клетки. Наибольшая частота встречаемости мутаций в этой группе была зафиксирована для aberrаций хромосомного типа: парные фрагменты -  $0,90 \pm 0,22$  и полиплоидные клетки -  $1,06 \pm 0,24$ . Соотношение между хромосомными и хроматидными aberrациями составило 83% и 17% соответственно, что свидетельствует о том, что у детей, родившихся от отцов-ликвидаторов аварии на ЧАЭС, происходит сдвиг в сторону увеличения частоты хромосомных aberrаций. Полученные данные совпадают в полной мере с данными литературы [4], согласно которым aberrации хромосомного типа считаются специфичными для радиационного воздействия, тогда как хроматидного – для химических мутагенов.

Таким образом, изучение состояния генетического аппарата у детей, рожденных от отцов-ликвидаторов аварии на ЧАЭС, а также у детей контрольной группы свидетельствовало о снижении частоты ХА у детей контрольной группы.

Анализируя частоту метафаз с aberrациями хромосом после мутагенного воздействия блеомицином и в интактных культурах, мы установили, что суммарная частота повреждений хромосом после воздействия мутагенной нагрузки у детей основной группы возросла до  $25,63 \pm 1,10\%$ , а в группе контроля до  $21,96 \pm 1,04\%$ ,  $p < 0,05$ . При этом частота aberrаций хроматидного типа после воздействия блеомицином *in vitro* в клетках лимфоцитов периферической крови у детей контрольной группы и основной группы не различалась. Мы полагаем, в связи с тем, что дети основной и контрольной группы проживают в одинаковых экологических условиях (г. Харьков, Харьковская область), то вполне закономерно, что частота aberrаций хроматидного типа, которые являются маркерами химического загрязнения, в группах сравнения не различалась.

Что касается aberrаций хромосомного типа, то отмечалась тенденция к увеличению их частоты в основной группе, однако данные статистически не различались.



Полиплоидные клетки регистрировались у детей основной группы как в обработанных блеомицином культурах ( $0,51 \pm 0,34\%$ ), так и в интактных культурах ( $1,06 \pm 0,24\%$ ,  $p < 0,05$ ). В группе контроля этот вид численных нарушений наблюдался только в культурах, обработанных блеомицином, и составлял  $1,18 \pm 0,39\%$ . В целом, суммарная частота ХА в клетках пациентов основной и контрольной групп превышала данные, полученные без дополнительной нагрузки ( $p < 0,001$ ).

Следовательно, при сопоставлении реакции хромосомного аппарата лимфоцитов периферической крови на тестирующее мутагенное воздействие *in vitro* было установлено, что дети основной группы более чувствительны, а дети контрольной группы оказались более стойкими к дополнительному мутагенному влиянию. Использование теста на чувствительность хромосом клеток к генотоксическому эффекту блеомицина *in vitro* позволило выявить наличие изменений стабильности генома соматических клеток детей ликвидаторов аварии на ЧАЭС, а также выявить группу лиц высокого мутационного риска.

#### **Выводы**

1. Частота спонтанного уровня ХА у детей, рожденных от отцов-ликвидаторов аварии на ЧАЭС, составила  $2,63 \pm 0,38\%$ , что достоверно превышало частоту хромосомных aberrаций у детей контрольной группы ( $0,99 \pm 0,35\%$ ,  $p < 0,001$ ).

2. У детей основной группы уровень ХА после мутагенной нагрузки блеомицином существенно превышал частоту ХА у здоровых детей ( $25,63 \pm 1,10\%$  и  $21,96 \pm 1,04\%$  соответственно,  $p < 0,05$ ), что свидетельствует о генетической нестабильности генома детей, родители которых участвовали в ликвидации последствий аварии на ЧАЭС.

#### **Литература**

1. Болтіна І.В. Частота аберацій хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові хворих на гліоми головного мозку при дії модельних мутагенів мітоміцину та диметеоату // Автореф. дис. ... канд. біол. наук. - К., 2005. – 20 с.

2. Бочков Н.П. Чеботарев А.Н. Наследственность человека и мутагены внешней среды. – М.: Медицина, 1989. – 270 с.

3. Бурлаков Е.Б., Михайлив В.Ф., Мазурик В.К. Система окислительно-восстановительного гомеостаза при радиационно-индуцируемой нестабильности генома // Радиационная биология. Радиозэкология. – 2001. - Т.41, № 5. – С. 489 – 499.

4. Мазник Н.О. Стабільні аберації хромосом як довгостроковий маркер радіаційного впливу // Український Радіологічний Журнал. – 2003. - №11. – С. 106 – 118.

5. Молекулярно-генетичні механізми в реалізації віддалених наслідків іонізуючого випромінення / А.А. Чумак, Д.А.Базика, І.В.Абраменко та інші //Журн. АМН України – 2006 – Т.12, №1 – С.161-167

6. Мутагенез в лимфоцитах крови у жителей сельской местности зоны отчуждения Чернобыльской АЭС / Л.К. Бездробная, Т.В. Цыганок, Е.П. Романова, А.В. Бухал, Л.А.Климкина // Междунар. журнал радиационной медицины – 2003. - №5. – С.118-127.

7. Настюкова В.В., Баронова Е.В. Распространенность цитогенетических аномалий у детей с врожденными пороками развития (ВПР) // Цитология и генетика. – 2000. – Т. 34, № 3. – С. 49 – 54.

8. Нейфах Е.А., Алимбекова А.И., Сусков И.И. Биохимические механизмы радиогенных цитогенетических и соматических нарушений у детей – резидентов загрязненных радионуклидами регионов // Радиационная биология. Радиозэкология. – 2002. - Т.42, № 6. – С. 615 – 623.

9. Педан Л Р Радіо індукований цитогенетичний ефект і його модифікація *in vitro* в лімфоцитах периферичної крові осіб, які постраждали від Чорнобильської аварії. // Автореф. дис. ... канд. біол. наук. - К., 2005. – 19 с.



10. Пилинская М.А. Цитогенетические эффекты в соматических клетках лиц, пострадавших вследствие Чернобыльской катастрофы, как биомаркер действия ионизирующих излучений в малых дозах // Междунар. журнал радиационной медицины – 1999. - №2. – С.60-66.

11. Сусков И.И., Кузьмина Н.С. Проблема индуцированной геномной нестабильности в детском организме в условиях длительного действия малых доз радиации // Радиационная биология. Радиозэкология. - 2001. - Т.41, № 5. – С. 704-707.

12. Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.J. Chromosomes preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood // Exper. Cell. Res. – 1960. – Vol.20. – P. 613–616.

### **Резюме**

В работе представлены характеристики спонтанного уровня хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови у детей, рожденных в семьях ликвидаторов аварии на ЧАЭС и здоровых сверстников. Проведена оценка мутагенеза у всех обследованных пробандов, выявлена скрытая нестабильность генома в ответ на мутагенную нагрузку блеомицином.

У роботі представлено характеристики спонтанного рівня хромосомних aberrаций у лімфоцитах периферичної крові у дітей, народжених у сім'ях ліквідаторів аварії на ЧАЕС, і здорових однолітків. Проведено оцінку мутагенезу у всіх обстежених пробандів, виявлено приховану нестабільність геному у відповідь на мутагенне навантаження блеоміцином.

The study presents characteristics of the spontaneous rate of chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of children, born into the families of the Chernobyl disaster liquidators and of healthy age-matched children . Mutagenesis was estimated in all the examined probands, and latent genome instability was revealed as a response to bleomycin mutagenic load.

**КУЗНЕЦОВА<sup>1</sup> М.А., ПОЧЕШХОВА<sup>2</sup> Э.А., ДИБИРОВА<sup>1</sup> Х.Д., ВАСИНСКАЯ<sup>1</sup> О.А., ФРОЛОВА<sup>1</sup> С.А., ПШЕНИЧНОВ<sup>1</sup> А.С., БАЛАНОВСКИЙ<sup>1</sup> О.П., ПУЗИНА<sup>1</sup> Т.А., ОРЛОВ<sup>1</sup> А.И., СОЛОВЬЕВА<sup>1</sup> Д.С., ДУБОВА<sup>3</sup> Н.А., БАЛАНОВСКАЯ<sup>1</sup> Е.В.**

<sup>1</sup>ГУ Медико-Генетический научный центр РАМН, г. Москва, Россия;

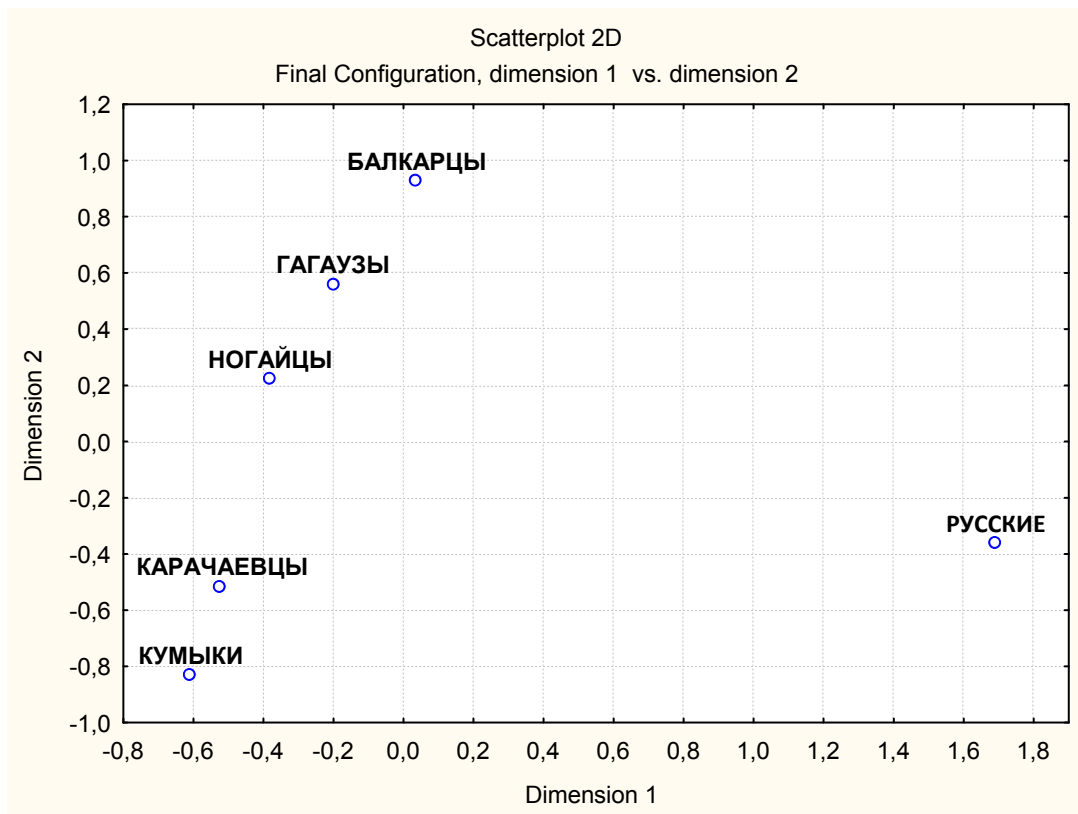
<sup>2</sup>Кубанская государственная медицинская академия, г. Майкоп, Россия;

<sup>3</sup>Институт этнографии и антропологии РАН, г. Москва, Россия.

[kirya70@list.ru](mailto:kirya70@list.ru)

### **ОЦЕНКА РАЗЛИЧИЙ ТЮРКОЯЗЫЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЕВРОПЫ ПО СПИД-ПРОТЕКТОРНОМУ ГЕНУ CCR5del32**

Делеционный полиморфизм del32 в локусе CCR5 представляет большой научный и практический интерес. Лица, несущие хотя бы один аллель с делецией, обладают повышенной устойчивостью к развитию СПИДа при заражении ВИЧ-1, а у лиц, несущих два делеционных аллеля, при заражении ВИЧ-1 СПИД практически не развивается [Stephens et al., 1998]. При этом известны четкие географические закономерности распространения CCR5del32 [Balanovsky et al., 2005], благодаря чему изучение изменчивости этой делеции может пролить свет на историю популяций.



**Рис. Диаграмма многомерного шкалирования генетических расстояний  $D_{NEI}$  между пятью тюркоязычными и одной славяноязычной популяциями.**  
Коэффициент стресса  $S=0.000$ .

В настоящей работе рассмотрена степень сходства тюркоязычных популяций Европы по частоте делеции CCR5del32. Нами исследован полиморфизм CCR5del32 в трех тюркоязычных популяциях Европы: гагаузов (N=219) Молдавии, балкарцев (N=100) Кабардино-Балкарии, карачаевцев (N=142) Карачаево-Черкесии. Для сравнительного анализа привлечены литературные данные о частотах CCR5del32 у тюркоязычных кумыков (N=224) и ногайцев (N=490) (база данных ALFRED, <http://alfred.med.yale.edu/>), а также у славяноязычных русских (собственные данные и база данных ALFRED, <http://alfred.med.yale.edu/>, N=1009). По частотам делеции CCR5del32 определены генетические расстояния [Nei, 1975] между этими шестью популяциями, по которым построена диаграмма многомерного шкалирования (рис.)

Распределение популяций на диаграмме многомерного шкалирования соответствует мере их языкового сходства: тюркоязычные популяции по частоте делеции CCR5del32 резко отличаются от славяноязычных русских, у которых делеция встречается в 1.5-2 раза чаще. Территориальная же удалённость, видимо, меньше влияет на меру сходства популяций по частоте делеции, поскольку географически удаленная от остальных тюркоязычных популяция гагаузов не проявляет ярких отличий по частоте CCR5del32 от тюркоязычных народов Кавказа. Частота делеции у гагаузов Молдавии не выходит за пределы размаха частот для включенных в анализ тюркоязычных популяций Кавказа (0.05-0.07).

Таким образом, полиморфизм CCR5del32, может эффективно использоваться для изучения истории народонаселения и, как показано в данном случае, выявляет сходство тюркоязычных популяций Европы.

Однако реальная картина изменчивости намного сложнее. В качестве общей «точки сравнения» мы использовали среднюю частоту CCR5del32 в русских популяциях, поскольку из всех народов Европы именно русские могли создать некий фон мигрантных генов в тюркоязычных популяциях. Однако русский ареал охватывает и север Европы, где частота делеции велика. На юге Европы, где и проживают тюркоязычные популяции, частота делеции снижается. Поэтому для корректного анализа необходимо сравнить каждую тюркоязычную популяцию с ее непосредственным географическим соседом. Такой анализ станет следующим этапом наших дальнейших исследований.

**Работа проведена при поддержке грантов РФФИ и РГНФ.**

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Balanovsky O, Pocheshkhova E, Pshenichnov A, Solovieva D, Kuznetsova M, Voronko O, Churnosov M, Tegako O, Atramentova L, Lavryashina M, Evseeva I, Borinska S, Boldyreva M, Dubova N, Balanovska E. Is spatial distribution of the HIV-1-resistant CCR5Delta32 allele formed by ecological factors? // Journal of Physiological Anthropology and Applied Human Sciences. 2005 Jul; 24(4):375-382.
2. Nei M. Molecular population genetics and evolution / Amsterdam: North-Holland Publ.C. 1975. 290 p.
3. Stephens JC, Reich DE, Goldstein DB, Shin HD, Smith MW, Carrington M, Winkler C, Huttley G, Allikmets R, Schriml L, Gerrard B, Malasky M, Ramos MD, Morlot S, Tzetzis M, Oddoux C, Giovine FS, Nasioulas G, Chandler D, Aseev M, Hanson M, Kalaydjieva L, Glavac D, Gasparini P, Kanavakis E, Claustres M, Kambouris M, Ostrer H, Duff G, Baranov V, Sibul H, Metspalu A, Goldman D, Martin N, Duffy D, Schmidtke J, Estivill X, O'Brien SJ, Dean M. Dating the origin of the CCR5-D32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes // Am J Hum Genet. 1998. 62: P.1507–1515.

#### **РЕЗЮМЕ**

*Исследован генетический полиморфизм трех тюркоязычных народов Европы по частоте делеции в аутосомном СПИД-протекторном локусе CCR5. Показано, что частота делеции соответствует языковой общности популяций.*

*Genetic polymorphism of Turkic-speaking populations of Europe has been studied in AIDS-protecting locus CCR5. It is shown that the frequency of the deletion is connected with linguistic affiliation.*

**ПЛІНСЬКА М.А., ДИБСЬКИЙ С.С., ДИБСЬКА О.Б., ПЕДАН Л.Р.**

*Науковий Центр радіаційної медицини АМН України,  
Україна, 040050, Київ, вул. Мельникова, 53, e-mail: pww@ukr.net*

#### **ВИЯВЛЕННЯ ПРИХОВАНОЇ ХРОМОСОМНОЇ НЕСТАБІЛЬНОСТІ ЗА ЧУТЛИВІСТЮ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ ДО ТЕСТУЮЧОЇ МУТАГЕННОЇ ДІЇ БЛЕОМІЦИНУ *IN VITRO***

У віддалені строки після Чорнобильської аварії провідне значення для реалізації стохастичних і деяких нестохастичних медичних наслідків променевого ураження

людини має радіаційно-індукована нестабільність геному [1, 2]. На цитогенетичному рівні важливу роль в дестабілізації геному відіграє прихована хромосомна нестабільність при нормальному чи аберантному каріотипі, яка проявляється як підвищення чутливості хромосом соматичних клітин людини до дії інших мутагенів – *in vivo* та *in vitro*.

Для виявлення прихованої хромосомної нестабільності використовуються т. з. „мутагени-провокатори” – в основному, іонізуюче випромінювання та, як альтернатива опроміненню, радіоміметик блеоміцин, якими обробляється культура лімфоцитів периферичної крові людини на ранній чи пізній постсинтетичній стадії мітотичного циклу ( $G_2$ -sensitivity assay) [3-5].

Тести для визначення індивідуальної чутливості хромосом людини до мутагенної дії опромінення чи блеоміцину одержали найбільше поширення при обстеженні онкологічних пацієнтів, переважно, для виявлення гіперчутливих осіб, схильних до виникнення та розвитку злоякісних новоутворень різної локалізації [6, 7]. В результаті проведених нами цитогенетичних обстежень Чорнобильських контингентів встановлено реальність радіоіндукованої зміни стабільності геному соматичних клітин людини і необхідність подальшого удосконалення і стандартизації моделі для її виявлення [8].

Оскільки на сьогодні не існує уніфікованої тест-системи для оцінки індивідуальної чутливості хромосом людини до мутагенної дії блеоміцину, різні дослідники використовують блеоміцин як мутаген-провокатор в широкому діапазоні концентрацій, що утруднює порівняння одержаних результатів. Враховуючи це, змістом першого етапу наших досліджень було відпрацювання модельної тест-системи для виявлення прихованої хромосомної нестабільності в лімфоцитах периферичної крові контрольних (умовно здорових) донорів.

#### **Матеріал та методи**

Для цитогенетичного аналізу цільну кров (~ 3 мл від кожної особи) культивували за напівмікрометодом у нашій модифікації [8]. При постановці експериментів використовували гідрохлорид блеоміцину для ін'єкцій (Bleocin, BLM, Nippon Kayaku Co. LTD). Базовий розчин та необхідні розведення готували за допомогою стерильного 0,9 % розчину хлористого натрію. Блеоміцин додавали до культури лімфоцитів через 48 годин після початку інкубації, тобто обробляли культуру *in vitro* на пізній постсинтетичній ( $G_2$ ) стадії мітотичного циклу. Цитогенетичний аналіз проводили “всліпу”, на рівномірно пофарбованих зашифрованих препаратах метафазних хромосом під мікроскопами зі збільшенням  $\times 1000$ . Кількість проаналізованих метафаз для кожного з варіантів залежала від мітотичного індексу культури і коливалась від 50 до 500, складаючи в середньому 200 на варіант, що відповідало вимогам, необхідним для дослідження цитогенетичного ефекту хімічних сполук в культурі лімфоцитів периферичної крові людини *in vitro* [9]. Всього проаналізували 8875 метафаз. Для оцінки стабільності хромосомного апарату враховували всі аберації хроматидного та хромосомного типів, які вірогідно можна розпізнати при груповому каріотипуванні на рівномірно пофарбованих препаратах метафазних хромосом [9].

#### **Результати та обговорення**

Спочатку нами було апробовано цитогенетичну дію 4-х найчастіше застосовуваних концентрацій блеоміцину (0,05; 5,00; 50,00; 500,00 мкг/мл) в культурах лімфоцитів периферичної крові, одержаних від 7-ми умовно здорових донорів (всі чоловіки) середнього віку. Кожну концентрацію тестували у двох-трьох повтореннях.

При дії блеоміцину *in vitro* спостерігали дозозалежний цитогенетичний ефект – частоти аберантних метафаз та хромосомних аберацій зростали із підвищенням концентрації препарату і коливались від 4,50 до 48,00 % та від 5,50 до 150,0 на 100 метафаз (при мінімальній та максимальній концентрації блеоміцину, відповідно), що достовірно ( $p < 0,01$ ) перевищувало аналогічні контрольні показники (1,12 % та 1,23 на

100 метафаз, відповідно). При всіх концентраціях блеоміцину (навіть при мінімальній – 0,05 мкг/мл) кількість аберацій перевищувала кількість аберантних метафаз (тобто частина аберантних клітин містила більше однієї аберації), і при максимальній концентрації (500 мкг/мл) на одну аберантну клітину в середньому припадало 3,61 хромосомних уражень. При концентраціях 50 та 500 мкг/мл спостерігали не тільки значний цитогенетичний ефект (навіть до пульверизації хромосомного матеріалу), але й виражену цитотоксичну дію – прогресуюче зниження мітотичної активності, що значно утруднювало проведення хромосомного аналізу. Пошкодження хромосом були представлені переважно простими абераціями – парними та одиночними ацентричними фрагментами з домінуванням останніх, що характерно для кластогенної дії блеоміцину *in vitro*. Частоти обмінних аберацій не залежали від концентрації препарату і знаходились в межах спонтанних коливань. При порівнянні цитогенетичного ефекту, індукованого блеоміцином в однакових концентраціях в культурах, одержаних від різних донорів, встановили, що за інтегральними цитогенетичними показниками (частоти аберантних клітин та всіх типів аберацій) група була досить гомогенна - донори майже не відрізнялись, але за окремими типами аберацій (співвідношення між одиночними та парними ацентричними фрагментами) спостерігались певні міжіндивідуальні коливання.

За результатами тестування цитогенетичної активності блеоміцину для подальших досліджень було відібрано дві оптимальні концентрації препарату – 0,05 та 5,00 мкг/мл, при яких майже не пригнічувалась мітотична активність культури та спостерігалось достовірне зростання частоти хромосомних аберацій без пульверизації хромосомного матеріалу. Оскільки навіть при цих концентраціях блеоміцину підвищувалась «завантаженість» аберантних метафаз хромосомними пошкодженнями (з'являлись мультиаберантні клітини), саме частоту аберацій хромосом (а не аберантних метафаз) вважали основним критерієм чутливості хромосом людини до тестуючого мутагенного навантаження блеоміцином.

На відпрацьованій моделі проведено дослідження стабільності хромосом лімфоцитів в контрольній групі - у 9-ти умовно здорових донорів (3-х жінок, 6-ти чоловіків у віці 18–64 роки), які заперечували свідомий контакт із знаними чи потенційними мутагенами.

Фонова середньогрупова частота хромосомних аберацій в обстеженій групі складала  $1,23 \pm 0,20$  на 100 клітин, що не відрізнялося від середньопопуляційного рівня ( $1,52$  на 100 клітин), ( $p > 0,01$ ) [8, 9]. Серед пошкоджень хромосом домінували прості аберації – одиночні та парні ацентричні фрагменти, співвідношення між їх частотами наближалось до 1:1.

Після дії блеоміцину в концентрації 0,05 мкг/мл середньогрупова частота хромосомних аберацій зросла до  $10,37 \pm 0,66$  на 100 метафаз, що достовірно ( $p < 0,01$ ) відрізнялось від такої в інтактних культурах ( $1,23 \pm 0,20$  на 100 метафаз). Середня частота аберацій на одну аберантну клітину досягала 2,18. Додаток до фонові середньогрупові частоти хромосомних аберацій (надспонтанна частота) складав 9,14 на 100 метафаз. Серед пошкоджень хромосом домінували прості аберації (одиночні та парні ацентричні фрагменти у співвідношенні, близькому до 1:1) – як у окремих осіб, так і по групі в середньому.

За всіма цитогенетичними показниками і, особливо, за загальною частотою хромосомних аберацій, зумовленою фрагментацією хромосом, спостерігали певну міжіндивідуальну варіабільність, яка не залежала від величини фонових даних, одержаних в інтактних культурах (рис.1). Міжіндивідуальний розмах частоти хромосомних аберацій складав 3,00 - 32,00 на 100 метафаз. Серед групи порівняння виділявся донор № 5 з максимальним цитогенетичним ефектом (32,00 аберацій на 100 метафаз) та максимальною «завантаженістю» аберантних клітин пошкодженнями хромосом (4,92 на одну аберантну метафазу), хоча фонові частота хромосомних

аберацій у нього складала лише 1,00 на 100 метафаз. Таким чином, використання блеомицину як мутагена-провокатора в концентрації 0,05 мкг/мл дозволило ідентифікувати одну особу з підвищеною чутливістю до мутагенної дії.

При дії блеомицину в концентрації 5,0 мкг/мл зросли як індивідуальні частоти хромосомних аберацій, так і їх середньогруповий рівень (до  $15,54 \pm 0,78$  на 100 метафаз), але середня кількість аберацій в одній абераційній клітині не тільки майже не змінилась, але й виявила тенденцію до зниження і складала 1,80, що може бути зумовлено цитотоксичною дією препарату. Надспонтанна (індукована) частота хромосомних аберацій також достовірно підвищилась і по групі в середньому становила 14,31 на 100 метафаз. Основним типом хромосомних пошкоджень залишились прості аберації – одиночні та парні ацентричні фрагменти у співвідношенні близькому до 1:1.

Реакція хромосомного апарату на дію мутагена-провокатора в концентрації 5,0 мкг/мл суттєво відрізнялась у різних осіб. Окрім гіперчутливого індивіда № 5 (виявленого при навантаженні культури лімфоцитів блеомицином в концентрації 0,05 мкг/мл), при використанні препарату в концентрації 5,00 мкг/мл ідентифіковано ще двох осіб із прихованою хромосомною нестабільністю - №№ 6 та 9. Частота хромосомних аберацій у цих індивідів становила  $35,0 \pm 3,37$ ;  $16,00 \pm 2,32$ ;  $34,00 \pm 3,35$  на 100 метафаз, відповідно, тоді як у інших осіб з цієї ж групи вона коливалась від 5,00 до 12,00 на 100 метафаз.

### Висновки

З використанням модифікованого нами тесту „G<sub>2</sub>-bleomycin sensitivity assay” виявлено трьох осіб, гіперчутливих до дії мутагена-провокатора, що, виходячи з їх анамнезу (відсутність контакту із відомими чи потенційними мутагенами), можна вважати генетично детермінованою прихованою хромосомною нестабільністю.

### Література

1. Мазурик В.К., Михайлов В.Ф. Радиационно-индуцируемая нестабильность генома: феномен, молекулярные механизмы, патогенетическое значение. // Радиационная биология. Радиозэкология. – 2001. – т. 41, №35. – С. 272-289.
2. Smith L.; Nagar S., Kim G. Morgan W. Radiation-induced genomic instability: radiation quality and dose response. // Health Physics. – 2003. – vol. 85, N 1. – P. 23–29.
3. Scott D. Chromosomal radiosensitivity and low penetrance predisposition to cancer // Cytogen. and Genome Res. – 2004. – vol. 104, № 1–4. – P. 365–370.
4. Ryabchenko N., Dyomina E. Radiosensitivity of human chromosomes estimated on the basis of the application of the test-system of peripheral blood lymphocytes // Chromosome Res. – 2005. – vol. 13, Suppl. 1. – P. 3567.
5. Comparison of bleomycin and radiation in G<sub>2</sub> assay of chromatid breaks / A. Adema, J. Closs, R. Verheijen et al. // Int. J. Radiat. Biol. – 2003. – vol. 79, № 8. – P. 655–661.
6. Does the bleomycin sensitivity assay express cancer phenotype? / G. Szekely, E. Remenar, M. Rifsler et al. // Mutagenesis. – 2003. – vol. 18, № 1. – P. 59–63.
7. Non-random distribution of chromatid breaks in lymphocytes of laryngeal squamous cell carcinoma patients / M. Gajecka, M. Jarmuz, W. Szyfter et al. // Oncology Reports. – 2004. – № 12. – P. 153–157.
8. Педан Л.Р., Пілінська М.А. Оцінка стабільності хромосом лімфоцитів периферичної крові осіб, постраждалих від дії факторів Чорнобильської аварії, за допомогою тестуючого мутагенного навантаження *in vitro* // Доп. Національної Акад. наук України. – 2004. – № 12. – С. 175–179.
9. Хромосомы человека: Атлас / А.Ф. Захаров, В.А. Бенюш, Н.П. Кулешов, Л.И. Барановская. – М.: Медицина. – 1982. – 263 с.

### Резюме

Отработана и апробирована модельная система для выявления скрытой хромосомной нестабильности в соматических клетках человека с помощью

тестирующей мутагенной нагрузки радиомиметиком блеомицином *in vitro*. Установлены оптимальные сроки обработки культуры лимфоцитов периферической крови человека блеомицином и оптимальные концентрации препарата, позволяющие оценить чувствительность хромосом к мутагенному воздействию.

Опрацьовано і апробовано модельну систему для виявлення прихованої хромосомної нестабільності в соматичних клітинах людини за допомогою тестуючого мутагенного навантаження радіоміметиком блеомицином *in vitro*. Визначено оптимальні строки обробки культури лімфоцитів периферичної крові людини блеомицином та оптимальні концентрації препарату, придатні для оцінки чутливості хромосом до мутагенної дії.

The model system for revealing of hidden chromosome instability in somatic human cells by means of radiomimetic bleomycin testing mutagenic exposure *in vitro* had been elaborated and aprobated. The optimal terms of treatment by bleomycin of human peripheral blood lymphocytes culture as well as optimal concentrations of bleomycin for the evaluation of human chromosomes sensitivity to mutagenic exposure had been suggested.

**ПШЕНИЧНОВ<sup>1</sup> А.С., БАЛАНОВСКИЙ<sup>1</sup> О.П., СОЛОВЬЕВА<sup>1</sup> Д.С.,  
КУЗНЕЦОВА<sup>1</sup> М.А., ДИБИРОВА<sup>1</sup> Х.Д., ВАСИНСКАЯ<sup>1</sup> О.А., ФРОЛОВА<sup>1</sup> С.А.,  
ИЩУК<sup>2</sup> М.Л., АТРАМЕНТОВА<sup>2</sup> Л.А., ЧУРНОСОВ<sup>3</sup> М.И., ПУЗИНА<sup>1</sup> Т.А.,  
БАЛАНОВСКАЯ<sup>1</sup> Е.В.**

<sup>1</sup>ГУ Медико-Генетический научный центр РАМН, г. Москва, Россия;

<sup>2</sup>Харьковский государственный университет, г. Харьков, Украина;

<sup>3</sup>Белгородский Государственный Университет, г. Белгород, Россия.

[pxemon@gmail.com](mailto:pxemon@gmail.com)

## **СХОДСТВО УКРАИНСКИХ И ДРУГИХ СЛАВЯНОЯЗЫЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ПО ЧАСТОТАМ СПИД-ПРОТЕКТОРНОГО ГЕНА CCR5 del32**

Один из важных генетических факторов устойчивости к ВИЧ-1 – делеция 32 нуклеотидов в гене CCR5 (CCR5del32) [Zimmerman et al., 1997] – генетически полиморфен. Его распространение на географической карте мира определяется сложным комплексом факторов [Balanovsky et al., 2005]. Часть этих факторов, вероятно, связана с отбором в пользу делеции del32: показана возможная роль этой мутации в повышении устойчивости к целому ряду инфекционных болезней, включая чуму [Stephens et al., 1998]. Делеция возникла относительно недавно - оценки времени возникновения колеблются в области 0,7-2 тыс. лет [Libert et al., 1998, Stephens et al., 1998]. А карта её распространения в Европе демонстрирует чёткий тренд уменьшения частоты делеции от северо-запада на юго-восток [Балановская, Балановский, 2007].

В настоящей работе впервые по частотам делеции CCR5del32 охарактеризовано внутринатное разнообразие украинского генофонда, представленного его основными этнотерриториальными подразделениями. Обследованы две популяции западных украинцев (Ивано-Франковская и Львовская области, N=57 и 102), подольские (Хмельницкая область, N=137), днепровские (Черкасская область, N=178) и восточные украинцы (Белгородская область, N=93). Частота делеции в изученных популяциях колеблется от 0.10 до 0.12, за исключением популяции из Ивано-Франковска, в которой частота делеции вдвое ниже.

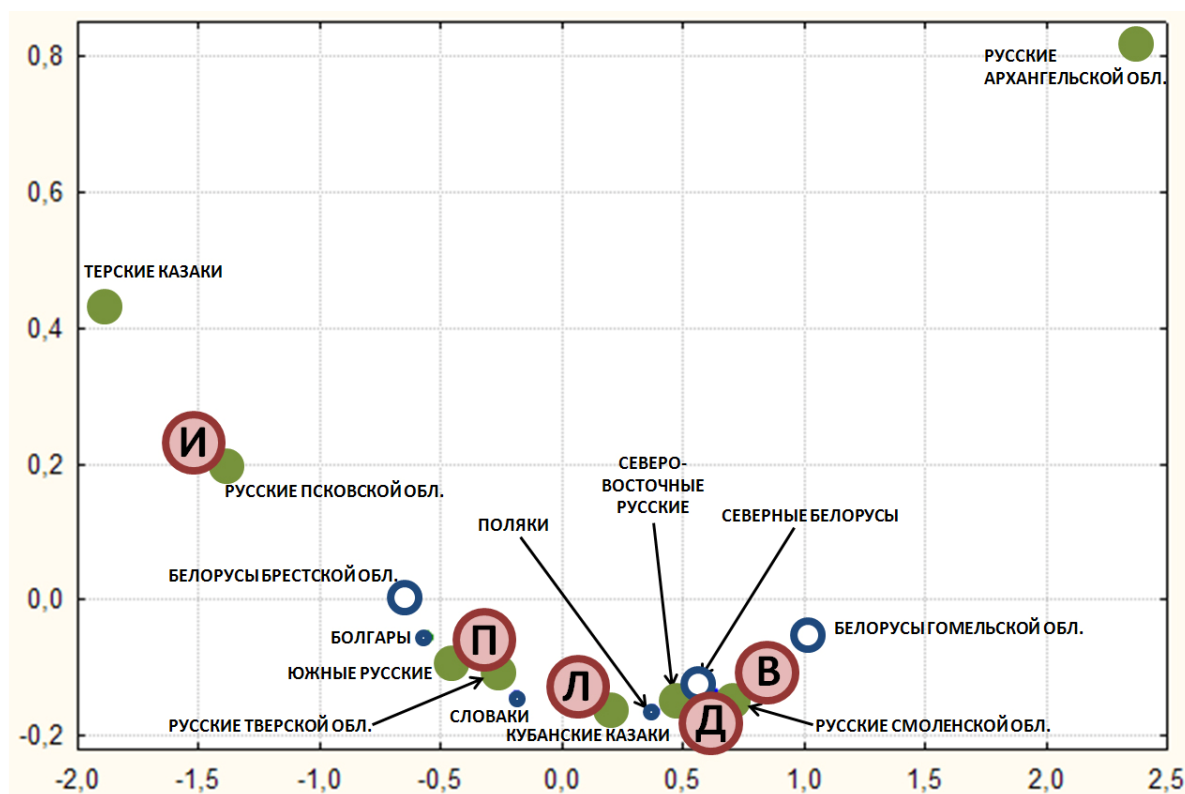
В целом, частоты делеции CCR5del32 у украинцев хорошо соответствуют общему тренду изменчивости CCR5 в Европе – снижения частот мутации с севера на

юг [Balanovsky et al., 2005]: они близки к средним частотам делеции у русских ( $q=0.11$ ) и белорусов ( $q=0.11$ ), ниже чем у более северного населения ( $q=0.17$  у русских Архангельской области,  $q=0.16$  у финнов) и выше чем у более южного населения Восточной Европы.

Для сравнения с другими славяноязычными народами были привлечены данные о русских, белорусских популяциях (наши неопубликованные данные), а также о частоте делеции у поляков, болгар и словаков (база данных ALFRED, <http://alfred.med.yale.edu/>). Между этими популяциями были определены генетические расстояния  $D_{NEI}$  [Nei, 1975] по частотам аллелей локуса CCR5 и проведено многомерное шкалирование расстояний (рис.).

По данным диаграммы, украинский генофонд не проявляет какой-либо специфики в отношении частоты делеции CCR5del32 на общем фоне генофонда славяноязычных народов.

Генетическое разнообразие украинцев по локусу CCR5 ( $G_{ST}$ ) равно  $0.54 \times 10^2$ . Оно в полтора раза больше, чем генетическое разнообразие белорусов по этому локусу ( $G_{ST}=0.36 \times 10^2$ ) и в два раза меньше, чем у русских ( $G_{ST}=1.14 \times 10^2$ ).



**Рис. Диаграмма многомерного шкалирования генетических расстояний по частотам аллеля CCR5del32 между славяноязычными популяциями.**

Буквами в кружках обозначены украинские популяции: И – западные украинцы (Ивано-Франковская область), Л – западные украинцы (Львовская область), П – подольские украинцы (Хмельницкая область), Д – днепровские украинцы (Черкасская область), В – восточные украинцы (Белгородская область).

**Работа проведена при поддержке грантов РФФИ и РГНФ.**

### Литература

1. Балановская Е.В., Балановский О.П. Русский генофонд на Русской равнине. –



М.:Луч. - 2007.- 416 с.

2. Balanovsky O, Pocheshkhova E, Pshenichnov A, Solovieva D, Kuznetsova M, Voronko O, Churnosov M, Tegako O, Atramentova L, Lavryashina M, Evseeva I, Borinska S, Boldyreva M, Dubova N, Balanovska E. Is spatial distribution of the HIV-1-resistant CCR5Delta32 allele formed by ecological factors? //Journal of Physiological Anthropology and Applied Human Sciences. 2005 Jul;24(4):375-382.
3. Galvani, Novembre. The evolutionary history of the CCR5-Delta32 HIV-resistance mutation // Microbes Infect. 2005.- N 7(2).- P. 302-309.
4. Libert F, Cochaux P, Beckman G, Samson M, Aksenova M, Cao A, Czeizel A, Claustres M, Rua C, Ferrari M, Ferrec C, Glover G, Grinde B, Guran S, Kucinkas V, Lavinha J, Mercier B, Ogur G, Peltonen L, Rosatelli C, Schwartz M, Spitsyn V, Timar L, Beckman L, Parmentier M, Vassart G. The D ccr5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe // Hum Mol Genet. 1998. 7: P.399–406.
5. Nei M. Molecular population genetics and evolution / Amsterdam: North-Holland Publ.C. 1975. 290 p.
6. Stephens JC, Reich DE, Goldstein DB, Shin HD, Smith MW, Carrington M, Winkler C, Huttley G, Allikmets R, Schriml L, Gerrard B, Malasky M, Ramos MD, Morlot S, Tzetzis M, Oddoux C, Giovine FS, Nasioulas G, Chandler D, Aseev M, Hanson M, Kalaydjieva L, Glavac D, Gasparini P, Kanavakis E, Claustres M, Kambouris M, Ostrer H, Duff G, Baranov V, Sibul H, Metspalu A, Goldman D, Martin N, Duffy D, Schmidtke J, Estivill X, O'Brien SJ, Dean M. Dating the origin of the CCR5-D32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes // Am J Hum Genet. 1998. 62: P.1507–1515.
7. Zimmerman P.A., Wieseman M., Spalding T., Boatman B.A., Nutman T.B. A new intercellular adhesion molecule-1 allele identified in West Africans is prevalent in African-Americans in contrast to other North American racial groups // Tissue Antigens. - 1997. -N 50(6). - P.654-656.

### Резюме

*Проведено сравнительное исследование частоты делеционного аллеля del32 аутосомного СПИД-протекторного гена CCR5 в пяти украинских популяциях. Показано сходство украинцев и других славянских популяций по частоте этой делеции. Five Ukrainian populations have been genotyped for a deletion polymorphism del32 in CCR5 gene. It has been shown that frequency of this allele in Ukrainians is similar to that of the other Slavic populations.*

### СЄДНЄВА І.А.

*Державна установа “Інститут спадкової палогії” АМН України,  
Україна, 79008, м. Львів, вул. Лисенка, 31-а*

### **ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ-ІНДУКТОРІВ ТА ГЕНІВ-СУПРЕСОРИВ АПОПТОЗУ У ПАЦІЄНТІВ З НОВОУТВОРАМИ ТОВСТОЇ КИШКИ, ЯКІ МАЮТЬ СПАДКОВО ОБТЯЖЕНИЙ АНАМНЕЗ ЗА ЦИМ ЗАХВОРЮВАННЯМ**

Прогноз онкологічних захворювань залежить від здатності організму до індукції спонтанного апоптозу [1], схильності до апоптозу онкотрансформованих клітин [2] та

ефективності індукції апоптозу злоякісних клітин під дією протипухлинних препаратів [3]. В здоровому дорослому організмі встановлюється баланс між процесами проліферації та загибелі клітин, завдяки якому підтримується клітинний гомеостаз. Пухлинні клітини змінюються фенотипово, отримуючи підвищену здатність до проліферації та втрачаючи здатність до повної диференціації, або апоптичної загибелі. Завдяки цим властивостям вони мають переваги перед клітинами нормальних тканин під час росту і виживання в однакових умовах [цит по 2].

Останнім часом у багатьох країнах світу, в тому числі і в Україні, спостерігається значне зростання захворювання на рак товстої кишки [4,5]. Серед сучасних уявлень про причини виникнення цієї онкопатології важливе місце посідають генетичні фактори [6]. Результати клініко-генеалогічних та цитогенетичних досліджень свідчать про те, що у осіб першого ступеня спорідненості із хворим на колоректальний рак є 2-4 кратний ступінь ризику розвитку аналогічного захворювання [6].

Апоптозу належить найважливіша роль як у фізіологічних, так і у патологічних процесах, оскільки і пригнічення, і неадекватне його посилення призводить до патологічних змін органів і тканин [1,7]. Фактори, регулюючі апоптоз різноманітні, але найбільш цікавими на наш погляд являються трансмембранний глікопротеїн FAS (Apo-1/CD 95), внутріклітинні - P53 та Bcl-2.

Велике значення у виникненні раку товстої кишки надається мутаціям гена-супресора p-53, який розташований на короткому плечі хромосоми 17 і здійснює регуляцію процесів клітинного поділу та контроль за цілісністю геному. Експресія білка P53 не має тканинної специфічності і спостерігається у пухлинах різного генезу, в тому числі і в епітелії товстої кишки [6]. Мутований ген p53 набуває зовсім іншої якості, яка характеризується рядом проявів, такими як затримка проліферації чи її посилення з затримкою супресії пухлинних клітин з прогресивним омолодженням диференціювання, пов'язаної з ним бурхливою прогресією і поганим прогнозом клінічного перебігу хвороби [7]. Мутація гену p53 виявлена майже у всіх типах пухлин людини. Крім активації окремих генів білок P53 здатен пригнічувати експресію антиапоптичних генів, наприклад, виявлено p53-залежне зниження експресії генів bcl-2 і рецептора IGF-1 [7].

Вперше білок Bcl-2 був визначений при дослідженні В-клітинної лімфоми, що і визначило його назву. Білки родини Bcl-2 регулюють мітохондріальний шлях в механізмах запрограмованої смерті клітин і є самими відомими інтрацелюлярними регуляторами апоптоза [8,9]. Саме цими білками контролюється найважливіша-термінальна, незворотня стадія апоптозу-етап деградації ДНК. Індуктори апоптозу та його інгібітори знаходяться в постійній динамічній рівновазі, утворюючи одне з одним гомо-та гетеродимери, а їх співвідношення визначає розвиток апоптозу.

Білок FAS (Apo-1/CD 95) – трансмембранний глікопротеїн, який відноситься до родини бета-рецепторів фактора некроза пухлини і є медіатором апоптоза. Система FAS-FASL відіграє значну роль в елімінації потенційно небезпечних клітин (інфікованих вірусом або трансформованих). Порушення нормальних механізмів апоптоза завжди призводить до порушення динаміки клітинних популяцій і розвитку патологічних станів, що супроводжуються або акумуляцією клітин (пухлинний ріст, аутоімунний процес), або їх втратою. Відповідно, розуміння механізмів апоптоза та розробка методів його об'єктивної детекції дозволять позитивно вплинути на діагностику, лікування і профілактику багатьох захворювань людини.

Враховуючи вищевказане, метою даної роботи було дослідити особливості експресії білків P53, Bcl-2 та FAS у пацієнтів з новоутворами товстої кишки, які мають спадково 3 родичів I-го чи II-го ступенів спорідненості з аналогічним новоутвором. обтяжений анамнез за цими захворюваннями.

#### **Матеріали та методи**

Клінічне і генетичне обстеження пацієнтів з раком товстої кишки (РТК)

проводили на базі проктологічного відділення обласної клінічної лікарні м. Львова. Проведено вивчення медичної документації, опитування про стан здоров'я пробандів і їх родичів та генеалогічний аналіз сімей 35 хворих на РТК (з них чоловіків було 20, жінок – 15) віком від 24 до 72 років. Лише у 10 хворих на РТК (з них чоловіків – 6, жінок – 4) віком від 34 до 72 років було виявлено в родоводі від 1 до 3 родичів I-го чи II-го ступенів спорідненості з аналогічним новоутвором.

Матеріалом дослідження були лімфоцити периферійної крові хворих на рак товстої кишки зі спадково обтяженим анамнезом за цим захворюванням. Лімфоцити виділяли в градієнті фікол-верографіну (питома вага = 1,076).

Імуноцистохімічна детекція експресії p53, bcl-2, FAS (Apo-1/CD 95) вивчалася непрямим імунофлуоресцентним методом [10]. Лімфоцити виділяли в градієнті фікол-верографіну (питома вага = 1,076).

Аналіз проводився в УФ світлі, діапазон збудження 360-440 нм, діапазон емісії 480-540 нм. Інтенсивність реакції визначали у відсотках з розрахунку на 200 проаналізованих клітин.

#### **Результати та обговорення.**

В усіх досліджених нами зразках, отриманих від 10 пацієнтів з РТК, зі спадково обтяженим анамнезом зареєстровано різний ступінь експресії досліджуваних маркерів в залежності від індивіда (табл 1).

*Таблиця 1*

#### **Характер експресії P53, Bcl-2 та CD 95 у хворих з новоутворами товстої кишки**

Код пацієнта	Діагноз	Показники експресії білка CD 95, %	Показники експресії білка P53, %	Показники експресії білка Bcl-2, %
Контроль	Практично здоровий	29.5	10.8	36.8
1/07	Рак анального каналу та сигмоподібної кишки	33.8	20	24
2/07	Рак прямої кишки	35.8	18.1	47.8
3/07	Рак прямої кишки	39.7	15.8	32
4/07	Рак прямої кишки	60	25	18.1
5/07	Рак сигмоподібної кишки та рак горла	46.7	39.8	23.2
6/07	Рак ректосигмоїдного згину	32	18	36
7/07	Рак прямої кишки	44.3	26	34
8/07	Рак анального каналу	30	33	28
9/07	Рак сигмоподібної кишки	49.7	22	16
10/07	Рак прямої кишки	41.2	35	28

Отримані результати свідчать про те, що лімфоцити периферійної крові хворих на рак кишківника чутливі до апоптозу. Загибель лімфоцитів або ж Т-клітин, може здійснюватися двома основними шляхами. Один з них, FAS-залежний, що контролюється bcl-2 і розвивається у відповідь на зниження концентрації цитокінів. Надлишковий апоптоз лімфоцитів може призводити до зриву захисних механізмів пацієнта. Оскільки bcl-2 є одним з головних регуляторів апоптозу, збільшення його експресії може свідчити про наявність початкових порушень регуляторних механізмів апоптозу у хворих на рак товстої кишки. Здатність пухлинних клітин уникати розпізнавання імунною системою хазяїна є головною умовою розвитку пухлини. В деяких роботах показано, що клітини пухлин різного походження можуть експресувати FASL і індукувати апоптоз в Т-клітинах, експресуючих FAS [7]. При цьому пухлинні клітини можуть експлуатувати внутрішню програму загибелі активованих Т-лімфоцитів, використовуючи саме головну зброю цитотоксичних клітин

- FASL. Деякими авторами показано, що апоптоз FAS-позитивних пухлиноінфільтруючих лімфоцитів при раку шлунка у людини асоціюється зі збільшенням експресії FASL на клітинах карциноми. Аналогічні результати були отримані при дослідженні експресії FASL у людини при колоктеральній карциномі, що узгоджується з отриманими нами результатами. З результатів, наведених в таблиці видно, що у всіх обстежених пацієнтів ми спостерігали збільшення експресії білка P53. Аномалії фактора P53, а також інших внутріклітинних факторів, контролюючих апоптоз, в процесі розвитку пухлини ведуть до її прогресування. Втративши такий контроль, клітини втрачають зв'язок з міжклітинним матриксом та іншими факторами нормального оточення, не гинуть, а успішно розвиваються в чужерідному середовищі, що сприяє метастазуванню пухлин. Це може бути непрямим показником структурно-функціональних змін, які відбуваються у генетичному апараті пухлинних клітин на різних етапах формування та маніфестації злоякісного процесу і, можливо, пов'язані із походженням, механізмом виникнення та типом мутації у гені p53. Результати дослідження p53-залежної індукції апоптозу при наявності інгібіторів синтезу РНК і білків свідчать про те, що існують механізми ініціації білка P53 апоптоза, які не пов'язані з його транскрипційною активністю. Поки що ці механізми практично не вивчені хоча є попередні свідчення, які вказують на здатність p53 безпосередньо взаємодіяти з апоптозасоційованими білками [7].

#### **Висновки.**

1. Виявлено збільшення експресії CD95 у пацієнтів з новоутворами товстої кишки, які мають спадково обтяжений анамнез за цими захворюваннями

2. Імуноцитохімічна детекція експресії p53 та bcl-2 у пацієнтів з новоутворами товстої кишки, які мають спадково обтяжений анамнез за цими захворюваннями виявила підвищення цих показників порівняно з контролем..

Отримані в результаті роботи дані свідчать про актуальність роботи та необхідність в подальшому вивченні проблеми.

#### **Література.**

1. Упоров А.В., Семиглазов В.Ф., Пожарский К.М. Иммуногистохимическое изучение клеток рака молочной железы с использованием маркеров пролиферации //Архив патологии.-2000.-№2.-С.28-30.
2. Фильченков А.А., Стойка Р.С. Апоптоз и рак .К., "Морион".-1999.-182 с.
3. Dockrell D.H. Apoptosis cell death in pathogenesis of infectious diseases //J.Infect.-2001.-Vol.42.,N4.-P.227-234.
4. Федоренко З.П., Міщенко А.Н., Гулак Л.О. та ін. Розповсюдженість злоякісних новоутворень в популяції України в 1991-1996 рр.(епідеміологічні та організаційні аспекти проблеми).- К.,1997.-118 с.
5. Иоффе А.Ю. Сравнительная иммуногистохимическая характеристика неспецифического язвенного колита и болезни Крона //Врачебное дело.-2005.-№5-6.-С.33-35.
6. Белоусова Е.А. Язвенный колит и болезнь Крона.-М.,Триада,2002.-127 с.
7. Фильченков А.А. Современные технологии количественной оценки апоптоза и их применение в экспериментальной и клинической онкологии. Семинары по гематопатологии. Вып.11.-Киев: ДИА,2003.-76 с.
8. Налескіна Л.А., Воробйова Л.Р., Хома Д.І., Поліщук Л.З., Полійніченко Г.П., Терсенов Я.О., Захарцева Л.М. Особливості експресії білка P53 в епітелії слизової оболонки товстої кишки, враженої поліпами та раком //Цитологія і генетика.-2000.-№1.-С.15-22.
9. Райхин Н.Т., Райхин А.Н. Регуляция и проявление апоптоза в физиологических условиях и в опухолях //Вопросы онкологии.-2002.-Т.48,№2.-С.159-170.
10. Липовець Л.Є., Луцик Б.Д. Посібник з лабораторної імунології.-Львів.-2002.-150 с.

#### **Резюме**

Імуноцитохімічна детекція експресії p53 та bcl-2 у пацієнтів з новоутворами товстої кишки, які мають спадково обтяжений анамнез за цими захворюваннями показала значне підвищення цих показників порівняно з контрольними. В результаті проведених досліджень виявлено збільшення експресії CD95 у пацієнтів з новоутворами товстої кишки, які мають спадково обтяжений анамнез за цими захворюваннями..

Имуноцитохимическая детекция экспрессии p53 и bcl-2 у пациентов с новообразованиями толстой кишки, которые имеют наследственно отягощенный анамнез по этому заболеванию, показала увеличение этих показателей по сравнению с нормой. В результате проведенных исследований выявлено увеличение экспрессии CD95 с данным заболеванием.

It was carried out the evaluation of expression of p53, bcl-2 and CD95, using immunocytochemical method in patients with neoplasia of large bowel that have relatives with the same oncopathology in anamnesis. The obtained results showed the increased expression of p53, bcl-2 and CD95 in these patients, comparing with the control group.

### **ТЕРПИЛЯК О.І.**

*ДУ Інститут спадкової патології АМН України*

*Україна, 79000, м. Львів, вул.М.Лисенка, 31а, e-mail:root@ihp.lviv.ua*

## **РОЗПОДІЛ ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ SNP –1082 G →A ПРОМОТОРНОЇ ДІЛЯНКИ ГЕНА ІЛ–10 ПРИ ВТОРИННОМУ НЕПЛІДДІ**

Непліддя це проблема, яка торкається 15% подружніх пар. Причини непліддя – різноманітні і до кінця не з'ясовані. Серед причин непліддя найбільш загадковою є «поведінка» імунітету. Більше того, цілий ряд авторів взагалі вважають, що втрата плоду на ранніх термінах вагітності (вторинне непліддя) має переважно імунну етіологію і базується на зсуві функціонального балансу Т–лімфоцитів–хелперів в бік клітин 1–го типу [1, 2, 3, 4, 5].

Відомо, що реалізація схильності організму до того, чи іншого захворювання відбувається при виключній участі генів імунорегуляторних структур, найбільш визнаними серед яких є цитокіни. Особливий інтерес викликає протизапальний цитокін інтерлейкін–10 (ІЛ–10). Він є одним з найважливіших регуляторних цитокінів, який в значній мірі визначає напрямок імунної відповіді: під впливом ІЛ–10 пригнічується клітинний імунітет, який регулюється Т–хелперами 1–го типу і стимулюється гуморальна відповідь з участю Т–хелперів 2–го типу, що власне і є необхідною умовою нормального протікання вагітності [5, 6]. Промоторна ділянка гена ІЛ–10 (пІЛ–10) містить ряд крапкових нуклеотидних варіацій, які відповідають за високу/низьку експресію ІЛ–10, ці ж SNP (single nucleotide polymorphism) формують алелі схильності до ряду захворювань. Найбільш дослідженими є SNP –1082 G →A, –819 T→C та –592 A→C [7], і зокрема показано, що генотип “високої” експресії –1082 GG асоціюється з мимовільними викиднями [8].

Отже, виходячи з вище сказаного, метою роботи було вивчення особливостей розподілу поліморфних варіантів SNP –1082 G →A промоторної ділянки гена ІЛ–10 в групі подружніх пар з вторинним непліддям, зумовленим мимовільними викиднями.

### **Матеріали і методи**

Матеріалом дослідження служила ДНК, виділена з периферичної крові подружніх пар з вторинним непліддям (ВН). Обстежено 35 індивідів (21 жінка і 14 чоловіків, що склали групу подружніх пар) з вторинним непліддям, в анамнезі котрих було 2–а і більше мимовільних викидні у І триместрі вагітності. Контроль складала 73 практично здорові індивіди із здоровими дітьми.

Досліджувану промоторну ділянку гена ІЛ-10, що містить SNP 1082-G→A ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) згідно методу, описаного Giordani L. et al. [9] з використанням реактивів “МВІ Fermentas”. Детекцію SNP – 1082 G→A проводили методом ПДРФ з використанням ендонуклеази рестрикції Eam1401 (“МВІ Fermentas”) згідно інструкцій фірми-виробника. Фрагменти ПЛР-продукту, отримані методом ПДРФ, розділяли у агарозному гелі (3%, 0,5 мг бромистого етидію).

Отримані дані піддавались обробці методами варіаційної статистики: визначали критерій Пірсона  $\chi^2$ . [10].

#### Результати та обговорення

В процесі роботи вивчали розподіл та частоти алелей низької (А) та високої (G) експресії гена ІЛ-10 та генотипів, які вони формують (AA, GG, AG) в групі подружніх пар з ВН. Отримані результати, які представлені в таблиці 1, засвідчили, що співвідношення частот А– та G– алелей становило 27 : 43 (в абсолютних значеннях), або 38,6% до 61,4% алелей. Таким чином, обстежувана група подружніх пар з вторинним непліддям характеризується суттєво підвищеною частотою алелі G (61,4%) SNP –1082 G→A, тобто алелі високої експресії гена ІЛ-10 в порівнянні з алеллю А (38,6%) – низька експресія гена ІЛ-10. Слід зазначити, що ці дані діаметрально протилежно відрізняються від показників контрольної групи, де підвищена частота належала алелі А (55%), а алель G характеризувалася заниженою частотою (45%). Оцінювання вірогідності відмінностей показників контрольної групи від обстежуваної групи з ВН підтвердили статистично вірогідну різницю при розподілі частот алелей в групі з ВН, а саме, зниження частоти алелі А та підвищення частоти G – алелі ( $\chi^2=4.98, p<0,05$ ).

Таблиця 1

**Розподіл та частота SNP –1082 G→A пІЛ-10 у групі подружніх пар з ВН**

№ п/п	Алелі	Контрольна група (73 особи, 146 алелей)		Подружні пари з ВН (35 осіб, 70 алелей)		$\chi^2$	p
		Абсолютні значення	%	Абсолютні значення	%		
1.	A	80	55	27	38,6	4,98	<0,05
2.	G	66	45	43	61,4	4,98	<0,05

Далі було проведено аналіз розподілу та встановлення частоти генотипів SNP – 1082 G→A пІЛ-10. Результати представлені в таблиці 2. Як видно, в обстежених осіб з групи подружніх пар з вторинним непліддям з найвищою частотою (45,7%) зустрічається генотип високої експресії гена ІЛ-10, а саме GG-генотип. Генотип низької експресії гена ІЛ-10, тобто AA-генотип, зустрічається з частотою 22,9%, а частота генотипу нормальної експресії (AG-генотип) становить 31,6%. Отже, генотип низької експресії характеризується найнижчою частотою. Що ж стосується контрольних показників, то вони суттєво відрізняються від дослідних: частота генотипу нормальної експресії гена ІЛ-10 (AG-генотип) становить 49%, частота генотипу низької експресії (AA-генотип) – 30 %, а частота генотипу високої експресії (GG-генотип) – 21%. Таким чином, в контрольній групі найвищою частотою характеризується генотип нормальної експресії (AG-генотип), а найнижчою генотип високої експресії (GG-генотип). Статистичне опрацювання отриманих результатів з використанням критерію Пірсона  $\chi^2$  показало вірогідно значиме зростання частоти GG-генотипу ( $\chi^2=7,3, p<0,01$ ), який асоціюється з високою експресією гена ІЛ-10 в групі подружніх пар з ВН.

## Розподіл та частота генотипів SNP –1082 G→A пІЛ–10 у подружніх пар з ВН

№ п/п	Генотип	Контрольна група (73 особи)		Подружні пари з ВН (35 осіб)		$\chi^2$	р
		Абсолютні значення	%	Абсолютні значення	%		
1.	AA	22	30	8	22,9	0,62	>0,05
2.	GG	15	21	16	45,7	7,3	<0,01
3.	AG	36	49	11	31,4	3,1	>0,05

При розподілі обстежуваної групи подружніх пар з вторинним непліддям за статтю попередньо встановлені закономірності частот алелей та генотипів SNP–1082G→A пІЛ10 зберігаються. Як у жінок, так і в чоловіків обстежуваної групи з найвищою частотою зустрічається алель високої експресії G (61,9% та 60,7%, відповідно) та генотип високої експресії гена ІЛ–10 – GG (42,9% та 50%, відповідно). Наші дані принципово співпадають з результатами Daher із співавт. [8], які передбачають, що саме ІЛ–10 може бути задіяний в патогенезі звиклого невиношування вагітності.

Крім вивчення розподілу і частот генотипів SNP–1082 G→A пІЛ–10 у подружніх пар з ВН, ми проаналізували встановлені генотипи на їх гомологічність в межах подружніх пар. Таким чином ми встановили, що 38,5% подружніх пар з ВН володіють однаковими генотипами SNP –1082 G→A пІЛ–10, з них 23,1% становить генотип високої експресії GG. Отже, отримані результати дають підстави думати, що гомологічність генотипів SNP–1082 G→A пІЛ–10 є негативним прогностичним фактором для нормального протікання вагітності.

**Висновки.**

1. В результаті вивчення частот алелей низької (А) та високої (G) експресії гена ІЛ–10 в групі подружніх пар з вторинним непліддям встановлено, що дана група характеризується достовірно підвищеною частотою алелі G.
2. При аналізі розподілу генотипів SNP–1082 G→A пІЛ–10 з'ясували, що в групі подружніх пар з вторинним непліддям достовірно найвищою частотою володіє генотип високої експресії (GG–генотип).
3. Встановлено, що 38,5% подружніх пар з вторинним непліддям є гомологічними по генотипах SNP–1082 G→A пІЛ–10.
4. Передбачаємо, що ІЛ–10 може бути задіяний в патогенезі звиклого невиношування вагітності.

**Література**

1. Старостина Т.А., Демидова Е.М., Анкирская А.С. и др. Современные вопросы патогенеза и терапии невынашивания беременности // Акуш. и гинекол. – 2002. – №5. – С.61–63.
2. Chou S.W. Cytomegalovirus and its clinical implication // *Traspl. Infect. Dis.* – 2001. – vol.5, No. – P.20–24.
3. Emmer P.M., Nelen W., Steegers E. Et al. Peripheral natural killer cytotoxicity CD56posCD16pos cells increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion // *Hum. Reprod.* – 2000. – vol.15, P.1163–1169.
4. Ntrivalas E.I., Kwak–Kim J.Y.H., Gilman–Sachs A. Et al. Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology // *Hum. Reprod.* – 2001. – vol.16. – P.855–861.
5. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. – Москва. – 2003. – 604 с.

6. *Mocellin S., Panelli M.C., Wang E., Nagorsen D., Marincola F.M.* The dual role of IL-10 // *Trends Immunol.* – 2003. – vol.24, №1. – P.36–43.
7. *Brenner S., Prosch S., Schenke-Layland K., Riese U., Gausmann U., Platzer C.* cAMP-induced interleukin-10 promoter activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation // *J.Biol.Chem.* – 2003. – vol.278, №8. – P.–5597–5604.
8. *Daher S., Shulzhenko N., Morgun A., Mattar R., Rampim GF., Camano L., DeLima M.G.* Assotiations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss // *J.Reprod. Immunol.* – 2003 – vol.58, No 1. – P.69–77.
9. *Giordani L., Bruzzi P., Lasalandra C., Quaranta M., Schittulli F., Ragione F. D., Iolascon A.* Association of breast cancer and polymorphisms of Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  genes // *Clin. Chem.* – 2003. – vol.49. – P. 1664–1667.
10. *Певницкий Л.А.* Статистическая оценка ассоциаций HLA-антигенов с заболеваниями // *Вестник АМН СССР.* – 1988. – №7. – С.48–51.

### Резюме

Вивчали крапкові нуклеотидні поліморфізми промоторної ділянки гена ІЛ-10 в групі подружніх пар з вторинним непліддям, обумовленим звиклим невиношуванням вагітності в І триместрі. Встановлено, що дана група характеризується достовірно підвищеною частотою алелі G – алелі високої експресії ІЛ-10 та генотипу високої експресії (GG-генотип). Встановлено, що 38,5% подружніх пар з вторинним непліддям є гомологічними по генотипах SNP-1082 G→A пІЛ-10. Передбачаємо, що ІЛ-10 може бути задіяний в патогенезі звиклого невиношування вагітності.

Изучали точечные нуклеотидные полиморфизмы промоторного участка гена ИЛ-10 в группе супружеских пар с вторичным бесплодием, обусловленным привычным невынашиванием беременности в I триместре. Установлено, что данная группа характеризуется достоверно повышенной частотой аллеля G – аллеля высокой экспрессии ИЛ-10 и генотипа высокой экспрессии (GG-генотип). Установлено, что 38,5% супружеских пар с вторичным бесплодием являются гомологичными по генотипам SNP-1082 G→A пИЛ-10. Допускаем, что ИЛ-10 может быть задействован в патогенезе привычного невынашивания беременности.

We studied the SNP1082 G→A of the gene IL-10 promotor region in couples with secondary infertility which was caused by first trimester reccurent pregnancy lost. As a result of studying was determined statistically significant increase of both IL-10 high expression allele frequency (G-allele) and IL-10 high expression genotype frequency (GG-genotype). The result also showed, that 38,5% investigated couples had homologous SNP-1082 G→A pIL-10 genotypes. We suppose that IL-10 gene may be active in pathogenesis of first trimester reccurent pregnancy lost.

**ТИЖНЕНКО Т.В.<sup>1</sup>, ПОЧЕРНЯЄВ А.К.<sup>1</sup>, ГОРШУНСЬКА М.Ю.<sup>2</sup>, ПОЛТОРАК В.В.<sup>1</sup>, АТРАМЕНТОВА Л.А.<sup>3</sup>, КРАВЧУН Н.О.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ДУ “Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського АМН України”  
Україна, 61002, Харків, вул. Артема 10

<sup>2</sup> Харківська медична академія післядипломної освіти  
Україна, 61176, м. Харків, вул. Корчагінців 58

<sup>3</sup> Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна  
Україна, 61077, м. Харків, пл. Свободи 4, e-mail: Tyzhnenko@ukr.net

**ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНА ПАРАОКСОНАЗИ (PON-1) У НАСЕЛЕННЯ М. ХАРКОВА**



Прогрес у розвитку медицини призводить до відносного зростання частки генетично обумовленої патології [1]. Одним з найбільш поширених полігенних спадкових захворювань є цукровий діабет (ЦД) 2 типу. Дослідження генетичної схильності до ЦД 2 типу показують, що є декілька генів-кандидатів, поліморфізм яких поєднується з підвищенням ризику розвитку ішемічної хвороби серця (ІХС) і інших атеротромботичних станів. До таких генів-кандидатів можна віднести ген параоксонази [2-4]. Параоксоназа (*PON1*) – антиоксидантний фермент, асоційований з ліпопротеїнами високої щільності (ЛПВЩ), який відіграє важливу роль у детоксикації орґанофосфатів і попередженні окислення ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) та попереджує розвиток атеросклерозу [5, 6]. Доведено, що поліморфізм гена *PON1* по 192 кодону глутамін-Gln (Q) → аргінін-Arg (R) (проявляється амінокислотною заміною глутаміна на аргінін у 192 позиції ферменту параоксонази) визначає міжіндивідуальну варіабельність активності параоксонази; із зміною активності *PON1* змінюється ризик атеросклерозу і кардіоваскулярних захворювань [7, 8]. Мутації в даному гені призводять до його низької експресії і використовуються як маркери ризику атерогенної макросудинної патології, в першу чергу, ішемічної хвороби серця (ІХС) [9]. Поліморфізм гена *PON-1* в кодоні 192 (глутамін/аргінін) пов'язує із продукцією двох ізоферментів, один з яких, асоційований з В формою (аргінін), виказує низьку активність та обумовлює високий ризик розвитку ІХС у хворих на ЦД 2 типу [10]. Наявні повідомлення, що наголошують патогенетичну роль у зниженні активності ферменту за умов діабету, поряд з генетичними факторами, і надбаними метаболічними порушеннями, а також такі, що засвідчують суттєву різницю в активності параоксонази за наявності та відсутності діабетичної протеїнурії [5, 10]. Повідомлення про зв'язок між поліморфізмом гена *PON-1* 192 (Q/R) та ІХС в загальній популяції різноспрямовані, так, істотні асоціації були описані у білих мешканців Північної Америки [11] і в мешканців Індії [11], а їх відсутність - у фінів [12] і китайців, які проживають в Сінгапурі [13]. Зниження активності параоксонази асоціювалося з підвищенням ризику ІХС у індійців [14]. Низька активність *PON-1* у поєднанні з ознаками оксидативного стресу (навіть за умов глікемічної компенсації) може складати патогенетичне підґрунтя передчасного атеросклерозу у хворих на ЦД 2 типу із дисліпідемією [15]. Особи, які гомозиготні по Q, мають суттєво знижену параоксоназну активність, ніж особи гомозиготні по R, в той час, як гетерозиготні особи мають середній рівень активності параоксонази [16]. Асоціацію між алелем 192(R) *PON-1* було виявлено у французьких [11] і японських [17, 18] пацієнтів, хворих на ЦД 2 типу та ІХС і в північно-американській загальній популяції [11], але не спостерігалось у етнічних фінів [12] та етнічних китайців, за наявності ЦД 2 типу [19]. Вивчення поліморфізму генів-кандидатів проведено в різних популяціях, проте молекулярно-генетичні дослідження ЦД 2 типу на території України не проводилися. Разом з тим, оскільки, схильність до захворювань слід розглядати з урахуванням того, що кожний індивід є складовою частиною популяції, має генетичну пристосованість до того середовища, в якому відбувалася її природна історія, то генетичне прогнозування обмежується рамками конкретної популяції [20, 21]. Основною метою дослідження, що проводиться, є вивчення одиночного нуклеотидного поліморфізму гена параоксонази у хворих на ЦД 2 типу за умов співставлення до недіабетичного загалу для визначення внеску генетичної та метаболічної складової до біохімічного фенотипу параоксонази, обґрунтування груп ризику щодо ІХС та розробки більш ефективних алгоритмів антидіабетичної терапії, спрямованої на зниження макросудинних ускладнень. Оскільки дослідження тільки розпочалося, на першому етапі заплановано розглянути поліморфізм гена параоксонази *PON1-192Q/R* серед відносно здорових мешканців м. Харкова.

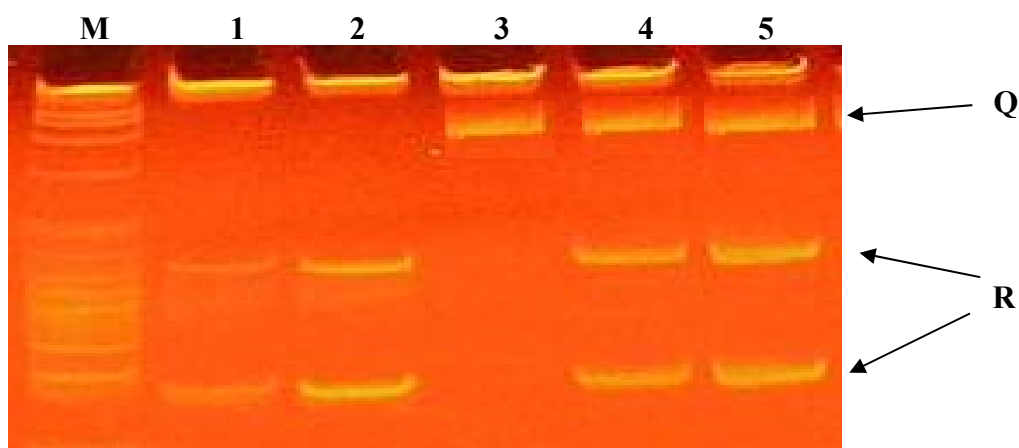
### **Матеріали і методи**

Зібрана генеалогічна інформація про 110 практично здорових мешканців м. Харкова (79 – чоловіків, 31 – жінка), віком від 20 до 60 років (середній вік на момент обстеження для чоловіків 32,83±1,12, для жінок 36,34±2,45). У вибірці виключені ознаки ІХС, вказівки на ЦД і артеріальну гіпертензію. Зразки крові були отримані на базі Харківської обласної станції переливання крові. Відповідно до вимог біоетики була отримана добровільна згода мешканців м. Харкова на участь

у дослідженні і проведено анкетування. ДНК виділена з лейкоцитів периферичної крові [22, 23]. Аналіз поліморфних маркерів проводили методом ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція) і ПДРФ (поліморфізм довжин рестриктних фрагментів) з використанням відповідних праймерів. Розділення фрагментів ДНК після ампліфікації і рестрикції проводили за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Статистичний аналіз проведено методом  $\chi^2$ .

#### Результати та обговорення

На рисунку представлено розподіл результатів електрофорезу. Зразки 1 і 2 демонструють 2 смужки, що відповідає довжині рестриктних фрагментів 135 та 64 пар нуклеотидів та характеризує генотип *R/R*. Зразок 3 має одну смужку розміром 199 пар нуклеотидів, що відповідає гомозиготному генотипу *Q/Q*. Зразки 4 та 5 представлені трьома смужками розміром 199, 135 та 64 пари нуклеотидів, що свідчить про гетерозиготний генотип – *Q/R*.



**Рис.** ПЛР-ПДРФ аналіз генотипів параоксонази.

1,2- *R/R* генотип; 3 - *Q/Q* генотип; 4, 5 - *Q/R* генотип; Для визначення розмірів рестриктних фрагментів ДНК використовують маркер молекулярної маси (М) *pUC19/MspI* (501; 489; 404; 331; 242; 190; 147; 111; 110; 67; 34; 26 пар нуклеотидів) ДНК, рестриційованої ферментом *Msp I*.

Результати аналізу електрофореграм 110 осіб представлені в табл.1. Частоти алелей розраховані прямим шляхом. Між групами чоловіків та жінок для даної вибірки виявлена достовірна різниця по розподілу частот алелей, у жінок в даній вибірці частота алеля *Q* була декілька вищою ( $P < 0,05$ ). Розподіл частот генотипів серед чоловіків і жінок відповідає рівноважному розподілу, очікуваному по рівнянню Харді-Вайнберга ( $\chi^2 = 4,33$ ;  $P < 0,05$ ).

Таблиця 1

**Розподіл частот генотипів та алелей гена параоксонази (*PON-1*)**

Генотипи	Чоловіки		Жінки		Середнє популяційне	
	n	p (%)	n	p (%)	n	p (%)
<i>Q/Q</i>	31	39,2	16	51,6	47	45,4
<i>Q/R</i>	39	49,4	15	48,4	54	48,9
<i>R/R</i>	9	11,4	0	0,0	9	11,4
Частота алеля <i>Q</i>	0,64		0,76		0,70	
Частота алеля <i>R</i>	0,36		0,24		0,30	

Примітка: n – кількість індивідів; p (%) – частота у відсотках;

Частоти виявлених алелей *PON-1(Q)* та *PON-1(R)* серед здорових осіб харківської популяції співпадають з дослідженнями російських вчених щодо поліморфізму гена *PON-1* серед етнічних татар, відповідно *PON-1(Q)* – 68,58% (0,69) та *PON-1(R)* – 31,42% (0,31) [24], а також серед італійців – 0,73 та 0,27 [25]. В той час у японській популяції частоти *Q* та *R* були протилежні до нашого дослідження і склали 0,31 та 0,69 [26]. В популяції Сербії генотипи гена *PON-1* розподілені таким чином: *QQ* – 0,55; *QR* – 0,38; *RR* – 0,07 [27], а в США – 0,30; 0,48; 0,22, відповідно [28], і є подібними до наших результатів, а саме *QQ* – 45,4% (0,45); *QR* – 48,9% (0,49),

RR – 11,4% (0,11). Відмінності у розподілі генотипів в різних популяціях можуть пояснюватися особливостями популяцій, їх етнічними характеристиками та генетичною різноманітністю [20, 21]. Порівняння частот генотипів показало міжетнічне та міжпопуляційне різноманіття.

#### **Висновки**

Переважання частоти алеля Q гена PON-1 (Q – 0,70, R – 0,30) серед здорових мешканців м. Харкова, за відсутності ІХС, обґрунтовує асоціацію цього поліморфізму з ангіопротективною дією ферменту параоксонази. Подальшого дослідження потребує визначення поліморфізму гена параоксонази у хворих на ЦД 2 типу з проявами макросудинних ускладнень, а також дослідження механізму зниженої активності параоксонази у діабетичного загалу.

#### **Література.**

1. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены предрасположенности. - СПб.: «Интермедика». - 2000. - 271 с.
2. Imai Y., Morita H., Kurihara H. et. al. Evidence for association between paraoxonase gene polymorphisms and atherosclerotic diseases//Atherosclerosis. – 2000. – V.149. – P.435–442.
3. Mackness B., Mackness M.I., Arrol S. Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus // Atherosclerosis. – 1998. - V.139. – P.341-349.
4. Ruiz J., Blanche H., James R. et. al. Gln-Arg192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes.//Lancet. – 1995 – Vol. 346. – P.869-872
5. Mackness M.I., Durrington P.N., Mackness B. How high density lipoprotein protects against the effect of lipid peroxidation//Curr Opin Lipidol. - 2000. - Vol. 11,N4.-P. 383-388.
6. Navab M., Imes S., Hama et.al. Monocyte transmigration induced by modification of LDL in cultures of human aortic endothelial cells is due to induction of MCP-1 synthesis and is abolished by HDL // J.Clin.Invest. – 1991. – Vol.88., N6. – P. 2039-2046.
7. Voetsch B., Kelly M., Benke S. et.al. Paraoxonase 192 Gln-Arg Polymorphism An Independent Risk Factor for Nonfatal Arterial Ischemic Stroke Among Young Adults //Stroke. - 2002. –Vol. 33. – P. 1459-1464
8. Humbert R., Adler D., Distèche C. et.al. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism//Nat. Genet. - 1993. - Vol. 3. – P. 73–76.
9. Sanghera D., Saha N., Aston C. et. al. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease//Arterioscler Thromb Vase Biol. – 1997. – Vol.1. – P.1067-1073.
10. Ikeda Y., Suchiro T., Inoue M. et al. Serum paraoxonase activity and its relationship to diabetes complication in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus//Metabolism. - 1998. - Vol. 47., N5. - P. 598-602.
11. Dharambir K. Sanghera; Nilmani Saha; Christopher E. Aston Genetic Polymorphism of Paraoxonase and the Risk of Coronary Heart Disease //Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.- 1997. - Vol. 17. – P.1067-1073.
12. Antikainen M, Murtomaki S, Syvanne M. et. al. The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns.//J Clin Invest. – 1996. – Vol. 98. – P.883-885.
13. Hughes K, Lun KC, Yeo P. Cardiovascular disease in Chinese, Malays and Indians in Singapore, I: differences in mortality//J Epidemiol Commun Health. – 1990. - Vol. 44. – P.24-28.
14. Martin Pfohl, Matthias Koch, Marckus D. Enderle et.al. Paraoxonase 192 Gln/Arg gene polymorphism, coronary artery disease, and myocardial infarction in type 2 diabetes //Diabetes. – 1999. – Vol.48. – P. 623-627.
15. Гориунська М.Ю. Активність параоксонази у жінок, хворих на цукровий діабет 2 типу: кореляція з параметрами оксидативного стресу, ліпідного профілю та глікемічного контролю //Ендокринологія. – 2001. – Т.6., № 2. – С. 160-165.
16. Koch M, Hering S, Barth C, Paraoxonase1 192 Gln/Arg gene polymorphism and cerebrovascular disease: interaction with type 2 diabetes.//Exp Clin Endocrinol Diabetes. - 2001. - Vol. 109. – P.141–145.
17. Odawara M, Tachi Y, Yamashita K. Paraoxonase polymorphism (Gln 192-Arg) is associated with

- coronary heart disease in Japanese noninsulin-dependent diabetes mellitus//J Clin Endocrinol Metab - 1997. - Vol. 82. – P. 2257-2260.
18. Suehiro T, Nakauchi Y, Yamamoto M et al. Paraoxonase gene polymorphism in Japanese subjects with coronary heart disease//Int J Cardiol. – 1996. – Vol.57. – P.69-73.
  19. Huang Q, Lui Y.H., Yang Q.D. et al Human serum paraoxonase gene polymorphism, Q192R and L55M, are not associated with the risk of cerebral infarction in Chinese Han population//Neurol.Res. – 2006. – Vol 28(5). – P. 549-554.
  20. Cavalli-Sforza L., Bodmer W. The genetics of human populations. - San Francisco: Freeman, 1971. - 962 p.
  21. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях.– М.: Наука, 2003.– 431 с.
  22. Walsh P., Metzger D., Higuchi R. Chelex 100 as a Medium for Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material // BioTechniques. – 1991.– №10. – P.506.
  23. СОУ85.2-37-206:2004 Методи виділення ДНК із біопроб за допомогою гуанідинізоціонату та реагенту “Chelex-100” для проведення полімеразної ланцюгової реакції.
  24. Мустафина О.Е., Данилова В.В., Зуева Л.П. и др.Полиморфизм 192Q/R гена параоксоназы 1 в популяции татар: анализ ассоциаций с сердечно-сосудистыми заболеваниями, содержанием липидов в крови и грациями возраста//Медицинская генетика: Материалы V съезда Российского общества медицинских генетиков. – 2005. - № 5. – С.223.
  25. Ombres D., Pannitteri G., Montali A. et al. Gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene is not associated with coronary artery disease in Italian patients //Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 1998. – V.18. – P.1611–1616.
  26. Sakai T., Matsuura B., Onji M. Serum paraoxonase activity and genotype distribution in Japanese patients with diabetes mellitus // Internal.Medicine. – 1998. – Vol.37, №7. – P. 581-584.
  27. Kotur-Stevuljevic J., Spasic S., Stefanovic A. et al. Paraoxonase-1 (PON1) activity, but not PON1 (Q192R) phenotype, is a predictor of coronary artery disease in a middle-ages Serbian population // Clin.Chem.Lab.Med. – 2006. – Vol. 44(10). – P.1206-1213
  28. Gan K., Smolen A., Eskerson H. et al. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase Evidense for one esterase catalyzing both activities//Drug.Metab.Dispos. – 1991. – Vol. 19. – P. 100-106.

### Резюме

Зібрана інформація про 110 (79 – чоловіків, 31 – жінка) практично здорових мешканців м. Харкова, віком від 20 до 60 років. Частота алеля *Q* гена параоксонази серед здорових мешканців м.Харкова складає 0,70; частота алеля *R* – 0,30. Розподіл частот генотипів серед чоловіків і жінок відповідає розподілу, очікуваному по рівнянню Харді-Вайнберга ( $\chi^2=4,33$ ;  $P<0,05$ ).

Собрана информация о 110 (79 – мужчины, 31 – женщина) практически здоровых жителях г.Харькова, в возрасте от 20 до 60 лет. Частота алеля *Q* гена параоксоназы среди здоровых жителей составляет 0,70; частота алеля *R* – 0,30. Распределение частот генотипов среди мужчин и женщин соответствует распределению, ожидаемому по уравнению Харди-Вайнберга ( $\chi^2=4,33$ ;  $P<0,05$ ).

The data about 110 (male/female: 79/31, age from 20 to 60 years) healthy Kharkov habitants were collected. Frequency of *Q* allele of paraoxonase gene is 0,70; frequency of *R* allele - 0,30. Distributions of genotype frequencies among men and women did not deviate from Hardy-Weinberg's equilibrium ( $\chi^2=4,33$ ;  $P<0,05$ ).

**ТИРКУС М.Я., МАКУХ Г.В., БІЛЕВИЧ О.Б., ЗАСТАВНА Д.В.**

ДУ "Інститут спадкової патології АМН України",

Україна, 79000, м.Львів, вул..М.Лисенка 31а, e-mail:tyrkus.m@ihp.lviv.ua

## ВНЕСОК ОСНОВНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ЧИННИКІВ В ЕТІОЛГІЇ ПОРУШЕНЬ СПЕРМАТОГЕНЕЗУ

Близько 15% подружніх пар є неплідними. Внесок чоловічого фактору в структуру непліддя складає 30 – 50%. Причини чоловічого непліддя – різноманітні та

до кінця не з'ясовані. Внесок генетичної компоненти при цьому сягає 10-20%. Найбільш вивченими є хромосомні порушення при неплідді і вони стосуються змін структури та чисельності хромосом, але в роботах останніх років щораз частіше зустрічаються молекулярно-генетичні дослідження при чоловічому неплідді[1].

Зокрема, відомо, що два гени Y-хромосоми – ген детермінації статі (SR $\text{Y}$ ) та ген фактору азооспермії (AZF) безпосередньо впливають на фертильність у чоловіків. Ген SR $\text{Y}$  розташований на короткому плечі Y-хромосоми і відповідає за диференціацію гонад в процесі ембріогенезу. При відсутності всього короткого плеча або його дистальних ділянок індивід втрачає ген SR $\text{Y}$ . При цьому процес розвитку ембріона порушується на стадії диференціації гонад, що призводить до виникнення жіночого фенотипу при чоловічому (46XY) каріотипі. І навпаки, транслокація гена SR $\text{Y}$  з Y на X - хромосому (або аутосому) призводить до формування чоловічого фенотипу при жіночому (46, XX) каріотипі (синдром де ля Шапеля)[2].

На довгому плечі Y-хромосоми ідентифіковано AZF регіон, який містить групу генів, відповідальних за нормальний сперматогенез. Тому, втрата цього регіону, або його сегментів (AZFa, AZFb, чи AZFc) супроводжується порушеннями фертильності. Отже, при делеції довгого плеча Y-хромосоми фенотип залишається чоловічим, а порушення сперматогенезу залежать від розміру втраченого сегменту[3].

Ще однією відомою причиною генетично детермінованої чоловічого непліддя є мутації гена TPBM, які призводять до генітальної форми муковісцидозу (MB). Так, у 97% чоловіків із MB діагностується обструктивна азооспермія, яка викликана ізольованим ураженням сім'явивідних протоків при відсутності класичних проявів захворювання. При цій атипичній формі MB 70-80% пацієнтів з двосторонньою природженою аплазією сім'явивідних протоків мають мутації гена TPBM і у 45-60% знаходять 5T алель поліморфного локусу IVS8polyT[4].

Тому метою роботи було вивчення частоти та спектру найпоширеніших генетичних чинників серед чоловіків з порушеними показниками спермограми.

### **Матеріали і методи**

Всього обстежено 200 чоловіків із порушеними показниками сперматогенезу при діагнозі азоо-, оліго-, астено-, астенотератозооспермія та аспермія.

Всі пацієнти проходили цитогенетичне обстеження із застосуванням GTG- та CBG–диференційного забарвлення препаратів метафазних хромосом, отриманих з культури лімфоцитів [5]. Паралельно, із лейкоцитів периферійної крові цих пацієнтів виділяли ДНК методом висолювання [6] для подальшого молекулярно-генетичного дослідження Y-хромосоми та мутацій гена TPBM.

Наявність гена SR $\text{Y}$  та мікроделеції AZF регіону Y-хромосоми вивчали за допомогою двох мультилокусних ПЛР, у кожній із яких ампліфікували фрагменти трьох AZF (AZFa, AZFb та AZFc) регіонів та контрольного фрагменту гена SR $\text{Y}$ . Аналіз продуктів ПЛР проводили шляхом електрофорезу у 2% агарозному гелі. Досліджували мікроделеції Y-хромосоми AZF-регіону в наступних STS локусах: sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255[7]. Відсутність на електрофореограмі певних фрагментів свідчила про наявність мікроделецій у відповідних локусах.

Дослідження мутацій гена TPBM проводили за допомогою ПЛР та подальшого гетеродуплексного, делеційного та рестрикційного аналізу. Залежно від типу досліджуваних мутацій здійснювали електрофорез у агарозному або поліакриламідному гелях. Отримані сигнали порівнювали з маркерами довжин, і на основі цього детектували розміри отриманих фрагментів. Для детекції алелів у триалельній поліморфній послідовності IVSpolyT-5T, 7T чи 9T проводили алель-специфічну ПЛР[8]. Спектр досліджуваних мутацій різнився від переліку мутацій, які досліджуються з метою верифікації класичної форми MB. Окрім найпоширеніших у популяції Західного регіону України алелів гена TPBM (F508del, G542X, N1303K,

CFTRdele2,3(21kb), W1282X, G551D, R553X, 1717-1G-A), у протокол молекулярно-генетичного дослідження були введені наступні мутації та поліморфні варіанти: R117H, R347P, R347H, R347L, R347C, I336K, R334W, R560T, G551S, Q552X, Y122X, D1270N, 621+1G-T, S549I, S549N [9].

#### **Результати та обговорення**

Каріотипування інфертильних чоловіків із порушеними показниками спермограми виявило аномалії каріотипу у 14 випадках, що складає 7%. Зокрема, у 8 випадках встановлено синдром Кляйнфельтера (каріотип - 47,XXY), у 3 – синдром де ля Шапеля (каріотип – 46,XX), у 1 – дисомію Y- хромосоми (каріотип – 47,XYU), у 2 – структурні перебудови хромосом: каріотип 46,Xdel(Y)(q11)/45,X(23:10) та делецію гетерохроматинового блоку 46,XYqh- і клон 46,Xdel(Y)(q12).

Молекулярно-генетичні дослідження Y-хромосоми у пацієнтів із синдромом Кляйнфельтера, не виявляли жодних змін у AZF-регіоні Y-хромосоми при наявності у всіх SRY-гена. В той час як у всіх трьох пацієнтів із синдром де ля Шапеля встановлено мікроделецію усїєї послїдовності AZF-регіону. Щодо гена SRY, то у 2 пацієнтів з синдромом де ля Шапеля він присутній, а у одного – відсутній.

У групї інфертильних чоловіків з нормальним каріотипом (всього 186 індивїдів), мікроделеції Y-хромосоми діагностовано у 12 осіб з наступним спектром мутацій: мікроделеції субрегіону AZFa – у однієї особи; AZFb - у однієї особи; субрегіонів AZFb+c – у 3 осіб; субрегіону AZFc – у 6 осіб, відсутність усїєї послїдовності AZFa, AZFb та AZFc локусів Y-хромосоми та SRY- гена – у 1 особи. Отже, 6,5% інфертильних чоловіків з нормальним каріотипом мають мікроделеції Y-хромосоми. Причому, найчастїше ушкоджувався субрегіон AZFc, відсутність якого встановлено у 10 із 12 виявлених випадків мутацій. Відносно усїєї групи обстежених інфертильних чоловіків частота мікроделецій Y-хромосоми сягає 7,5%. Отримані дані принципово співпадають із даними інших дослідників, зокрема, Лївшиць Л.А. із співавт.[10].

Особливо слід наголосити, що переважна більшість порушень, описаних вище, утворюється de novo. Причини їх утворення – невідомі, але, разом з тим, вони мають тенденцію до закрїплення у подальших поколіннях. Це необхідно враховувати, при рекомендаціях застосування додаткових репродукційних технологій. Проведення цитота молекулярно-генетичних досліджень у такому випадку є особливо необхідним. При наявності хромосомних чи генних аномалій подружня пара може народити здорову дитину, використовуючи сучасні репродукційні технології, за умови проведення коректної доїмплантаційної чи пренатальної діагностики.

Ще однією причиною чоловічого неплїддя, як зазначалося вище, може бути генїтальна форма муковїсцидозу, яка проявляється у вигляді порушення прохідності, або повної непрохідності сїм'явивїдних протоків, і обумовлюється мутаціями гена ТРБМ[11]. Тому, при наявності у чоловіків порушень сперматогенезу у вигляді олігоастенотератозооспермії, ізольованої олігозооспермії, азооспермії нез'ясованого генезу, зниженому об'ємі сїм'яної плазми, відсутності або низької концентрації фруктози, патологічної в'язкості еякуляту, очевидно, доцїльно проводили молекулярно-генетичне дослідження мутацій гена ТРБМ. Відповідно, спектр порушень спермограм, які зафіксовані в обстежуваних нами чоловіків і перечислені вище у «Матеріалах і методах», передбачає доцїльність вивчення мутацій гена ТРБМ у обстежуваній групї чоловіків – як однієї з причин генетично обумовленого чоловічого неплїддя.

Отримані результати засвідчили, що частота мажорної мутації F508del в обстеженій групї інфертильних чоловіків складає 3,85%. В одному випадку ідентифїковано мутацію R117H. Решта мутацій, а саме: G542X, N1303K, CFTRdele2,3(21kb), W1282X, G551D, R553X, 1717-1G-A, R347P, R347H, R347L, R347C, I336K, R334W, R560T, G551S, Q552X, Y122X, D1270N, 621+1G-T, S549I, S549N у обстежуваній групї пацієнтів не ідентифїковані. Разом з тим, у 17 чоловіків досліджуваної групї детектовано 5T алель поліморфного локусу IVS8polyT, що

становить 8,5%. Результати розподілу генотипів поліморфного локусу IVS8polyT були наступними: 9T/9T генотип виявлено у 1,37%, 7T/9T – у 59,5%, 7T/7T – у 30% та 5T/7T – у 8,5% інфертильних чоловіків.

Таким чином, біля 12% обстежених чоловіків входять в групу ризику по атиповій формі муковісцидозу, що може спричинитися до їх інфертильності. Більше того, родини таких чоловіків потребують більш детального медико-генетичного консультування. Зокрема, при виявленні гетерозиготного носійства мутацій гена ТРБМ у дружини, з метою запобігання народження хворих дітей, рекомендується проводити пренатальну діагностику МВ[12].

Отже, поряд з хромосомними аномаліями та мікрodelеціями Y-хромосоми мутації гена ТРБМ є вагомим чинником в етіології ідопатичного непліддя, що вимагає проведення їх дослідження у чоловіків із порушеними параметрами спермограм нез'ясованого генезу.

### **Висновки**

1. При цитогенетичному дослідженні чоловіків із порушеними процесами сперматогенезу у 7 % випадків виявлено кількісні та структурні зміни хромосом.

2. Серед дослідженої групи інфертильних чоловіків частота мікрodelецій Y-хромосоми становить 7,5%, причому, найчастіше ушкоджено субрегіон AZFc, відсутність якого встановлено у 10 із 12 виявлених випадків мутацій.

3. При проведенні молекулярно-генетичного аналізу мутацій гена ТРБМ детектовано мутації F508del (3,85%), R117H (один випадок) та 5T алель поліморфного локусу IVS8polyT (8,5%).

4. Отримані результати вказують на вагомий внесок генетичної компоненти у порушеннях сперматогенезу та передбачають необхідність проведення генетичних досліджень в усіх випадках ідопатичного непліддя у чоловіків.

### **Література**

1. *Diemer T., Desjardins C.* Developmental and genetic disorders in spermatogenesis // Human Reproduction Update. 1999.-Vol. 5.- No 2.-P. 120-140.

2. *Layman L. C.* Human gene mutations causing infertility // Journal Medical Genet. 2002.- Vol. 39.- P. 153-161.

3. *Hopps, C.V., Mielnik, A., Goldstein, M., Palermo, G.D., Rosenwaks, Z. & Schlegel, P.N.* Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. Human Reproduction. 2003, 18 1660-1665.

4. *Sertic J., Cvitkovic P., Myers M., Randall K. Saiki, Stavljenic Rukavina A.* Genetic Markers of Male Infertility: Y Chromosome Microdeletions and Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Gene Mutations. Croatian Medical Journal. 2001.-Vol. 42.- No 4.-P. 416-420.

5. *Пілінська М.А., Дибський С.С., Шеметун О.В., Талан О.О.* Рівень спонтанних хромосомних аберацій у дітей з екологічно чистого регіону України, встановлений при цитогенетичному аналізі рівномірно та диференційно забарвлених метафазних хромосом // Цитология и генетика.-2004.-40, №6.-С.45-48.

6. *Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F.* A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells // Nucleic Acids Research. – 1988. – Vol.16. – No 3. – P.1215.

7. *Simoni M., Bakker E., Krausz C.* EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions // International J. of Andrologi.- 2004.- No 27.- P. 240-249.

8. *Маниатис Т., Фриз Е.Е, Сэмбрук Ж.* Молекулярное клонирование.- М. Мир.- 1985.- С.420.

9. *Kusić J, Radojković D, Maletić V, Branković S, Savić A.* Mutations and polymorphisms in CFTR genes in infertile men with oligospermia or azoospermia. Srp Arh Celok Lek. 2002 Jan-Feb;130(1-2):1-6.

10.Лівшиць Л. А., Ясінська О. А. Роль мікрodelецій хромосомної ділянки Yq11 в розвитку необструктивних форм чоловічого безпліддя // Цитология и генетика.-2002.-№5.-С.73-78.

11.Kanavakis E. Tzetis M. Antoniadis T. Cystic fibrosis mutation screening in CBAVD patients and men with obstructive azoospermia or severe oligozoospermia // Molecular Human Reproduction. –1998. –Vol.4, №4. –P.333-337.

12.Jakubiczka S, Bettecken T, Stumm M Frequency of CFTR gene mutations in males participating in an ICSI programme // Human Reproductions. 1999. –Vol.14, №7. – P. 833-834.

### **Резюме**

Отримані результати вказують на вагомий внесок генетичної компоненти у порушеннях сперматогенезу у чоловіків. Показано високу результативність комплексу цито- та молекулярно-генетичних досліджень при неплідді у чоловіків: у 7% випадків встановлені порушення кариотипу; у 7,5% - мікрodelеції Y-хромосоми; детектовано мутації гена ТРБМ та 5Т алель поліморфного локусу IVS8polyT.

Полученные результаты свидетельствуют о существенном влиянии генетической компоненты при нарушениях сперматогенеза у мужчин. Показана высокая результативность комплекса цито- и молекулярно-генетических исследований при бесплодии у мужчин: в 7% установлены изменения кариотипа; 7,5% - микрodelеции Y-хромосома; найдены мутации гена ТРБМ и 5Т алель полиморфного локуса IVS8polyT.

The final results are the evidence of the essential influence of the genetic component on male infertility. It was shown high effectiveness of the complex of cyto- and molecular-genetic researches at male infertility: quantitative and structural chromosome abnormalities were found in 7%, Y-chromosome microdeletions - in 7,5%, CFTR gene mutations and 5T allele of polymorphic locus IVS8polyT are found in males with spermatogenesis failure.

### **ФИЛИПЦОВА О.В.1 , АТРАМЕНТОВА Л.А.**

*Национальный фармацевтический университет,*

*Украина, 61002, Харьков, ул. Пушкинская, 53, e-mail: philiptsova@yahoo.com*

*Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина,*

*Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы,4, e-mail:wshkoda23@rambler.ru*

### **ГЕНЕАЛОГИЧЕСКАЯ КУЛЬТУРА В УКРАИНЕ: ФЕНОМЕН ЭТНИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ**

При решении различных проблем, связанных с наследственностью человека, нередко возникает проблема получить точную генеалогическую информацию. Одним из важнейших показателей является этническая принадлежность – национальность [1-3]. Этот показатель необходим для корректного применения ДНК-маркёров в криминалистике и медицинской генетике [4-8]. В последнее время в Украине, как и в других странах мира, в связи с повышением доли внебрачных рождений, применением репродуктивных технологий растёт число детей, не имеющих генетического родства с одним или обоими родителями [9]. Воспитание детей в неполных семьях способствует утрате информации о родственниках по одной из линий, как правило, отцовской. Отсутствие в Украине реестров близнецов и приёмных детей также осложняет работу генетиков. Кроме того, население Украины не привычно к популяционным исследованиям и выражает непонимание и обеспокоенность относительно использования данных. В паспорте гражданина Украины отсутствует позиция «национальность». Отмечается, что молодое поколение отождествляет понятие



национальности и гражданства. Такое положение дел снижает точность исследования, и соответственно - генетических прогнозов. При сборе генеалогической информации возникает вопрос, что вкладывают в понятие «национальность» жители Украины, каков критерий самоназвания украинцев, русских и представителей других национальностей в городах, где коэффициент миграции составляет около 0,3-0,7? Как происходит этническое самоопределение в разных географических локальностях страны? Как устанавливается эта национальность, если для исследования берётся биологический материал в медицинских учреждениях, где в обязанности сотрудников не входит выяснение генеалогии пациентов? Выяснение этого и стало целью работы.

#### Материалы и методы

10152 человека – преимущественно жителей Харькова и Харьковской области дали информированное согласие принять участие в исследовании и получили полный комплект анкет, учитывающих более 500 генеалогических и психометрических показателей. Возвратили заполненные анкеты 2002 человека (около 22%). Статистический анализ проведен с использованием критерия  $\chi^2$ . База данных сформирована в программе Microsoft Excel. Расчеты произведены в программах Microsoft Excel и Biostat.

#### Результаты и обсуждение

Распределение обследованных по национальности, которую они отметили в анкете, представлено в табл.1. Среди этнических меньшинств чаще всего встречались евреи, белорусы, армяне, греки и азербайджанцы. В целом среди мужчин было представлено 13 этнических групп, среди женщин – 19. В настоящее время к украинцам себя отнесли более 70% обследованных (табл.1). По данным брачных записей 1993 года, украинцев в Харькове было 49,9% и почти столько же русских – 43,6% [10]. Такое резкое изменение можно объяснить изменением самоназвания. Поэтому мы не использовали этническую принадлежность лиц молодого возраста, а принимали во внимание лишь национальность родителей и прародителей. Для корректного исследования необходимо иметь родственников по прямой линии по меньшей мере в трёх поколениях. Из обследованных мужчин «молодого» (до 30 лет включительно) поколения 9,4% затруднились отнести себя к определенной национальности, 26,4% не знали национальности своего отца, 17,3% – матери. Из мужчин «старшего» (после 31 года) поколения 7,6% не смогли определиться с собственной национальностью, 16,0% – с национальностью отца и 15,1% – с национальностью матери. Среди женщин «молодого» поколения не смогли отнести себя к определенной национальности 3,3%, среди женщин «старшего» поколения – 2,1%. В «молодом» поколении не знали национальности отца 10,8%, а национальности матери – 11,2% женщин, в «старшем» – 6,3% и 8,7% соответственно. От 1/3 до 3/4 не знали национальности своих прародителей, а говорить о прапрародителях уже и не приходилось. В целом и мужчины и женщины лучше были информированы о своих родственниках по материнской линии. Это связано с воспитанием детей в неполных семьях, проживанием детей с разведённой матерью, а не отцом. Лица «молодого» поколения с большим затруднением воспроизводят информацию о своих родственниках.

Таблица 1

Этническая принадлежность	Мужчины		Женщины	
	n	%	n	%
Украинцы	455	70,9	971	72,3
Русские	104	16,2	297	22,1
Национальные меньшинства	31	4,8	37	2,8
Не указано	52	8,1	38	2,8
Всего	642	100,0	1343	100,0
$\chi^2 = 39,7, v = 3, p < 0,001$				

*Примечание. n – количество обследованных,  $\chi^2$  – критерий хи-квадрат, v – число степеней свободы, p – уровень значимости.*

Анализ данных в зависимости от этнической принадлежности по самоназванию и брачной структуры родительских и прародительских пар показал следующее. Из табл.2 заметно, насколько существенно «выпадение» обследованных из анализа при попытке разбивать их на группы для учета различных эффектов, связанных с этнической эндо-экзогамией. Так, «чистых» представителей определенной национальности с учетом лишь информации о родителях и прародителях оказалось не более 1/3 от всех обследованных по самоназванию.

Данные табл.2 также свидетельствуют о том, что наибольшая корректность воспроизведения, а, следовательно, и наибольшая этническая идентичность поддерживается в группах малочисленных национальностей. Это находится в соответствии с данными предыдущих наших исследований, в которых было показано, что наибольшая брачная ассортативность по этническому признаку также наблюдается у представителей этнических меньшинств [10-12]. Результаты исследования свидетельствуют, что в будущем судить об этнической принадлежности жителя Украины по самоназванию будет затруднительно. Полученные результаты также позволяют спланировать объем выборки для исследования. Мужчин необходимо набирать вдвое больше, поскольку они с меньшим желанием участвуют в исследованиях, а в целом же около 80% из набранных людей могут отсеяться. При проведении генетических исследований, учитывающих этническую принадлежность, необходимо увеличить это количество обследованных еще в три-десять раз, учитывать, что многочисленные этнические группы хуже воспроизводят генеалогическую информацию, чем представители редких национальностей.

Возможно, эти реалии объясняют слабое развитие в Украине таких научных направлений, как популяционная генетика человека и генетика поведения человека. Эти исследования на первый взгляд кажутся довольно простыми, однако при их реализации перед исследователем возникает множество проблем – от обоснования методологической корректности до огромных затрат времени при сборе материала. Тем не менее, эти исследования проводить необходимо, так как они создают базу для корректного применения точных и дорогостоящих методов молекулярной генетики. Без строго учёта генеалогической информации снижается информационная ценность судебных маркёров и маркёров генетической предрасположенности к заболеваниям с наследственным компонентом.

*Таблица 2*

**Связь этнической принадлежности обследованных с типом брака родителей и прародителей**

Группы	Родители и прародители имеют ту же национальность, к которой причислили себя обследованные	
<b>Мужчины «молодого» поколения</b>		
Украинцы (n = 407)	31	7,6%
Русские (n = 68)	11	16,2%
Другие (n = 25)	7	28,0%
<b>Мужчины «старшего» поколения</b>		
Украинцы (n = 74)	10	13,5%
Русские (n = 36)	7	19,4%
Другие (n = 6)	2	33,3%
<b>Женщины «молодого» поколения</b>		
Украинцы (n = 778)	95	12,2%
Русские (n = 169)	23	13,6%
Другие (n = 30)	4	13,3%

Женщины «старшего» поколения		
Украинцы (n = 192)	40	20,8%
Русские (n = 128)	14	10,9%
Другие (n = 7)	2	28,6%

*Примечание. Обозначения как в табл. 1.*

### **Выводы**

Проведённое исследование свидетельствует о низкой генеалогической культуре населения. Молодые люди хуже информированы о своей генеалогии, чем старшее поколение. Национальность, которую указывают молодые люди при генеалогическом анкетировании, часто не совпадает с этнической принадлежностью их родителей и прауродителей. Женщины дают более полную информацию о своих родственниках, чем мужчины, причём информация по материнской линии воспроизводится более полно, чем по отцовской.

Исследование поддержано грантом Президента Украины «Оценка интеллектуального потенциала молодежи Украины средствами генетики» (2007 г.).

### **Литература**

- 1 *Gaines S.O., Agnew C.R.* Relationship maintenance in intercultural couples: An interdependence analysis // In D.J. Canary (Ed) and M. Dainton (Ed). *Maintaining relationships through communication: relational, contextual, and cultural variations.* – 2003. – NJ: Lawrence Erlbaum Associates, Publishers. – P.231-253.
- 2 *Fu X., Tora J., Kendall H.* Marital happiness and inter-racial marriage: A study in a multi-ethnic community in Hawaii // *Journal of Comparative Family Studies.* – 2001. – Vol.32. – P.47-60.
- 3 *Gil-White F.J.* The Study of Ethnicity and Nationalism Needs Better Categories: Clearing up the Confusions that Result from Blurring Analytic and Lay Concepts // *Journal of bioeconomics.* – 2006. – Vol.7. –P.239-270.
- 4 *Пшеничнов А.С., Балановский О.П., Атраментова Л.А. и др.* Украинцы, русские и белорусы среди их соседей по Европе: свидетельства мтДНК и Y-хромосомы // VII Конгресс этнографов и антропологов России. Москва. 2007. – С. 275.
- 5 *Balanovsky O., Pshenichnov F., Rootsi S. et al.* Intra-ethnic variation of the Y chromosome in European countries: a comparative study // *The Fifth ISABS Conference in Forensic Genetics and Molecular Anthropology.* – Split, Croatia, 2007. – P. 121.
- 6 *Pshenichnov A., Balanovska E., Balanovsky O. et al.* Variation of paternal, maternal and autosomal genetic markers on intra-ethnic (Ukrainians) and inter-ethnic (Europe) level supports Y chromosomal marker bias // *International Society for Applied Biological Sciences, Split.* – 2007. – P.128.
- 7 *Zhivotovsky L.A., Veremeichyk V.M., Mikulich A.I. et al.* A comprehensive population survey on the distribution of STR frequencies in Belarus. – *Forensic Science International.* – 2007. – Vol.172. – P.156-160.
- 8 *Пшеничнов А.С., Балановский О.П., Ищук М.А. и др.* Генофонд пяти популяций украинцев по данным о полиморфизме мтДНК и Y-хромосомы// V съезд Российского общества медицинских генетиков. Уфа. Медицинская генетика. 2005 – С.256.
- 9 *Salaru N.N.R.* Evaluation of HLA in Detection of Non-Parentage Among Known False Trios // *Journal of Forensic Sciences.* – 1993. – Vol.38, Issue 6.
- 10 *Атраментова Л.А., Филипцова О.В.* Генетико-демографические процессы в городских популяциях Украины в 90-х годах. Брачная структура харьковской популяции // *Генетика.* – 1998. – Т.34, №8. – С.1120-1126.
- 11 *Атраментова Л.А., Филипцова О.В.* Генетико-демографические процессы в городских популяциях Украины в 90-х годах. Брачная структура полтавской популяции // *Генетика.* – 1999. – Т.35, №12. – С.1699-1705.
- 12 *Атраментова Л.А., Мухин В.Н., Филипцова О.В.* Генетико-демографические

процессы в городских популяциях Украины в 90-х годах. Брачная структура донецкой популяции // Генетика. – 2000. – Т.36, №1. – С.93-99.

### **Резюме**

В работе поднята проблема генеалогической культуры и сложностей сбора генетического материала у современных жителей Украины. Показана сложность применения понятия национальности для генетических целей. В методологическом аспекте высказаны рекомендации по оценке численности выборки для классических генетических исследований.

В роботі піднята проблема генеалогічної культури та складностей при збиранні генетичного матеріалу у сучасних мешканців України. Показана складність використання поняття національності для генетичних цілей. В методологічному аспекті виказані рекомендації з оцінки чисельності вибірки для класичних генетичних досліджень.

In the paper the problem of genealogical culture and genetic material collection difficulties in contemporary Ukrainian inhabitants are raised. Complexity of applying nationality notion for genetic purposes is shown. In a methodological aspect recommendations on sample number evaluation for classical genetic research are given.

**ЦАО ЮЙ, АТРАМЕНТОВА Л.А.**

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина,  
Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы,4, e-mail:wshkoda23@rambler.ru*

### **ПОТЕРЯ ГЕТЕРОЗИГОТНОСТИ ГЕНА *FHIT* КАК ФАКТОР РИСКА РАКА ПИЩЕВОДА**

Заболееваемость раком пищевода в мире в среднем составляет 3-5 на 100 тыс. населения. Китайская провинция Хебэй по распространенности рака пищевода стоит на первом месте – 133 больных на 100 тыс. населения, а в уезде Цийсян этой провинции 244, а в отдельных местах 1004 больных на 100 тыс. населения [1, 15]. Эпидемиологические, популяционные и семейные исследования показали высокую наследуемость рака пищевода в этом регионе [16]. Оценки параметров модели главного гена предполагает наличие в системе генетического контроля этого заболевания главного гена с сильным эффектом [17]. В настоящее время уже известно много генов, имеющих отношение к канцерогенезу, среди них ген *FHIT*, описанный в 1996 г.[9]. Ген расположен в локусе 3p14.2, содержит 10 экзонов [9, 14]. В клетках различных злокачественных опухолей человека экспрессия гена *FHIT* снижена, выявлены его аномальные варианты, вызванные в основном делециями [3, 4, 6, 8, 9, 11] Унаследованная рецессивная мутация гена супрессора опухоли присутствует в гетерозиготном состоянии во всех соматических клетках организма и функционирует как ген наследственной предрасположенности к раку. Если в одной из гетерозиготных клеток происходит мутация второго аллельного гена, клетка утрачивает гетерозиготность (loss of heterozygosity – LOH), становится гомозиготной и даёт начало раковой опухоли [2]. Изложенное послужило основанием для исследования делеции гена *FHIT* у больных раком пищевода из провинции Хебэй в Китае.

#### **Материалы и методы**

Сбор материала и молекулярно-генетический анализ выполнены в Институте онкологии провинции Хебэй (Китай). Изучены опухолевые и гомологичные

нормальные ткани 22 больных раком пищевода (17 мужчин и 5 женщин) в возрасте 50-79 лет. ДНК выделена с помощью протеинкиназы К методом фенол-хлороформной экстракции [5]. Для маркирования гена *FHIT* использованы внутригенные микросателлиты (*D3S1540*, расположенный рядом с 5 экзоном, и *D3S1234*, находящийся рядом с 8 экзоном), которые были амплифицированы с помощью полимеразной цепной реакции с последующим электрофорезом. Статистический анализ проведён точным методом Фишера, проверку нулевых гипотез проводили на уровне значимости не менее 0,05 для двустороннего критерия. Расчёты выполнены в программе Excel.

### Результаты и обсуждение

О наличии гомозиготной делеции свидетельствуют электрофореграммы ДНК. Отсутствие полосы указывает на гомозиготность клеток по делеции, а присутствие полосы свидетельствует о том, что в клетке имеется вариант нормальной ДНК. На электрофореграмме раковой ткани (образец Т2) полоска отсутствует, а в нормальной ткани того же больного (образец N2) она имеется (рис.1). На присутствие гомозиготной делеции свидетельствует также пониженная интенсивность окрашивания полосы. В образце Т4 (опухолевая ткань) полоска окрашена слабее по сравнению с образцом N4 (нормальная ткань). На рис. 2 в образцах Т1, Т2 и Т3 полоса на электрофореграмме ДНК из опухолевой ткани окрашена слабее, чем на электрофореграмме ДНК из гомологичных здоровых тканей (N1, N2 и N3). В образцах N10 и T10 полосы окрашены одинаково интенсивно, что указывает на отсутствие гомозиготной делеции в клетках раковой и нормальной тканей.

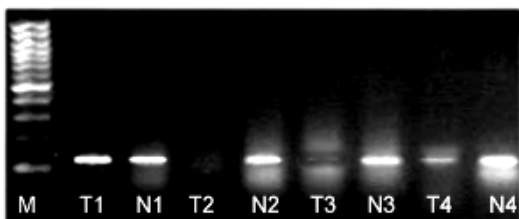


Рис. 1.

Электрофореграмма, выявляющая гомозиготную делецию с помощью маркера *D3s1234* в области 8 экзона. (М – 100-1500 бп стандартный молекулярный маркер, Т – раковая ткань, N – нормальная ткань)

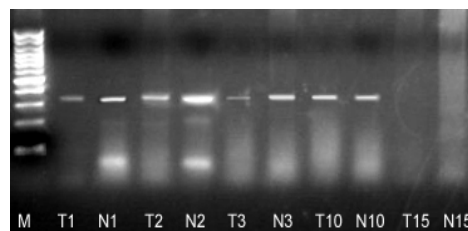


Рис. 2.

Электрофореграмма, выявляющая гомозиготную делецию с помощью маркера *D3s1540* в области 5 экзона. (М – 100-1500 бп стандартный молекулярный маркер, Т – раковая ткань, N – нормальная ткань)

Данный метод не позволяет различить нормальную гомозиготу (+/+) и гетерозиготу (+/-) по делеции, так как в обоих случаях на электрофореграмме присутствует искомая полоска и лишь её отсутствие указывает на генотип -/-.

Если в клетках здоровой ткани имеется один нормальный аллель (+/), то генотип -/- клеток раковой ткани этого же пациента следует рассматривать как результат одной мутации (+/-) → (-/-). Если генотип здоровой ткани гомозиготный (+/+), то переход в состояние -/- является результатом двух мутаций в одной клетке. Частота генных мутаций, как известно, составляет  $10^{-5}$ – $10^{-7}$ . Это даёт основание считать, что две одинаковых мутации в одной клетке – событие для группы в 22 человека маловероятное ( $10^{-10}$ – $10^{-14}$ ). Поэтому пациентов, у которых клетки здоровой ткани имели нормальный аллель, а клетки раковой ткани имели генотип -/-, с высокой вероятностью можно считать гетерозиготными (+/-), а сами эти случаи можно рассматривать как потерю гетерозиготности (LOH).

У пяти пациентов клетки здоровой ткани были гомозиготными по делеции в 5 экзоне. У четырёх из них гомозиготны были и клетки опухолевой ткани, а у одного опухолевая ткань имела нормальный аллель. (Мы не исключаем, что этот случай

является методической ошибкой, иначе следует признать наличие обратной мутации – восстановление гетерозиготности). У 10 пациентов в опухолевой ткани имелась гомозиготная делеция. Эти случаи рассматриваем как потерю гетерозиготности, вследствие которой развилась опухоль. У семи пациентов в нормальной и опухолевой ткани был выявлен нормальный аллель. Эти пациенты могли быть как нормальными гомозиготами (+/+), так и гетерозиготами (+/-).

Клетки здоровой ткани только одного пациента были гомозиготны по делеции в 8 экзоне (у этого же пациента гомозиготной была и раковая ткань), а у остальных 21 в клетках здоровой ткани обнаружен нормальный аллель. 12 пациентов с высокой вероятностью были гетерозиготными. Это заключение мы делаем на том основании, что в опухолевой ткани этих пациентов произошла потеря гетерозиготности – их клетки были гомозиготны по делеции. Генотип 9 пациентов по этому сайту точно не определён, так как и в клетках их здоровой и опухолевой ткани выявлен нормальный аллель.

В общем у 16 пациентов из 22 в опухолевой ткани имеется гомозиготная делеция в области 5 или 8 экзона, причём у 6 из них имеется две гомозиготных делеции – в обоих экзонах. Статистический анализ показал статистически значимую ( $p < 0,01$ ) связь рака пищевода с делецией в гене *FHIT*.

Вследствие делеции ген *FHIT* становится неактивным и теряет свойство быть супрессором опухоли [7, 10, 12, 13]. Делеции и гена *FHIT* выявляются уже на ранних стадиях заболевания, и потому могут использоваться для ранней диагностики рака. У пяти пациентов в раковой ткани не выявлена гомозиготная делеция в изученных районах гена. У этих пациентов могут быть повреждены другие участки гена *FHIT*, либо заболевание вызвано у них иной генетической причиной.

Дальнейшие исследования гена *FHIT* помогут приблизиться к пониманию механизмов канцерогенеза и обнаружить мишени для эффективного терапевтического воздействия.

Авторы выражают благодарность директору Института онкологии Баоэн Шан за содействие в проведении исследования и научному сотруднику Лиджень Вей за помощь в подборе методик.

#### Литература

1. *CHINA CANCER DATABASE* / Ministry of health P. R. China, Ministry of science & technology P. R. China — ( 2000 ~ ) — web: <http://WWW.CANCERNET.CICAMS.AS.CN>
2. *Cavanee W.K., Dryja T.P., Phillips R.A., et al.* Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma // *Nature*. – 1983. – Vol. 305 – P. 779–784.
3. *Claudio S, Antonella B, Simonetta O, et al.* The FHIT gene is expressed in pancreatic Ductular cells and is altered in pancreatic cancers [J]. // *Cancer Res* — 1999—vol. 59, № 6—P. 1308-1314.
4. *Huping C, Kristjansdottir S, Bergthorsson JT, et al.* High frequency of LOH, MSI and abnormal expression of FHIT in gastric cancer. // *Eur J Cancer* — 2002— vol.38, № 5 — P.728~735.
5. *Joe Sambrook and David Russell.* Isolation of high-molecular weight DNA from mammalian cell using proteinase K and phenol // *Molecular Cloning. A Laboratory Manual Third Edition.* – Cold Spring Harbor Laboratory Press – 2001 – P. 542–555
6. *Kitamura A, Yashima K, Okamoto E, et al.* Reduced FHIT expression occurs in the early stage of esophageal tumorigenesis: no correlation with p53 expression and apoptosis[J]. // *Oncology*—2001—vol.61, № 3— P. 205-211.
7. *Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, et al.* Allele loss and promoter hypermethylation of VHL, RAR, beta, RASSF1A and FHIT tumor suppressor genes on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma // *Cancer Res.* — 2003. — vol. 63, № 13. — P. 3724-3728.
8. *Li P, Li DT.* Study on the correlation between FHIT gene and the development of

- esophageal carcinoma // CHIN J. Cancer RREV Treat. — 2005. — vol. 12, № 21. — P. 1669-1672.
9. Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, et al. The *FHIT* gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers // Cell. — 1996. — vol. 84, № 4. — P. 587-597.
  10. Shimada Y, Sato F, Watanabe G, et al. Loss of *fragile histidine triad gene* expression is associated with progression of esophageal squamous cell carcinoma, but not with the patient's prognosis and smoking history // Cancer. — 2000 — vol. 89, № 1. — P. 5-11.
  11. Sozzi G, Pastotino U, Moiraghi L, et al. Loss of *FHIT* function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions [J]. // Cancer Res — 1998 — vol. 58, № 22 — P. 5032
  12. Yang Q, Nakamura M, Nakamura Y, et. al. Two-hit inactivation of *FHIT* by loss of heterozygosity and hypermethylation in breast cancer // Clin. Cancer Res. — 2002 — vol. 8, № 9. — P. 2890-2893.
  13. Zheng S., He ZG, Wang SB. *FHIT* genes and tumor // Foreign Medical Sciences (Pathophysiology and Clinical Medicine). — 1999. — vol. 19, № 6. — P. 417-420.
  14. Zimonjic D.B., Druck T., Ohta M., Kastury K., Croce C.M., Popescu N.C., and Huebner K. Positions of chromosome 3p14.2 fragile sites (FRA3B) within the *FHIT* gene. // Cancer Res. — 1997. — Vol. 57, № 6 — P. 166-1170.
  15. Wu Min, Sun Kaixian. Oncological genetics — Beijing: science — 2004 — P. 870.
  16. Генетико-эпидемиологическое исследование рака пищевода в Китае. // вестник харьковского национального университета — 2006 — vol. 729, № 3 — P. 141-146.
  17. Сегрегационный и компонентный анализ рака пищевода в провинции Хебэй. // вестник харьковского национального университета - 2006 — vol. 748, № 4 — P. 87-91.

#### Резюме

С помощью внутригенных микросателлитов *D3S1540* и *D3S1234* выявляли делеции в области 5 и 8 экзонов гена *FHIT* у 22 больных раком пищевода. У 16 пациентов в опухолевой ткани имеется гомозиготная делеция в области 5 или 8 экзона, причём у 6 из них имеется гомозиготные делеции в обоих экзонах. Статистический анализ показал статистически значимую ( $p < 0,01$ ) связь рака пищевода с делецией в гене *FHIT*.

За допомогою внутрігенних мікросателітів *D3S1540* і *D3S1234* визначали делеції в області 5 і 8 екзонів гену *FHIT* у 22 хворих на рак стравоходу. У 16 пацієнтів в пухлинній тканині присутня гомозиготна делеція в області 5 або 8 екзона, причому у 6 з них гомозиготні делеції присутні в обох екзонах. Статистичний аналіз показав значущий ( $p < 0,01$ ) зв'язок раку стравохода з делецією в гені *FHIT*.

Study deletion exons 5 and 8 of *FHIT* gene in 22 cases of ESCC was evaluated by intragenic microsatellites *D3S1540* and *D3S1234*. In 16 ESCC tissues have homozygous deletion in exons 5 or 8, and in 6 cases have two deletions, as it happens, there is a deletion in both of the exons. Statistical analysis shows, that there is a connection between ESCC and deletions of *FHIT* gene ( $p < 0.01$ ).

**ЧЕРЕДНИК Ю. О.<sup>1</sup>, ЖЕРЕБКО Н. М.<sup>2</sup>, СТРИЖ В. О.<sup>1</sup>, АНОПРИЄНКО О. В.<sup>3</sup>, ГОРОВЕНКО Н. Г.<sup>4</sup>, КОСТРОМІНА В. П.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Інститут фтизіатрії й пульмонології ім. Ф. Г. Яновського АМН України, вул. М. Амосова, 10, м. Київ, 03680, Україна.

<sup>2</sup>"ІнтерЛабСервіс-Україна", вул. М. Амосова, 5, Київ, 03038, Україна.

<sup>3</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Заболотного, 150, м.

Київ, 03143, Україна.

<sup>4</sup>Київська Медична Академія післядипломного утворення ім. П. Л. Шупика МОЗ України, вул. Дорогожицька, 9, м. Київ, 03112, Україна. E-mail: [yurach@ukr.net](mailto:yurach@ukr.net)

## ПРОБЛЕМИ ГЕНОДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

В останні роки в багатьох країнах спостерігається погіршення епідеміологічної ситуації захворюваності на туберкульоз. В Україні тенденція до зростання кількості таких хворих також зберігається. За даними ВООЗ кожного року в світі діагностується до 8 мільйонів нових випадків захворювання і більше 2 мільйонів людей помирають від цієї хвороби [9]. Основними факторами, які впливають на погіршення епідеміологічної ситуації у світі є прискорення міграційних процесів, зниження рівня соціально-економічних та екологічних умов проживання, розповсюдження ВІЛ-інфекції на фоні туберкульозу та збільшення кількості лікарсько-стійких штамів збудника туберкульозу [5, 6, 7]. Розрізняють монорезистентні та полірезистентні штами, серед яких все більшого розповсюдження набувають особливо небезпечні мультирезистентні штами (MDR), стійкі одночасно до двох основних протитуберкульозних препаратів: рифампіцину і ізоніазиду. У період з 1996 по 1999 роки MDR-штами були виявлені на 54 географічних територіях світу з 58 обстежених. Так, рівень розповсюдженості MDR-штамів на територіях країн Балтії склав: 14,1% для Естонії, 9% для Латвії і від 6% до 9% для окремих регіонів Росії [10]. Пізніше були відмічені спалахи мультирезистентного туберкульозу на територіях країн Східної Європи та Америки, для яких цей показник складав до 3% [1].

Наявність супутньої ВІЛ-інфекції у хворих туберкульозом значно знижує ефективність лікування і підвищує вірогідність несприятливого перебігу захворювання. Саме у таких хворих в 2005 році було вперше виявлено нові особливо небезпечні екстремально-резистентні штами (XDR), які окрім резистентності до рифампіцину і ізоніазиду є одночасно стійкими до будь-якого з фторхінолонів, а також до одного з трьох препаратів, таких як капреоміцин, канаміцин і амікацин [8]. Попередні дані вже показують, що близько 10% виявлених випадків MDR-ТБ насправді є XDR-ТБ [8].

В останні роки спостерігається збільшення кількості випадків захворювання туберкульозом серед дітей. Оскільки діти відносяться до найбільш вразливої категорії хворих з важким перебігом цього захворювання, раннє виявлення туберкульозної інфекції в біологічному матеріалі цих хворих є досить актуальною проблемою. Поряд із цим, особливістю туберкульозу у дітей є вкрай слабе бактеріовиділення, що ускладнює діагностику захворювання. Детекція мікобактерій туберкульозу ПЛР-методами допоможе діагностувати специфічний процес, особливо в тих випадках, коли підтвердити етіологію захворювання традиційними методами мікробіологічної діагностики не представляється можливим.

Класичні методи діагностики туберкульозу, такі як бактеріоскопія, культуральний, імуноферментний, цитологічний досить ефективні, але відрізняються або недостатньою чутливістю, або тривалістю виявлення в порівнянні з молекулярно-генетичними методами. Тому пошук нових, більш ефективних методів діагностики туберкульозу для протидії епідемії цього захворювання є життєво-важливим завданням для країни в цілому. Розвиток й удосконалення молекулярно-діагностичних методів відкриває нові перспективи для швидкого виявлення мікобактерій у клінічних зразках.

Тест-система «АмпліСенс<sup>®</sup> МБТ» призначена для виявлення ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* у біологічному матеріалі за допомогою ПЛР і була використана для оцінки ефективності методу ПЛР-діагностики туберкульозу на клінічних зразках, отриманих від дітей, хворих на туберкульоз органів дихання (ТБОД).

### Матеріали й методи

Об'єм клінічного матеріалу для виділення ДНК становить 0,1мл. Виділення ДНК



проводилось відповідно до протоколу в інструкції виробника тест системи «АмпліСенс МТБ» з використанням сорбенту універсального. Перед процедурою виділення ДНК до зразків додавали ВКЗ (внутрішній контрольний зразок) *M. tuberculosis complex*, до негативного й позитивного контролів - ОКЗ й ПКЗ+ОКЗ відповідно.

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в ампліфікаторі з активним регулюванням (по розчину в пробірці) «Терцик» (ДНК-технологія) за наступним режимом: 1 цикл {95°C, 15 хв}, 10 циклів {95°C – 10сек, 70°C – 20сек}, 32 циклу {95°C – 5сек 72°C – 15сек}, 1 цикл {72°C - 1хв}; 10°C - зберігання.

Чутливість тест-системи «АмпліСенс<sup>®</sup> МБТ» становить 1x10<sup>3</sup> кліт/мл ліофілізованих штамів *M. tuberculosis complex* й 1x10<sup>3</sup> геномних еквівалентів/мл ДНК *M. tuberculosis complex* у біологічних зразках. Облік результатів ПЛР аналізу проводиться по наявності або відсутності на електрофореграмі специфічних смуг ДНК (Рис. 1). Довжина ампліфікованих специфічних фрагментів ДНК: *Mycobacterium tuberculosis* – 390 п.н., ВКЗ *Mycobacterium tuberculosis* – 750п.н.

### Результати й обговорення

Дослідження проводили на зразках патологічного матеріалу, отриманого від 22 дітей, хворих на вперше діагностований туберкульоз органів дихання (ТБОД), 12 (68%) з них становили дівчата, 10(32%) – хлопчики. Середній вік складав 14 років. Зразки включали мокротиння, промивні води бронхів, венозна кров.

Всі діти одержали щеплення БЦЖ у пологовому будинку й при надходженні в клініку вже були інфіковані МБТ (мали позитивну реакцію на 2 ТЕ РРД-Л за тестом Манту) протягом 2 і більше років. Рентгенологічно туберкульоз ТВ у фазі інфільтрації й обсіменіння встановили у 31,8% дітей, у фазі інфільтрації й розпаду - у 9,1%, у фазі інфільтрації без розпаду і/або обсіменіння - у 59,1%.

Клінічні зразки патологічного матеріалу (мокротиння, промивні води бронхів венозна кров) досліджували в активну фазу захворювання за допомогою тест-системи «АмпліСенс<sup>®</sup> МБТ», а промивні води бронхів – додатково за допомогою мікроскопії й посіву на щільні живильні середовища. Отриманий результат виявлення *M.tuberculosis* методом ПЛР склав 73.3%. Це було на 50% вище (P<0,001) виявлення традиційними методами. Порівняльне дослідження зразків респіраторного й нереспіраторного походження дозволило визначити, що виявлення методом ПЛР із клінічних зразків мокротиння, промивних вод бронхів на 34% вище виявлення *M.tuberculosis* зі зразків крові (Рис. 1.). Подвійний забір матеріалу з різних біологічних зразків однієї хворої дитини підвищує ефективність виявлення *M.tuberculosis* на 31,8%.

Отримані результати демонструють переваги генодіагностичних методів перед традиційними та істотно підвищують можливості експрес-діагностики туберкульозу у дітей.

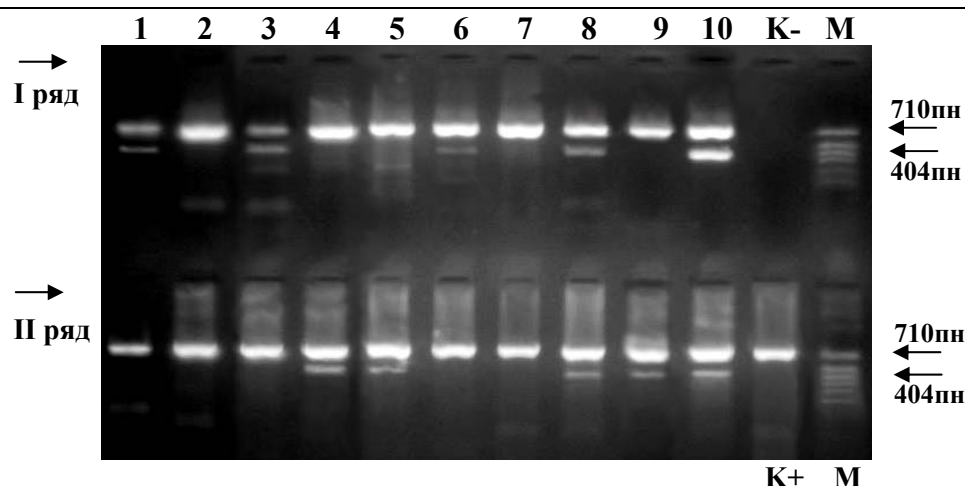


Рисунок 1. Електрофореграма аналізу клінічних зразків крові й респіраторних зразків за допомогою тест-системи «АмпліСенс МТБ».

Стрілками праворуч від малюнка зазначені смуги ДНК-маркера pBluescriptSK+/MspI

---

розміром 710пн й 404пн. Над малюнком і під малюнком позначені лунки з негативним і позитивним контролю та ДНК-маркером. **I ряд:** зразки в лунках 1, 3, 6, 8, 10 виявляють специфічну смугу, характерну для *M.tuberculosis*; зразки в лунках 2, 4, 5, 7, 9 демонструють відсутність *M.tuberculosis*. **II ряд:** лунки 4, 5, 8, 9, 10 – виявлення збудника *M.tuberculosis*, лунки 1, 2, 3, 6, 7, – відсутність *M.tuberculosis*. Зразки II ряду з 1 по 7 лунки представляють результат аналізу зразків хворих після завершення лікування: лунки – 1, 2, 3 аналіз зразків крові, лунки 4, 5, 6 – аналіз зразків мокротиння. В інших лунках представлені різні за походженням зразки отримані від окремих пацієнтів.

---

Діагностичні тест-системи на основі ПЛР, що використовують різні геномні мішені збудника ТБ, розробляються вже досить давно. Їх перевагою в цілому є висока чутливість та специфічність. Проте не існує єдиної стандартизованої методики. Для діагностичних цілей використовували окремі гени rRNA, хромосомні фрагменти, ген, що кодує 65 kDa білок теплового шоку, ген *dnaJ*, деякі інсерційні послідовності та інші ділянки геному *M.tuberculosis* [2, 3, 4]. Однак використання кожної з цих мішеней має свої переваги й обмеження. Наприклад, ген *mpv40*, який вивчали для встановлення можливості його застосування в генодіагностиці, й певні інерційні елементи присутні не у всіх штаммах *M.tuberculosis* [4]. Ефективні тест-системи на основі ПЛР, з використанням rRNA-гену як ДНК-мішені доступні комерційно (Amplior; Roche Molecular Systems, Branchburg, N.J.; GeneProbe, Inc., San Diego, Calif.) [3], однак включають додаткові етапи діагностики, такі як ДНК-гібридизація. Беручи до уваги погіршення епідеміологічної ситуації захворюваності на туберкульоз, та появу нових небезпечних мікобактеріальних штамів, дослідники продовжують пошук нових методів та стратегій для удосконалення генодіагностики цього захворювання.

#### Література

1. Левицька Н.А., Бажора Ю.І., Николаєвський В.В., Асмолов О.К. Медикаментозна резистентність мікобактерій туберкульозу в Одеській області України та фактори ризику розповсюдження резистентного туберкульозу: дані проспективного дворічного дослідження // Укр. Прульмонологічний журнал. – 2005. – №. 2. – С. 9-15.
2. Фещенко Ю. І., Мірошник В. М., Петренко В. М. та інші. Наукові розробки інституту фтизіатрії й пульмонології ім. Ф.Г. Яновського АМН України за 10 років // Укр. пульмонолог. журн. - 2001. - № 2. - С.5-13.
3. Beavis K.G., Lichty M.B., Jungkind D.L., and Giger O. Evaluation of Amplior PCR for direct detection of Mycobacterium tuberculosis from sputum specimens // J. Clin. Microbiol. - 1995 - V. 33. - P.2582-2586.
4. Dziadek J., Sajduda A., and Borun T.M. Specificity of insertion sequence-based PCR assays for mycobacterium tuberculosis complex // Int J Tuberc Lung Dis - 2001. - V.5. - P.569-574.
5. Enserink M. In Hiv era, an old TB vaccine causes new problems //Science. - 2007. - V.318. - P.1059.
6. Espinal M.A., Laszlo A., Simonsen L., et al. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance // N Engl J Med. 2001 Apr 26;344(17):1294-303.
7. Iñigo J., García de Viedma D., Arce A., et al, Analysis of Changes in Recent Tuberculosis Transmission Patterns after a Sharp Increase in Immigration J. Clin. Microbiol. - 2007 - V.45. - P.63-69.
8. Raviglione M.C and, Smith I.M. XDR tuberculosis - implication for Global Public Health // N. Engl. J. Med. - 2007. - V.365. - P.656-659.
9. World Health Organization. 2003. W.H.O. report 2003 global tuberculosis control. <http://www.who.int/gtb/publications/globrep/index/html>.
10. Yam W.C., Tam C.M., Leung C.C., et al. Direct Detection of Rifampin-Resistant

### **Резюме**

У роботі представлені результати аналізу виявлення збудника ТБ у дітей, хворих ТБОД, у клінічних зразках респіраторного й нереспіраторного походження за допомогою тест-системи «АмплиСенс МТБ». Обговорюється сучасний стан проблеми молекулярної діагностики туберкульозу й вибору ефективних методів генодіагностики.

В работе представлены результаты анализа выявления возбудителя ТБ у детей, больных ТБОД, в клинических образцах респираторного и нереспираторного характера с помощью тест-системы «АмплиСенс<sup>Р</sup> МТБ». Обсуждается современное состояние проблемы молекулярной диагностики туберкулеза и выбора эффективных методов для генодиагностики.

The results of analysis of TB pathogene detection in clinical specimens of respirator and nonrespirator character from children, suffering from lung tuberculosis, by PCR-test-system «АмплиСенс МТБ» are presented. The modern state problems of molecular diagnostics and the choice of effective methods of TB DNA-diagnostics are considered.

**ЧОРНА Л.Б., ТРЕТЯК Б.І., МАРКЕВИЧ Н.В., МАКУХ Г.В., АКОПЯН Г.Р.**

*ДУ "Інститут спадкової патології АМН України",*

*Україна, 79000, м. Львів, вул. М.Лисенка 31а, e-mail: lilyachorna1@rambler.ru*

### **РОЗПОДІЛ АЛЕЛЕЙ ПОЛІМОРФНИХ ЛОКУСІВ ГЕНА ІНТЕРЛЕЙКІНА-10 У ПАЦІЄНТІВ З СИНДРОМОМ НІЙМЕГЕН**

Синдром Ніймеген (Nijmegen breakage syndrome, NBS) - це аутосомно-рецесивне спадкове захворювання з важким перебігом, що належить до групи синдромів хромосомної нестабільності (СХН) і характеризується мікроцефалією, комбінованим Т-і В-клітинним імунodefіцитом, схильністю до онкологічних захворювань та чутливістю до іонізуючої радіації [10]. Причиною виникнення даної патології є мутантні зміни гена NBN, що кодує білок нібрин (p95). Найбільш поширеною мутацією, локалізованою в гені NBN, є мутація 657del5. Частота виникнення синдрому Ніймеген суттєво коливається у різних країнах, від 1:3000000 новонароджених у Німеччині до 1:133000 в Україні [1, 3]. На 2000 рік у 16 країнах світу було описано 130 хворих на NBS. При цьому, близько 95% всіх хворих виявились слов'янського походження [3]. Головною причиною смертності хворих на синдром Ніймеген є розвиток онкологічної патології та хронічні синопульмонарні інфекції. У 60% пацієнтів з синдромами хромосомної нестабільності розвиваються пухлини лімфоретикулярної системи, переважно злоякісні неходжкінські В-клітинні лімфоми з ранньою маніфестацією [4]. Значне поширення онкологічних захворювань у відносно ранньому дорослому віці зареєстровано серед гетерозиготних носіїв мутації 657del5. Тип лімфоретикулярної пухлини, вік в якому починається розвиток захворювання, швидкість прогресування та ефективність лікування відрізняються у різних пацієнтів з синдромом Ніймегена [7, 8].

На сьогоднішній день залишається не з'ясованою роль мутації 657del5 у патогенезі злоякісних неходжкінських лімфом. Імовірно, що клінічний перебіг синдрому Ніймеген можуть обумовлювати додаткові генетичні чинники, зокрема, вплив генів – модифікаторів генної мережі організму, котрі за певних умов визначають схильність організму до розвитку тієї чи іншої патології. Серед них особливої уваги заслуговує ген інтерлейкіну –10 (IL - 10). Інтерлейкін–10 входить до групи цитокінових молекул з імуносупресивною активністю і продукується значним спектром клітин

імунної системи [2]. Критична роль IL - 10 як важливого регулятора імунної системи проявляється в ряді онкологічної патології, зокрема при негоджкінських лімфомах, меланомі та карциномі [5,7]. Промоторна частина гена IL-10 містить ряд крапкових нуклеотидних варіацій (SNP), які відповідають за високу чи низьку експресію IL-10, ці ж SNP-варіації формують алелі схильності до різних захворювань, зокрема таких як аутоімунні та онкологічні. До них належать SNP –1082 A→G, –819 T→C та –592 A→C і власне для них характерним є явище впливу на рівень експресії цитокіну. Алелями “високої” експресії визначені алелі: –1082 G, –819 C та –592 C; алелі “низької” експресії: –1082 A, –819 T та –592 A.

Отже, метою роботи було дослідити частоту та розподіл алелей поліморфних варіантів гена IL-10 (1082 A→G, –819 T→C та –592 A→C) у групі пацієнтів з синдромом Ніймеген для встановлення можливих генетичних передумов клінічного перебігу даної патології.

### **Матеріали і методи**

Матеріалом для дослідження були зразки ДНК пацієнтів з NBS, що проходили молекулярно-генетичне обстеження у Інституті спадкової патології АМН України. Проводили виділення та очистку ДНК із лейкоцитів периферійної крові методом ферментативного розщеплення та подальшої фенольної екстракції або методом висолювання. Молекулярно-генетичний аналіз мутацій проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на приладі “Терцик” (“ДНК-технології”, Росія) з використанням реактивів, олігонуклеотидних послідовностей та ендонуклеази рестрикції (“МБІ Fermentas”). Для подальшого аналізу поліморфного варіанту гена IL-10 1082 A→G, використовували метод ПДРФ. Детекцію крапкових поліморфізмів гена IL - 10 –819 T→C та –592 A→C проводили за допомогою ARMS-ПЛР (Amplification Refractory Mutation System). Фрагменти ДНК розділяли методом електрофорезу у 3% агарозному гелі та візуалізували в УФ-трансліюмінаторі.

### **Результати та обговорення**

Першим етапом роботи було формування груп пацієнтів з підозрою носійства мутації 657del5 гена NBN. Основним діагностичним критерієм слугувала мікроцефалія без зниження інтелекту, або із незначним його зниженням. Створено банк ДНК пацієнтів з підозрою синдрому Ніймеген та членів їх родин (74 пробанди, 122 батьків, 8 сибсів).

Проведено молекулярно - генетичне дослідження мутації 657del5 гена NBN у 204 осіб із різних регіонів України. Молекулярно-генетичний аналіз носійства мутації 657del5 гена NBN в групі пацієнтів з мікроцефалією та підозрою на NBS дозволив виявити випадки гомозиготного носійства мутації 657del5 та верифікувати синдром Ніймеген. У сім'ях пробандів встановлено гетерозиготне носійство даної мутації. Слід відмітити, що загальносвітові дані налічують інформацію про 190 випадків синдрому Ніймеген, а у даній роботі молекулярно-генетично верифіковано 22 випадки даного захворювання. Усі пацієнти були гомозиготами за мутацією 657del5 гена NBN. Підтверджено успадкування даної мутації від батьків пробандів.

Наступним етапом роботи було дослідження крапкових нуклеотидних поліморфізмів (SNP) –1082 G→A, –819 T→C та –592 A→C промоторної ділянки гена IL-10 у пацієнтів із синдромом Ніймеген. Для контролю генотиповано 73 практично здорові людини без обтяженого анамнезу, онкологічної чи аутоімунної патології.

За результатами молекулярно-генетичного аналізу розподілу генотипів поліморфного локусу –1082 G→A гена IL-10, у контрольній групі співвідношення по частоті A – та G –алелів склало 54,8% до 45,2% відповідно, а серед пацієнтів з NBS частота A- алелю – 47,4% та G – 52,6%. У групі пацієнтів із синдромом Ніймеген частота G -алелю переважала її частоту в контрольній групі, проте ця різниця не є статистично вірогідною. Провівши аналіз розподілу генотипів поліморфного локусу – 1082 G→A гена IL-10, ми виявили підвищення частоти GG – генотипу (42,2%) у групі

пацієнтів з NBS у порівнянні з контрольною групою (21%), а також значне зниження частоти GA-генотипу - 21% проти 49% відповідно. Результати молекулярно-генетичного дослідження поліморфних локусів гена IL-10 серед пацієнтів із синдромом Ніймеген та у контрольній групі наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

**Частота генотипів досліджуваних поліморфних локусів гена IL-10**

Генотип	Контрольна група, %	Дослідна група, %	$\chi^2$	P
IL1082AA	30,0	36,8	0,31	p>0,05
IL1082GA	49,0	21,0	4,90	p<0,05
IL1082GG	21,0	42,2	4,10	p<0,05
IL819CC	76,2	52,6	2,43	p>0,05
IL819CT	19,0	31,6	0,83	p>0,05
IL819TT	4,80	15,8	1,35	p>0,05
IL592CC	66,7	52,6	0,82	p>0,05
IL592AC	33,3	47,4	0,82	p>0,05
IL592AA	0	0	-	-

A-алель та AA - генотип SNP –1082 G→A гена IL-10 пов'язані з низьким рівнем продукції інтерлейкіна - 10, а G- алель та GG – генотип відповідає за “високу” експресію цього гена. Дослідження розподілу SNP –1082 G→A IL-10 в групі пацієнтів з NBS показало статистично вірогідне підвищення частоти GG-генотипу, тобто дані результати засвідчили спадково обумовлену схильність пацієнтів з NBS до продукції високих рівнів IL - 10.

Проведено молекулярно-генетичне дослідження розподілу алелів та генотипів SNP –819 T→C та –592 A→C гена інтерлейкіна – 10 методом алель-специфічної ПЛР. У групі пацієнтів з NBS частота A- алелі SNP –592 A→C переважала її частоту в контрольній групі – 23,7% проти 16,7%. У випадку SNP –819 T→C – частота T –алелю була вищою у пацієнтів з NBS – 31,6% проти 14,3 % у контрольній групі. Встановлено вищу частоту генотипів TT та CT у дослідній групі в порівнянні з контрольною: 15,8% до 4,8% та 31,58% до 19% відповідно. Проте, відмінності, щодо розподілу даних алелів у досліджуваних групах, не є статистично вірогідними.

Проаналізувавши поєднання алелів усіх трьох досліджуваних поліморфізмів, встановлено, що серед пацієнтів з NBS переважали наступні генотипи: GCC/GCC – 21,1%; ACC/ACC – 15,8%; ACA/ATC, GTA/GTC, GCA/ATC - по 10,53%. Інші комбінації алелів виявлені у поодиноких випадках. Генотипи SNP –1082, –819, –592 GCC/ACC; GCC/ATA визначені як генотипи “середньої” експресії гена IL - 10. Вважають, що наявність поліморфізму, визначеного як „поліморфізм експресії”, приводить до зміни константи зв'язування транскрипційних факторів, що зумовлює різну експресійну здатність гена [6]. Показано, що гаплотипи „низької” та „середньої” експресії ATA і ACC, що формуються SNP –1082 A→G , –819 T→C та –592 A→C гена IL - 10, можуть підвищувати схильність до розвитку агресивних негоджкінських лімфом та бути одними з генетичних факторів, які впливають на її розвиток.

В зв'язку з тим, що наше дослідження мало деякі обмеження (малий обсяг вибірки, низька частота синдрому Ніймеген) його слід розглядати, як попереднє. Отримані нами данні слід перевірити на більшій вибірці хворих з NBS. Також доцільно визначити реальний рівень продукції інтерлейкіну-10 у хворих на синдром Ніймеген з різними генотипами.

**Висновки**

1. Проведено молекулярно - генетичне дослідження мутації 657del5 гена NBN та верифіковано 22 випадки синдрому Ніймеген.

2. Виявлено статистично вірогідну різницю у розподілі частоти GG- та AG-генотипу SNP -1082 G→A гена IL - 10 в групі пацієнтів з синдромом Ніймеген у порівнянні з контролем.
  3. Відмінності, щодо розподілу алелів та генотипів SNP -819 T→C та -592 A→C гена інтерлейкіна - 10 у групі пацієнтів з синдромом Ніймеген у порівнянні з контролем не є статистично вірогідними.
  4. Щодо поєднання алелів трьох досліджуваних поліморфізмів промоторної ділянки гена IL-10, серед пацієнтів з синдромом Ніймеген переважали наступні генотипи: GCC/GCC – 21,1%; ACC/ACC – 15,8%; ACA/ATC, GTA/GTC, GCA/ATC - по 10,53%.
  5. Показано роль поліморфізмів промоторних ділянок гена IL-10, як можливих імуногенетичних чинників клінічного перебігу синдрому Ніймеген.
- Роботу виконано при фінансовому сприянні Західно-Українського Біо-Медичного Дослідницького Центру підтримки молодих вчених (WUBMRC).

### Література

1. Акоюн Г., Савицький В., Федоришин З., та ін. Селективний скринінг мікроцефалії в популяції Львівської області з метою ранньої діагностики та профілактики онкологічної патології // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. Зб. Наук. праць. Київ-Луганськ-Харків. – 2004. – с.21-26.
2. Akdis C.A., Joss A., Akdis M., Faith A., Blaser K. A molecular basis for T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase binding. // FASEB. J. – 2000. – Vol. 14. – p. 1666–1668.
3. Carlomagno F., Chang-Claude J., Dunning A. M., Ponder B. A. J. Determination of the frequency of the common 675del5 Nijmegen breakage syndrome mutation in the German population: no association with risk of breast cancer // Genes Chromosomes Cancer. – 1999. – Vol. 25. – p. 393-395.
4. Cunningham LM, Chapman C, Dunstan R, Bell MC, Joske DJ // Polymorphisms in the interleukin 10 gene promoter are associated with susceptibility to aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Leuk Lymphoma. – 2003. -N44, – P.251–255.
5. Hirakata A., Inami T., Saito M. et al. Diagnostic value of interleukin-10 and interleukin-6 in the vitreous of intraocular malignant lymphoma patients // Nippon Ganka Gakkai Zasshi. – 2004. – Vol. 108, N6. – p. 359-367.
6. Kube D, Platzner C, von Knethen A, Straub H, Bohlen H, Hafner M, Tesch H. Isolation of the human interleukin-10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines // Cytokine. – 1995, V.7, N1. – p. 360-367.
7. Nemunaitis J., Fong T., Shabe P, Martineau D., Ando D. Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma // Cancer Investig. – 2001. – Vol. 19. – p. 239-247.
8. Nijmegen breakage syndrome. The International Nijmegen Breakage Syndrome // Dis Child. – 2000.- Vol. 82.- p. 400-406.
9. Seemanova E., Passarge E., Beneskova D., Houstek J., Kasal P., Sevcikova M., Familial microcephaly with normal intelligence, immunodeficiency, and risk of lymphoreticular malignancies: a new autosomal recessive disorder // Am. J. Med. Genet. – 1985. - Vol. 20. - p. 639 - 648.
10. Weemaes C. M. R., Hustinx T. W. J., Scheres J. M. J. C. et al. A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome // Acta Paediat. Scand. - 1981. - Vol. 70.- p. 557-564.

## Резюме

Досліджували частоту та розподіл алелів трьох поліморфних варіантів гена IL-10 у групі пацієнтів з синдромом Ніймеген. Виявлено статистично вірогідну різницю у розподілі частоти GG- та GA- генотипу SNP –1082 G→A гена IL - 10 в дослідній групі порівняно із контрольною групою. Показано, що серед пацієнтів з NBS переважали генотипи GCC/GCC – 21,1% та ACC/ACC – 15,8%.

Исследовали частоту и распределение алелей трёх полиморфных вариантов гена IL-10 среди пациентов с синдромом Ниймеген. Установлена статистически достоверная разница в распределении частот GG- и GA- генотипов SNP –1082 G→A гена IL -10 в группе пациентов в сравнении с контрольной. Результаты указывают, что среди пациентов с NBS преобладают генотипы GCC/GCC – 21,1%; ACC/ACC – 15,8%.

The distribution of interleukin-10 gene promoter single nucleotide polymorphism (SNP) among the NBS patients has been studied. The difference of frequency of GG- and GA- SNP –1082 G→A genotypes of IL-10 genes was statistically significant between patients and healthy controls. The GCC/GCC (21, 1%) and ACC/ACC (15, 8%) genotype among the NBS patients was prevalent.

## ШТАНДЕЛЬ С.А.

Государственное учреждение «Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я.Данилевского АМН Украины»,  
Украина, 61002, Харьков, ул. Артема, 10, e-mail: [shtandel@mail.ru](mailto:shtandel@mail.ru)

## ЕСТЕСТВЕННЫЙ ОТБОР РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Естественный отбор – процесс, который, будучи наиболее важным фактором эволюции, способствует повышению приспособленности и предотвращает разрушительные последствия всех остальных процессов. Концепция естественного отбора – противоречивая проблема эволюционной генетики человека. Несмотря на популярность гипотезы «нейтральной эволюции», большинство генетиков считают, что отбор сыграл решающую роль в эволюции видов и сформировал все биологическое разнообразие популяций человека [1]. При рассмотрении больших популяций человека различают следующие типы отбора: 1) внутригрупповой, основанный на межиндивидуальных различиях в приспособленности (дифференциальное размножение генотипов) и 2) межгрупповой, принимающий во внимание различия в средней приспособленности популяций (дифференциальный естественный прирост отдельных групп) [2]. Однако использование применительно к человеку концепции биологической приспособленности, измеряемой числом жизнеспособных потомков, вызывает ряд трудностей, поскольку не учитывает специфики социальной организации человеческого общества. Так, широкое распространение практики планирования семьи и успехи репродуктивной медицины привели к нивелированию межсемейных различий по числу потомков и снижению давления отбора. Важным предсказуемым последствием этого явился рост генетического груза популяции. Технологии современной медицины позволяют «откорректировать» фенотипические проявления ряда наследственно обусловленных заболеваний, создать адаптивную среду для генотипов, которые в более жестких условиях были бы элиминированы отбором, и тем самым повысить их приспособленность. Этот феномен получил название «дисгенный эффект медицины» [3, 4]. Изменение давления внутригруппового отбора (например, путем успешного лечения мультифакториальных болезней) приводит к изменению кривой распределения предрасположенности к данному заболеванию и, следовательно,

к увеличению его распространенности. Однако количественная оценка таких изменений затруднена. С точки зрения популяционной генетики наследственные заболевания делятся на болезни, при которых способность к размножению нарушена и болезни, при которых способность к размножению не нарушена, либо ввиду незначительности дефектов, либо потому, что проявляются они только после завершения репродуктивного периода. Встречаемость и распространение заболеваний первой группы определяются частотой возникновения соответствующих мутаций. Иная ситуация имеет место в случае болезней, не затрагивающих размножение. К этой группе в основном и относятся наиболее распространенные мультифакториальные заболевания, к которым принадлежат как онкопатологии в общем, так и рак щитовидной железы (РЩЖ) в частности [5-7]. РЩЖ – злокачественная опухоль с различными вариантами клинического течения. Ему свойственно определенное разнообразие гистологических вариантов с медленным прогрессированием при высокодифференцированных карциномах и агрессивным течением при анапластической карциноме. Промежуточное место занимает форма с относительно агрессивным клиническим течением фолликулярного РЩЖ [8]. Подъем заболеваемости РЩЖ отмечается с 30 лет, достигая максимальных значений в возрастном периоде от 50 до 60 лет [9]. Учитывая то, что основная заболеваемость РЩЖ происходит в среднем возрасте, логично предположить, что это заболевание может не подпадать под действие отбора.

Целью настоящей работы было изучить особенности отбора РЩЖ в условиях существования «дисгенного эффекта медицины».

#### **Материалы и методы**

Для определения направленности отбора изучен акушерский анамнез женщин в пострепродуктивном периоде (старше 45 лет): 2106 здоровых жительниц Харьковской области и 168 больных РЩЖ. Относительная адаптивность ( $w$ ) и коэффициент отбора ( $s$ ) рассчитывались согласно [10]. При этом  $w$  оценивалась как произведение плодовитости и выживаемости, а  $s = 1-w$ . Составляющая плодовитости определялась путем вычисления среднего числа потомков, приходящихся на одну женщину для больных сахарным диабетом 1 типа и здоровых женщин с последующим делением среднего числа потомков для каждой группы на большее среднее число потомков в сравниваемых группах. Компонента выживаемости определялась вычислением доли потомков, доживших до 25 лет, в сравниваемых группах с последующим делением доли выживших потомков для каждой группы на большую долю выживших потомков в сравниваемых группах. Сведения о динамике распространенности РЩЖ и общей численности населения получены из статистических сборников Института эндокринологии и обмена веществ им. В.П.Комиссаренко АМН Украины за 1989, 2000 – 2004 гг. [11-16].

#### **Результаты и обсуждение**

Данные, акушерского анамнеза, послужившие основой для вычисления показателей адаптивности, приведены в таблице 1.

*Таблица 1*

#### **Значения плодовитости и выживаемости потомков у здоровых женщин и пациенток, больных РЩЖ**

Показатели	Здоровые жительницы г. Харькова	Женщины с РЩЖ
Беременности, количество на женщину	4,06±0,07	4,00±0,30
Роды, количество на женщину	1,41±0,02	1,61±0,07*
Спонтанные аборты, количество на женщину	0,08±0,01	0,10±0,03
Внематочные беременности, количество на женщину	0,03±0,01	0,05±0,02
Женщины, не имеющие детей, (%)	12,35±0,72	7,14±1,99*



Дети, дожившие до 25 лет, (доля)	0,972	0,971
Дети, умершие до 25 лет (доля)	0,028	0,029

Примечание. \* - достоверность различий по сравнению с популяцией ( $p < 0,01$ ).

Сравниваемые группы женщин достоверно отличались по количеству родов и числу женщин, не имеющих детей. Следовательно, больные РЦЖ женщины оставляют больше потомков, чем здоровые женщины. Показатели беременностей, спонтанных аборт и внематочных беременностей у больных РЦЖ и в популяции практически не отличались (таблица 1), что свидетельствует о том, что на стадии эмбриогенеза не отмечено какого-либо давления отбора. Анализ выживаемости потомков здоровых женщин и матерей с РЦЖ не зафиксировал повышенной смертности среди потомков пациенток, имеющих РЦЖ, и был на уровне такового у детей здоровых женщин. Показатели относительной адаптивности и коэффициентов отбора приведены в таблице 2.

Представленные цифры свидетельствуют о более высокой относительной адаптивности в группе больных РЦЖ по сравнению со здоровым фенотипом. Величина коэффициента отбора в группе РЦЖ значительно ниже, чем среди здоровых женщин Харьковской области. Таким образом, проведенное исследование показывает, что больные РЦЖ, оставляют больше потомков, чем здоровые, при их одинаковой выживаемости, что, в свою очередь увеличивает в популяции частоту генов предрасположенности к исследуемому заболеванию.

Таблица 2

**Относительная адаптивность и коэффициенты отбора**

Группа	Относительная адаптивность (w)			Коэффициент отбора (s)
	Компонента плодовитости	Компонента выживаемости	Суммарная приспособленность	
Здоровые женщины	0,876	1	0,876	0,124
Пациентки с РЦЖ	1	0,999	0,999*	0,001*

Примечание. \* - достоверность различий по сравнению с популяцией ( $p < 0,001$ ).

Полученные данные подтверждаются данными об увеличении почти в 2,5 раза распространенности РЦЖ в популяции Харьковской области за пятнадцать лет с 1989-2004 гг. (рис. 1).

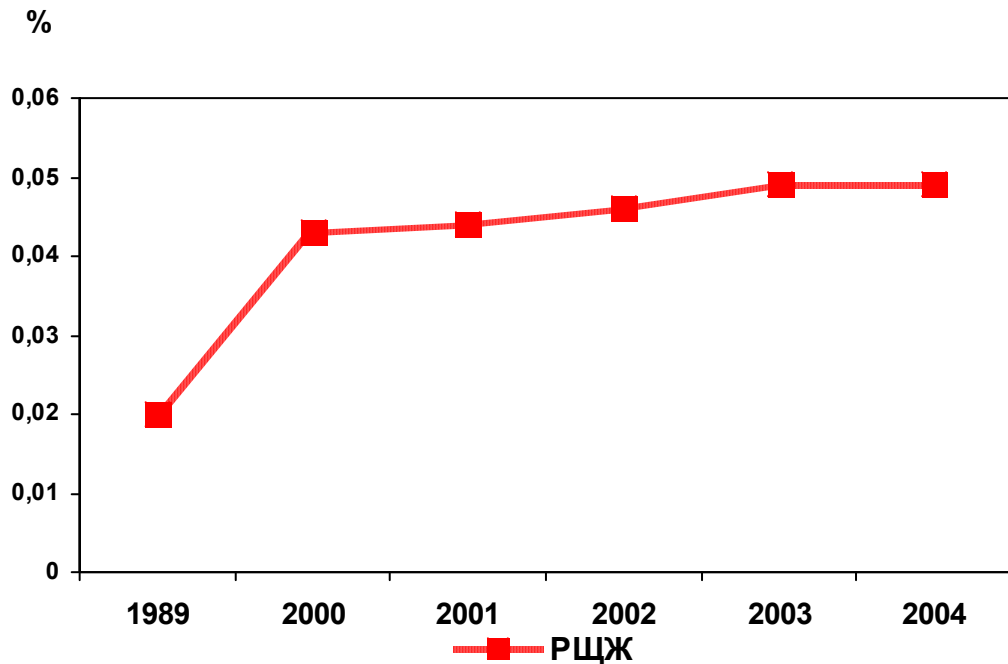


Рис. 1. Распространенность РЦЖ в Харьковской области

#### Выводы

- Установлено, что количество родов на одну женщину при РЦЖ достоверно превышает такое среди здоровых особ ( $p < 0,001$ ) при одинаковой выживаемости потомков. Показатели, характеризующие число беременностей, спонтанных абортов, внематочных беременностей в сравниваемых группах не различались.
- Рассчитано, что суммарная приспособленность у больных РЦЖ составляла 0,999 против 0,876 у здоровых женщин ( $p < 0,001$ ), а коэффициент отбора равнялся 0,001 против 0,124 соответственно ( $p < 0,001$ ).
- Показано, что положительная направленность отбора является одной из причин, определяющей увеличение распространенности РЦЖ в популяции.

#### Литература

1. Алтухов Ю.П. Динамика генофондов при антропогенных воздействиях // Вестник ВОГиС. – 2004. – Т. 8, № 2. – С. 40-59.
2. Курбатова О.Л. Демографическая генетика мегапопуляций: изменчивость параметров отбора // Материалы третьих антропологических чтений к 75-летию со дня рождения академика В.П.Алексеева «Экология и демография человека в прошлом и настоящем». Москва, 15-17 ноября 2004 г. – Москва, 2004. – С.259-262.
3. Bodmer W.F. and Cavalli-Sforza L.L. Genetics, Evolution, and Man. WH Freeman and Company, San Francisco. - 1976. - 965 p.
4. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека. – М.: Мир, 1990. – Т. 2. – 378 с.
5. Donis-Keller H., Dou S., Chi D., et al. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. Hum. Mol. Genet. – 1993. – vol. 2. – P.851-856.
6. Berndt I., Reuter M., Saller B., Frank-Raue K. et al., A new hot spot for mutations in the ret protooncogene causing familial medullary carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2A. J Clin. Endocrinol. Metab. – 1998. – vol. 83. – P.770-774.
7. Goldgar DE., Easton DF., Cannon-Albright LA., Skolnick MH. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. J Natl. Cancer. inst. - 1994, vol. – 86. – P.1600-1608.
8. Дж.П.Шах. Органозберігаючий хірургічний підхід до лікування раку щитоподібної залози // Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія.– 2003. -

№ 3(4). – С.81-82.

9. С.О. Подвязников. Рак щитовидной железы // Русский медицинский журнал. – 1998. – Т. 6. - № 10. – <http://www.rmj.ru/main.htm/rmj/t6/n10/8.ht>.
10. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. – М.: Мир, 1988. – Т. 3. – 335 с.
11. Основные показатели специализированной эндокринологической помощи населению Украинской ССР в 1989 – 1990 гг. Киевский Научно-исследовательский институт эндокринологии и обмена веществ. – Киев, 1991 – Табл. 2, 24.
12. М.Д.Тронько, А.Д.Чернобровий. Основні показники діяльності ендокринологічної служби України за 2000 рік. – Київ, 2000. –Табл. 2, 30.
13. М.Д.Тронько, А.Д.Чернобровий. Основні показники діяльності ендокринологічної служби України за 2001 рік. – Київ, 2002. –Табл. 2, 30.
14. М.Д.Тронько, А.Д.Чернобровий. Основні показники діяльності ендокринологічної служби України за 2002 рік. - Київ, 2003. – Табл. 2, 30.
15. М.Д.Тронько, А.Д.Чернобровий. Основні показники діяльності ендокринологічної служби України за 2003 рік. - Київ, 2004. – Табл. 2, 30.
16. М.Д.Тронько, А.Д.Чернобровий. Основні показники діяльності ендокринологічної служби України за 2004 рік. - Київ, 2005. – Табл. 2, 30.

### Резюме

Анализ данных дифференциальной плодовитости 168 женщин, больных раком щитовидной железы и 2106 здоровых жительниц Харьковской области показал, что больные раком щитовидной железы оставляют больше потомков, при одинаковой их выживаемости, чем здоровые женщины. Положительная направленность отбора является одной из причин, определяющей увеличение распространенности заболевания в популяции.

Аналіз даних диференційної плодючості 168 жінок, хворих на рак щитоподібної залози та 2106 здорових мешканок Харківської області показав, що хворі на рак щитоподібної залози залишають більше нащадків при однаковій їх виживаності, ніж здорові жінки. Позитивна спрямованість добору є однією з причин, що визначає зростання розповсюдженості захворювання у популяції.

Differential fertility indexes of 2049 able-bodied women and 168 patients with thyroid cancer were investigated. It has been shown, that thyroid cancer women leave more offspring with equal survival rate, than health ones. Natural selection positive direction is one of the causes, which define the growth of thyroid cancer prevalence in population.

## ПИТАННЯ ВИКЛАДАННЯ ГЕНЕТИКИ, ЕВОЛЮЦІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

**ЗАДЕРЕЙ Н.С.**

*Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,  
Україна, 65026, Одеса, вул. Дворянська, 2,  
e-mail:putilin@breezein.net; e-mail:putilin@normaplus.com*

### СПОСОБИ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ УЧБОВОГО ПРОЦЕСУ

Неможливо уявити собі подальший розвиток суспільства без розвитку біотехнології. Мікроклональне розмноження рослин, отримання цінних метаболітів рослинного походження, біосинтез інсуліну, соматотропіну, інтерферону та інших речовин за допомогою трансформованих мікроорганізмів – стало невід'ємною складовою сьогодення. Ці технології давно є буденними, їх використання у подальшому буде тільки розширюватись за рахунок залучення все більшої кількості різних видів організмів, здатних забезпечити ефективність виробництва у промислових масштабах.

Більш новітні технології, такі як генотерапія, клонування тварин, вирощування тканин та органів тварин тільки набувають своєї сили, існують на рівні лабораторних досліджень і напевно не в найближчий час зможуть бути широко використані. Але перспективність цих напрямків досліджень не викликає сумнівів навіть за наявності певних етичних питань, що виникають у суспільстві.

У зв'язку з цим на ринку праці виникає постійний попит на висококваліфікованих спеціалістів – біотехнологів. Це в свою чергу обумовлює впровадження такого предмету як „Біотехнологія” в навчальні плани практично всіх вузів біологічного напрямку.

В Одеському національному університеті курс „Біотехнологія” читається вже протягом багатьох років і включає 24 години лекцій і 10 годин лабораторних занять. Зважаючи на те, що університет випускає „інженерів – лаборантів” особлива увага приділяється практичній складовій курсу. Лабораторні заняття проводяться на базі відділу біотехнології Південного біотехнологічного центру у рослинництві УААН який являється філіалом університету і надає студентам можливість отримати практичні навички, що до роботи з культурами тканин і клітин *in vitro*, ознайомитися з роботою ламінар-боксів, набути необхідних знань правильної постановки експерименту з метою отримання необхідних результатів.

Практичний курс включає в себе слідує теми:

1. Принципи та методи вирощування ізолюваних клітин і тканин рослин.
2. Умови отримання калюсних та суспензійних культур.
3. Мікроклональне розмноження рослин.
4. Методи цитологічного аналізу рослинного матеріалу.
5. ПЛР-аналіз ДНК.

Не зважаючи на значну обмеженість у часі ( всього 10 годин ) теми практичних занять підібрані так, щоб забезпечити студентам можливість опанувати основні методи роботи в біотехнологічній лабораторії, такі як приготування поживних середовищ, стерилізація посуду та рослинного матеріалу, висаджування експлантів в стерильних умовах ламінар-баксу, підбір умов культивування експлантів, калюсних культур та рослин – регенерантів. Особливістю даних занять є те, що студенти опановують не тільки методи культури тканин і клітин, а і методи аналізу результатів, наприклад цитологічний, який надає можливості з'ясувати ефективність морфогенезу у запропонованих умовах культивування тканин або визначити соматоклональні варіанти в популяціях калюсних клітин. Під час роботи з мікроскопом студенти знайомляться з технікою мікрофотографування, яка може бути використана ними при виконанні кваліфікаційних і магістерських робіт. Знайомство з ПЛР-аналізом поглиблює знання студентів у галузі генетики, молекулярної біології, еволюції живих організмів. Цей

метод аналізу ДНК має широкий спектр застосування, як у фундаментальних дослідженнях так і в медичній практиці у зв'язку з чим опанування цього метода студентами підвищує їх кваліфікаційний рівень, забезпечує можливість в подальшому влаштуватись на роботу в лабораторії з різними напрямками діяльності. Таким чином, ознайомлення студентів з теоретичними аспектами біотехнології під час лекцій з послідуочим закріпленням цих знань під час практичних занять має забезпечити необхідний рівень підготовки спеціалістів.

Особлива увага, при вивченні курсу, приділяється контролю засвоєння знань студентами. За програмою, по завершенню курсу, передбачено проведення диф. заліку, в результаті якого оцінювання знань студента здійснюється по вибірковим темам курсу і не відображає в повній мірі якість цих знань. З метою підвищення кваліфікаційного рівня майбутніх спеціалістів ми вважаємо за необхідне здійснювати декілька зрізів знань студентів під час вивчення курсу, що забезпечить кращу підготовку студентів і надасть можливість викладачу звернути увагу кожного студента на недоліки в їх підготовці. У зв'язку з цим загальний курс розбито на три змістовні модулі: „Біотехнологія мікроорганізмів”, „Біотехнологія рослин” та „Біотехнологія тварин”. Після кожного з цих змістовних модулів проводиться залікова контрольна робота. Обмеженість у часі штовхає викладача до вибору такої форми контролю знань, яка дозволила б за короткий час досягнути необхідного результату. Одною з таких форм є тестування, яке забезпечує можливість швидкого опитування великої кількості студентів. Але тестування має свої недоліки, пов'язані, в першу чергу, з тим, що тести запропонують студенту певну кількість відповідей і студент має зіграти в лотарею „вгадав – не вгадав”, що не відображає, в повній мірі, рівень знань студента.

На протязі декількох років нами використовується такий спосіб контролю знань студента, як бліц-опитування. Таке опитування представляє собою письмову контрольну роботу під час якої викладач запропоновує студентам запитання, які передбачають дуже коротку відповідь на них, наприклад, охарактеризувати певні терміни, з якими знайомились під час вивчення даного змістовного модуля. Така форма аналізу знань студента дозволяє оцінити рівень самостійної роботи студента за межами аудиторії, визначити здатність студента осмислювати отримані на лекціях та практичних заняттях знання і таким чином підвищити якість учбового процесу.

Нами був проведений порівняльний аналіз рівня знань студентів які не мали такого поетапного контролю їх знань ( I група ) і тих студентів, які зазнали такого контролю

( II група ). Результати цього аналізу показали, що середній бал за диф. залік в кінці курсу у першої групи складає 74,3 бали, у той час, як у другої групи він складає в середньому 86,5 бали. Отримані результати безперечно підтверджують ефективність такого типу контролю знань в процесі викладання курсу.

Приклад переліку запитань до змістовного модуля „Біотехнологія рослин” наводиться нижче.

1. Дайте визначення терміну морфогенез.
2. Дайте визначення терміну регенерація.
3. Дайте визначення термінам диференціація та дедиференціація.
4. Що таке калюс?
5. Охарактеризуйте особливості органогенезу та соматичного ембріогенезу.
6. Що таке експлант?
7. Назвіть фізіологічно-активні речовини, що використовуються при культивуванні тканин *in vitro*.
8. Що таке андрогенез та гіногенез?
9. Поясніть різницю між диплоїдами, гаплоїдами та дигаплоїдами.
10. Значення дигаплоїдів в селекції рослин.

11. Опишіть особливості розвитку мікроспори в культурі *in vitro* та способи стимуляції аномального розвитку.
12. Перерахуйте фактори які впливають на процес андрогенезу.
13. Що таке гаплопродюсери?
14. Обґрунтуйте необхідність використання ембріокультури для отримання віддалених гібридів.
15. Перерахуйте переваги мікроклонального розмноження рослин.
16. Дайте визначення терміну клітинна інженерія.
17. Перерахуйте ферменти, які використовують для отримання протопластів.
18. Що таке соматична гібридизація?
19. Способи отримання соматичних гібридів?
20. Що таке асиметричний гібрид?

Кожне послідує запитання зі списку пропонується студентам після того як більшість з них відповіло на попереднє запитання. На протязі одного опитування студентам можна запропонувати для відповіді 10 або 20 запитань, в залежності від рівня їх складності. Оцінювання відповідей відбувається по 100 бальній системі, причому кожне запитання має свою цінність і загальна оцінка виставляється за сумою набраних правильних відповідей.

Підсумовуючи все вищевказане приходимо до висновку, що для якісного викладання курсу необхідно звертати увагу не тільки на високий рівень лекцій, але і на розширення знань студентів у галузі практичного застосування теоретичних знань, для чого тематика лабораторних робіт має бути дбайливо підібрана і включати всі найпоширеніші методи досліджень та аналізу результатів. Багатоступеневий контроль знань студентів є найважливішим фактором в процесі навчання так як стимулює їх до постійної роботи. Такий комплексний підхід до навчання безперечно забезпечить високу якість знань студентів.

#### **Резюме**

В статті приводиться новий спосіб быстрого и качественного анализа знаний студентов. Письменная контрольная работа включает серию вопросов, предполагающих короткие ответы, которые зачитываются студентам с интервалом в несколько минут. Использование этого метода позволяет повысить эффективность учебного процесса.

В статті наводиться новий спосіб швидкого та якісного аналізу знань студентів. Письмова контрольна робота включає запитання, які передбачають короткі відповіді. Кожне послідує запитання зі списку пропонується студентам після того як більшість з них відповіло на попереднє запитання. Використання цього прийому дозволяє підвищити ефективність учбового процесу.

The new method of rapid and high-quality analysis of knowledges of students is presented in the article. Writing control work includes the series of questions, supposing short answers which are read out students with an interval in a few minutes. The use of this method allows to promote efficiency of educational process.

**МАМАЛИГА В.С., МАЗУР В.А., ПОЛЩУК І.С.**

*Вінницький державний аграрний університет,*

*Україна, 21008, Вінниця – 8, вул. Сонячна, 3, e-mail: stepanovich1@yandex..ru*

**ПОТОЧНИЙ КОНТРОЛЬ ЗАСВОЄННЯ НАВЧАЛЬНОГО МАТЕРІАЛУ З  
ГЕНЕТИКИ СТУДЕНТАМИ ВИЩОГО АГРАРНОГО НАВЧАЛЬНОГО**

## ЗАКЛАДУ ПРИ КРЕДИТНО-МОДУЛЬНІЙ СИСТЕМІ ОРГАНІЗАЦІЇ НАВЧАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ

Подальші соціально-економічні й політичні зміни в суспільстві, зміцнення державності України, входження її в цивілізоване світове співтовариство неможливі без структурної реформи національної системи вищої освіти, спрямованої на забезпечення мобільності, працевлаштування та конкурентоспроможності фахівців з вищої освіти. Однією із передумов входження України до єдиної Європейської зони вищої освіти (ECTS) є реалізація системою вищої освіти України ідей Болонського процесу. Кредитно-модульна система організації навчального процесу (КМСОНП) – це модель організації навчального процесу, яка ґрунтується на поєднанні модульних технологій навчання та залікових освітніх одиниць (залікових кредитів). Метою впровадження КМСОНП є підвищення якості вищої освіти фахівців і забезпечення на цій основі конкурентоспроможності випускників та престижу української вищої освіти у світовому освітньому просторі.

Основними завданнями КМСОНП є:

- адаптація ідей ECTS до системи вищої освіти України для забезпечення мобільності студентів у процесі навчання та гнучкості підготовки фахівців, враховуючи швидкозмінні вимоги національного та міжнародного ринків праці;
- забезпечення можливості навчання студентів за індивідуальною варіативною частиною освітньо-професійної програми, що сформована за вимогами замовників та побажаннями студента і сприяє його саморозвитку і відповідно підготовці до життя у вільному демократичному суспільстві;
- стимулювання учасників навчального процесу з метою досягнення високої якості вищої освіти;
- унормування порядку надання можливості студенту отримання професійних кваліфікацій відповідно до ринку праці.

Генетика на агрономічному факультеті університету вивчається в IV семестрі. На її вивчення відводиться 30 годин лекційних занять, 40 – лабораторних та 38 – самостійної роботи студента ( 2 академічних кредити за національною шкалою чи 3 кредити відповідають до системи ECTS). Дисципліна розподілена на 2 модулі – самостійні структурні логічні частини теоретичного і практичного матеріалу (табл. 1), кожен з яких завершується заліковим кредитом.

Таблиця 1

**Розподіл балів за видами занять при вивченні генетики за КМСОНП**

Вид занять	ГОДИНИ			Кількість балів
	Всього	в тому числі		
		I модуль	II модуль	
Лекції	30	14	16	15
Лабораторні заняття	40	20	20	70
Самостійна робота студентів (СРС)	38	19	19	15

Теми для опрацювання студентами самостійно (СРС) визначені у методичних вказівках.

Навчальний процес в умовах КМСОНП здійснюється за індивідуальними навчальними планами студента (ІНПС). Це робочий документ, який складається студентом разом із куратором кафедри до початку кожного навчального року згідно з робочим навчальним планом. Перед складанням ІНПС куратор знайомить студента з галузевими стандартами підготовки бакалавра та основними положеннями КМСОНП, надає рекомендації студенту щодо формування ІНПС та контролює його реалізацію на підставі відомостей про зараховані студенту залікові кредити з подальшим поданням пропозицій щодо продовження навчання студента чи його відрахування.

Поточний контроль засвоєння студентами навчального матеріалу здійснюється під час лабораторних і самостійних занять і має на меті перевірку рівня оволодіння студентом певної теми чи розділу навчальної програми.

Кожне лабораторне заняття розпочинається з тестової контрольної роботи з попереднього заняття, на яку відводиться, в залежності від складності завдання, від 4 до 18 хв. Потім проводиться усна перевірка готовності студентів до виконання поточної лабораторної роботи шляхом постановки кожному студенту 3-5 коротких запитань. Якість засвоєння матеріалу за підсумками контрольної роботи і за результатами усного опитування оцінюється певною кількістю балів (табл. 2).

Таблиця 2

**Розподіл балів за категоріями діяльності студента під час лабораторних занять**

Оцінка	Балів		
	всього	в тому числі	
		виконання тестових завдань	усно
“відмінно”	3,5	2,5	1,0
“добре”	2,8	2,0	0,8
“задовільно”	2,1	1,6	0,5
“незадовільно”*			
(2 пит)	1,4	1,2	0,2
(1 пит)	0,9	0,7	-
присутність на занятті	0,7	0,5	0,2

- Кожне тестове завдання складається з 5 питань. Правильні відповіді на всі 5 питань забезпечує оцінку “відмінно” і бал 2,5, на 4 – “добре” і бал 2,0 і т.д.

Якість опрацювання матеріалу, виділеного для самостійної роботи, визначається колоквіумами (по 2 в кожному модулі). Кожен колоквіум включає 20-25 тестових завдань. Виконання завдання під час колоквіуму на «відмінно» оцінюється в 3,75 бала, «добре» - 3,0 бала, «задовільно» - 2 бали, «незадовільно» і присутність на колоквіумі – 1 бал.

В цілому за 2 модулі студент може набрати 100 балів (табл. 3).

Таблиця 3

**Структурно-модульна схема дисципліни «Генетика»**

Мо- дуль	Кількість годин			Форма контролю	К-сть заході в	Оцінка за захід, балів		Сума балів	
	ЛЗ*	ЛПЗ*	СРС			max	min	max	min
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	14	20	19	Присутність на лекції	7	1	0	7	0
				Контрольні тестові завдання	10	3,5	0,7	35	7
				Колоквіум	2	3,75	1	7,5	2
Всього								49,5	9
2	16	20	19	Присутність на лекції	8	1	0	8	0
				Контрольні тестові завдання	10	3,5	0,7	35	7
				Колоквіум	2	3,75	1	7,5	2
Всього								50,5	9
2	30	40	38	Разом				100	18

Крім того, участь студента в науково-дослідній роботі та висвітлення результатів цієї роботи під час виступу на студентській науковій конференції оцінюється в 7 додаткових балів, а за зайняте призове місце – 10.

В залежності від того, яку суму балів набере студент за 2 модулі, він одержує відповідну оцінку (табл.4).



## Шкала оцінки знань студента

За шкалою ECTS	За національною шкалою	Рейтингова оцінка за шкалою навчального закладу (абсолютна к-сть балів за дисципліну)
A	5 - відмінно	90...100
BC	4 - добре	75...89
DE	3 - задовільно	60...74
FX*	2 - незадовільно (з можливістю повторного складання)	35...59
X*	2 - незадовільно (з обов'язковим повторним курсом навчання)	1...34

*Примітки:* FX означає «незадовільно» – необхідно виконати певну додаткову роботу для успішного складання; F означає «незадовільно» - з обов'язковим повторним курсом навчання.

З метою підвищення рівня підготовки окремих студентів чи розкриття їх індивідуальних творчих здібностей за окремим графіком організуються індивідуальні навчальні заняття під керівництвом викладача. Під час цих занять студенти отримують консультації з окремих незрозумілих питань, відпрацьовують пропущені лекційні заняття (шляхом захисту реферату об'ємом 8-10 стор. за темою пропущеної лекції) чи лабораторної роботи (виконуючи тестові контрольні роботи).

Комплексний поточний контроль навчальної діяльності сприяє своєчасному і якісному виконанню ІНПС, розвиває вміння і навички самостійної роботи, заохочує до участі в результативній творчій праці, забезпечує індивідуалізацію навчання й підвищення зацікавленості студента в процесі набуття знань.

### Література

1. *Кравченко С.М., Іщенко Т.Д. та ін.* Методичні рекомендації щодо впровадження в аграрних ВНЗ України III – IV рівнів акредитації окремих нормативних і навчально-методичних матеріалів з КМСОНП. – К.: «Аграрна освіта», 2005. – 56с.
2. *Мамалига В.С.* Особливості викладання генетики у ВНЗ за модульно-рейтинговою системою / Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова, т. 3;/ За ред. М.В. Роїка. – К.: Логос, 2006. – С. 672-675.
3. *Пльонсак В.А., Гунько І.В., Журенко В.К., Казьмірук Л.В.* Науково-методичне забезпечення навчального процесу за КМСОНП у Вінницькому державному аграрному університеті (методичні рекомендації). – Вінниця; РВВ ВДАУ, 2007. – 29 с.

### Резюме

Узагальнено досвід поточного контролю якості засвоєння студентами навчального матеріалу з генетики на агрономічному факультеті Вінницького державного аграрного університету.

Обобщен опыт систематического контроля качества усвоения студентами учебного материала по генетике на агрономическом факультете Винницкого государственного аграрного университета.

The experience of systematic control of the students learning of such subject as genetics at the Agronomy department of Vinnytsia State Agrarian University is generalized the article.

## ЗМІСТ

### ЗАГАЛЬНІ ПИТАННЯ ЕВОЛЮЦІЇ

<b>БУРКАТ В.П., ПОДОБА Б.Є., ГУЗЄВ І.В., БОДРЯШОВА К.В.</b> МІКРОЕВОЛЮЦІЙНІ ПРОЦЕСИ В ПОПУЛЯЦІЯХ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН.....	3
<b>ГОРДЕЕВА Н.В., АЛЕКСЕЕВ С.С., САМУСЕНКО В.П., МАТВЕЕВ А.Н.</b> МЕХАНИЗМИ СИМПАТРИЧЕСКОГО ВИДООБРАЗОВАНИЯ: ПРИМЕР ФОРМООБРАЗОВАНИЯ У АРКТИЧЕСКИХ ГОЛЬЦОВ <i>SALVELINUS ALPINUS</i> ЗАБАЙКАЛЬЯ.....	7
<b>КАШИН А.С., ЦВЕТОВА М.И., ДЕМОЧКО Ю.А.</b> ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОК ЗАРОДЫШЕВОГО ПУТИ И ПРОБЛЕМА ДЕТЕРМИНАЦИИ ГАМЕТОФИТНОГО АПОМИКСИСА .....	11
<b>МАЛЕЦКИЙ С.И.</b> ПОЛИПЛОИДИЯ И АНАЛОГОВАЯ ФОРМА НАСЛЕДСТВЕННОСТИ У РАСТЕНИЙ .....	15
<b>МИХЕЕВ А.Н.</b> О СООТНОШЕНИИ СЕЛЕКТОГЕНЕТИЧЕСКИХ И НОМОГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ФИЛОГЕНЕЗА .....	19
<b>СИВОЛАПОВ А.И.</b> РОЛЬ ИНТРОГРЕССИВНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ И ПОЛИПЛОИДИИ В ЭВОЛЮЦИИ РОДА <i>POPULUS</i> .....	23
<b>СУХАРЛЕВ В.А.</b> ДИВЕРГЕНЦИЯ – ВАЖНЫЙ ФАКТОР ЭВОЛЮЦИИ ОВЕЦ И ПОРОДООБРАЗОВАНИЯ В ОВЦЕВОДСТВЕ .....	27
<b>ТРУТ Л.Н.</b> ДОМСТИЦИРУЕМЫЕ ЛИСИЦЫ КАК ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭВОЛЮЦИОННАЯ МОДЕЛЬ .....	31
<b>ХОХЛОВ А.М., БАРАНОВСКИЙ Д.И.</b> ОНТОГЕНЕЗ И МИКРОЭВОЛЮЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ У СВИНЕЙ .....	32
<b>ЧАДОВ Б.Ф.</b> КВАЗИЦИКЛ «ГЕН – ПРОГЕН» - ИММАНЕНТНОЕ СВОЙСТВО ЖИВОЙ СИСТЕМЫ .....	36
<b>ЮДАКОВА О.И.</b> АДАПТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПОЛИВАРИАНТНОСТИ ЭМБРИОЛОГИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ У ФАКУЛЬТАТИВНО АПОМИКТИЧНЫХ ЗЛАКОВ .....	39

### ЕВОЛЮЦІЯ ГЕНОМІВ В ПРИРОДІ І ЕКСПЕРИМЕНТІ

<b>БАТУРИН С.О.</b> НЕРЕДУКЦІЯ ГАМЕТ У <i>FRAGARIA VESCA</i> L. В ПРИРОДІ І ОПИТЕ .....	44
<b>ВЕРГОЛЯС М. Р., ГОНЧАРУК В. В.</b> ВИКОРИСТАННЯ ЦИТОЛОГІЧНИХ БІОМАРКЕРІВ НА РИБАХ ДЛІ ОЦІНКИ АНТРОПОГЕННОГО ЗАБРУДНЕННЯ МОРСЬКИХ І ПРІСНИХ ВОД.....	48
<b>ВОЛЫНКИН В.А., ПОЛУЛЯХ А.А.</b> РЕЛИКТОВЫЕ ЭНДЕМИЧНЫЕ ФОРМЫ ВИНОГРАДА КРЫМА ОТБРАЖАЮЩИЕ ЭВОЛЮЦИОННУЮ ИЗМЕНЧИВОСТЬ КУЛЬТУРЫ .....	50
<b>ГОРДЕЙ И. А., БЕЛЬКО Н. Б., ЛЮСИКОВ О. М.</b> ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ФОРМИРОВАНИЯ ГЕНОМА СЕКАЛОТРИТИКУМ .....	55
<b>ДЕНИСЮК П.В.</b> ОСЦИЛЛЯТОРНАЯ ГИПОТЕЗА ГЕТЕРОЗИСА .....	59

<b>ДУБОВЕЦ Н.И., СЫЧЕВА Е.А., СОЛОВЕЙ Л.А., ШТЫК Т.И., БОНДАРЕВИЧ Е.Б.</b> КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ГЕНОМА ТЕТРАПЛОИДНЫХ ТРИТИКАЛЕ .....	63
<b>КИРПИЧЁВА И.В.</b> ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ <i>angustifolia (an3-1)</i> НА СТРОЕНИЕ ЛИСТЬЕВ У <i>ARABIDOPSIS</i> <i>THALIANA</i> (L.) НЕУНН .....	67
<b>КОЗАЧЕНКО М.Р.</b> ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВДОСКОНАЛЕННЯ ФОРМ ЯРОГО ЯЧМЕНЮ З НОВИМИ ТА РІДКІСНИМИ ОЗНАКАМИ .....	71
<b>КОНДРАТЕНКО С.І.</b> РОЗРОБКА ЕЛЕМЕНТІВ МЕТОДИКИ ІНДУКЦІЇ НЕРЕГУЛЯРНОГО АПОМІКСИСУ У КАПУСТИ ГОЛОВЧАСТОЇ .....	75
<b>КОНОВАЛОВ В.С., КОПЫЛОВА Е.В., КОВАЛЕНКО Г.С., БИРЮКОВА. О.Д., СТАРОДУБ Л.Ф., ШЕЛЕВ А.В.</b> ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ СКРЫТОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ МЕТОДАМИ ЦИТО-ФЕНО-ДНК- МАРКЕРНОГО МОНИТОРИНГА .....	78
<b>КОРШИКОВ И.И.</b> ПОДДЕРЖАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ВИДОВ СЕМЕЙСТВА <i>PINACEAE</i> LINDL. В ЗАРОДЫШАХ ИХ СЕМЯН .....	81
<b>КРАВЕЦ Е.А.</b> КЛЕТОЧНАЯ КОНКУРЕНЦИЯ В ВЕГЕТАТИВНЫХ И ГЕНЕРАТИВНЫХ МЕРИСТЕМАХ И ЕЕ РОЛЬ В МЕХАНИЗМАХ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПРИ ДЕЙСТВИИ ОБЛУЧЕНИЯ .....	86
<b>ЛЮСИКОВ О. М., ГОРДЕЙ И. А.</b> ХРОМОСОМНАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ ГЕНОМА РЖАНО-ПШЕНИЧНЫХ АМФИДИПЛОИДОВ СЕКАЛОТРИТИКУМ ( $\times$ SECALOTRITICUM) .....	90
<b>РУБАН Ю.Д.</b> ЭВОЛЮЦИЯ ПОРОД ЖИВОТНЫХ В СИСТЕМЕ ПЛЕМЕННОЙ РАБОТЫ .....	94
<b>САМАТАДЗЕ Т.Е., ЗЕЛЕНИН А.В., МУРАВЕНКО О.В.</b> СРАВНИТЕЛЬНОЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНОМОВ СОРТОВ И ЛИНИЙ ГОРОХА ПОСЕВНОГО ( <i>PISUM SATIVUM</i> L.). .....	96
<b>СОКОЛОВ И.Д., МЕДВЕДЬ О.М., СИГИДИНЕНКО Л.И., СОКОЛОВА Е.И.</b> ГЕННЫЕ МУТАЦИИ И РЕКОМБИНАЦИИ КАК ФАКТОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ: ПОЛУЧЕНИЕ МУЛЬТИМУТАНТНЫХ ЛИНИЙ АРАБИДОПСИСА С ПРИЗНАКАМИ, ВЫХОДЯЩИМИ ЗА РАМКИ СЕМЕЙСТВЕННОСПЕЦИФИЧЕСКИХ .....	99
<b>ЦВЕТОВА М.И., ЭЛЬКОНИН Л.А., ИШИН А.С.</b> ГЕНОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ АУТОТЕТРАПЛОИДОВ СОРГО, ИНДУЦИРОВАННЫХ КОЛХИЦИНОМ .....	103

#### **МОЛЕКУЛЯРНА СТРУКТУРА ТА ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНОМІВ**

<b>БЕЛАЯ Е. В., МИХАЙЛОВА М.Е., ВОЛЧОК Н.М., КАМЫШ Н.А.</b> ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА ГОРМОНА РОСТА, АССОЦИИРОВАННОГО С МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ И ДНК- ДИАГНОСТИКА МУТАЦИИ <i>VLAD</i> В БЕЛОРУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ КРС .....	107
<b>ЖАРИКОВА Н.В., КОРОБОВ В.В., АНИСИМОВА Л.Г., ЯСАКОВ Т.Р., ЖУРЕНКО Е.Ю., МАРКУШЕВА Т.В.</b> МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ НОВОЙ ПЛАЗМИДЫ ДЕГРАДАЦИИ ХЛОРФЕНОКСИУКСУСНЫХ КИСЛОТ .....	111
<b>ЗЛАЦЬКА А.В., КОРОЛЬ Л.В., ШИТКОВА Ю.В., ШЕРЕПИТКО Д.В.</b>	

ПЕРЕВІРКА ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ ISSR-МАРКЕРІВ У ВИВЧЕННІ ГЕНОМУ БУРЯКА ЦУКРОВОГО .....	114
<b>ИВАНОВА Э.А., ВАФИНА Г.Х., ТРОПЫНИНА Т.С., ИВАНОВ Р.С.</b> ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ <i>ARG-X</i> ПРОТЕОЛИЗА В ПРОТЕОМЕ ГЕНОМА ПРО- И ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК .....	118
<b>КАМЫШ Н.А., МИХАЙЛОВА М.Е., ВОЛЧОК Н.М., БЕЛАЯ Е.В.</b> ДНК-ТИПИРОВАНИЕ БЕЛОРУССКИХ ПОПУЛЯЦИЙ СВИНЕЙ ПО ГЕНУ <i>H-FABP</i> , ДЕТЕРМИНИРУЮЩЕМУ СОДЕРЖАНИЕ ВНУТРИМЫШЕЧНОГО ЖИРА .....	122
<b>КАРПОВ П.А., ЕМЕЦ А.И., БЛЮМ Я.Б.</b> АНАЛИЗ КИНОМА <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> НА ОСНОВАНИИ ГОМОЛОГИИ КАТАЛИТИЧЕСКОМУ ДОМЕНУ ТИРОЗИНКИНАЗЫ <i>ZAR70 MUS MUSCULUS</i> .....	126
<b>КОЗУБ Н.А., СОЗИНОВ И.А., СОЗИНОВ А.А.</b> ОСОБЕННОСТИ ПЕРЕДАЧИ РЖАНЫХ ТРАНСЛОКАЦИЙ 1AL/1RS И 1BL/1RS ЧЕРЕЗ ГАМЕТЫ У ГИБРИДОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ .....	130
<b>ЛЕВИТЕС Е.В.</b> К ВОПРОСУ О МНОГОМЕРНОСТИ КОДИРОВАНИЯ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИНФОРМАЦИИ У РАСТЕНИЙ .....	134
<b>ЛУЦИК А.П., КОЖУХОВА Н.Е., СИВОЛАП Ю.М.</b> ГЕНИ, ЩО КОДУЮТЬ БІЛКИ ТЕПЛОВОГО ШОКУ КУКУРУДЗИ: СТРУКТУРА ТА ПОЛІМОРФІЗМ .....	138
<b>МЕЛЬНИКОВА М.Н., ПАВЛОВ С.Д., АНТИПОВА Н.В.</b> ПОЛИМОРФНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ В ПОПУЛЯЦИЯХ КАМЧАТСКОЙ МИКИЖИ ( <i>PARASALMO (O.) MYKISS</i> ) .....	141
<b>МУРАВЕНКО О.В.</b> СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОМОВ У ВИДОВ ПЯТИ СЕКЦИЙ РОДА <i>LINUM L.</i> С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХРОМОСОМНЫХ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ .....	146
<b>НОВОХАЦЬКА О.В., ЦИБА Л.О., СКРИПКІНА І.Я., НІКОЛАЄНКО О.В., ДЕРГАЙ О.В., РИНДИЧ А.В.</b> ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ АДАПТОРНОГО БІЛКА ІНТЕРСЕКТИНУ 2 З БІЛКАМИ- ПАРТНЕРАМИ .....	149
<b>ОЖЕРЕДОВА И.П., КОЗЕРЕЦКАЯ И.А.</b> ПРЕДСКАЗАНИЕ ФУНКЦИИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ <i>DESCHAMPSIA</i> <i>ANTARCTICA</i> НА ОСНОВАНИИ ГОМОЛОГИИ С ИЗВЕСТНЫМИ БЕЛКАМИ .....	153
<b>ПІДПАЛА О.В., ЯЦИШИНА А.П., ЛУКАШ Л.Л.</b> ДО ПИТАННЯ ПРО ПОХОДЖЕННЯ ВІРОЇДІВ .....	157
<b>ПОЛІЩУК Л.В., ЛУКЯНЧУК В.В., МАРІЄВСЬКИЙ В.Ф., РУБАН Н.М.</b> ДОСЛІДЖЕННЯ НУКЛЕОТИДНОЇ ПОСЛІДОВНОСТІ ПЛАЗМІДИ pEC1257 .....	163
<b>ТИЩЕНКО Е.Н., МИХАЛЬСКАЯ С.И., СЕРГЕЕВА Л.Е.</b> НЕСТАБИЛЬНОСТЬ RAPD-АМПЛИКОНОВ СОИ ПРИ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ОКСИАНИОНАМ ВОЛЬФРАМА И ВАНАДИЯ .....	166
<b>ФЕДОРОВА Н.Б., ЧАДОВА Е.В.</b> МУТАЦИЯ В ОНТОГЕНЕ ДРОЗОФИЛЫ ВЫЗЫВАЕТ ПЕРЕМЕЩЕНИЕ РЕТРОТРАНСПОЗОНА 412 .....	170
<b>ЧУМАЧЕНКО А.Г., МЯЗИН А.Е., РАМАЙЯ Л.К., ПОМЕРАНЦЕВА М.Д., ШАЙХАЕВ Г.О., РУБАНОВИЧ А.В.</b> ВЛИЯНИЕ ОБЛУЧЕНИЯ НА ТРАНСГЕНЕРАЦИОННУЮ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ RAPD- МАРКЕРОВ ПОТОМКОВ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C .....	174

## МЕХАНІЗМИ ВЗАЄМОДІЇ ТА ЕКСПРЕСІЇ ГЕНЕТИЧНИХ СИСТЕМ

<b>АЗАРИН К. В.</b> МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ СТРУКТУРЫ ГЕНА, КОНТРОЛИРУЮЩЕГО СИНТЕЗ УРАТОКСИДАЗЫ .....	178
<b>АНДРИЕВСКИЙ А. М.</b> ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗНООБРАЗИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ КАРБОКСИЭСТЕРАЗ У ДРОЗОФИЛ И ОТДЕЛЬНЫХ ВИДОВ КЛАССА <i>INSECTA</i> .....	181
<b>БОГУСЛАВСКИЙ Д.В., ЗАХАРОВ И.С., БАЛАБАН П.М.</b> РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК -ПРЕДШЕСТВЕННИК НЕЙРОПЕПТИДОВ ПИЩЕВОГО ПОВЕДЕНИЯ .....	185
<b>ВАГИН Ю.В., ВАГИНА И.Н.</b> ОВАРИАЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ ПЕРИИМПЛАНТАЦИИ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ.....	190
<b>ВОЛКОВА Н.С., ВОРОБЬОВА Л.І.</b> ВПЛИВ ПІГМЕНТНИХ МУТАЦІЙ НА СТАТЕВУ ПОВЕДІНКУ <i>Drosophila melanogaster</i> ....	194
<b>ГЕРБЕК Ю.Э., ОСЬКИНА И.Н., ГУЛЕВИЧ Р.Г., ПЛЮСНИНА И.З.</b> ВЛИЯНИЕ ОТБОРА ПО ПОВЕДЕНИЮ И МЕТИЛОБОГАЩЁННОЙ ДИЕТЫ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ В ГИППОКАМПЕ СЕРЫХ КРЫС .....	198
<b>ГРАЧЕВА М.А., ВОРОБЬЕВА Л.И.</b> ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПА НА ЭКСПРЕССИВНОСТЬ МУТАЦИИ <i>ey</i> И НЕКОТОРЫЕ АДАПТИВНО ВАЖНЫЕ ПРИЗНАКИ <i>Drosophila melanogaster Meig</i> .....	202
<b>ДМИТРИЄВ О.П., КРАВЧУК Ж.М., НАУМЕНКО В.Д., ПОЛЯКОВСЬКИЙ С.О., ДЯЧЕНКО А.І.</b> ІНДУКУВАННЯ СИСТЕМНОЇ СТІЙКОСТІ У РОСЛИН ЗА ДОПОМОГОЮ БІОГЕННИХ ЕЛІСИТОРІВ .....	205
<b>ДЬЯЧЕНКО Л.Ф., ТОЦЬКИЙ В.М., ФАЙТ В.І., ТОПТІКОВ В.А.</b> ЭКСПРЕССИВНОСТЬ МНОЖИННЫХ ФОРМ ДЕЯКИХ ФЕРМЕНТІВ У ТКАНИНАХ РОСЛИН ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ З РІЗНИМИ ГЕНАМИ ФОТОПЕРІОДИЗМУ .....	209
<b>ЕВТУШЕНКОВ А.Н., АГАБОЗОРГИ С.</b> ВИРУЛЕНТНЫЕ СВОЙСТВА МУТАНТОВ БАКТЕРИЙ <i>ERWINIA ATROSEPTICA</i> ПО ГЕНАМ СИСТЕМЫ СЕКРЕЦИИ III ТИПА .....	213
<b>КИРИКОВИЧ С.С., ДЕНИСОВА Ф.Ш., ЛЕВИТЕС Е.В.</b> ИМПРИНТИНГ В АГАМОСПЕРМНЫХ ПОТОМСТВАХ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ .....	217
<b>КОНОВАЛОВ В.С., ПЕТРЕНКО И.П., ГАВРИЛЕНКО Н.С., БЕЛЫЙ Ю.А., ШИБУНЬКО М.В.</b> К ВОПРОСУ О ТЕНДЕНЦИЯХ РАЗВИТИЯ СЕЛЕКЦИОННОГО МЕЛАНИЗМА СРЕДИ ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ СТАД ЧЕРНО-ПЕСТРОГО СКОТА .....	221
<b>КРИПКА А., ЗЕЛЕНАЯ Л.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ ТИПА АДАПТИВНОЙ СТРАТЕГИИ РАСТЕНИЙ С РАЗНЫМ ТИПОМ РЕПРОДУКЦИИ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ .....	225
<b>ЛОГВИНЕНКО Н.С.</b> ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ АЛЬДОСТЕРОНОМ ЭКСПРЕССИИ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО НАТРИЕВОГО КАНАЛА (ENaC) И ГЛЮКОКОРТИКОИД-РЕГУЛИРУЕМОЙ КИНАЗЫ-1 (SGK-1) В КЛЕТКАХ ЭПИТЕЛИЯ НЕФРОНА КРЫСЫ.....	228
<b>ЛОГИНОВА Д.Б., ДЕЙНЕКО Е.В.</b> МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОЗАИЧНОГО ХАРАКТЕРА ПРОЯВЛЕНИЯ МАРКЕРНОГО ГЕНА <i>NPTII</i> У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА .....	232
<b>МИРОСЬ Е. Л., КОЗЕРЕЦКАЯ И. А., АНДРИЕВСКИЙ А. М.</b>	

ПОЛИМОРФИЗМ И ЭКСПРЕССИЯ КАРБОКСИЭСТЕРАЗ У САМЦОВ В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ ЗОНЫ ОТЧУЖДЕНИЯ .....	236
<b>ОСЬКИНА И.Н., ПРАСОЛОВА Л.А.</b> АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ ВОЗНИКНОВЕНИЯ БЕЛОЙ ПЯТНИСТОСТИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДОМЕСТИКАЦИИ .....	239
<b>ПОТОПАЛЬСЬКИЙ А.І., ЮРКЕВИЧ Л.Н., КАЦАН В.А.</b> ГОМЕОБОКСНІ ГЕНИ, ЯК МОЖЛИВІ МІШЕНІ ДІЇ ЕКЗОГЕННИХ ДНК ПРИ ОТРИМАННІ НОВИХ ФОРМ ЖИТА .....	243
<b>РАДЧЕНКО О.М.</b> МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ СОРТІВ ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ..	248
<b>СЕРГЕЕВА Ж. Ю., ГОРЬ Т. Е., БУРОВА Л. М., ТОВКАЧ Ф. И.</b> МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КРИПТИЧЕСКИХ ПЛАЗМИД <i>ERWINIA CAROTOVORA</i> .....	250
<b>СОКОЛОВА Е.И.</b> ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАРТИРОВАННЫХ ГЕНОВ <i>API, BP, GL1, CH5, CLV1, MIN ARABIDOPSIS THALIANA</i> (L.) НЕУНН. ПО ПРИЗНАКУ «МАССА РАСТЕНИЯ» .....	254
<b>ТИТОК М.А., БУЛЫГА И. М., ВАСИЛЕНКО С.Л.</b> ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ БИОДЕГРАДАЦИОННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ У ПРИРОДНЫХ БАКТЕРИЙ <i>PSEUDOMONAS</i> .....	257
<b>ТОЦКИЙ В.Н., ХАУСТОВА Н.Д., БЕЛОКОНЬ С.В.</b> ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ И ГЕННЫЙ БАЛАНС .....	261
<b>ХАУСТОВА Н.Д., БЛОКОНЬ С.В., ТОЦКИЙ В.М.</b> ПРИСТОСОВАНІСТЬ МУТАНТІВ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> ЗА ШТУЧНОГО ЗАМІЩЕННЯ ХРОМОСОМ .....	264
<b>ШИЛИНА Ю.В., ГУЩА Н.И., ДЯЧЕНКО А.И., МОЛОЖАВАЯ О.С., ОВСЯННИКОВА Л.Г., ДМИТРИЕВ А.П.</b> ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ КАК АДАПТИВНАЯ РЕАКЦИЯ У БАКТЕРИЙ .....	269
<b>ЩЕРБАКОВА О.В., МОГИЛЯК І.І., МАТІЙЦІВ Н.П., МАКСИМІВ Д.В., ЧЕРНИК Я.І.</b> ЗМІНИ У ТКАНІНІ МОЗКУ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНОГО МУТАНТА 4.14 <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> В НОРМІ ТА ЗА УМОВ ГІПЕРОКСІЇ .....	274
<b>ЯЦЕНКО А.С., КУЧЕРЕНКО М.М., ЩЕРБАТА Г.Р., РУОХОЛА-БЕЙКЕР Х., ГОЛУБ Н.Я., МАКСИМІВ Д.В., ЧЕРНИК Я.І.</b> ДИСТРОФІН ТА ДИСТРОГЛІКАН Є НЕОБХІДНИМИ ДЛЯ ФУНКЦІОНУВАННЯ М'ЯЗІВ ТА ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ПОЛЯРНОСТІ ФОТОРЕЦЕПТОРНИХ АКСОНІВ ГОЛОВНОГО МОЗКУ У <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> .....	277
<b>ДМУТРУК К.В., ДМУТРУК О.В., СІБІРНУ А.А.</b> CONSTRUCTION OF URICASE-OVERPRODUCING STRAINS OF THE METHYLOTROPHIC YEAST <i>HANSENULA POLYMORPHA</i> .....	281
<b>OLENKINA O.M., OLENINA L. V., LAVROV S.A., KLENOV M. S., GVOZDEV V.A.</b> ANALYSIS OF TESTIS - EXPRESSED <i>STELLATE</i> GENES PROMOTER REGION IN <i>D. melanogaster</i> .....	285

#### ГЕНЕТИКА ЛЮДИНИ ТА МЕДИЧНА ГЕНЕТИКА

<b>БАРИЛЯК І.Р., НЕУМЕРЖИЦЬКА Л.В., ЄВТУШОК Л.С., ШКАРУПА В.М.</b> ОЦІНКА ВРОДЖЕНИХ ВАД РОЗВИТКУ В ПІВНІЧНО-ЗАХІДНОМУ РЕГІОНІ УКРАЇНИ .....	290
--	-----

<b>БАРИЛЯК І.Р., ШКАРУПА В.М.</b> ТЕОРЕТИЧНІ МОДЕЛІ В АНАЛІЗІ ДОЗОВИХ ЗАЛЕЖНОСТЕЙ МУТАГЕННОЇ ДІЇ МІТОМІЦИНУ С В ДОСЛІДАХ НА <i>ALLIUM CEPA L.</i> .....	293
<b>БОДНАР Л.С., БЕЛЯЄВА В.В., ГОРБУЛІНСЬКА С.М., ФЕДИНЯК А.В.</b> СКРИНІНГ ПРИРОДНИХ ЗРАЗКІВ ВОДИ ЧЕРВОНОГРАДСЬКОГО ГІРНИЧО - ПРОМИСЛОВОГО РЕГІОНУ НА ІНДУКЦІЮ СОМАТИЧНИХ МУТАЦІЙ ТА РЕКОМБІНАЦІЙ НА <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> .....	298
<b>ВАСИНСКАЯ О.А., ЛАВРЯШИНА М.Б., УЛЬЯНОВА М.В., БАЛАНОВСКИЙ О.П., ДИБИРОВА Х.Д., ПШЕНИЧНОВ А.С., ПОЧЕШХОВА Э.А., КУЗНЕЦОВА М.А., ФРОЛОВА С.А., ОРЛОВ А.И., ПУЗИНА Т.А., БАЛАНОВСКАЯ Е.В.</b> УНИКАЛЬНОСТЬ ГЕНОФОНДА ШОРЦЕВ ПО СПИД-ПРОТЕКТОРНОМУ ГЕНУ <i>CCR5del32</i> В КОНТЕКСТЕ НАСЕЛЕНИЯ ЕВРАЗИИ.....	301
<b>ВІШТАК Н.В., ГНАТЕЙКО О.З.</b> ДОСЛІДЖЕННЯ АЛЕЛЬНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗ У ДІТЕЙ, ЩО ПРОЖИВАЮТЬ В УМОВАХ ЗАБРУДНЕНОГО ДОВКІЛЛЯ .....	305
<b>ВОРОБЬЄВА Л.И., ВДОВИЧЕНКО Н.И., МИКУЛИНСКИЙ Ю.Е., КУЛЬШИН В.Е.</b> ИЗУЧЕНИЕ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ <i>GSTR1, RASSF1A, APC</i> ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ .....	308
<b>ГЕНИК-БЕРЕЗОВСЬКА С.О.</b> АНАЛІЗ ЕФЕКТИВНОСТІ ВИКОРИСТАННЯ РЕГІОНАЛЬНОГО РЕЄСТРУ ПРИРОДЖЕНИХ ВАД РОЗВИТКУ СЕРЕД НОВОНАРОДЖЕНИХ У ПОЛОГОВИХ ЗАКЛАДАХ ЛЬВІВСЬКОЇ ОБЛАСТІ ДЛЯ УДОСКОНАЛЕННЯ МЕДИКО- ГЕНЕТИЧНОГО КОНСУЛЬТУВАННЯ НАСЕЛЕННЯ .....	312
<b>ГУЛЬКО Т.П., ТОПОРОВА Е.К., СУХОРАДА Е.М., РУБАН Т.А., АЛЕКСЕЕВА Т.А., ИРОДОВ Д.М., КОРДЮМ В.А.</b> ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ УГЛЕРОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ КАК МАТРИКСОВ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ В СИСТЕМАХ <i>IN VITRO</i> И <i>IN VIVO</i> .....	316
<b>ДИБИРОВА Х.Д.</b> ЕСТЬ ЛИ У НАРОДОВ КАВКАЗА ПОЛИМОРФИЗМ ПО СПИД-ПРОТЕКТОРНОМУ ГЕНУ <i>CCR5del32</i> ? .....	321
<b>КОВАЛЕВА В.И., БАГАЦКАЯ Н.В., ДЕМЕНКОВА И.Г., НЕФИДОВА В.Е.</b> ОЦЕНКА МУТАГЕНЕЗА У ДЕТЕЙ, РОЖДЕННЫХ В СЕМЬЯХ ЛИКВИДАТОРОВ АВАРИИ НА ЧАЭС .....	324
<b>КУЗНЕЦОВА М.А., ПОЧЕШХОВА Э.А., ДИБИРОВА Х.Д., ВАСИНСКАЯ О.А., ФРОЛОВА С.А., ПШЕНИЧНОВ А.С., БАЛАНОВСКИЙ О.П., ПУЗИНА Т.А., ОРЛОВ А.И., СОЛОВЬЕВА Д.С., ДУБОВА Н.А., БАЛАНОВСКАЯ Е.В.</b> ОЦЕНКА РАЗЛИЧИЙ ТЮРКОЯЗЫЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЕВРОПЫ ПО СПИД- ПРОТЕКТОРНОМУ ГЕНУ <i>CCR5del32</i> .....	328
<b>ПЛІНСЬКА М.А., ДИБСЬКИЙ С.С., ДИБСЬКА О.Б., ПЕДАН Л.Р.</b> ВИЯВЛЕННЯ ПРИХОВАНОЇ ХРОМОСОМНОЇ НЕСТАБІЛЬНОСТІ ЗА ЧУТЛИВІСТЮ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ ДО ТЕСТУЮЧОЇ МУТАГЕННОЇ ДІЇ БЛЕОМІЦИНУ <i>IN VITRO</i> .....	330
<b>ПШЕНИЧНОВ А.С., БАЛАНОВСКИЙ О.П., СОЛОВЬЕВА Д.С., КУЗНЕЦОВА М.А., ДИБИРОВА Х.Д., ВАСИНСКАЯ О.А., ФРОЛОВА С.А., ИЩУК М.Л., АТРАМЕНТОВА Л.А., ЧУРНОСОВ М.И., ПУЗИНА Т.А., БАЛАНОВСКАЯ Е.В.</b> СХОДСТВО УКРАИНСКИХ И ДРУГИХ СЛАВЯНОЯЗЫЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ПО ЧАСТОТАМ СПИД-ПРОТЕКТОРНОГО ГЕНА <i>CCR5 del32</i> .....	334

<b>СЄДНЄВА І.А.</b> ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ-ІНДУКТОРІВ ТА ГЕНІВ-СУПРЕСОРИВ АПОПТОЗУ У ПАЦІЄНТІВ З НОВОУТВОРАМИ ТОВСТОЇ КИШКИ, ЯКІ МАЮТЬ СПАДКОВО ОБТЯЖЕНИЙ АНАМНЕЗ ЗА ЦИМ ЗАХВОРЮВАННЯМ .....	336
<b>ТЕРПИЛЯК О.І.</b> РОЗПОДІЛ ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ SNP –1082 G-A ПРОМОТОРНОЇ ДІЛЯНКИ ГЕНА IL–10 ПРИ ВТОРИННОМУ НЕПЛІДІ .....	340
<b>ТИЖНЕНКО Т.В., ПОЧЕРНЯЄВ А.К., ГОРШУНСЬКА М.Ю., ПОЛТОРАК В.В., АТРАМЕНТОВА Л.А., КРАВЧУН Н.О.</b> ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНА ПАРАОКСОНАЗИ ( <i>PN-1</i> ) У НАСЕЛЕННЯ М. ХАРКОВА .....	343
<b>ТИРКУС М.Я., МАКУХ Г.В., БІЛЕВИЧ О.Б., ЗАСТАВНА Д.В.</b> ВНЕСОК ОСНОВНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ЧИННИКІВ В ЕТІОЛГІЇ ПОРУШЕНЬ СПЕРМАТОГЕНЕЗУ .....	347
<b>ФИЛИПЦОВА О.В., АТРАМЕНТОВА Л.А.</b> ГЕНЕАЛОГИЧЕСКАЯ КУЛЬТУРА В УКРАИНЕ: ФЕНОМЕН ЭТНИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ .....	351
<b>ЦАО ЮЙ, АТРАМЕНТОВА Л.А.</b> ПОТЕРЯ ГЕТЕРОЗИГОТНОСТИ ГЕНА <i>FHIT</i> КАК ФАКТОР РИСКА РАКА ПИЩЕВОДА .....	355
<b>ЧЕРЕДНИК Ю. О., ЖЕРЕБКО Н. М., СТРИЖ В. О., АНОПРИЄНКО О. В., ГОРОВЕНКО Н. Г., КОСТРОМІНА В. П.</b> ПРОБЛЕМИ ГЕНОДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ .....	358
<b>ЧОРНА Л.Б., ТРЕТЯК Б.І., МАРКЕВИЧ Н.В., МАКУХ Г.В., АКОПЯН Г.Р.</b> РОЗПОДІЛ АЛЕЛІВ ПОЛІМОРФНИХ ЛОКУСІВ ГЕНА ІНТЕРЛЕЙКІНА-10 У ПАЦІЄНТІВ З СИНДРОМОМ НІЙМЕГЕН .....	362
<b>ШТАНДЕЛЬ С.А.</b> ЕСТЕСТВЕННЫЙ ОТБОР РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ .....	366

#### **ПИТАННЯ ВИКЛАДАННЯ ГЕНЕТИКИ, ЕВОЛЮЦІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ**

<b>ЗАДЕРЕЙ Н.С.</b> СПОСОБИ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ УЧБОВОГО ПРОЦЕСУ .....	371
<b>МАМАЛИГА В.С., МАЗУР В.А., ПОЛІЩУК І.С.</b> ПОТОЧНИЙ КОНТРОЛЬ ЗАСВОСННЯ НАВЧАЛЬНОГО МАТЕРІАЛУ З ГЕНЕТИКИ СТУДЕНТАМИ ВИЩОГО АГРАРНОГО НАВЧАЛЬНОГО ЗАКЛАДУ ПРИ КРЕДИТНО- МОДУЛЬНІЙ СИСТЕМІ ОРГАНІЗАЦІЇ НАВЧАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ .....	373