

Scientific Peer Reviewed Journal

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Founded in 1997

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

«Вавиловский журнал генетики и селекции»/«Vavilov Journal of Genetics and Breeding» до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/“The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists”.

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (редакция от 25.05.2015 г.: <http://vak.ed.gov.ru/87>), Российский индекс научного цитирования, базу данных Ulrich's Periodicals Directory.

Переводная версия “Russian Journal of Genetics: Applied Research” индексируется в базах данных SCOPUS, EMBASE, Google Scholar, OCLC, SCImago, Summon by ProQuest.

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

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

© ИЦиГ СО РАН, 2015

© Вавиловский журнал генетики и селекции, 2015

© Сибирское отделение Российской академии наук, 2015

Учредители

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров
Сибирское отделение Российской академии наук

Главный редактор

В.К. Шумный – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Редакционный совет

Н.А. Колчанов (заместитель главного редактора) – академик РАН, д-р биол. наук (Россия);
В.С. Баранов – чл.-кор. РАН, д-р мед. наук (Россия); *Л.А. Беспалова* – академик РАН, д-р с.-х. наук (Россия);
А. Бёрнер – д-р наук (Германия); *В.М. Говорун* – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия); *И. Гроссе* – д-р наук, проф. (Германия); *Г.Л. Дианов* – д-р биол. наук, проф. (Великобритания); *Ю.Е. Дуброва* – д-р биол. наук, проф. (Великобритания); *И.К. Захаров* – д-р биол. наук, проф. (Россия); *И.А. Захаров-Гезехус* – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия); *С.Г. Инге-Вечтомов* – академик РАН, д-р биол. наук (Россия); *И.Е. Керкис* – д-р наук (Бразилия); *А.В. Кильчевский* – чл.-кор. НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь); *С.В. Костров* – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия); *Ж. Ле Гуи* – д-р наук (Франция); *Б. Люгтенберг* – д-р наук, проф. (Нидерланды);
В.И. Молодин – академик РАН, д-р ист. наук (Россия); *В.П. Пузырев* – академик РАН, д-р мед. наук (Россия);
А.Ю. Ржецкий – канд. биол. наук, проф. (США); *И.Б. Rogozin* – канд. биол. наук (США); *А.О. Рувинский* – д-р биол. наук, проф. (Австралия); *К.Г. Скрыбин* – академик РАН, д-р биол. наук (Россия); *К.В. Славин* – д-р наук, проф. (США); *И.А. Тихонович* – академик РАН, д-р биол. наук (Россия); *Л.В. Хотылева* – академик НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь); *Э.К. Хуснутдинова* – д-р биол. наук, проф. (Россия); *М.Ф. Чернов* – д-р мед. наук (Япония); *С.В. Шестаков* – академик РАН, д-р биол. наук (Россия); *Н.К. Янковский* – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

Редакционная коллегия

Н.Б. Рубцов (заместитель главного редактора) – д-р биол. наук, проф. (Россия); *Е.К. Хлесткина* (заместитель главного редактора) – д-р биол. наук (Россия); *Т.Г. Амстиславская* – д-р биол. наук, доцент (Россия); *Е.Е. Андронов* – канд. биол. наук (Россия); *Ю.С. Аульченко* – д-р биол. наук (Россия);
Д.А. Афонников – канд. биол. наук, доцент (Россия); *Л.И. Афтанас* – академик РАН, д-р мед. наук (Россия);
Е.В. Березиков – канд. биол. наук, проф. (Россия, Нидерланды); *С.А. Боринская* – д-р биол. наук (Россия);
П.М. Бородин – д-р биол. наук, проф. (Россия); *М.И. Воевода* – чл.-кор. РАН, д-р мед. наук (Россия);
Т.А. Гавриленко – д-р биол. наук, доцент (Россия); *В.Н. Даниленко* – д-р биол. наук, проф. (Россия);
С.А. Демаков – д-р биол. наук (Россия); *Е.А. Долгих* – канд. биол. наук (Россия); *Н.Н. Дыгало* – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия); *С.Л. Киселев* – д-р биол. наук, проф. (Россия); *В.А. Козлов* – академик РАН, д-р мед. наук (Россия); *Ю.М. Константинов* – д-р биол. наук, проф. (Россия); *А.В. Кочетов* – д-р биол. наук, доцент (Россия); *О. Кребс* – д-р биол. наук, проф. (Германия); *И.Н. Лаврик* – канд. хим. наук (Германия); *Л.А. Лутова* – д-р биол. наук, проф. (Россия); *В.Ю. Макеев* – д-р физ.-мат. наук (Россия);
М.П. Мошкин – д-р биол. наук, проф. (Россия); *Н.А. Проворов* – д-р биол. наук (Россия); *Д.В. Пышный* – д-р хим. наук, доцент (Россия); *А.В. Ратушный* – канд. биол. наук (США); *Е.А. Салина* – д-р биол. наук, проф. (Россия); *М.Г. Самсонова* – д-р биол. наук (Россия); *В.А. Степанов* – д-р биол. наук, проф. (Россия)

✉ e-mail: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090. Отв. секретарь редакции: С.В. Зубова, тел. (383)3634977*5415.
Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 20 июля 2011 г. При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна. Отв. секретарь выпуска О.В. Ваулин.
Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Зав. отделом: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: А.А. Ончукова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич. Компьютерная графика и верстка: А.В. Харкевич, Т.Б. Коняхина. Подписано в печать 30.07.2015 г.
Формат бумаги 60 × 84¹/₈. Уч.-изд. л. 18,95. Усл.-печ. л. 13,48. Тираж 200 экз. Заказ № 183.

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН», Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.

Молекулярные механизмы генетических процессов

- 247 Репарация ДНК в опухолевых стволовых клетках как фактор развития устойчивости глиом к радиотерапии
Ю.С. Макушева, Г.Л. Дианов
- 255 Рецептор глюкокортикоидов: переход из цитоплазмы в клеточное ядро, хроматиновый и внутриядерный шапероновый циклы
В.М. Меркулов, Н.В. Климова, Т.И. Меркулова
- 264 Профиль экспрессии длинных и коротких РНК в цитоплазме и ядрах растущих ооцитов домашней курицы (*Gallus gallus domesticus*)
А.В. Красикова, А.В. Федоров

Генетика и биотехнология микроорганизмов

- 270 Эффективный метод идентификации штаммов *Escherichia coli*, выделенных из различных органов домашней птицы (*Gallus gallus domesticus*)
В.П. Терлецкий, В.И. Тыщенко, О.Б. Новикова, Э.Д. Джавадов, И.Я. Шахтамиров, Н.Л. Адаев

Генетика и селекция животных

- 277 Применение репродуктивных технологий для повышения эффективности геномной селекции молочного крупного рогатого скота
Н.С. Юдин, К.И. Лукьянов, М.И. Воевода, Н.А. Колчанов
- 286 Собачий узел: систематический обзор рода *Canis* и предложения по таксономии
В. Динец
- 292 Репродуктивные способности и пути повышения плодовитости шиншиллы (*Chinchilla laniger Molina*)
М.В. Новиков, Н.Н. Шумилина

- 296 Модулирующее действие мутаций генов, затрагивающих окраску волосяного покрова, на генерацию и нейтрализацию активных форм кислорода. Американская норка (*Neovison vison*) как модель
С.Н. Сергина, В.А. Илюха, И.В. Баишникова, Т.Н. Ильина

Генетика и селекция растений

- 303 Разработка новых SSR-маркеров к локусам гомеологичных генов *WFZP* на основе изучения строения и локализации микросателлитов в богатых генами районах хромосом 2AS, 2BS, 2DS мягкой пшеницы
О.Б. Добровольская, К. Понт, Ю.Л. Орлов, Ж. Сальс
- 310 Пребридинговые исследования почти изогенных линий яровой мягкой пшеницы с комбинацией транслокаций от *Agropyron elongatum* (Host.) P.B. и *Aegilops ventricosa* Tausch.
С.Н. Сибикеев, А.Е. Дружин
- 316 Идентификация генов *Sr* у новых источников устойчивости мягкой пшеницы к расе стеблевой ржавчины Ug99 с использованием молекулярных маркеров
О.А. Баранова, И.Ф. Лапочкина, А.В. Анисимова, Н.Р. Гайнуллин, И.В. Иорданская, И.Ю. Макарова
- 323 Формирование ассоциаций генов, контролирующих общий гомеостаз и элементы продуктивности твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.)
П.Н. Мальчиков, М.Г. Мясникова
- 333 Маркер-контролируемое выявление генотипов кукурузы с улучшенным качеством белка
О.А. Орловская, С.В. Кубрак, С.И. Вакула, Л.В. Хотылева, А.В. Кильчевский
- К 160-летию со дня рождения И.В. Мичурина**
- 339 К 160-летию со дня рождения Ивана Владимировича Мичурина
Н.П. Гончаров, Н.И. Савельев

The molecular basis of genetic processes

- 247 DNA repair in cancer stem cells as a factor for glioma resistance to radiotherapy
Yu.S. Makusheva, G.L. Dianov
- 255 Glucocorticoid receptor: translocation from the cytoplasm to the nuclei, chromatin and intranuclear chaperone cycles
V.M. Merkulov, N.V. Klimova, T.I. Merkulova
- 264 Expression profiles of long and short RNAs in the cytoplasm and nuclei of growing chicken (*Gallus gallus domesticus*) oocytes
A.V. Krasikova, A.V. Fedorov

Microbial genetics and biotechnology

- 270 Efficient method for identification of *Escherichia coli* strains isolated from various chicken (*Gallus gallus domesticus*) organs
V.P. Terletskiy, V.I. Tyshchenko, O.B. Novikova, E.D. Dzhavadov, I.Ya. Shakhtamirov, N.L. Adaev

Animal genetics and breeding

- 277 Application of reproductive technologies to the improvement of dairy cattle genomic selection
N.S. Yudin, K.I. Lukyanov, M.I. Voevoda, N.A. Kolchanov
- 286 The *Canis* tangle: a systematics overview and taxonomic recommendations
V. Dinets
- 292 Reproductive performance and increased fecundity in the chinchilla (*Chinchilla laniger* Molina)
M.V. Novikhov, N.N. Shumilina

- 296 The modulating effect of coat color mutations on the generation and neutralization of reactive oxygen species in the American mink (*Neovison vison*) as a model
S.N. Sergina, V.A. Ilyukha, I.V. Baishnikova, T.N. Ilyina

Plant genetics and breeding

- 303 Development of new SSR markers for homoeologous *WFZP* loci based on the study of structure and location of microsatellites in gene-rich regions of chromosomes 2AS, 2BS, 2DS
O.B. Dobrovolskaya, C. Pont, Yu.L. Orlov, J. Salse
- 310 Prebreeding research of near-isogenic lines of spring bread wheat with a combination of translocations from *Agropyron elongatum* (Host.) P.B. and *Aegilops ventricosa* Tausch.
S.N. Sibikeev, A.E. Druzhin
- 316 Identification of *Sr* genes in new common wheat sources of resistance to stem rust race Ug99 using molecular markers
O.A. Baranova, I.F. Lapochkina, A.V. Anisimova, N.R. Gajnullin, I.V. Iordanskaya, I.Yu. Makarova
- 323 Formation of gene associations that code for general homeostasis and performance components of durum wheat (*Triticum durum* Desf.)
P.N. Malchikov, M.G. Myasnikova
- 333 Marker-assisted identification of maize genotypes with improved protein quality
O.A. Orlovskaya, S.V. Kubrak, S.I. Vakula, L.V. Khotyleva, A.V. Kilchevsky

On the 160th anniversary of I.V. Michurin's birth

- 339 On the 160th anniversary of Ivan V. Michurin's birth
N.P. Goncharov, N.I. Savel'ev

Репарация ДНК в опухолевых стволовых клетках как фактор развития устойчивости глиом к радиотерапии

Ю.С. Макушева¹, Г.Л. Дианов^{1, 2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Оксфордский институт радиационной онкологии, Отделение онкологии Оксфордского университета, Оксфорд, Великобритания

Глиомы – опухоли головного мозга, происходящие из клеток глии и их предшественников. Несмотря на применяемые методы лечения, выживаемость пациентов остается крайне низкой. Высокая смертность больных связана с устойчивостью этих опухолей к терапии, в большинстве случаев даже после хирургического удаления опухоли и последующего лечения сохраняется высокая вероятность рецидива заболевания. В настоящее время развитие глиом связывают с так называемыми опухолевыми стволовыми (ОСК), или опухоль-иницирующими, клетками. Широкое распространение получила иерархическая модель структурной организации опухоли, при которой вся опухоль развивается из одной клетки. Такие клетки, обладающие характеристиками стволовых клеток, за счет способности к самообновлению и дифференцировке, а также наличия генетических нарушений обеспечивают развитие опухоли. Таким образом, даже наличие небольшого числа таких клеток после удаления основной массы опухоли может привести к повторному развитию злокачественной опухоли. Накопленные за последнее время данные свидетельствуют о важной роли ОСК в развитии устойчивости опухоли к действию химио- и радиотерапии. В данном обзоре помимо общей информации о классификации глиом и методах лечения этих опухолей также рассматриваются результаты исследований, связанных именно с влиянием лучевой терапии на жизнеспособность ОСК, а также с определением роли процесса репарации ДНК в восстановлении опухолевых стволовых клеток. Можно сделать вывод, что процесс репарации ДНК вносит значимый вклад в развитие устойчивости ОСК к действию ионизирующего излучения. Также получены данные, свидетельствующие о том, что ингибирование репарации в таких клетках приводит к увеличению чувствительности опухоли к радиотерапии.

Ключевые слова: глиома; репарация ДНК; радиотерапия; опухолевые стволовые клетки.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Макушева Ю.С., Дианов Г.Л. Репарация ДНК в опухолевых стволовых клетках как фактор развития устойчивости глиом к радиотерапии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):247-254.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Makusheva Yu.S., Dianov G.L. DNA repair in cancer stem cells as a factor for glioma resistance to radiotherapy. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(3):247-254.

УДК 615.8:602.9:577.29

Поступила в редакцию 05.02.2015 г.

Принята к публикации 28.05.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

DNA repair in cancer stem cells as a factor for glioma resistance to radiotherapy

Yu.S. Makusheva¹, G.L. Dianov^{1, 2}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Cancer Research UK and Medical Research Council Oxford Institute for Radiation Oncology, Department of Oncology, University of Oxford, Oxford, UK

Gliomas are brain tumors originating from glial cells and their precursor cells. In spite of currently used therapy, patient survival remains very poor. The main reason for dismal prognosis is the high level of tumor recurrence because of resistance to different ways of treatment. Currently, it is believed that glioma development is connected with the existence of cancer stem cells (CSCs), or tumor-initiating cells. The theory of hierarchical tumor structure is now commonly accepted. It accounts for characteristics of these cells, namely, the capability of self-renewal and differentiation into astrocytes, oligodendrocytes, and neurons. Moreover, these cells bear multiple genetic lesions typical of cancer cells. Thus, the presence of these cells after surgery and further treatment allows the tumor to recur. The data obtained in recent years confirm the important role of CSCs in the development of tumor resistance to chemo- and radiotherapy. In this review, we present general information about classification and treatment of gliomas and consider results of research connected with the influence of radiation therapy. Some authors show that DNA repair enables CSCs to survive even after treatment. To sum up, it is shown that DNA repair contributes to the development of tumor resistance to ionizing radiation. In addition, our work confirms the hypothesis that inhibition of DNA repair processes in these cells leads to tumor sensitization to radiotherapy.

Key words: glioma; DNA repair; radiotherapy; cancer stem cells.

Опухоли головного мозга – исключительно гетерогенная группа новообразований, различающихся по молекулярно-биологическим и гистологическим характеристикам и, как следствие, по основным подходам при их лечении. Среди первичных опухолей головного мозга взрослых людей более 30 % составляют глиомы – опухоли, происходящие из глиальных клеток (астроглиальных и/или олигодендроглиальных), которые в зависимости от происхождения и степени анаплазии делятся на несколько типов и градаций. Наиболее агрессивными и практически не поддающимися лечению являются глиобластомы (IV степень злокачественности), которые составляют примерно половину от всех выявляемых глиом.

Концепция иерархической структуры опухоли с ОСК как предшественниками всех клеток была впервые показана на гематологических онкологических заболеваниях, но затем подтверждена и для солидных опухолей, в том числе глиом (Singh et al., 2004; Zaidi et al., 2009; Heywood et al., 2012). Известно, что по крайней мере в некоторых типах опухолей небольшая популяция раковых стволовых клеток может определять биологическое поведение опухоли, включая ответ на терапию (Tamura et al., 2010). Несмотря на существующие методы лечения, включающие хирургическое удаление опухоли и последующую химио- и радиотерапию, прогноз для пациентов остается крайне неблагоприятным. Так как глиомы являются диффузными опухолями и во время операции невозможно удалить все опухолевые клетки, то даже после применения высоких доз облучения сохраняется высокая вероятность рецидива опухоли (Heywood et al., 2012).

В исследовании ряда авторов было показано увеличение количества ОСК после облучения за счет более эффективной репарации повреждений ДНК этих клеток по сравнению с клетками опухоли, не обладающими характеристиками стволовых (Bao et al., 2006; Tamura et al., 2010; Lim et al., 2012). Однако также имеются данные, свидетельствующие о большей чувствительности ОСК к действию ионизирующего излучения (McCord et al., 2009), и, таким образом, необходимо дальнейшее изучение роли ОСК в возникновении устойчивости глиом к радиотерапии. В данном обзоре представлены результаты исследований процессов репарации ДНК опухолевых стволовых клеток, а также рассмотрена роль этих процессов в развитии устойчивости глиом к действию ионизирующего излучения.

Классификация глиом

Глиомы – наиболее часто встречающиеся первичные опухоли головного мозга, имеющие нейроэктодермальное происхождение. По разным оценкам они составляют от 50 до 80 % всех злокачественных новообразований центральной нервной системы и значительно различаются по морфологии, локализации, генетическим изменениям и ответу на терапию.

Согласно существующей в настоящее время классификации Всемирной организации здравоохранения в зависимости от исходного типа клеток глиомы делят на три типа:

1. Астроцитарные опухоли (астроциты и их предшественники).

2. Олигодендроглиальные опухоли (олигодендроциты и их предшественники).

3. Олигоастроцитарные опухоли (смешанный тип).

По степени злокачественности выделяют четыре градации:

I. Субэпендимарные гигантоклеточные астроцитомы и пилоцитарные астроцитомы.

II. Пиломиксоидные астроцитомы, диффузные астроцитомы, плеоморфные ксантоастроцитомы, олигодендроглиомы и олигоастроцитомы.

III. Анапластические астроцитомы, олигодендроглиомы и олигоастроцитомы.

IV. Глиобластомы – гигантоклеточные глиобластомы и глиосаркомы.

Астроцитомы второй степени злокачественности (II степень злокачественности) – это хорошо дифференцированные и медленно растущие опухоли, главной негативной характеристикой которых является способность диффузно проникать в окружающие структуры мозга. Вследствие этого такие опухоли имеют тенденцию возникать снова после хирургического удаления, что часто приводит к прогрессии в более злокачественные типы, такие как анапластическая астроцитома (III степень злокачественности) и в конечном итоге вторичная глиобластома (IV степень злокачественности) (Louis et al., 2007).

Олигодендроглиомы второй степени злокачественности – это также хорошо дифференцированные, медленно растущие и диффузно распространяющиеся опухоли, обычно расположенные в полушариях головного мозга и состоящие преимущественно из клеток, морфологически схожих с клетками олигодендроглии. Анапластическая олигодендроглиома (III степень злокачественности) – олигодендроглиома с различными гистологическими характеристиками злокачественности и менее благоприятным прогнозом (Louis et al., 2007).

Олигоастроцитомы второй степени злокачественности состоят из двух различных типов опухолевых клеток, морфологически похожих на опухолевые клетки олигодендроглиомы и астроцитомы низкой степени злокачественности (Louis et al., 2007). Анапластическая олигоастроцитома (III степень злокачественности) – это олигоастроцитома с гистологическими признаками злокачественности, которая по генетическому статусу и выживаемости является промежуточным типом между анапластическими астроцитомами и олигодендроглиомами (Okamoto et al., 2004; Louis et al., 2007).

Глиобластомы (IV степень злокачественности) встречаются наиболее часто и являются самыми агрессивными глиомами. Подавляющее большинство глиобластом (> 90 %) – первичные, развиваются быстро у пациентов зрелого возраста (в среднем 62 года) и не имеют промежуточных, менее злокачественных, стадий. Две трети пациентов с таким диагнозом имеют историю болезни менее 3 месяцев (Ohgaki et al., 2004). Вторичные глиобластомы составляют менее 10 % от всех выявляемых глиом. Они поражают более молодых пациентов (средний возраст диагноза – 45 лет) и развиваются медленнее из менее злокачественных диффузной или анапластической астроцитомы. В популяционном исследовании было показано, что среднее время прогрессии от глиомы второй

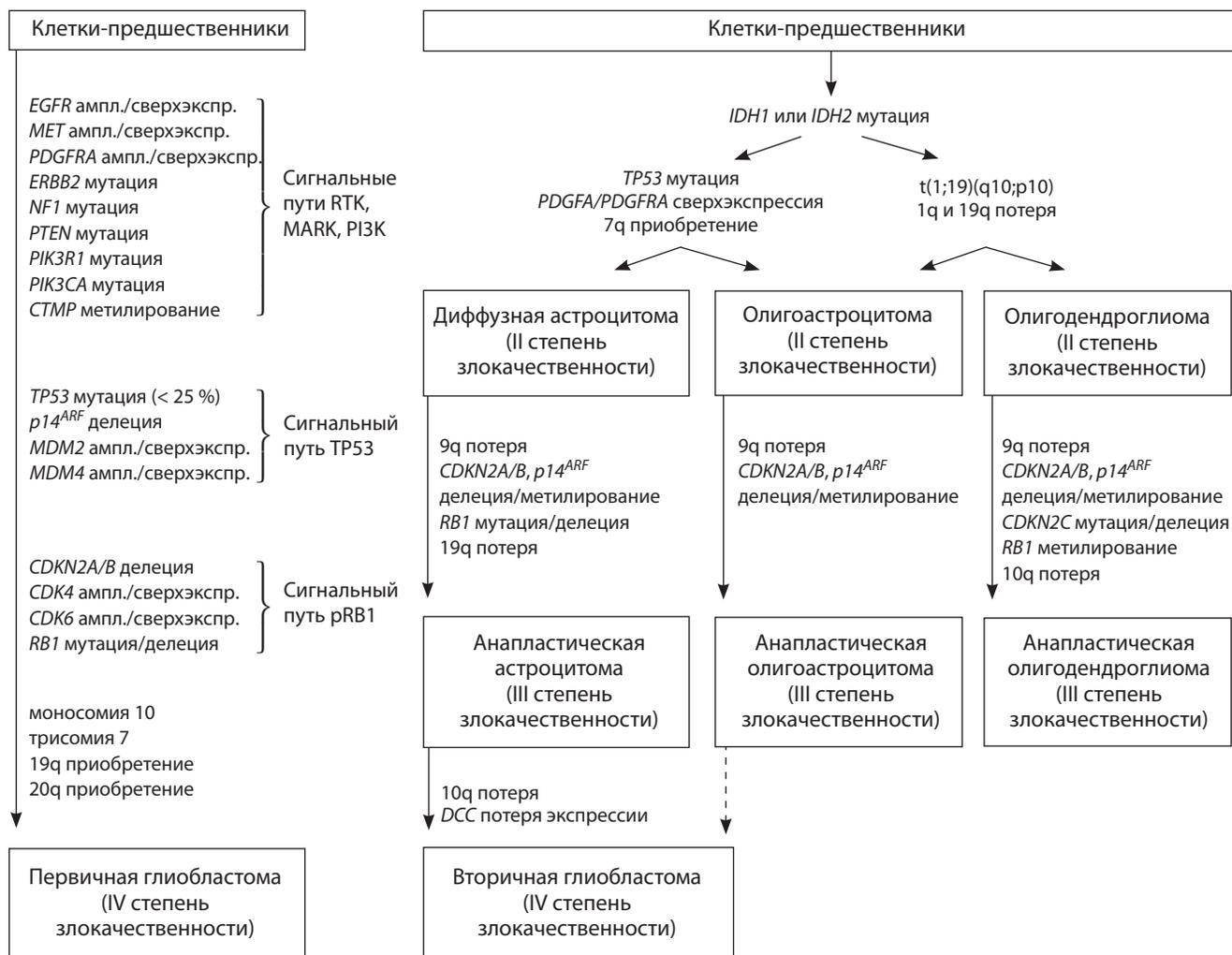


Рис. 1. Наиболее частые генетические изменения в глиальных опухолях, приводящие к формированию первичной и вторичной глиобластом (по материалам статьи: Riemenschneider, Jeuken et al. 2010).

ампл. – амплификация, сверхэкспр. – сверхэкспрессия.

степени злокачественности до глиобластомы составляет 5,3 года, от анапластической астроцитомы до глиобластомы – 1,4 года (Ohgaki, Kleihues, 2005). Хотя первичные и вторичные глиобластомы гистологически большей частью неотличимы, они развиваются по разным генетическим путям (Ohgaki, Kleihues, 2007).

Молекулярно-генетические изменения в процессе онкогенеза глиом

Как и все онкологические заболевания, глиомы развиваются в результате последовательных генетических нарушений, которые накапливаются с прогрессией опухоли. Сейчас известны часто встречающиеся мутации для каждого типа глиом и сформулированы представления о путях формирования первичных и вторичных глиобластом (рис. 1). Первичные глиобластомы (IV степень злокачественности) возникают сразу из клеток-предшественников, минуя стадии глиом низкой степени злокачественности. При этом характер и последовательность молекулярно-генетических нарушений имеют свои

особенности в разных путях формирования глиобластом. В частности, первичные глиобластомы характеризуются частой амплификацией гена *EGFR* и мутациями гена *PTEN* при отсутствии мутаций гена *IDH1*, в то время как во вторичных глиобlastомах часто обнаруживаются мутации генов *TP53* и *IDH1*, но нет амплификации гена *EGFR* (Ohgaki, Kleihues, 2007; Kleihues, Ohgaki, 1999). На хромосомном уровне первичные глиобластомы отличаются от вторичных частой трисомией хромосомы 7, моносомией хромосомы 10, а также приобретением хромосомных плеч 12p, 19q и 20q (Toedt et al., 2011). Тем не менее большая часть генетических изменений в первичных и вторичных глиобlastомах одинакова. Для глиом II и III степеней злокачественности, а также вторичных глиобlastомах характерным нарушением являются мутации в генах *IDH1/IDH2*, что предполагает наличие общего предшественника у этих опухолей. В астроцитомах II степени злокачественности часто мутирован ген *TP53*, в то время как для олигодендроглиальных опухолей свойственна делеция участка хромосомы 1p/19q. Молекулярные нару-

шения, связанные с прогрессией опухоли до III степени злокачественности, включают потерю участка хромосомы 9p, а также инактивацию генов *CDKN2A* и *CDKN2B*. При прогрессии до вторичной глиобластомы происходит потеря участка хромосомы 10q и потеря экспрессии гена *DCC* (Riemenschneider et al., 2010).

Нейральные стволовые и опухолевые стволовые клетки мозга

В 1962 г. впервые в мозге взрослой крысы было обнаружено существование делящихся клеток (Altman, 1962). Впоследствии существование таких клеток было показано и для мозга человека (Kirschenbaum et al., 1994; Uchida et al., 2000). Выделение нейральных стволовых клеток *in vitro* стало возможным благодаря разработке метода получения нейросфер – плавающих сфер, которые формируются из глиальных клеток при выращивании в бессывороточной среде с добавлением митогенов, основного фактора роста фибробластов и эпидермального фактора роста (Reynolds et al., 1992).

В 2002 г. методика получения нейросфер, обычно применяемая для выделения нейральных стволовых клеток, была использована при исследовании опухолей головного мозга, и было установлено, что клетки глиобластомы также способны формировать нейросферы (Ignatova et al., 2002). В результате последующих экспериментов было обнаружено, что клетки глиобластом, формирующие нейросферы, могут дифференцироваться по трем направлениям развития тканей мозга – в нейроны, астроциты и олигодендроциты и, следовательно, могут быть определены как стволовые клетки (Galli et al., 2004). Опухолевые стволовые клетки могут повторять типичные гистологические, цитологические и морфологические черты исходной опухоли человека при пересадке иммунодефицитным мышам даже после многократных последовательных пассажей этих клеток *in vitro*. В отличие от нейросфер, изолированных из нормальной ткани, клетки нейросфер, выделенных из опухоли человека, содержат генетические нарушения и подвержены отклоняющейся от нормы пролиферации и дифференцировке (Hemmati et al., 2003; Singh et al., 2003). Кроме того, число нейросфер, полученных *in vitro*, прямо коррелирует с уровнем роста опухоли и инвазии при введении клеток опухоли иммунодефицитным мышам (Zerpernick et al., 2008).

Опухолевые стволовые клетки также рассматриваются как опухоль-иницирующие клетки, которые образуются при трансформации клеток головного мозга и дают начало глиобластам (Ignatova et al., 2002; Hemmati et al., 2003; Galli et al., 2004; Brazel et al., 2005). Однако происхождение этих клеток остается не до конца выясненным. В исследовании Zaidi с соавт. (Zaidi et al., 2009) описаны три возможных источника происхождения опухоль-иницирующих клеток. Такие клетки могут образовываться из зрелых клеток глии, которые в результате последовательных мутаций приобретают характеристики стволовых клеток и при наличии мутаций в онкогенах и онкосупрессорах могут считаться опухолевыми стволовыми клетками. Также источником происхождения опухоль-иницирующих клеток мозга могут быть глиальные клетки-предшественники, которые менее дифференцированы и имеют ограни-

ченный потенциал к самообновлению. Мутации в таких клетках могут приводить к увеличению возможности самообновления, что впоследствии способствует образованию опухоли. Альтернативный вариант происхождения опухолевых стволовых клеток из нейральных стволовых клеток подтверждается значительным сходством между ними (экспрессия одинаковых клеточных маркеров, способность мигрировать сквозь паренхиму мозга, образовывать нейросферы *in vitro*, дифференцироваться в различные типы клеток), а также возникновением глиом вблизи субвентрикулярной зоны – места расположения нейральных стволовых клеток в головном мозге.

Для идентификации ОСК глиом преимущественно используется маркерный белок CD133, экспрессия которого характерна для нормальных нейральных стволовых клеток (Hemmati et al., 2003; Singh et al., 2004; Zaidi et al., 2009). Singh с соавт. (Singh et al., 2004) показали, что даже 10^2 CD133+ клеток достаточно для формирования опухолей при имплантации иммунодефицитным мышам, в то время как инъекция 10^5 CD133- клеток не обеспечивала образования опухоли. Однако имеются также данные о том, что и CD133- клетки могут формировать нейросферы *in vitro* (Patru et al., 2010) и опухоли при имплантации крысам (Wang et al., 2008). Это свидетельствует о том, что CD133 не является универсальным маркером ОСК, и в настоящее время продолжается поиск маркеров этих клеток.

Методы лечения глиом

Основными методами в лечении глиом являются хирургическое удаление опухоли, лучевая терапия, химио- и иммунокорректирующая терапия. В редких случаях удается обойтись применением только одного метода, чаще всего для повышения эффективности лечения используется их сочетание. Хирургическое лечение, как правило, сопровождается лучевой терапией и/или каким-либо вариантом химиотерапии. Иммунокорректирующая терапия (применение таких препаратов, как левамизол, Т-активин, тимоген, неовир) улучшает состояние пациентов при проведении им химиотерапевтического лечения (Олюшин, 2005).

Для лечения глиом высокой степени злокачественности возможно применение алкилирующих препаратов нитрозомочевины – кармустина, ломустина и нидрана. За последние пять лет определенную эффективность в комплексном лечении глиом продемонстрировал темодал (темозоломид) – алкилирующий препарат, обладающий высокой противоопухолевой активностью в сочетании с низкой токсичностью по сравнению с другими препаратами. Для повышения чувствительности к темодалу и эффективного лечения опухоли большое значение имеет инактивация гена *MGMT*, которая является следствием делеции гена или метилирования его промотора (Стрельников и др., 2011).

Также для лечения глиом широко используются таргетные препараты. Одним из вариантов действия таких препаратов может быть блокирование сигнальных путей рецепторных тирозинкиназ. На рецепторном уровне основной точкой приложения в этом случае является рецептор эпидермального фактора роста. В настоящее время для лечения глиобластом применяются вещества,

блокирующие функцию этого рецептора моноклональными антителами (например, цетуксимаб C225) или ингибирующие его тирозин-киназную активность (гефинитиб, эрлонитиб, лапатиниб). Однако при потере или мутации гена *PTEN* (опухолевого супрессора) лечение ингибиторами EGFR оказывается неэффективным (Стрельников и др., 2011).

Несмотря на существующие в настоящее время комплексные подходы в лечении глиом, выживаемость пациентов остается крайне низкой, особенно при глиомах высоких степеней злокачественности. Одной из основных проблем в лечении глиом является высокая вероятность возникновения рецидива (Neman, Jandial, 2010).

Механизмы репарации двуцепочечных разрывов ДНК

Ключевым методом лечения остается применение радиационной терапии. Этот метод основан на действии ионизирующего излучения, которое вызывает нарушения непосредственно в ДНК, наиболее значимыми из которых являются двуцепочечные разрывы, а также формирование свободных радикалов при ионизации молекул воды в клетках. В результате облучения погибает основная масса опухолевых клеток, но часть клеток сохраняет жизнеспособность за счет процессов репарации. Двуцепочечные разрывы ДНК репарируются с помощью двух механизмов: негомологичного соединения концов и гомологической рекомбинации (San Filippo et al., 2008; Kesari et al., 2011).

Первый способ является самым простым и состоит в сшивании концов ДНК. При этом не требуется гомологии последовательности ДНК в местах разрыва, и после удаления поврежденных нуклеотидов происходит лигирование концов ДНК лигазой IV. Вследствие этого такой метод является неточным и приводит к потере генетической информации в области разрыва (Kesari et al., 2011; Abbotts et al., 2014).

Второй механизм репарации – гомологическая рекомбинация – начинается с удаления части нуклеотидов и образования одноцепочечного участка ДНК, который затем внедряется в гомологичную последовательность, образуя Д-петлю (рис. 2). Далее

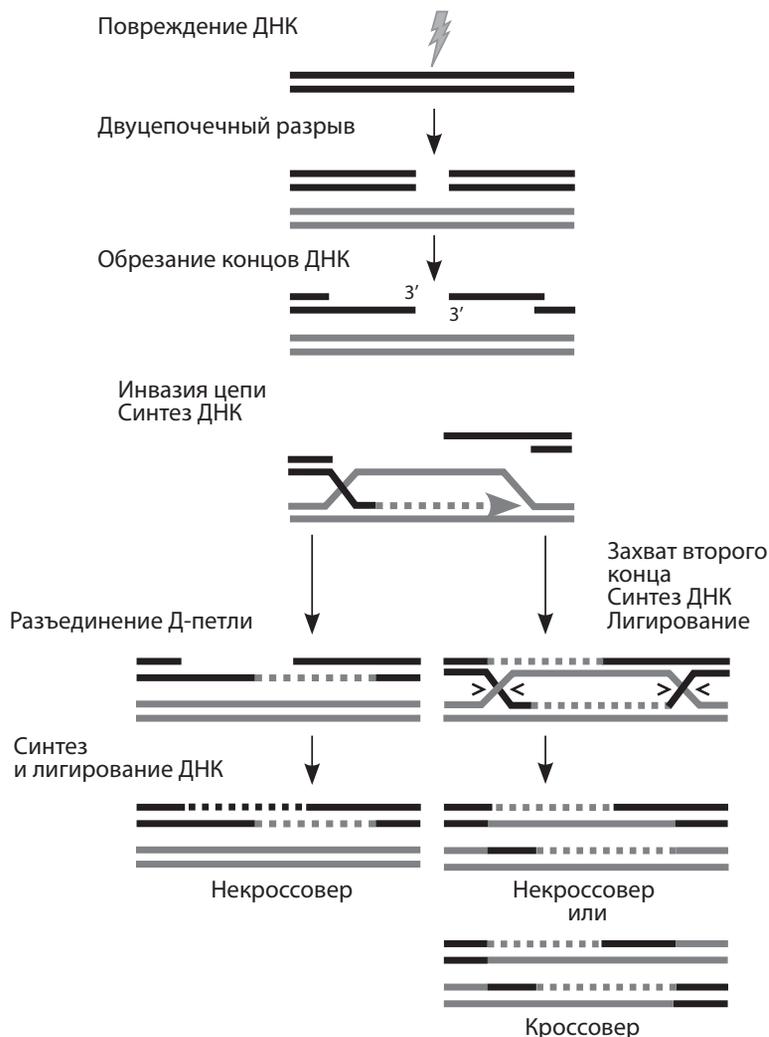


Рис. 2. Пути репарации двуцепочечных разрывов ДНК с помощью гомологической рекомбинации (по: San Filippo et al., 2008).

происходит либо раскручивание петли и высвобождение цепи ДНК с последующим достраиванием и лигированием ДНК, либо могут образоваться структуры Холлидея, разрешение которых приводит к формированию кроссоверных или некроссоверных продуктов (San Filippo et al., 2008).

Гомологическая рекомбинация является более точным методом репарации ДНК, чем негомологическое соединение концов ДНК. Однако ввиду необходимости в последовательности, по образцу которой будет проходить восстановление структуры ДНК, гомологическая рекомбинация может применяться только в делящихся клетках, в то время как негомологичное соединение концов может происходить независимо от стадии клеточного цикла. Если в клетках есть мутации или делеции в генах, регулирующих гомологическую рекомбинацию, то репарация двуцепочечных разрывов будет проводиться с помощью негомологичного соединения концов ДНК, что характерно для репарации в раковых клетках (Ward et al., 2015).

Роль опухолевых стволовых клеток в развитии устойчивости глиом к радиотерапии

Механизмы, отвечающие за устойчивость глиом к радиотерапии, еще недостаточно изучены, однако уже получены некоторые данные, в частности о роли опухолевых стволовых клеток в этом явлении.

Значимый вклад в развитие этой области внесло исследование Вао с соавт.

(Bao et al., 2006). Авторы продемонстрировали увеличение доли CD133+ клеток в общей опухолевой массе после воздействия излучения. Причем было показано, что происходит увеличение числа выживших клеток именно за счет ОСК. Более того, анализ формирования колоний выявил, что ОСК являются более устойчивыми к облучению, чем основная масса клеток опухоли, и увеличение доли таких клеток происходит за счет снижения апоптотической гибели клеток. Авторы показали, что в ОСК происходит активация точек контроля клеточного цикла, что свидетельствует о стимулировании остановки клеточного цикла и репарации поврежденной ДНК. С помощью метода ДНК-комет было показано, что процесс репарации ДНК в опухолевых стволовых клетках проходит более эффективно, чем в основной массе опухолевых клеток (Bao et al., 2006).

Хотя Bao с соавторами показали, что конверсии CD133-клеток в CD133+ клетки не происходит, данные, полученные Dahan с соавт. (Dahan et al., 2014), свидетельствуют о возможности такого процесса. В этой работе авторы сначала стимулировали дифференцировку ОСК, затем подвергали их ионизирующему излучению и анализировали их способность к снижению степени дифференцировки. Несмотря на первоначальное отсутствие маркеров стволовых клеток и наличие маркеров дифференцированных клеток, после облучения клетки вновь приобретали маркеры стволовых (Dahan et al., 2014).

Похожие результаты получили исследователи, проанализировавшие парафиновые срезы образцов рецидивирующей опухоли у пациентов, прошедших курс радиотерапии. Было показано, что у таких больных происходит накопление CD133+ клеток по сравнению с образцами опухолей, полученными от пациентов, не подвергавшихся облучению (Tamura et al., 2010).

Австралийские ученые также обнаружили, что CD133+ клетки устойчивы к действию радиотерапии (Lim et al., 2012). Анализ экспрессии маркеров гомологической рекомбинации Rad51 и Brca1 выявил, что репарация ДНК в опухолевых стволовых клетках происходит именно с помощью гомологической рекомбинации. Кроме того, ослабленная активация чекпойнт-киназ свидетельствовала об отсутствии точки контроля G1-S, что приводило к переходу клеток в фазу S и последующей гомологической рекомбинации. При этом было показано, что в нормальных стволовых клетках для репарации двуцепочечных разрывов используется преимущественно негомологичное соединение концов (Aguilar-Morante et al., 2011; Lim et al., 2014). Далее этим же коллективом авторов было показано, что при направленном ингибировании гомологической рекомбинации происходит увеличение чувствительности ОСК к радиотерапии, аналогичные результаты были получены в исследованиях (Biddlestone-Thorpe et al., 2013) на перевиваемых линиях глиом *in vivo*. По результатам экспериментов было отмечено, что после имплантации клеток глиом мышам и проведения курса терапии с использованием ингибиторов гомологической рекомбинации в сочетании с ионизирующим излучением наблюдалась повышенная выживаемость животных по сравнению с контрольной группой животных, не получавших лечения, а также животных, подвергавшихся

воздействию либо ионизирующего излучения, либо ингибиторов гомологической рекомбинации. Более того, клетки, мутантные по TP53, были более чувствительны к радиотерапии по сравнению с клетками с функциональной формой белка. Похожие результаты были получены авторами при анализе эффективности ингибиторов гомологической рекомбинации на культурах стволовых клеток глиом (Vecchio et al., 2014).

В то же время имеются данные о более высокой чувствительности к ионизирующему излучению CD133+ клеток глиом, полученных в виде первичных культур нейросфер, по сравнению с перевиваемыми клеточными линиями глиом (McCord et al., 2009). Методом анализа колоний авторы продемонстрировали большую чувствительность ОСК к излучению по сравнению с перевиваемыми клеточными линиями глиом. С помощью метода анализа фосфорилирования гистона H2AX и метода ДНК-комет авторы выявили снижение способности ОСК к репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Однако в работе Lee с соавт. (Lee et al., 2006) подвергается сомнению правомерность сравнения характеристик ОСК и перевиваемых клеточных линий глиом, так как было показано, что постоянные клеточные линии не могут служить адекватной моделью развития опухоли из-за значительных отличий от исходной опухоли.

В исследовании Ropolo (Ropolo et al., 2009) сообщалось, что способность к репарации ДНК не отличалась у CD133+ и CD133- клеток. Несмотря на то что по результатам исследования стволовые клетки сохраняли основные характеристики пролиферирующих клеток и в них поддерживалась постоянная активация чекпойнт-киназ, никакого стимулирования репарации ДНК в этих клетках не наблюдалось. Причем использовались те же методы, что и в исследовании Bao с соавт. (анализ фосфорилирования гистона γ H2AX, вестерн-блот и метод ДНК-комет). Авторы предположили, что такое несоответствие может свидетельствовать о том, что клеточные линии глиом отличаются по каскаду реакций, запускаемых после воздействия ионизирующего излучения (Ropolo et al., 2009).

Устойчивость глиом к химио- и радиотерапии остается одной из основных причин неблагоприятного прогноза для пациентов. Развитие устойчивости – это комплексный процесс, он вовлекает множество механизмов/путей, одним из наиболее значимых является репарация ДНК. В данной статье представлена информация о классификации и генетических нарушениях в глиомах, методах лечения этих опухолей, а также описаны результаты исследований, касающихся роли опухолевых стволовых клеток в возникновении рецидивов заболевания. Было показано, что количество этих клеток увеличивается после обработки гамма-излучением за счет более низкого уровня апоптотической гибели этих клеток. Основным механизмом репарации ДНК в этих клетках является гомологическая рекомбинация, причем ее ингибирование приводит к увеличению чувствительности опухолевых клеток к радиотерапии. Несмотря на то что имеются данные о высокой чувствительности ОСК к гамма-излучению, эффективная репарация в раковых стволовых

клетках рассматривается как основная причина устойчивости глиом к действию радиотерапии.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке по базовому бюджетному проекту № VI.58.1.3.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Олюшин В.Е. Глиальные опухоли головного мозга: краткий обзор литературы и протокол лечения больных. *Нейрохирургия*. 2005;4:41-47.
- Стрельников В.В., Землякова В.В. Молекулярно-генетическая диагностика опухолей головного мозга. Введение в молекулярную диагностику. Под ред. М.А. Пальцева, Д.В. Залегаяева М.: Медицина, 2011;2:486-503.
- Abbotts R., Thompson N., Madhusudan S. DNA repair in cancer: emerging targets for personalized therapy. *Cancer Manag. Res.* 2014;6:77-92. DOI: 10.2147/CMAR.S50497
- Aguilar-Morante D., Cortes-Canteli M., Sanz-Sancristobal M., Santos A., Perez-Castillo A. Decreased CCAAT/enhancer binding protein β expression inhibits the growth of glioblastoma cells. *Neuroscience*. 2011;176:110-119. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.12.025
- Altman J. Autoradiographic study of degenerative and regenerative proliferation of neuroglia cells with tritiated thymidine. *Exp. Neurol.* 1962;5:302-318.
- Bao S., Wu Q., McLendon R.E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A.B., Dewhirst M.W., Bigner D.D., Rich J.N. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756-760. DOI: 10.1038/nature05236
- Biddlestone-Thorpe L., Sajjad M., Rosenberg E.J., Beckta M., Valerie N.C., Tokarz M., Adams B.R., Wagner A.F., Khalil A., Gilford D., Golding S.E., Deb S., Temesi D.G., Lau A., O'Connor M.J., Choe K.S., Parada L.F., Lim S.K., Mukhopadhyay N.D., Valerie K. ATM kinase inhibition preferentially sensitizes p53-mutant glioma to ionizing radiation. *Clin. Cancer Res.* 2013;19(12):3189-3200. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3408
- Brazel C.Y., Limke T.L., Osborne J.K., Miura T., Cai J., Pevny L., Rao M.S. Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell.* 2005;4(4):197-207. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2005.00158.x
- Dahan P., Martinez Gala J., Delmas C., Monferran S., Malric L., Zentkowski D., Lubrano V., Toulas C., Cohen-Jonathan Moyal E., Lemarie A. Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. *Cell Death Dis.* 2014. DOI: 10.1038/cddis.2014.509
- Galli R., Binda E., Orfanelli U., Cipelletti B., Gritti A., De Vitis S., Fiocco R., Feroni C., Dimeco F., Vescovi A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 2004;64(19):7011-7021. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1364
- Hemmati H.D., Nakano I., Lazareff J.A., Masterman-Smith M., Geschwind D.H., Bronner-Fraser M., Kornblum H.I. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2003;100(25):15178-15183. DOI: 10.1073/pnas.203653100
- Heywood R.M., Marcus H.J., Ryan D.J., Piccirillo S.G., Al-Mayhany T.M., Watts C. A review of the role of stem cells in the development and treatment of glioma. *Acta Neurochir. (Wien)*. 2012;154(6):951-969. DOI: 10.1007/s00701-012-1338-9
- Ignatova T.N., Kukekov V.G., Laywell E.D., Suslov O.N., Vrionis F.D., Steindler D.A. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers *in vitro*. *Glia*. 2002;39(3):193-206. DOI: 10.1002/glia.10094
- Kesari S., Advani S.J., Lawson J.D., Kahle K.T., Ng K., Carter B., Chen C.C. DNA damage response and repair: insights into strategies for radiation sensitization of gliomas. *Future Oncol.* 2011;7(11):1335-1346. DOI: 10.2217/fon.11.111
- Kirschenbaum B., Nedergaard M., Preuss A., Barami K., Fraser R.A., Goldman S.A. *In vitro* neuronal production and differentiation by precursor cells derived from the adult human forebrain. *Cereb. Cortex*. 1994;4(6):576-589.
- Kleihues P., Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol.* 1999;1(1):44-51.
- Lee J., Kotliarova S., Kotliarov Y., Li A., Su Q., Donin N.M., Pastorino S., Purow B. W., Christopher N., Zhang W., Park J.K., Fine H.A. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*. 2006;9(5):391-403. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.03.030
- Lim Y.C., Roberts T.L., Day B.W., Harding A., Kozlov S., Kijas A.W., Ensby K.S., Walker D.G., Lavin M.F. A role for homologous recombination and abnormal cell-cycle progression in radioresistance of glioma-initiating cells. *Mol. Cancer Ther.* 2012;11(9):1863-1872. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-1044
- Lim Y.C., Roberts T.L., Day B.W., Stringer B.W., Kozlov S., Fazry S., Bruce Z.C., Ensby K.S., Walker D.G., Boyd A.W., Lavin M.F. Increased sensitivity to ionizing radiation by targeting the homologous recombination pathway in glioma initiating cells. *Mol. Oncol.* 2014;8(8):1603-1615. DOI: 10.1016/j.molonc.2014.06.012
- Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K., Burger P.C., Jouvet A., Scheithauer B.W., Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97-109. DOI: 10.1007/s00401-007-0243-4
- McCord A.M., Jamal M., Williams E.S., Camphausen K., Tofilon P.J. CD133+ glioblastoma stem-like cells are radiosensitive with a defective DNA damage response compared with established cell lines. *Clin. Cancer Res.* 2009;15(16):5145-5153. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0263
- Neman J., Jandial R. Decreasing glioma recurrence through adjuvant cancer stem cell inhibition. *Biologics*. 2010;4:157-162. DOI: 10.2147/BTT.S9497
- Ohgaki H., Dessen P., Jourde B., Horstmann S., Nishikawa T., Di Patre P.L., Burkhard C., Schüler D., Probst-Hensch N.M., Maiorica P.C., Baeza N., Pisani P., Yonekawa Y., Yasargil M.G., Lütolf U.M., Kleihues P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2004;64(19):6892-6899. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1337
- Ohgaki H., Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2005;64(6):479-489.
- Ohgaki H., Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am. J. Pathol.* 2007;170(5):1445-1453. DOI: 10.2353/ajpath.2007.070011
- Okamoto Y., Di Patre P.L., Burkhard C., Horstmann S., Jourde B., Fahey M., Schüler D., Probst-Hensch N.M., Yasargil M.G., Yonekawa Y., Lütolf U.M., Kleihues P., Ohgaki H. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol.* 2004;108(1):49-56. DOI: 10.1007/s00401-004-0861-z
- Patru C., Romao L., Varlet P., Coulombel L., Raponi E., Cadusseau J., Renault-Mihara F., Thirant C., Leonard N., Berhneim A., Mihalescu-Maingot M., Haiech J., Bièche I., Moura-Neto V., Dumas-Duport C., Junier M.P., Chneiweiss H. CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glioma-neuronal tumors. *BMC Cancer.* 2010;10:66. DOI: 10.1186/1471-2407-10-66
- Reynolds B.A., Tetzlaff W., Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* 1992;12(11):4565-4574.
- Riemenschneider M.J., Jeuken J.W., Wesseling P., Reifenberger G. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol.* 2010;120(5):567-584. DOI: 10.1007/s00401-010-0736-4
- Ropolo M., Daga A., Griffero F., Foresta M., Casartelli G., Zunino A.,

- Poggi A., Cappelli E., Zona G., Spaziante R., Corte G., Frosina G. Comparative analysis of DNA repair in stem and nonstem glioma cell cultures. *Mol. Cancer Res.* 2009;7(3):383-392. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0409
- San Filippo J., Sung P., Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 2008;77:229-257. DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255
- Singh S.K., Clarke I.D., Terasaki M., Bonn V.E., Hawkins C., Squire J., Dirks P.B. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003;63(18):5821-5828.
- Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D., Squire J.A., Bayani J., Hide T., Henkelman R.M., Cusimano M.D., Dirks P.B. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004;432(7015):396-401. DOI: 10.1038/nature03128
- Tamura K., Aoyagi M., Wakimoto H., Ando N., Nariyai T., Yamamoto M., Ohno K. Accumulation of CD133-positive glioma cells after high-dose irradiation by Gamma Knife surgery plus external beam radiation. *J. Neurosurg.* 2010;113(2):310-318. DOI: 10.3171/2010.2.JNS091607
- Toedt G., Barbus S., Wolter M., Felsberg J., Tews B., Blond F., Sabel M.C., Hofmann S., Becker N., Hartmann C., Ohgaki H., von Deimling A., Wiestler O.D., Hahn M., Lichter P., Reifenberger G., Radlwimmer B. Molecular signatures classify astrocytic gliomas by IDH1 mutation status. *Int. J. Cancer.* 2011;128(5):1095-1103. DOI: 10.1002/ijc.25448
- Uchida N., Buck D.W., He D., Reitsma M.J., Masek M., Phan T.V., Tsukamoto A.S., Gage F.H., Weissman I.L. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2000;97(26):14720-14725. DOI: 10.1073/pnas.97.26.14720
- Vecchio D., Daga A., Carra E., Marubbi D., Baio G., Neumaier C.E., Vagge S., Corvò R., Pia Brisigotti M., Louis Ravetti J., Zunino A., Poggi A., Mascelli S., Raso A., Frosina G. Predictability, efficacy and safety of radiosensitization of glioblastoma-initiating cells by the ATM inhibitor KU-60019. *Int. J. Cancer.* 2014;135(2):479-491. DOI: 10.1002/ijc.28680
- Wang J., Sakariassen P., Tsinkalovsky O., Immervoll H., Bøe S.O., Svendsen A., Prestegarden L., Røsland G., Thorsen F., Stuhr L., Molven A., Bjerkvig R., Enger P. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int. J. Cancer.* 2008;122(4):761-768. DOI: 10.1002/ijc.23130
- Ward A., Khanna K.K., Wiegman A.P. Targeting homologous recombination, new pre-clinical and clinical therapeutic combinations inhibiting RAD51. *Cancer Treat. Rev.* 2015;41(1):35-45. DOI: 10.1016/j.ctrv.2014.10.006
- Zaidi H.A., Kosztowski T., DiMeco F., Quiñones-Hinojosa A. Origins and clinical implications of the brain tumor stem cell hypothesis. *J. Neurooncol.* 2009;93(1):49-60. DOI: 10.1007/s11060-009-9856-x
- Zeppernick F., Ahmadi R., Campos B., Dictus C., Helmke B.M., Becker N., Lichter P., Unterberg A., Radlwimmer B., Herold-Mende C.C. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin. Cancer Res.* 2008;14(1):123-129. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0932

Рецептор глюкокортикоидов: переход из цитоплазмы в клеточное ядро, хроматиновый и внутриядерный шапероновый циклы

В.М. Меркулов, Н.В. Климова, Т.И. Меркулова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

Рецептор глюкокортикоидных гормонов (ГР) является лиганд-зависимым фактором транскрипции, регулирующим экспрессию сотен генов. В отсутствие гормона ГР находится в цитоплазме клетки в комплексе с молекулярными шаперонами hsp90, hsp70, p23, Hop, FKBP51, FKBP52 и др. В составе этого комплекса ГР приобретает конформацию, обладающую высоким сродством к глюкокортикоидам. После связывания с гормоном рецептор высвобождается из комплекса с шаперонами и переходит в клеточное ядро, где взаимодействует со специфическими участками ДНК (GREs) генов-мишеней глюкокортикоидов, влияя на интенсивность их транскрипции. Затем свободный от гормона ГР выходит из клеточного ядра в цитоплазму, завершая ядерно-цитоплазматический цикл этого белка. Согласно современным представлениям, существуют также внутриядерные хроматиновый и шапероновый циклы ГР. Хроматиновым циклом называется цикл связывания/диссоциации/повторного связывания гормон-рецепторных комплексов с GREs, занимающий от нескольких секунд до нескольких десятков секунд. Шапероновый цикл происходит после диссоциации гормон-рецепторного комплекса в ядрах, когда ГР связывается с присутствующими в них теми же молекулярными шаперонами, которые взаимодействуют с этим белком в цитоплазме, и в результате чего вновь связывает гормон, затем высвобождается из комплекса с шаперонами и снова взаимодействует с GREs. Предполагается, что главным образом за счет существования шаперонового цикла ГР удерживается в ядре клетки в течение нескольких часов. В настоящем обзоре обобщены имеющиеся в литературе данные, на основании которых были построены модели хроматинового и внутриядерного шаперонового циклов ГР и проведен их критический анализ.

Ключевые слова: рецептор глюкокортикоидов; молекулярные шапероны; клеточные ядра; хроматин; циклы.

Glucocorticoid receptor: translocation from the cytoplasm to the nuclei, chromatin and intranuclear chaperone cycles

V.M. Merkulov, N.V. Klimova, T.I. Merkulova

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Glucocorticoid receptor (GR) is a ligand-dependent transcription factor, involved in the regulation of hundreds of genes. In the absence of any ligand, GR resides in the cytoplasm where it is sequestered in a multimeric chaperone complex consisting of hsp90, hsp70, p23, Hop, FKBP51, FKBP52, etc. As part of this multiprotein complex, GR undergoes conformational changes that allow glucocorticoid hormone binding. Upon ligand binding, GR dissociates from chaperone complex and translocates into the nucleus, where it interacts with specific DNA sequences (GREs) in the regulatory regions of target genes and modulates their expression. Then unliganded GR is exported to the cytoplasm, completing the nuclear-cytoplasmic cycle. Recent evidence suggests that, in addition to this cycle, chromatin and chaperone GR cycles exist within the nuclei. The chromatin cycle implies repeated interactions of ligand-bound GR with GREs in the chromatin context lasting for few seconds. The chaperone cycle starts after dissociation of the hormone-receptor complex, when GR binds to the nuclear chaperone machinery. As a result, its hormone-binding affinity is regained. Upon hormone binding, GR releases from chaperone complex and binds to GREs again. It is assumed that the chaperone cycle is mainly responsible for prolonged GR retention in nuclei (half-life within 8–12 h upon steroid withdrawal). In this review, we summarize and critically analyze the published data on chromatin and intranuclear chaperone GR cycles.

Key words: glucocorticoid receptor; molecular chaperones; nuclei; chromatin; cycles.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Меркулов В.М., Климова Н.В., Меркулова Т.И. Рецептор глюкокортикоидов: переход из цитоплазмы в клеточное ядро, хроматиновый и внутриядерный шапероновый циклы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):255-263.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Merkulov V.M., Klimova N.V., Merkulova T.I. Glucocorticoid receptor: translocation from the cytoplasm to the nuclei, chromatin and intranuclear chaperone cycles. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(3):255-263.

УДК 577.17:576.315

Поступила в редакцию 25.05.2015 г.

Принята к публикации 29.06.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015



e-mail: merkti@niboch.nsc.ru

Глюкокортикоидные гормоны являются регуляторами широкого круга процессов, протекающих в организме позвоночных животных, таких как поддержание метаболического гомеостаза, пролиферация клеток, противовоспалительный и иммунный ответ, индивидуальное развитие, размножение и поведение (Boumpas et al., 1993; Schmid et al., 1995; Hierholze, Buhler, 1996; Beato, Klug, 2000). Действие этих гормонов в клетке реализуется через связывание с белком-рецептором глюкокортикоидов (ГР, NR3C1) – транскрипционным фактором из суперсемейства ядерных рецепторов (Mangelsdorf et al., 1995; Смирнов, 2002).

В отсутствие гормона ГР локализован преимущественно в цитоплазме клетки, где он находится в составе комплекса с рядом молекулярных шаперонов (hsp90, hsp70, p23, Нор, FKBP51, FKBP52 и др.), которые необходимы для придания рецепторному белку гормон-связывающей конформации и обеспечивают его защиту от протеолитической деградации (Pratt, Toft, 1997; Cheung, Smith, 2000; Pratt et al., 2004). После того как ГР связывается с гормоном, мультибелковый комплекс диссоциирует либо претерпевает изменения состава, в результате чего происходит переход рецептора в клеточное ядро (Grad, Picard, 2007; Vandevyver et al., 2012). В ядре клетки гормон-рецепторный комплекс связывается со специфическими участками ДНК – элементами глюкокортикоидной регуляции (GREs) (Schoneveld et al., 2004; Merkulov, Merkulova, 2009; Nicolaidis et al., 2010) и привлекает к месту своей посадки ряд кофакторных (p160, p300, CBP) и хроматин-ремоделирующих белков (SWI/SNF). Комплекс этих белков осуществляют локальную реорганизацию структуры хроматина, что способствует привлечению базальных транскрипционных факторов, РНК-полимеразы II и началу транскрипции (Kino et al., 1999; Wallberg et al., 2000). Затем свободный от гормона ГР выходит из клеточного ядра в цитоплазму, завершая ядерно-цитоплазматический цикл этого белка (Vandevyver et al., 2012).

Показано, что стимулируемый гормоном переход ГР в клеточное ядро происходит достаточно быстро (время полуперехода 3–5 мин), тогда как выход этого белка из ядер занимает несколько часов, т. е. ГР находится в ядре клетки довольно долго (Vandevyver et al., 2012). Согласно современным представлениям, находящийся в ядре гормон-рецепторный комплекс может осуществлять множество раундов связывания/диссоциации и повторного связывания с GREs, и каждый такой раунд занимает несколько секунд или несколько десятков секунд. Эти раунды названы хроматиновыми циклами. Если же происходит диссоциация гормон-рецепторного комплекса, свободный ГР может связаться с присутствующими в ядре теми же молекулярными шаперонами, что взаимодействуют с ним в цитоплазме, и в результате этого вновь приобрести способность связывать гормон. Затем образовавшиеся в ядре гормон-рецепторные комплексы теряют связь с шаперонами и вновь взаимодействуют с GREs. Такой внутриядерный, опосредованный взаимодействием с шаперонами, оборот ГР получил название шаперонового цикла. Предполагается, что главным образом за счет существования этого цикла ГР удерживается в ядре клетки

длительное время (George et al., 2009; Miranda et al., 2013; Stavreva et al., 2012).

Основной целью настоящего обзора являлись систематизация имеющихся в литературе данных, на основании которых были построены модели хроматинового и внутриядерного шаперонового циклов ГР, и их критический анализ.

Стимулируемый гормоном переход рецептора глюкокортикоидов в ядро клетки

Известно, что в отсутствие гормона ГР находится в цитоплазме клетки в составе мультибелкового комплекса, содержащего одну молекулу рецепторного белка (Okret et al., 1985), димер белка теплового шока hsp90, а также ряд других молекулярных шаперонов (Pratt, 1993; Pratt, Toft, 1997). В составе этого комплекса ГР принимает конформацию, обладающую высоким сродством к глюкокортикоидам. Показано, что в условиях *in vitro* для создания такой конформации необходимы 5 шаперонных белков (Bresnick et al., 1989). Это белки теплового шока, hsp70, hsp90 и DnaJ/Hsp40, а также hsp90-связывающий белок p23 и hsp70/hsp90-организующий белок Нор, который собирает hsp70 и hsp90 в единый комплекс (Pratt, Toft, 1997; Cheung, Smith, 2000). При этом ведущую роль в открывании лиганд-связывающего кармана ГР играет его взаимодействие с димером hsp90 (Grenert et al., 1999). Показано, что в отсутствие hsp90 сродство ГР к глюкокортикоидным гормонам снижается в 100 раз (Nemoto et al., 1990). Кроме того, в состав цитоплазматического мультибелкового комплекса входят иммунофилины: FKBP51, циклофилин Сур40 и иммунофилинподобный белок – фосфатаза PP5, а также ряд других белков (Grad, Picard, 2007; Echeverria, Picard, 2010). Затем связывание с гормоном ГР меняет конформацию, мультибелковый комплекс диссоциирует или же частично меняет состав, после чего рецептор переходит в клеточное ядро (Echeverria, Picard, 2010).

Предложены два механизма перехода ГР в ядро клетки (рис. 1). Первый заключается в связывании транспортных белков импортинов (кариоферин) с высвободившимися в результате полной диссоциации комплекса сигналами ядерной локализации (NLS) молекулы рецептора. NLS являются специфическими короткими аминокислотными последовательностями, обеспечивающими ядерную локализацию белков. Импортины – это довольно крупные белки (90–120 кДа), на N-конце которых расположен домен, связывающийся с небольшим белком GTP-азой Ran (Ras related nuclear protein), в то время как C-конец взаимодействует с NLS подлежащего транспортировке белка (Nakielnny, Dreyfuss, 1999). Импортины осуществляют непосредственный контакт с белками комплекса ядерной поры и транспорт связанного с ними белка внутрь клеточного ядра посредством кооперации с RanGTP-азной системой (Marfogi et al., 2011). Показано, что с основным сигналом ядерной локализации ГР – NL1, расположенным в шарнирном домене рецептора, взаимодействуют гетеродимер импортинов α и β , а также импортины 7 и 8. Сигнал NL2, расположенный в гормон-связывающем домене, распознается только импортинами 7 и 8 (Freedman, Yamamoto, 2004; Vandevyver et al., 2012).

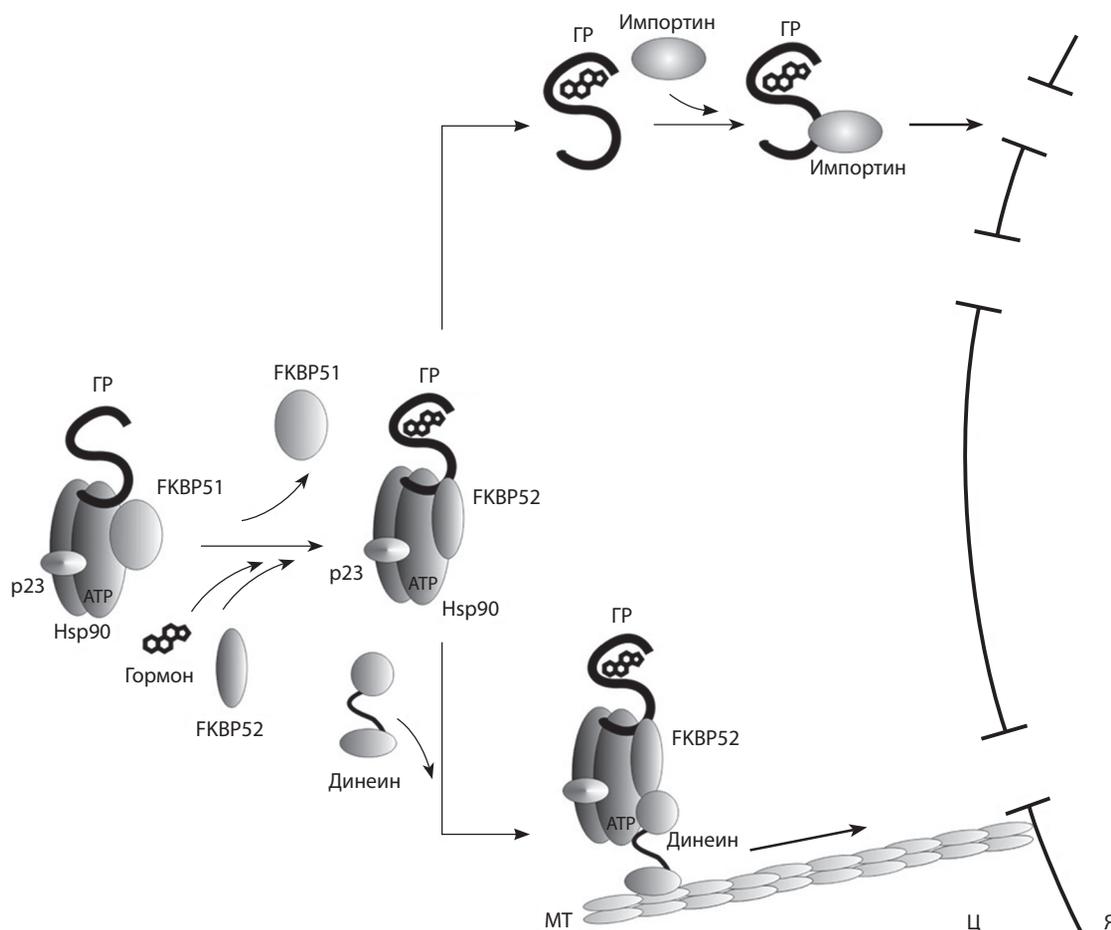


Рис. 1. Два механизма перехода ГР в ядро клетки.
МТ – микротрубочки; Ц – цитоплазма; Я – ядро. (Адаптировано по: Grad, Picard, 2007.)

Второй механизм перехода ГР в ядро клетки опосредован шаперонами. В этом случае не происходит диссоциации цитоплазматического мультибелкового комплекса, но частично меняется его состав. В частности, установлено, что в отсутствие гормона в мультибелковой комплекс входит иммунофилин FKBP51. После связывания гормона этот белок быстро замещается другим иммунофилином – FKBP52, в результате чего комплекс перемещается в ядро клетки (Davies et al., 2002). Это перемещение осуществляется за счет непосредственного контакта FKBP52 с моторным белком динеином, способным перемещаться вдоль микротрубочек цитоскелета по направлению к ядру, с использованием АТФ в качестве источника энергии. Таким образом, за счет работы динеина вдоль микротрубочки движется содержащий ГР белковый комплекс (Harrell et al., 2004).

Установлено, что транспорт ГР в ядро происходит достаточно быстро. К настоящему времени проведено большое число исследований по динамике перехода гормон-рецепторных комплексов из цитоплазмы в клеточные ядра. Хотя эти исследования проводились на разных моделях (клеточные культуры, экспериментальные животные), с помощью различных методов и с использованием как природных, так и синтетических глюкокортикоидов, их

результаты практически идентичны. Во всех исследованиях показано, что время полуперехода в ядра гормон-рецепторных комплексов составляет 3–5 мин (см. примеры в работах (Picard, Yamamoto, 1987; Yang, DeFranco, 1994; Sackey et al., 1996; Hache et al., 1999; Savory et al., 1999; Conway-Campbell et al., 2007), что обеспечивает быструю передачу гормонального сигнала к воспринимающим этот сигнал регуляторным элементам генома (GREs).

Хроматиновый цикл

Согласно сложившимся в 80–90-е годы прошлого века представлениям, считалось, что после перехода в ядра гормон-рецепторные комплексы остаются в контакте с GREs в течение длительного времени, обеспечивая открытую структуру хроматина и способствуя связыванию других транскрипционных факторов, необходимых для активации транскрипции (Hager et al., 2000; McNally et al., 2000). Эти представления были подкреплены результатами изучения динамики взаимодействия ГР с опознаваемыми им сайтами в составе изолированных фрагментов ДНК. В частности, было показано, что время полужизни комплекса ГР с синтетическим глюкокортикоидом триамценолоном с фрагментом ДНК LTR MMTV, содержащим несколько GREs, составляет 108 мин (Perlmann et al., 1990).

Однако проведенные позднее эксперименты *in vivo* дали совершенно неожиданные результаты, продемонстрировав, что в живой клетке комплекс ГР с гормоном контактирует со своими сайтами на ДНК не более 5–10 с. Для проведения этих экспериментов была использована клеточная линия, содержащая в геноме tandem повторов LTR MMTV со множественными GREs (всего 800–1200 GREs в одном месте) и экспрессирующая ГР, слитый с флюоресцирующим белком GFP (Walker et al., 1999). Наличие такой линии позволило изучить динамику связывания ГР (в комплексе с синтетическим гормоном дексаметазоном) с GREs в живой клетке с помощью регистрации потери флюоресценции в результате лазерного отбеливания (fluorescence loss in photobleaching, FLIP) и восстановления флюоресценции после фотоотбеливания (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP). Было показано, что при связывании ГР, слитого с флюоресцирующим белком GFP, с местом компактной локализации сотен GREs в ядре клетки наблюдается яркая флюоресцирующая точка, которая исчезает после ее прицельного облучения лазером. Если бы ГР оставался связанным с GREs длительное время, облучение флюоресцирующей точки лазером приводило бы к ее исчезновению надолго, однако оказалось, что флюоресценция очень быстро восстанавливается за счет обмена «потухшего» ГР–GFP на свежий слитый белок из нуклеоплазмы (McNally et al., 2000; George et al., 2009).

Поскольку в обоих описанных экспериментах, *in vivo* и *in vitro*, использовались синтетические глюкокортикоиды, образующие комплексы с ГР с примерно одинаковой стабильностью, полученные противоречия в результатах этих экспериментов, очевидно, связаны с другими причинами. В частности, эти противоречия можно было бы объяснить, предположив, что в ядре клетки находятся факторы, способствующие быстрому сходу гормон-рецепторных комплексов с их мест связывания на ДНК в составе хроматина. И действительно, такие факторы были обнаружены среди белковых комплексов, привлекаемых ГР к месту своей посадки на LTR MMTV и необходимых для ремоделирования хроматина и, как следствие, активации транскрипции. Эти факторы были выявлены при изучении динамики связывания очищенного ГР (в комплексе с дексаметазоном) с искусственно реконструированным хроматином на фрагменте LTR MMTV (–437/+574), в точности воспроизводящем число и положение нуклеосом на этом участке в составе геномной ДНК (Fletcher et al., 2000). Связывание белков с иммобилизованным фрагментом хроматина фиксировалось (за счет образования ковалентных сшивок) периодическим облучением УФ лазером в течение 5 наносекунд, после чего их состав анализировался с помощью Вестерн-блот гибридазации. Оказалось, что при добавлении ГР вместе с белками SWI/SNF хроматин-ремоделирующего комплекса и необходимой для работы этого комплекса АТФ рецептор связывается с фрагментом LTR циклически, когда за одной минутой пребывания ГР в контакте с хроматином следовали 4–5 мин отсутствия рецептора в исследуемом препарате. При этом SWI/SNF комплекс осуществлял сходные циклы связывания/диссоциации (McNally et al., 2000; Nagaich et al., 2004). Было также показано, что

в отсутствие SWI/SNF или АТФ ГР находился в комплексе с иммобилизованным фрагментом хроматина постоянно (Fletcher et al., 2002; Nagaich et al., 2004). При уменьшении соотношения SWI/SNF:ГР с 1 : 1 до 0,1 : 1 время цикла увеличивалось до 15 мин (Nagaich et al., 2004).

Известно, что механизм глюкокортикоидной индукции многих генов включает привлечение глюкокортикоидным рецептором SWI/SNF хроматин-ремоделирующего комплекса к месту его посадки на GRE (Muchardt, Yaniv, 1993; King et al., 2012). В частности, показано, что взаимодействие ГР, связанного с GREs LTR MMTV, с SWI/SNF комплексом приводит к изменениям структуры нуклеосом на данном участке и деконденсации хроматина, что необходимо для связывания других транскрипционных факторов (NF1, OTF1) и, как следствие, активации процесса транскрипции (Richard-Foy, Hager, 1987; Archer et al., 1991; Truss et al., 1995). Таким образом, получается, что механизм, осуществляющий первые шаги активации транскрипции, одновременно запускает хроматиновый цикл ГР (рис. 2, а), обеспечивая быстрый сход рецепторного белка с его мест связывания на ДНК в составе хроматина (Nagaich et al., 2004).

Похожие результаты были получены и при изучении динамики хроматинового цикла рецепторов эстрогенов (ЭР) (Sharp et al., 2006), прогестерона (ПР) (Rayasam et al., 2005) и андрогенов (АР) (Klokk et al., 2007). В экспериментах также использовались клеточные линии, содержащие в геноме кассеты из сотен сайтов связывания этих белков. Соответственно, эти линии экспрессировали ЭР, АР либо ПР, слитые с GFP. Методом FRAP было показано, что так же, как и в случае с ГР, в живой клетке все эти рецепторы остаются связанными со своими сайтами на ДНК в течение недолгого времени – 3–8 с в случае ЭР и ПР, и 50 с – в случае АР. Кроме того, оказалось, что так же, как для оборота ГР, для осуществления хроматинового цикла ЭР, ПР и АР необходимо участие SWI/SNF хроматин-ремоделирующего комплекса (Rayasam et al., 2005; Sharp et al., 2006; Klokk et al., 2007).

Кроме хроматин-ремоделирующих комплексов на время пребывания ГР в контакте со своими сайтами связывания в составе хроматина могут оказывать влияние внутриядерные протеасомы и молекулярные шапероны. Так, протеасомы могут удалять ГР с его сайтов на ДНК, разрушая часть молекул рецептора. Об этом свидетельствуют данные об обнаружении протеасомных комплексов в участках связывания ГР в условиях *in vivo* и об увеличении времени пребывания ГР на его сайтах в составе хроматина в присутствии ингибитора протеасом MG132 (Stavreva et al., 2004). Имеются данные и о присутствии шаперонов hsp90 и p23 в участках связывания ГР в хроматине живых клеток (Freeman, Yamamoto, 2002). Однако они, по-видимому, оказывают противоположный эффект на взаимодействие ГР с его сайтами, так как в присутствии соответствующих ингибиторов время контакта ГР с этими сайтами уменьшается (Stavreva et al., 2004; Miranda et al., 2013).

В ходе осуществления хроматинового цикла связанный с гормоном ГР может перемещаться с GREs, контролирующих экспрессию одних генов, на GREs других генов. Таким образом, в ядре происходит стохастический

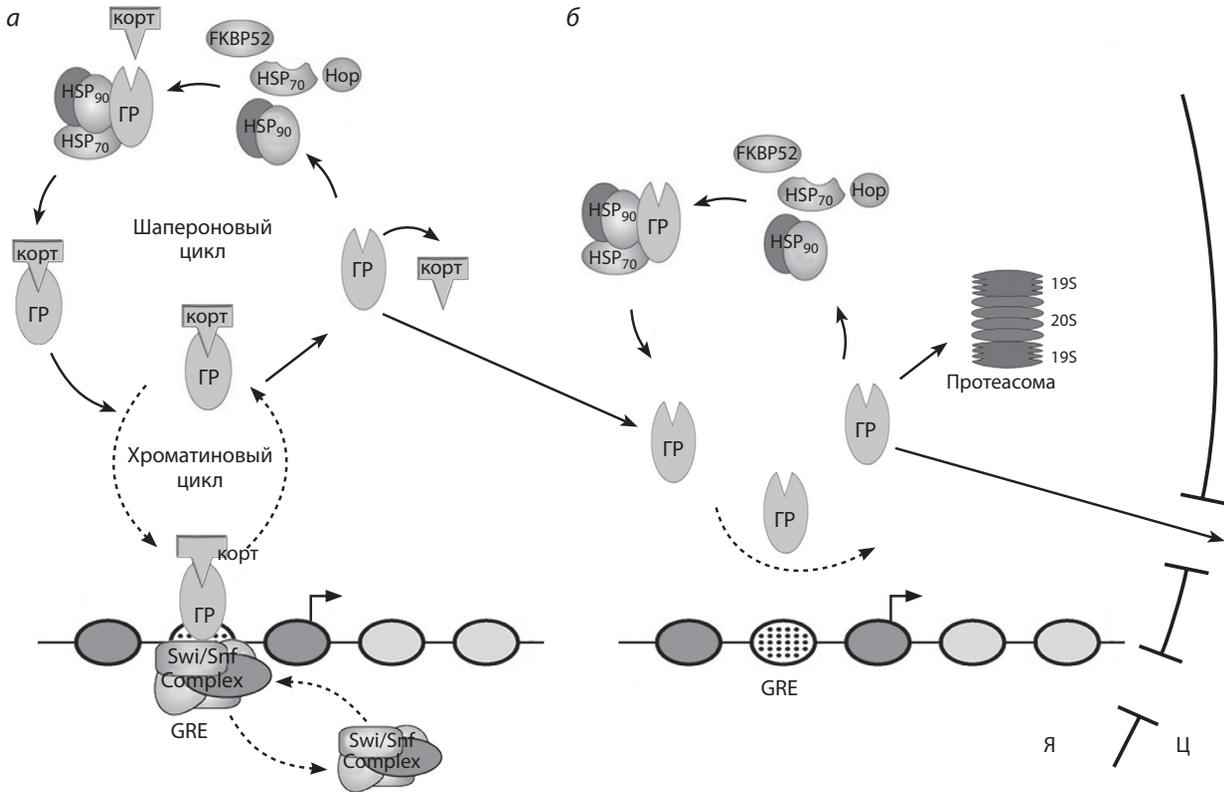


Рис. 2. Хроматиновый и шапероновый циклы ГР в ядре клетки.

а – после схода с регуляторного элемента (GRE) гормон-рецепторный комплекс либо осуществляет очередной хроматиновый цикл, либо диссоциирует. Свободный от гормона рецептор может вновь связаться с лигандом лишь после ассоциации с ядерным шапероновым комплексом. После связывания с гормоном ГР высвобождается из комплекса с шаперонами и возвращается в хроматиновый цикл; б – «холостой» шапероновый цикл, разрушение ГР протеасомами и выход из ядра. Ц – цитоплазма; Я – ядро; корт – гормон (кортизол – у человека, кортикостерон – у грызунов). (Адаптировано по: George et al., 2009.)

процесс оборота/перемещения гормон-рецепторных комплексов между генами-мишенями глюкокортикоидов. Если же гормон диссоциирует из комплекса, то ГР либо вступает в контакт с находящимися в ядре шаперонами и осуществляет внутриядерный шапероновый цикл, либо разрушается внутриядерными протеасомами, либо выводится из ядра клетки (рис. 2) (George et al., 2009; Stavreva et al., 2012; Vandevyver et al., 2012).

Внутриядерный шапероновый цикл ГР и выход рецептора из клеточного ядра

Известно, что молекулярные шапероны могут взаимодействовать со свободным от гормона ГР не только в цитоплазме клетки, но и в ее ядре (Sanchez et al., 1990; Liu, DeFranco, 1999). Показано, что в клеточном ядре присутствуют все шаперонные белки, в комплексе с которыми ГР принимает конформацию, позволяющую ему вновь связать гормон. Это белки теплового шока: hsp70 (Daugaard et al., 2007), hsp90 (Freeman, Yamamoto, 2002; Erlejan et al., 2014), hsp90-связывающий белок p23 (Freeman, Yamamoto, 2002), hsp70/hsp90 организующий белок Hop (Odunuga et al., 2004) и FKBP52 (Perrot-Appian et al., 1995). Предполагается, что так же, как и в цитоплазме, ГР взаимодействует с комплексом этих белков в ядре клетки и в результате оказывается способным вновь связаться

с гормоном, а образовавшиеся гормон-рецепторные комплексы вновь вступают в хроматиновый цикл (рис. 2, а). Такой оборот ГР в ядре, опосредованный его взаимодействием с шаперонами, был назван шапероновым циклом (George et al., 2009; Stavreva et al., 2012). При этом ГР может проходить шапероновый цикл и «вхолостую», когда связывания гормона не происходит (вероятнее всего, при его недостаточной концентрации в ядре клетки) и диссоциирующий из комплекса с шаперонами свободный от гормона ГР не взаимодействует с GREs и не оказывает влияния на транскрипцию генов-мишеней (рис. 2, б).

Наличие ядерного шаперонного цикла ГР может служить основным объяснением феномена длительного пребывания рецептора в клеточных ядрах. Известно, что, в отличие от быстрого перехода гормон-рецепторных комплексов в ядра (5–10 мин), время выхода рецепторных молекул из ядер после удаления гормона из окружающей среды измеряется несколькими часами (Sackey et al., 1996; Naché et al., 1999; Liu, DeFranco, 2000; Tago et al., 2004). Показано, что использование специфических ингибиторов hsp90 гельдамина и радицикола увеличивает скорость выхода ГР из клеточных ядер, при этом время пребывания ГР в ядрах может уменьшиться в несколько раз (Tago et al., 2004; Kakar et al., 2006). О существовании же «холостого» шаперонного цикла свидетельствуют данные о том, что

время выхода ГР из ядер не зависит от времени жизни гормон-рецепторных комплексов, вошедших в эти ядра. Так, установлено, что при использовании как природного глюкокортикоида кортизола (время полужизни комплексов ~ 15 мин (Stavreva et al., 2009)), так и синтетического дексаметазона (время полужизни комплексов ~ 8–10 ч (Stavreva et al., 2009)) время полувыхода ГР из ядер после удаления гормона из культуральной среды составляет 8–9 ч (Sackey et al., 1996; Naché et al., 1999; Tago et al., 2004). Учитывая быстрое (в течение 10–20 мин) разрушение кортизола в водной среде и биологических жидкостях (Conway-Campbell et al., 2012) следует заключить, что в экспериментах с использованием этого гормона ГР должен пребывать в ядрах длительное время в свободном от гормона состоянии и что именно связывание с шаперонами удерживает его в ядрах и обеспечивает защиту от деградации внутриядерными протеасомами за счет осуществления «холостых» шапероновых циклов.

Механизм выхода ГР из клеточного ядра пока еще довольно слабо изучен. Выяснено, что экспорт ГР из ядра осуществляется с участием одного из известных рецепторов ядерного экспорта – кальретикулина (Walther et al., 2003; Olkku, Mahonen, 2009). В присутствии ионов Ca^{2+} этот белок связывается с сигналом ядерного экспорта ГР, расположенным между двумя цинковыми пальцами его ДНК-связывающего домена (Holaska et al., 2001; Black et al., 2001). Показано, что удаление Ca^{2+} ингибирует экспорт ГР из клеточного ядра, а последующее его добавление приводит к восстановлению экспорта (Holaska et al., 2002). После выхода из ядра ГР или вступает в комплекс с шаперонами, восстанавливая способность связывать гормон и повторяя переход в ядра, или разрушается протеасомами (Liu, DeFranco, 2000).

Обсуждение

Рецептор глюкокортикоидов так же, как рецепторы других стероидных гормонов (эстрогенов, андрогенов, минералокортикоидов и прогестинов), был открыт более 40 лет назад. Открытие этих белков оказалось возможным благодаря химическому синтезу молекул гормонов, содержащих в своей структуре радиоактивный изотоп водорода – тритий. В частности, получение меченых тритием препаратов кортизола и дексаметазона позволило выявить внутриклеточный белок, обладающий высоким сродством и специфичностью к этим гормонам, который и был назван глюкокортикоидным рецептором (ГР) (Baxter, Tomkins, 1971; Beato et al., 1972). С использованием подходов, основанных на регистрации радиоактивности, были также получены первые данные о стимулируемом гормоном переходе ГР из цитоплазмы в ядро клетки и связывании его с хроматином и ДНК (Higgins et al., 1973; Rousseau et al., 1975; Simons et al., 1976).

Дальнейшее развитие работ по изучению динамики перехода ГР из цитоплазмы в клеточные ядра, внутриядерных перемещений рецептора, а также взаимодействия этого белка с его сайтами связывания на ДНК в составе хроматина произошло благодаря становлению современной методической базы молекулярно-генетических исследований, которое в основном пришлось на последнюю четверть прошлого века. В этот период были

осуществлены молекулярное клонирование и секвенирование белок-кодирующей части гена ГР; определены функциональные домены белка-рецептора (Danielsen et al., 1986); получен высокоочищенный ГР (Wrange et al., 1979); открыты специфические сайты его связывания на ДНК (GREs) (Payvar et al., 1981; Beato et al., 1989); изучены кинетические параметры взаимодействия ГР/GRE (Perlmann et al., 1990; Drouin et al., 1992); получены моноклональные антитела к ГР (Gametchu, Harrison, 1984); создана плазмидная конструкция, экспрессирующая ГР, слитый с флюоресцирующим белком GFP (Carey et al., 1996), и получены линии клеток со стабильной экспрессией слитого белка (Walker et al., 1999), а также накоплено большое число данных о взаимодействиях ГР с другими регуляторными белками (Kino et al., 1999; Wallberg et al., 2000; Schoneveld et al., 2004; Merkulov, Merkulova, 2009). С одной стороны, все это позволило существенно продвинуться в понимании того, как ГР функционирует в живой клетке, а с другой – породило множество новых вопросов, в том числе связанных с динамикой хроматинового и внутриядерного шаперонового циклов.

Ряд таких вопросов касается времени взаимодействия ГР и других факторов транскрипции с их сайтами связывания на ДНК в живой клетке. Пока все данные о быстром (измеряемом секундами) обороте транскрипционных факторов были получены на ограниченном числе искусственных экспериментальных моделей. Эти модели представляют собой клеточные линии, содержащие в геноме кассеты из сотен сайтов связывания и экспрессирующие изучаемый фактор транскрипции, слитый с GFP. Кроме оборота рецепторов стероидных гормонов, принадлежащих одному семейству факторов транскрипции (ГР, ЭР, ПР и АР) (McNally et al., 2000; Rayasam et al., 2005; Sharp et al., 2006; Klock et al., 2007), в такой системе был исследован также оборот неродственного им фактора NF-κB. Оказалось, что и этот фактор остается связанным со своими сайтами на ДНК в течение недолгого времени и завершает хроматиновый цикл приблизительно за 30 с (Bosisio et al., 2006). Однако использование кассет из сотен сайтов связывания и повышенная концентрация как транскрипционных факторов, так и взаимодействующих с ними коактиваторов и ремоделеров хроматина в одном месте могут приводить к кооперативным эффектам, следствием которых, возможно, и является столь короткое время хроматинового цикла. Если это так, то в естественных условиях на одиночных сайтах или небольших их группах в геноме время хроматинового цикла может быть иным, в том числе гораздо большим. Ответа на этот вопрос пока нет, поскольку имеющиеся методические средства не позволяют проводить подобные исследования на отдельных сайтах.

Если же допустить, что быстрый оборот фактора может происходить и на одиночных сайтах, возникает новый вопрос о том, касается ли это всех сайтов связывания данного фактора в геноме. В частности, для ГР показано, что такой оборот происходит при участии SWI/SNF хроматин-ремоделирующего комплекса, когда рецептор связывается с GREs, находящимися в составе нуклеосомы (Nagaich et al., 2004) (рис. 2, а). Однако недавно при изучении связывания ГР в масштабах генома было

показано, что только порядка 10–15 % мест связывания рецептора попадают в районы «закрытого» хроматина, где ГР выступает в качестве фактора-пионера, привлекая к ним хроматин-ремоделирующие комплексы. Остальные GREs локализованы в участках уже ремоделированного открытого хроматина (John et al., 2011). Какова динамика взаимодействия ГР с GREs, расположенными в «открытом» хроматине, пока не известно. Также неизвестно, какова динамика взаимодействия ГР с GREs в случае, если для стимулируемой ГР деконденсации хроматина требуются другие хроматин-ремоделирующие белки (John et al., 2008). Все эти вопросы требуют отдельного изучения, возможно, с использованием содержащих GREs каскад регуляторных районов генов с различными механизмами глюкокортикоидной индукции.

Возникают также вопросы относительно внутриядерного шаперонового цикла. Прежде всего, существуют серьезные различия в оценках времени пребывания ГР в клеточных ядрах. С одной стороны, эксперименты на трансфицированных ГР линиях клеток COS7 и GrH2, выполненные с помощью непрямого иммунофлюоресцентного анализа, показали, что после удаления из культуральной среды природного глюкокортикоида кортизола время полувыхода ГР из ядер составляет 8–9 ч (Sackey et al., 1996; Naché et al., 1999). Такая же динамика выхода ГР из ядер клеток COS7 наблюдалась и при использовании в качестве лиганда синтетического глюкокортикоида дексаметазона, хотя в этом случае регистрировалась флюоресценция ГР-GFP слитого белка (Tago et al., 2004). С другой стороны, из трансфицированных ГР клеток COS1 рецептор полностью выходил через 4–8 ч после отмычки кортикостерона (для регистрации использовали метод непрямого иммунофлюоресцентного анализа) (Liu, DeFranco, 2000). Более того, в экспериментах *in vivo* методом иммуногистохимии было показано, что ГР полностью выходит из ядер пирамидальных клеток CA1 гиппокампа в течение одного часа после прекращения подачи кортикостерона (Conway-Campbell et al., 2010). Хотя этих данных пока немного, их анализ показывает, что различия в полученных оценках времени выхода ГР из ядер вряд ли являются следствием использования разных методов или разных (природных или синтетических) гормонов. Было выдвинуто предположение, что время пребывания ГР в ядрах, вероятнее всего, определяется типом клеток (Walther et al., 2003). Однако даже для простого подтверждения такого предположения требуется существенно больший объем данных по времени выхода ГР из ядер клеток различных типов. Если же предположение окажется справедливым, большой интерес будет представлять выяснение механизмов и физиологического значения такой клеточной специфичности, в частности особенностей шаперонового цикла в разных типах клеток.

Остается также неясным, какая часть ГР разрушается внутриядерными протеасомами, какое количество рецептора возвращается в цитоплазму и вновь приобретает активность в результате связывания с комплексом шаперонов. Представляется весьма вероятным, что эффективность этих процессов должна определяться как типом клеток, так и их состоянием. Однако данные об этом пока отсутствуют.

Очевидно, получение ответа на все поставленные вопросы будет зависеть от дальнейшего развития методической базы молекулярной, клеточной и физико-химической биологии, включающего появление принципиально новых и совершенствование существующих методов массового анализа ДНК/белковых и белок/белковых взаимодействий как *in vitro*, так и в живой клетке.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке базового бюджетного проекта № VI.58.1.2.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Смирнов А.Н. Ядерные рецепторы: номенклатура, лиганды, механизмы влияния на экспрессию генов. Биохимия. 2002;67:1157-1181.
- Archer T.K., Cordingley M.G., Wolford R.G., Hager G.L. Transcription factor access is mediated by accurately positioned nucleosomes on the mouse mammary tumor virus promoter. Mol. Cell. Biol. 1991;11(2):688-698. DOI: 10.1128/MCB.11.2.688
- Baxter J.D., Tomkins G.M. Specific cytoplasmic glucocorticoid hormone receptors in hepatoma tissue culture cells. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1971;68(5):932-937.
- Beato M., Chalepakis G., Schauer M., Slater E.P. DNA regulatory elements for steroid hormones. J. Steroid. Biochem. 1989;32(5):737-748. DOI: 10.1016/0022-4731(89)90521-9
- Beato M., Kalimi M., Feigelson P. Correlation between glucocorticoid binding to specific liver cytosol receptors and enzyme induction *in vivo*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1972;47(6):1464-1472. DOI: 10.1016/0006-291X(72)90237-9
- Beato M., Klug J. Steroid hormone receptors: an update. Hum. Reprod. Update. 2000;6(3):225-236. DOI: 10.1093/humupd/6.3.225
- Black B.E., Holaska J.M., Rastinejad F., Paschal B.M. DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. Curr. Biol. 2001;11(22):1749-1758. DOI: 10.1016/S0960-9822(01)00537-1
- Bosisio D., Marazzi I., Agresti A., Shimizu N., Bianchi M.E., Natoli G. A hyper-dynamic equilibrium between promoter-bound and nucleoplasmic dimers controls NF- κ B-dependent gene activity. EMBO J. 2006;25(4):798-810. DOI 10.1038/sj.emboj.7600977
- Boumpas D.T., Chrousos G.P., Wilder R.L., Cupps T.R., Balow J.E. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. Ann. Intern. Med. 1993;119(12):1198-1208. DOI: 10.7326/0003-4819-119-12-199312150-00007
- Bresnick E.H., Dalman F.C., Sanchez E.R., Pratt W.B. Evidence that the 90-kDa heat shock protein is necessary for the steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor. J. Biol. Chem. 1989;264(9):4992-4997.
- Carey K.L., Richards S.A., Lounsbury K.M., Macara I.G. Evidence using a green fluorescent protein-glucocorticoid receptor chimera that the Ran/TC4 GTPase mediates an essential function independent of nuclear protein import. J. Cell. Biol. 1996;133(5):985-996. DOI: 10.1083/jcb.133.5.985
- Cheung J., Smith D.F. Molecular shaperone interactions with steroid receptors: an update. Mol. Endocrinol. 2000;14(7):939-946. DOI: 10.1210/me.14.7.939
- Conway-Campbell B.L., McKenna M.A., Wiles C.C., Atkinson H.C., de Kloet E.R., Lightman S.L. Proteasome-dependent down-regulation of activated nuclear hippocampal glucocorticoid receptors determines dynamic responses to corticosterone. Endocrinology. 2007;148(11):5470-5547. DOI: 10.1210/en.2007-0585
- Conway-Campbell B.L., Pooley J.R., Hager G.L., Lightman S.L. Molecular dynamics of ultradian glucocorticoid receptor action. Mol. Cell

- Endocrinol. 2012;348(2):383-393. DOI: 10.1016/j.mce.2011.08.014
- Conway-Campbell B.L., Sarabdjitsingh R.A., McKenna M.A., Pooley J.R., Kershaw Y.M., Meijer O.C., De Kloet E.R., Lightman S.L. Glucocorticoid ultradian rhythmicity directs cyclical gene pulsing of the clock gene period 1 in rat hippocampus. *J. Neuroendocrinol.* 2010;22(10):1093-100. DOI: 10.1111/j.1365-2826.2010.02051.x
- Danielsen M., Northrop J.P., Ringold G.M. The mouse glucocorticoid receptor: mapping of functional domains by cloning, sequencing and expression of wild-type and mutant receptor proteins. *EMBO J.* 1986;5(10):2513-2522.
- Daugaard M., Rohde M., Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.* 2007;581(19):3702-3710. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.05.039
- Davies T.H., Ning Y.M., Sánchez E.R. A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *J. Biol. Chem.* 2002;277(7):4597-4600. DOI: 10.1074/jbc.C100531200
- Drouin J., Sun Y.L., Tremblay S., Lavender P., Schmidt T.J., de Léan A., Nemer M. Homodimer formation is rate-limiting for high affinity DNA binding by glucocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol.* 1992;6(8):1299-1309. DOI: 10.1210/me.6.8.1299
- Echeverria P.C., Picard D. Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010;1803(6):641-649. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2009.11.012
- Erlejan A.G., Lagadari M., Toneatto J., Piwien-Pilipuk G., Galigniana M.D. Regulatory role of the 90-kDa-heat-shock protein (Hsp90) and associated factors on gene expression. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014;1839(2):71-87. DOI: 10.1016/j.bbagr.2013.12.006
- Fletcher T.M., Ryu B.W., Baumann C.T., Warren B.S., Fragoso G., John S., Hager G.L. Structure and dynamic properties of a glucocorticoid receptor-induced chromatin transition. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20(17):6466-6475. DOI: 10.1128/MCB.20.17.6466-6475.2000
- Fletcher T.M., Xiao N., Mautino G., Baumann C.T., Wolford R., Warren B.S., Hager G.L. ATP-dependent mobilization of the glucocorticoid receptor during chromatin remodeling. *Mol. Cell. Biol.* 2002;22(10):3255-3263. DOI: 10.1128/MCB.22.10.3255-3263.2002
- Freeman B.C., Yamamoto K.R. Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones. *Science.* 2002;296(5576):2232-2235. DOI:10.1126/science.1073051
- Freedman N.D., Yamamoto K.R. Importin 7 and Importin {alpha}/Importin {beta} Are Nuclear Import Receptors for the Glucocorticoid Receptor. *Mol. Biol. Cell.* 2004;15(5):2276-3386. DOI: 10.1091/mbc.E03-11-0839
- Gametchu B., Harrison R.W. Characterization of a monoclonal antibody to the rat liver glucocorticoid receptor. *Endocrinology.* 1984;114(1):274-279. DOI: http://dx.doi.org/10.1210/endo-114-1-274
- George A.A., Schiltz R.L., Hager G.L. Dynamic access of the glucocorticoid receptor to response elements in chromatin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2009;41(1):214-224. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.09.019
- Grad I., Picard D. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2007;275(1/2):2-12. DOI: 10.1016/j.mce.2007.05.018
- Grenert J.P., Johnson B.D., Toft D.O. The importance of ATP binding and hydrolysis by hsp90 in formation and function of protein heterocomplexes. *J. Biol. Chem.* 1999;274(25):17525-17533. DOI: 10.1074/jbc.274.25.17525
- Haché R.J., Tse R., Reich T., Savory J.G., Lefebvre Y.A. Nucleocytoplasmic trafficking of steroid-free glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 1999;274(3):1432-1439. DOI: 10.1074/jbc.274.3.1432
- Hager G.L., Fletcher T.M., Xiao N., Baumann C.T., Müller W.G., McNally J.G. Dynamics of gene targeting and chromatin remodeling by nuclear receptors. *Biochem. Soc. Trans.* 2000;28(4):405-410. DOI: 10.1042/0300-5127:0280405
- Harrell J.M., Murphy P.J., Morishima Y., Chen H., Mansfield J.F., Galigniana M.D., Pratt W.B. Evidence for glucocorticoid receptor transport on microtubules by dynein. *J. Biol. Chem.* 2004;279(52):54647-54654. DOI: 10.1074/jbc.M406863200
- Hierholzer K., Buhler H. Metabolism of cortical steroid hormones and their general mode of action. *Comprehensive human physiology.* Ed. R. Greger, U. Windhorst. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1996. DOI: 10.1007/978-3-642-60946-6_21
- Higgins S.J., Rousseau G.G., Baxter J.D., Tomkins G.M. Early events in glucocorticoid action. Activation of the steroid receptor and its subsequent specific nuclear binding studied in a cell-free system. *J. Biol. Chem.* 1973;248(16):5866-5872.
- Holaska J.M., Black B.E., Love D.C., Hanover J.A., Leszyk J., Paschal B.M. Calreticulin is a receptor for nuclear export. *J. Cell Biol.* 2001;152(1):127-140. DOI: 10.1083/jcb.152.1.127
- Holaska J.M., Black B.E., Rastinejad F., Paschal B.M. Ca²⁺-dependent nuclear export mediated by calreticulin. *Mol. Cell. Biol.* 2002;22(17):6286-6297. DOI: 10.1128/MCB.22.17.6286-6297.2002
- John S., Sabo P.J., Johnson T.A., Sung M.H., Biddie S.C., Lightman S.L., Voss T.C., Davis S.R., Meltzer P.S., Stamatoyannopoulos J.A., Hager G.L. Interaction of the glucocorticoid receptor with the global chromatin landscape. *Mol. Cell.* 2008;29(5):611-624. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.02.010
- John S., Sabo P.J., Thurman R.E., Sung M.H., Biddie S.C., Johnson T.A., Hager G.L., Stamatoyannopoulos J.A. Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns. *Nat. Genet.* 2011;43(3):264-268. DOI: 10.1038/ng.759
- Kakar M., Kanwal C., Davis J.R., Li H., Lim C.S. Geldanamycin, an inhibitor of Hsp90, blocks cytoplasmic retention of progesterone receptors and glucocorticoid receptors via their respective ligand binding domains. *AAPS J.* 2006;8(4):E718-E728. DOI: 10.1208/aapsj080481
- King H.A., Trotter K.W., Archer T.K. Chromatin remodeling during glucocorticoid receptor regulated transactivation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012;1819;7:716-726. DOI: 10.1016/j.bbagr.2012.02.019
- Kino T., Nordeen S.K., Chrousos G.P. Conditional modulation of glucocorticoid receptor activities by CREB-binding protein (CBP) and p300. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 1999;70(1/3):15-25. DOI: 10.1016/S0960-0760(99)00100-4
- Klokk T.I., Kurys P., Elbi C., Nagaich A.K., Hendarwanto A., Slagsvold T., Chang C.Y., Hager G.L., Saatcioglu F. Ligand-specific dynamics of the androgen receptor at its response element in living cells. *Mol. Cell. Biol.* 2007;27(5):1823-1843. DOI: 10.1128/MCB.01297-06
- Liu J., DeFranco D.B. Chromatin recycling of glucocorticoid receptors: implications for multiple roles of heat shock protein 90. *Mol. Endocrinol.* 1999;13(3):355-365. DOI: 10.1210/me.13.3.355
- Liu J., DeFranco D.B. Protracted nuclear export of glucocorticoid receptor limits its turnover and does not require the exportin 1/CRM1-directed nuclear export pathway. *Mol. Endocrinol.* 2000;14(1):40-51. DOI: 10.1210/me.14.1.40
- Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R.M. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 1995;83(6):835-839. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90199-X
- Marfori M., Mynott A., Ellis J.J., Mehdi A.M., Saunders N.F., Curmi P.M., Forwood J.K., Bodén M., Kobe B. Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011;1813(9):1562-1577. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2010.10.013
- Merkulov V.M., Merkulova T.I. Structural variants of glucocorticoid receptor binding sites and different versions of positive glucocorticoid responsive elements: Analysis of GR-TRRD database. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2009;115:1-8. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2009.02.003
- McNally J.G., Müller W.G., Walker D., Wolford R., Hager G.L. The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science.* 2000;287(5456):1262-1265. DOI:10.1126/science.287.5456.1262
- Miranda T.B., Morris S.A., Hager G.L. Complex genomic interactions in the dynamic regulation of transcription by the glucocorticoid receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2013;380(1/2):16-24. DOI: 10.1016/j.mce.2013.03.002

- Muchardt C., Yaniv M. A human homologue of *Sacharomyces cerevisia* *SNF2/SWI2* and *Drosophila bhm* genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 1993;12(11):4279-4290.
- Nagaich A.K., Walker D.A., Wolford R., Hager G.L. Rapid periodic binding and displacement of the glucocorticoid receptor during chromatin remodeling. *Mol. Cell.* 2004;14:163-174.
- Nakielny S., Dreyfuss G. Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell.* 1999;99(7):677-690. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81666-9
- Nemoto T., Ohara-Nemoto Y., Denis M., Gustafsson J.A. The transformed glucocorticoid receptor has a lower steroid-binding affinity than the nontransformed receptor. *Biochemistry.* 1990;29(7):1880-1886.
- Nicolaides N.C., Galata Z., Kino T., Chrousos G.P., Charmandari E. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids.* 2010;75(1):1-12. DOI: 10.1016/j.steroids.2009.09.002
- Odonuga O.O., Longshaw V.M., Blatch G.L. Hop: more than an Hsp70/Hsp90 adaptor protein. *Bioessays.* 2004;26(10):1058-1068. DOI: 10.1002/bies.20107
- Okret S., Wikstrom A.C., Gustafsson J.A. Molybdate-stabilized glucocorticoid receptor: evidence for a receptor heteromer. *Biochemistry.* 1985;24(23):6581-6586.
- Olkku A., Mahonen A. Calreticulin mediated glucocorticoid receptor export is involved in beta-catenin translocation and Wnt signaling inhibition in human osteoblastic cells. *Bone.* 2009;44(4):555-565. DOI: 10.1016/j.bone.2008.11.013
- Payvar F., Wrangle O., Carlstedt-Duke J., Okret S., Gustafsson J.A., Yamamoto K.R. Purified glucocorticoid receptors bind selectively *in vitro* to a cloned DNA fragment whose transcription is regulated by glucocorticoids *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981;78(11):6628-6632.
- Perlmann T., Eriksson P., Wrangle O. Quantitative analysis of glucocorticoid receptor-DNA interaction at the mouse mammary tumor virus glucocorticoid response element. *J. Biol. Chem.* 1990;265(8):17222-17229.
- Perrot-Appianat M., Cibert C., Geraud G., Renoir J.M., Baulieu E.E. The 59 kDa FK506-binding protein, a 90 kDa heat shock protein binding immunophilin (FKBP59-HBI), is associated with the nucleus, the cytoskeleton and mitotic apparatus. *J. Cell. Sci.* 1995;108 (Pt 5):2037-2051.
- Picard D., Yamamoto K.R. Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 1987; 6(11):3333-3340.
- Pratt W.B. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 1993;268(29):21455-21458.
- Pratt W.B., Toft D.O. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 1997;18(3):306-360. DOI: 10.1210/edrv.18.3.0303
- Pratt W.B., Galigniana M.D., Morishima Y., Murphy P.J. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem.* 2004;40:41-58.
- Rayasam G.V., Elbi C., Walker D.A., Wolford R.G., Fletcher T.M., Edwards D.P., Hager G.L. Ligand specific dynamics of the progesterone receptor in living cells and during chromatin remodeling *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* 2005;25(6):2406-2418. DOI: 10.1128/MCB.25.6.2406-2418.2005
- Richard-Foy H., Hager G.L. Sequence-specific positioning of nucleosomes over the steroid-inducible MMTV promoter. *EMBO J.* 1987; 6(8):2321-2328.
- Rousseau G.G., Higgins S.J., Baxter J.D., Gelfand D., Tomkins G.M. Binding of glucocorticoid receptors to DNA. *J. Biol. Chem.* 1975; 250(15):6015-6021.
- Sackey F.N., Haché R.J., Reich T., Kwast-Welfeld J., Lefebvre Y.A. Determinants of subcellular distribution of the glucocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol.* 1996;10(10):1191-1205. DOI: 10.1210/mend.10.10.9121487
- Sanchez E.R., Hirst M., Scherrer L.C., Tang H.-Y., Welsh M.J., Harmon J.M., Simons S.S. Jr., Ringold G.M., Pratt W.B. Hormone-free mouse glucocorticoid receptors overexpressed in Chinese hamster ovary cells are localized to the nucleus and are associated with both hsp70 and hsp90. *J. Biol. Chem.* 1990;265(33):20123-20130.
- Savory J.G., Hsu B., Laquian I.R., Giffin W., Reich T., Haché R.J., Lefebvre Y.A. Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Mol. Cell. Biol.* 1999;19(2):1025-1037.
- Schmid W., Cole T.J., Blendy J.A., Schutz G. Molecular genetic analysis of glucocorticoid signalling in development. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 1995;53(1/6):33-35. DOI: 10.1016/0960-0760(95)00038-2
- Schoneveld O.J., Gaemers I.C., Lamers W.H. Mechanisms of glucocorticoid signaling. *Biochem. Biophys. Acta.* 2004;1680(2):114-128. DOI: 10.1016/j.bbexp.2004.09.004
- Sharp Z.D., Mancini M.G., Hinojos C.A., Dai F., Berno V., Szafaran A.T., Smith K.P., Lele T.T., Ingber D.E., Mancini M.A. Estrogen-receptor-alpha exchange and chromatin dynamics are ligand- and domain-dependent. *J. Cell. Sci.* 2006;119(19):4101-4116. DOI: 10.1242/jcs.03161
- Simons S.S. Jr., Martinez H.M., Garcea R.L., Baxter J.D., Tomkins G.M. Interaction of glucocorticoid receptor-steroid complexes with acceptor sites. *J. Biol. Chem.* 1976;251(2):334-343.
- Stavreva D.A., Müller W.G., Hager G.L., Smith C.L., McNally J.G. Rapid glucocorticoid receptor exchange at a promoter is coupled to transcription and regulated by chaperones and proteasomes. *Mol. Cell. Biol.* 2004;24(7):2682-2697. DOI: 10.1128/MCB.24.7.2682-2697.2004
- Stavreva D.A., Varticovski L., Hager G.L. Complex dynamics of transcription regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012;1819(7):657-666. DOI: 10.1016/j.bbagr.2012.03.004
- Stavreva D.A., Wiench M., John S., Conway-Campbell B.L., McKenna M.A., Pooley J.R., Johnson T.A., Voss T.C., Lightman S.L., Hager G.L. Ultradian hormone stimulation induces glucocorticoid receptor-mediated pulses of gene transcription. *Nat. Cell Biol.* 2009; 11(9):1093-1102. DOI: 10.1038/ncb1922
- Tago K., Tsukahara F., Naruse M., Yoshioka T., Takano K. Regulation of nuclear retention of glucocorticoid receptor by nuclear Hsp90. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2004;213(2):131-138. DOI: 10.1016/j.mce.2003.10.057
- Truss M., Bartsch J., Schelbert A., Hache R.J., Beato M. Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter *in vivo*. *EMBO J.* 1995;14(8):1737-1751.
- Vandevyver S., Dejager L., Libert C. On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back. *Traffic.* 2012;13(3):364-374. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2011.01288.x
- Wallberg A.E., Flinn E.M., Gustafsson J.A., Wright A.P. Recruitment of chromatin remodelling factors during gene activation via the glucocorticoid receptor N-terminal domain. *Biochem. Soc. Trans.* 2000;28(4):410-414. DOI: 10.1042/bst0280410
- Walker D., Htun H., Hager G.L. Using inducible vectors to study intracellular trafficking of GFP-tagged steroid/nuclear receptors in living cells. *Methods.* 1999;19(3):386-393. DOI: 10.1006/meth.1999.0874
- Walther R.F., Lamprecht C., Ridsdale A., Groulx I., Lee S., Lefebvre Y.A., Hache R.J. Nuclear export of the glucocorticoid receptor is accelerated by cell fusion-dependent release of calreticulin. *J. Biol. Chem.* 2003;278(39):37858-37864. DOI: 10.1074/jbc.M306356200
- Wrangle O., Carlstedt-Duke J., Gustafsson J.A. Purification of the glucocorticoid receptor from rat liver cytosol. *J. Biol. Chem.* 1979;254(18):9284-9290.
- Yang J., DeFranco D.B. Differential roles of heat shock protein 70 in the *in vitro* nuclear import of glucocorticoid receptor and simian virus 40 large tumor antigen. *Mol. Cell. Biol.* 1994;14(8):5088-5098. DOI: 10.1128/MCB.14.8.5088

Профиль экспрессии длинных и коротких РНК в цитоплазме и ядрах растущих ооцитов домашней курицы (*Gallus gallus domesticus*)

А.В. Красикова¹, А.В. Федоров^{1, 2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

² Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Материнская РНК, накапливаемая в ооците во время созревания, необходима не только для формирования зиготы, но и для поддержания определенного числа клеточных делений до активации генома зародыша. К одним из существенных этапов исследования транскриптома ооцитов относятся адаптация методик экстракции РНК и характеристика профиля экспрессии РНК. Адекватной моделью для исследования динамики накопления РНК в ходе оогенеза представляются яичники domesticированных видов птиц. В настоящей работе оптимизированы методы экстракции РНК из цитоплазмы и нуклеоплазмы ооцитов домашней курицы (*Gallus gallus domesticus*) и охарактеризованы изменения в профиле длинных и коротких РНК в ходе роста ооцита. Во фракциях РНК из цитоплазмы ооцитов курицы выявлено наличие 28S и 18S рибосомных РНК (рРНК), малых РНК и гетерогенных по размеру длинных РНК. В профиле тотальной РНК из ядер растущих ооцитов присутствуют преимущественно пики низкомолекулярной РНК, соответствующей по размеру транспортным, малым ядерным и коротким регуляторным РНК. В ядрах растущих ооцитов самок курицы зарегистрированы следовые количества или отсутствие 28S и 18S рРНК, что обусловлено инактивацией единственного ядрышкового организатора. В ооцитах домашней курицы выявлены три отличающиеся по размеру группы коротких (от 20 до 40 н.) РНК, которые могут соответствовать классам коротких регуляторных РНК. Показано накопление коротких РНК в цитоплазме ооцита курицы в ходе его роста. Предполагается, что запасаемые в цитоплазме ооцитов птиц короткие РНК могут использоваться на ранних стадиях эмбриогенеза для регуляции функций генома.

Ключевые слова: домашняя курица; короткие РНК; материнская РНК; некодирующие РНК; ооцит; оогенез; рибосомная РНК.

Expression profiles of long and short RNAs in the cytoplasm and nuclei of growing chicken (*Gallus gallus domesticus*) oocytes

A.V. Krasikova¹, A.V. Fedorov^{1, 2}

¹ Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

² Almazov Federal Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russia

Maternal RNAs accumulated during oocyte maturation are required not only for zygote formation but also for supporting the first embryonic cell divisions until embryo genome activation. Essential stages of transcriptome analysis include adaptation of RNA extraction procedures and characterization of the RNA expression profile. Ovaries of domestic birds represent an adequate model for exploration of RNA accumulation during oogenesis. In the present study, we optimized methods of RNA extraction from chicken (*Gallus gallus domesticus*) oocyte cytoplasm and nucleoplasm and characterized changes in profiles of long and short RNAs during oocyte growth. Cytoplasmic RNA fractions contained 28S and 18S ribosomal RNAs (rRNAs), small RNAs, and long RNAs heterogeneous in size. The profiles of total RNA from growing oocyte nuclei were dominated by low molecular weight RNAs corresponding in size to transport RNAs, small nuclear RNAs, and short regulatory RNAs. Importantly, oocyte nuclei from chicken egg-laying females demonstrated trace amounts or absence of 28S and 18S rRNA, which was due to inactivation of the only nucleolar organizer. Three groups of short RNAs differing in size (from 20 to 40 nucleotides) were recognized in chicken oocytes. They might correspond to short regulatory RNA classes. Furthermore, we demonstrated that short RNAs were accumulated in the cytoplasm during oocyte growth. We suggest that short RNAs accumulated in avian oocyte cytoplasm are involved in the regulation of genome functions at early embryogenesis stages.

Key words: domestic chicken; non-coding RNA; short RNA; maternal RNA; oocyte; oogenesis; ribosomal RNA.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Красикова А.В., Федоров А.В. Профиль экспрессии длинных и коротких РНК в цитоплазме и ядрах растущих ооцитов домашней курицы (*Gallus gallus domesticus*). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):264-269.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Krasikova A.V., Fedorov A.V. Expression profiles of long and short RNAs in the cytoplasm and nuclei of growing chicken (*Gallus gallus domesticus*) oocytes. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(3):264-269.

УДК 577.214

Поступила в редакцию 12.01.2015 г.

Принята к публикации 28.04.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

Исследования спектра транскрибируемых последовательностей ДНК в разных тканях позвоночных, в том числе наиболее распространенных модельных организмов, далеки от завершения. Особенно мало внимания уделяется высокопроизводительному анализу транскриптома ооцита и РНК, передаваемой с цитоплазмой ооцита в эмбрионы (материнской РНК) (Fair et al., 2007; Huang, Wells, 2010). Высокопроизводительный анализ, с помощью которого можно не только изучать известные транскрипты, но и открывать новые РНК, подразумевает массовое параллельное секвенирование всего набора молекул РНК, синтезируемых в данном типе клеток или тканей. Актуальность исследования транскриптома ооцитов обусловлена ролью материнской РНК, передаваемой с цитоплазмой яйцеклетки, в ранних этапах развития эмбриона.

Следует отметить, что ооциты птиц представляют собой адекватную модель для исследования динамики накопления материнской РНК. Так, яичник яйцекладущей курицы (*Gallus gallus domesticus*) состоит из неиерархических фолликулов и созревающих преовуляторных фолликулов, классифицируемых в зависимости от размера (от стадии F6 к стадии F1). Эмбриональный геном курицы активируется, когда эмбрион содержит 30–50 клеток, через 24 ч после оплодотворения (Zagris et al., 1998). Таким образом, материнская РНК, накапливаемая в ооците курицы в ходе созревания, необходима не только для оплодотворения и формирования зиготы, но и для поддержания определенного числа делений эмбриональных клеток до активации генома самого зародыша.

Для изучения транскриптома ооцитов могут быть выбраны растущие ооциты домашней курицы. Выбор такого объекта исследования связан с завершением проекта по секвенированию генома курицы, средним размером генома (1,2 Gbp) и низким содержанием повторов в геноме, наличием подробных генетических карт хромосом этого вида и различных доступных молекулярно-генетических инструментов (таких как экспрессионные микрочипы, базы данных поли(A)- и коротких РНК различных тканей и разных стадий развития) (Froman et al., 2006; Cogburn et al., 2007; Nie et al., 2010).

В настоящей работе оптимизированы методы экстракции РНК из ооцитной цитоплазмы и нуклеоплазмы ооцитов курицы и охарактеризованы изменения в профиле длинных гетерогенных и коротких РНК в ходе роста ооцита.

Материалы и методы

Получение препаратов ядер и цитоплазмы ооцитов

Для получения фракций цитоплазмы и нуклеоплазмы ооцитов яйцекладущих самок домашней курицы (*G. g. domesticus*) был использован стандартный протокол (<http://projects.exeter.ac.uk/lampbrush/protocols.htm>). Ядра (зародышевые пузырьки) отделяли от остального содержимого ооцита и его оболочек микрохирургическим путем с помощью вольфрамовых игл в среде «5:1 + фосфаты» (83,0 mM KCl, 17,0 mM NaCl, 6,5 mM Na₂HPO₄, 3,5 mM KH₂PO₄, 1 mM MgCl₂) при наблюдении под стереомикроскопом (Krasikova et al., 2012). Наиболее оптимальными

для изолирования ядер оказались белые неиерархические фолликулы. Выделяемые микрохирургически ядра и энуклеированные (лишенные ядер) ооциты без слоя фолликулярных клеток (т. е. цитоплазма ооцитов) незамедлительно помещали на лед и использовали для выделения РНК.

Выделение общей РНК из цитоплазмы и нуклеоплазмы ооцитов курицы

Были оптимизированы методы выделения РНК из различных тканей домашней курицы, включая печень и яичник, а также из изолированных ядер ооцитов и энуклеированных ооцитов разного размера. РНК выделяли с помощью реагента TRIzol (Invitrogen), согласно рекомендациям производителя, с некоторыми модификациями, а именно после лизиса в TRIzol экстракт дополнительно центрифугировали при 12 тыс. об/мин в течение 10 мин, чтобы избавиться от нерастворимой фракции. РНК осаждали изопропанолом в течение 20 мин при –20 °С; для осаждения низкомолекулярных фракций РНК время центрифугирования увеличивали до 30 мин. Дополнительно для преципитации малых количеств РНК и коротких РНК в изопропанол использовали соосадитель – свободный от РНКаз гликоген (в концентрации 10 мкг/мл). Осадок РНК тщательно промывали (2 раза) в охлажденном 75 %-м этаноле, первый раз с разбиванием осадка на вортексе. Пробы РНК хранили под спиртом при температуре –80 °С.

Определение количества РНК, оценка присутствия примесей и анализ профиля общей РНК

Количество общей РНК и соотношения A260 : A280 и A260 : A230 определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Соотношение A260 : A280 в пробах РНК из цитоплазмы ооцитов курицы имело значение не менее 1,9, что свидетельствовало об отсутствии контаминации образцов белками. Соотношение A260 : A230 также позволило оценить загрязненность образцов и было выше значения 1,0 для проб РНК из цитоплазмы ооцитов курицы. Профиль РНК, а также степень ее деградации и отсутствие тотальной ДНК контролировали посредством электрофореза на микрофлюидном чипе с помощью биоанализатора Bioanalyzer 2100 (Agilent). Степень деградации РНК оценивали по индексу целостности РНК (RNA Integrity Number (RIN)), а также по отношению количеств 28S и 18S рРНК.

Загрязненность геномной ДНК в пробах РНК из цитоплазмы и ядер ооцитов оказалась пренебрежимо малой, что было подтверждено данными профиля хроматограмм. В связи с этим очистку получаемых проб от загрязнений геномной ДНК не осуществляли.

Анализ профиля низкомолекулярной РНК

Образцы РНК разделяли в 10 %-м ПАА-геле с помощью вертикального электрофореза и окрашивали бромистым этидием, детекцию связавшегося с НК красителя проводили с помощью системы гель-детекции GDS-800 (UVP, США) на трансиллюминаторе в УФ-свете. Полученные электрофореграммы денситометрировали с использованием программы GelQuantNET (<http://biochemlabsolutions.com/GelQuantNET.html>).

Результаты и обсуждение

Количество общей РНК в ооцитах курицы

Общую РНК выделяли из различных тканей и ооцитов *G. g. domesticus* с помощью модифицированного протокола, позволяющего получать препараты, содержащие как высокомолекулярные, так и низкомолекулярные транскрипты. Использование в качестве соосадителя гликогена существенно повышало количество выделяемой из цитоплазмы ооцитов РНК. Применяемый модифицированный протокол позволяет получить около 1 мкг тотальной РНК на ооцит и около 1 нг РНК на изолированное ядро (усредненные значения), что дает соотношение 1000:1. В сравнении с этими значениями количество РНК, получаемой при стандартной процедуре экстракции РНК из ооцитов шпорцевой лягушки (*Xenopus tropicalis*), было несколько выше – 1 мкг РНК на ооцит и 2 нг РНК на изолированное ядро (соотношение 500:1) (Gardner et al., 2012; Simeoni et al., 2012). Это связано с меньшими размерами ядер ооцитов на стадии наиболее высокой транскрипционной активности в яичнике домашней курицы.

Профиль высокомолекулярной РНК в ооцитах курицы

С помощью электрофореза на микрофлюидном чипе сравнили профили общей РНК из цитоплазмы и ядер растущих ооцитов *G. g. domesticus* (рис. 1). В цитоплазме ооцитов наблюдали пики рибосомных РНК, малых РНК и различных гетерогенных по размеру транскриптов (рис. 1, б). Присутствие в цитоплазме ооцитов 28S и 18S рРНК позволяет оценить степень деградации РНК в образцах. Для препаратов РНК из цитоплазмы RIN составлял не менее 5,0 ед. (до 8,3 ед.), а отношение концентраций 28S:18S рРНК было не менее 1,0 (рис. 1, б).

Как показал детальный анализ фракций РНК из растущих ооцитов курицы разного размера, в ходе роста ооцита в цитоплазме накапливаются рРНК. Известно при этом, что уровень экспрессии 18S и 28S рРНК в ооците значительно уменьшается с момента овуляции (Elis et al., 2008). Гетерогенные РНК наблюдались во всем спектре анализируемого диапазона размеров РНК (рис. 1, б).

Профиль тотальной РНК из микрохирургически изолированных ядер растущих ооцитов домашней курицы значительно отличался. Основные максимумы соответствовали низкомолекулярной РНК, в том числе транспортным РНК и малым ядерным РНК (рис. 1, в). При этом не наблюдали больших количеств гетерогенной по размеру РНК, которая могла бы соответствовать синтезируемым на стадии хромосом типа ламповых щеток различным видам транскриптов.

Важно отметить, что в образце тотальной РНК из ядер ооцитов практически полностью отсутствовали 28S и 18S рибосомные РНК, что не позволяло оценить сохранность РНК с помощью вычисления RIN или по расчету отношения количеств 28S:18S рРНК (рис. 1, в). Полученные данные на биохимическом уровне подтверждают установленную ранее инактивацию единственного ядрышкового организатора на хромосоме GGA16 в оогенезе половозрелых самок курицы (Greenfield, 1966; Gaginskaia, Chin, 1980; Hutchison, 1987). Следовые количества 28S и 18S

рРНК являются, скорее, примесью РНК из цитоплазмы, чем ядерными транскриптами. Поскольку для выделения РНК из ядер и цитоплазмы применяли одни и те же реактивы и протокол, при этом сохранность РНК из цитоплазмы хорошая, то есть все основания полагать, что РНК из ядер ооцитов также не деградировала.

Профиль размеров РНК из ядер ооцитов домашней курицы отличается от такового у шпорцевой лягушки. Действительно, в ядрах ооцитов лягушки были обнаружены вновь синтезируемые 18S и 28S рРНК, что связано с активностью в ядре ооцита амплифицированных ядрышек (Anderson, Smith, 1978). Отметим, что сходные отличия в профиле высокомолекулярной РНК наблюдали в семенниках и сперме мыши (Kawano et al., 2012). Если в профиле общей РНК из семенников присутствовали выраженные пики 28S и 18S рРНК, то в профиле общей РНК из спермы почти отсутствовали длинные РНК, включая рибосомные РНК.

В связи с накоплением рРНК в цитоплазме (но не в ядрах растущих ооцитов) можно с уверенностью утверждать, что в оогенезе курицы и, вероятно, других видов птиц рРНК поступает из окружающих ооцит клеток фолликулярного эпителия. Эти данные находятся в соответствии с высказанными ранее предположениями о роли фолликулярного эпителия в снабжении ооцита курицы различными видами РНК (Gaginskaia, Chin, 1980) и сведениями о наличии в фолликулярных клетках в яичниках птиц одного или нескольких ядрышек (Gilbert et al., 1983; Krasikova et al., 2012).

Профиль низкомолекулярной РНК в ооцитах курицы

Профиль экспрессии коротких РНК в ходе роста ооцитов *G. g. domesticus* сравнивали с профилем экспрессии коротких РНК в клетках соматических тканей. На рис. 2 приведена характерная картина профиля экспрессии малых (размером больше 60 н.) и коротких (от 20 до 60 н.) РНК в разных тканях (печень и яичник) и на разных этапах созревания ооцита у курицы.

Согласно полученным результатам, короткие РНК в цитоплазме растущих ооцитов курицы представлены в виде трех хорошо отличимых зон (рис. 2). Количественный анализ показал, что в клетках печени общее количество коротких РНК было в 3,8 раза меньше, чем в яичниках, и в 6,2 раз меньше, чем в цитоплазме созревающих ооцитов (рис. 3, а). Ранее при анализе общей РНК из печени, легких, семенников и яичника курицы с помощью электрофоретического разделения в 15 %-м ПАА-геле короткие РНК размером от 20 до 30 н. были обнаружены только в семенниках (Yang et al., 2012).

Важно отметить, что цитоплазма маленьких желтых фолликулов обогащена короткими РНК, по сравнению с цитоплазмой неиерархических фолликулов. При этом количество коротких РНК в ооплазме резко увеличивалось (почти в 15 раз) в ходе созревания ооцита (от 1 до 4 мм в диаметре) (рис. 3, б), что может свидетельствовать о специфичном накоплении и запасании коротких регуляторных РНК.

Наиболее быстро мигрирующая (нижняя) зона в продуктах электрофоретического разделения низкомо-

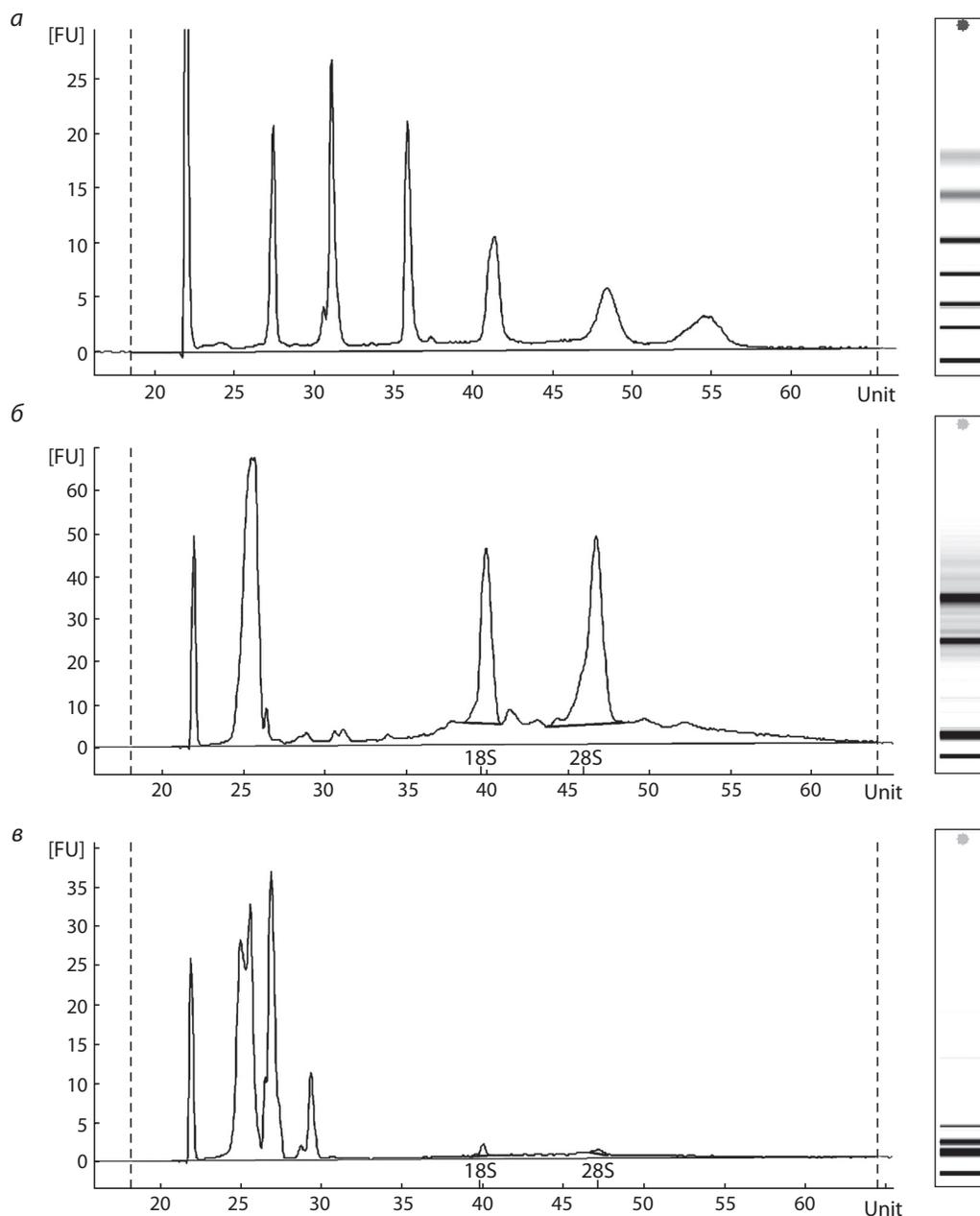


Рис. 1. Сравнение профилей РНК из цитоплазмы и микрохирургически изолированных ядер растущих ооцитов курицы.

Контрольная лесенка маркеров размера ДНК со следующими пиками: 25, 200, 500, 1000, 2000, 4000, 6000 н. (а); хроматограммы и псевдоэлектрофореграммы электрофореза на микрофлюидном чипе 9 нг общей РНК из цитоплазмы (б) и 2,6 нг общей РНК из ядер (в). По оси Y приведены интенсивности сигнала от молекул РНК (FU – относительная интенсивность флуоресценции), по оси X – длина молекул РНК (Unit – относительное время миграции). Отмечены положения пиков 18S и 28S рРНК. В образце РНК из цитоплазмы значение RIN составляло 8,3 ед., а отношение 28S/18S рРНК равно 1,4.

лекулярной РНК может соответствовать miРНК. Это предположение подтверждается анализом зрелых miРНК домашней курицы в базе данных коротких РНК (miRBase, <http://www.mirbase.org/cgi-bin/>). Так, среди имеющихся на момент анализа в базе данных miРНК курицы 499 последовательностей зрелые miРНК имеют размер 18–25 н., наиболее часто встречаются miРНК размером 20–21 н. Интересно отметить, что большая часть генов miРНК (312 генов, 63 %) в геноме курицы сосредоточена на 10 наиболее крупных хромосомах (макрохромосомах), хотя

именно они считались обедненными генами при анализе распределения белок-кодирующих последовательностей (Родионов, 1996).

Присутствующие во фракции РНК, изолированной из ооцитов курицы, короткие РНК в наименее быстро мигрирующей (верхней) зоне по размеру соответствуют РИWI-взаимодействующим РНК (риРНК) и обогащены в созревающих ооцитах (2–4 мм в диаметре). Такого рода короткие некодирующие РНК являются потенциальными претендентами на роль риРНК в транскриптоме ооцитов

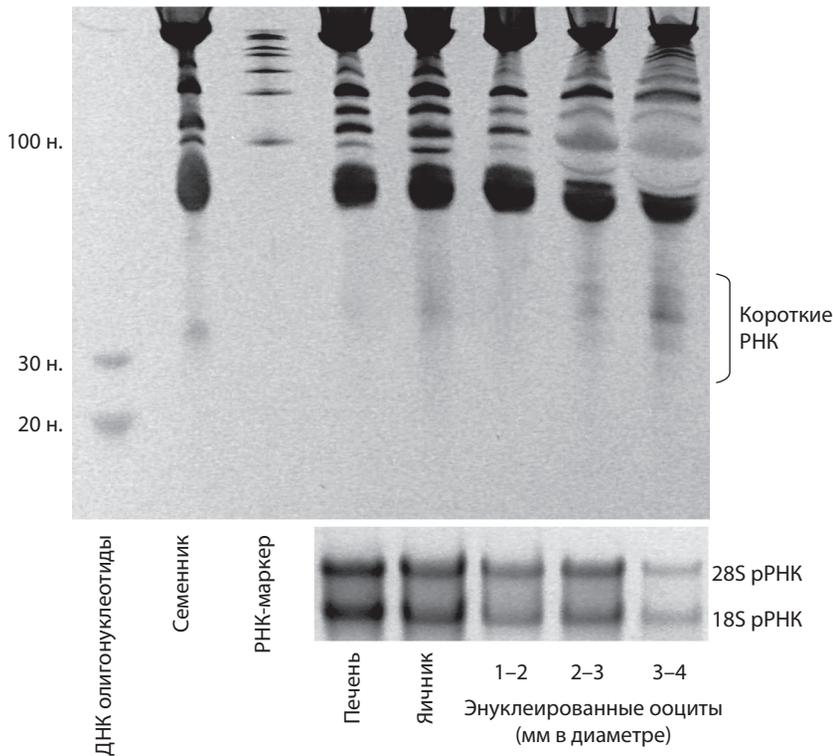


Рис. 2. Цитоплазма созревающих ооцитов курицы обогащена короткими РНК. Результат разделения коротких РНК из печени, яичника и энуклеированных ооцитов домашней курицы в 10 %-м ППА-геле (окрашивание бромистым этидием).

Верхняя панель: в качестве контроля нанесена общая РНК из семенников крыс линии Wistar массой 300 г, обогащенная короткими рiРНК (дорожка 2). В качестве маркеров молекулярного веса приведены олигонуклеотидные ДНК-маркеры (дорожка 1) и РНК-маркер (дорожка 3). В 15 %-м ППА-геле ДНК-олигонуклеотиды мигрируют на 10 % быстрее, чем РНК (Yang et al., 2012). Нижняя панель: представлен результат разделения в агарозном геле рибосомных РНК из тех же образцов.

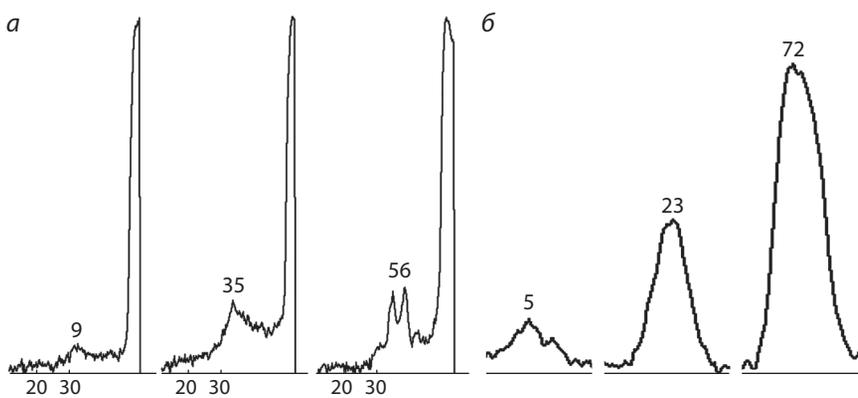


Рис. 3. Результаты денситометрии электрофореграмм препаратов РНК из разных тканей и ооцитов курицы после их разделения в ППА-геле.

а – профили экспрессии коротких РНК в разных тканях и в ооцитах курицы (слева направо): печень, яичник, энуклеированные ооциты. По оси *У* приведены интенсивности сигнала (в отн. ед.); по оси *Х* – длина молекул РНК относительно олигонуклеотидного ДНК-маркера (20 и 30 н.); *б* – количество коротких РНК на разных этапах созревания ооцитов курицы (слева направо): энуклеированные ооциты 1–2, 2–3, 3–4 мм в диаметре. По оси *У* приведены интенсивности сигнала (в отн. ед.).

домашней курицы и ранее не были охарактеризованы. рiРНК экспрессируются в половых клетках, участвуя в инактивации мобильных элементов генома и регуляции экспрессии специфичных для клеток яичника и/или семенников генов (Aravin, Hannon, 2008; Lau et al., 2009; Malone et al., 2009). У курицы рiРНК и рiРНК-подобные РНК были недавно охарактеризованы с помощью технологии секвенирования следующего поколения (NGS) в семенниках (Yang et al., 2012; Zhang et al., 2013) и в ранних эмбрионах (Shao et al., 2012), в том числе в клетках зародышевого пути (Rengaraj et al., 2014), но не в растущих ооцитах.

Обнаруженные нами в цитоплазме энуклеированных ооцитов курицы промежуточные по размеру короткие РНК (средняя зона среди коротких РНК) являются претендентами на эндогенные малые интерференционные РНК (endo-siРНК). Такие короткие РНК вряд ли могут представлять собой молекулы, участвующие в инактивации ретротранспозонов семейства LINE (CR1 в геноме курицы), поскольку большинство повторов этого семейства в геноме курицы представлены инактивированными копиями с усеченными или мутированными 5'UTR-промоторами, а контроль их экспрессии не зависит от пути интерференции РНК, инициируемой РНКазой III Dicer (Lee et al., 2009).

Мы предполагаем, что появление эндогенных siРНК в клетках *G. g. domesticus* может обеспечиваться процессингом двухцепочечных длинных или содержащих шпилечные структуры РНК – продуктов транскрипции LTR-ретротранспозонов и сателлитных повторов ДНК. Подобного рода короткие siРНК были охарактеризованы в ооцитах мыши (Watanabe et al., 2006). Ранее мы показали, что тандемно повторяющиеся последовательности активно транскрибируются на хромосомах типа ламповых щеток в ооцитах курицы, а транскрипция некоторых повторов ДНК (повторы CNM, PO41) осуществляется с обеих нитей, что может приводить к генерации комплементарной им двухцепочечной РНК (Krasikova et al., 2006; Deryusheva et al., 2007). Мы предполагаем, что синтезируемые

на стадии хромосом типа ламповых щеток в ооцитах птиц транскрипты tandemных и диспергированных повторов ДНК процессируются с образованием коротких регуляторных РНК (вероятно, siРНК и piРНК). Образующиеся короткие регуляторные РНК накапливаются в цитоплазме ооцита и, предположительно, могут быть использованы на ранних стадиях эмбриогенеза.

Основная функция подобных регуляторных РНК материнского происхождения – регуляция эмбрионального генома механизмом котранскрипционного сайленсинга. При этом короткие регуляторные РНК материнского происхождения могут принимать участие в образовании гетерохроматина в отсутствие собственных регуляторных транскриптов, синтезированных в эмбрионе. Действительно, короткие регуляторные РНК обнаружены на самых ранних стадиях эмбриогенеза домашней курицы (Shao et al., 2012). Таким образом, передаваемые с цитоплазмой ооцита птиц короткие регуляторные РНК могут служить своего рода эпигенетическими детерминантами, переносящими эпигенетическую информацию в ряду поколений.

Благодарности

Исследования проводились при поддержке гранта Российского научного фонда № 14-14-00131. Работа выполнена с использованием оборудования ресурсного центра «Хромас» Санкт-Петербургского государственного университета.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Родионов А.В. MICRO vs. MACRO: сравнительный анализ молекулярной и функциональной организации микро- и макро-хромосом птиц. Генетика. 1996;32(5):597-608.
- Anderson D.M., Smith L.D. Patterns of synthesis and accumulation of heterogeneous RNA in lampbrush stage oocytes of *Xenopus laevis* (Daudin). Dev Biol. 1978;67(2):274-285.
- Aravin A.A., Hannon G.J. Small RNA silencing pathways in germ and stem cells. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2008;73:283-290.
- Cogburn L.A., Porter T.E., Duclos M.J., Simon J., Burgess S.C., Zhu J.J., Cheng H.H., Dodgson J.B., Burnside J. Functional genomics of the chicken – a model organism. Poult Sci. 2007;86(10):2059-2094.
- Deryusheva S., Krasikova A., Kulikova T., Gaginskaya E. Tandem 41-bp repeats in chicken and Japanese quail genomes: FISH mapping and transcription analysis on lampbrush chromosomes. Chromosoma. 2007;116(6):519-530.
- Elis S., Batellier F., Couty I., Balzergue S., Martin-Magniette M.L., Monget P., Blesbois E., Govoroun M.S. Search for the genes involved in oocyte maturation and early embryo development in the hen. BMC Genomics. 2008;9:110.
- Fair T., Carter F., Park S., Evans A.C., Lonergan P. Global gene expression analysis during bovine oocyte *in vitro* maturation. Theriogenology. 2007;68:S91-S97.
- Froman D.P., Kirby J.D., Rhoads D.D. An expressed sequence tag analysis of the chicken reproductive tract transcriptome. Poult. Sci. 2006;85(8):1438-1441.
- Gaginskaya E.R., Chin S.H. Peculiarities of oogenesis in the chicken. II Follicular period in oocyte development. Ontogenes. 1980;11:13-221.
- Gardner E.J., Nizami Z.F., Talbot C.C. Jr., Gall J.G. Stable intronic sequence RNA (sisRNA), a new class of noncoding RNA from the oocyte nucleus of *Xenopus tropicalis*. Genes Dev. 2012;26(22):2550-2559.
- Gilbert A.B., Pery M.M., Waddington D., Hardie M.A. Role of atresia in establishing the follicular hierarchy in the ovary of the domestic hen (*Gallus domesticus*). J. Reprod Fertil. 1983;69:221-227.
- Greenfield M.L. The oocyte of the domestic chicken shortly after hatching, studied by electron microscopy. J. Embryol. Exp. Morphol. 1966;15:297-316.
- Huang Z., Wells D. The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome. Mol. Hum. Reprod. 2010;16(10):715-725.
- Hutchison N. Lampbrush chromosomes of the chicken, *Gallus domesticus*. J. Cell Biol. 1987;105:1493-1500.
- Kawano M., Kawaji H., Grandjean V., Kiani J., Rassoulzadegan M. Novel small noncoding RNAs in mouse spermatozoa, zygotes and early embryos. PLoS One. 2012;7(9):e44542.
- Krasikova A., Deryusheva S., Galkina S., Kurganova A., Evteev A., Gaginskaya E. On the positions of centromeres in chicken lampbrush chromosomes. Chromosome Res. 2006;14(7):777-789.
- Krasikova A., Khodyuchenko T., Maslova A., Vasilevskaya E. Three-dimensional organisation of RNA-processing machinery in avian growing oocyte nucleus. Chromosome Res. 2012;20(8):979-994.
- Lau N.C., Ohsumi T., Borowsky M., Kingston R.E., Blower M.D. Systematic and single cell analysis of *Xenopus* Piwi-interacting RNAs and Xiwi. EMBO J. 2009;28(19):2945-2958.
- Lee S.H., Eldi P., Cho S.Y., Rangasamy D. Control of chicken CR1 retrotransposons is independent of Dicer-mediated RNA interference pathway. BMC Biol. 2009;7:53.
- Malone C.D., Brennecke J., Dus M., Stark A., McCombie W.R., Sachidanandam R., Hannon G.J. Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. Cell. 2009;137(3):522-535.
- Nie H., Crooijmans R.P., Bastiaansen J.W., Megens H.J., Groenen M.A. Regional regulation of transcription in the chicken genome. BMC Genomics. 2010;11:28.
- Rengaraj D., Lee S.I., Park T.S., Lee H.J., Kim Y.M., Sohn Y.A., Jung M., Noh S.J., Jung H., Han J.Y. Small non-coding RNA profiling and the role of piRNA pathway genes in the protection of chicken primordial germ cells. BMC Genomics. 2014;15:757.
- Shao P., Liao J.Y., Guan D.G., Yang J.H., Zheng L.L., Jing Q., Zhou H., Qu L.H. Drastic expression change of transposon-derived piRNA-like RNAs and microRNAs in early stages of chicken embryos implies a role in gastrulation. RNA Biol. 2012;9(2):212-227.
- Simeoni I., Gilchrist M.J., Garrett N., Armisen J., Gurdon J.B. Widespread transcription in an amphibian oocyte relates to its reprogramming activity on transplanted somatic nuclei. Stem Cells Dev. 2012;21(2):181-190.
- Watanabe T., Takeda A., Tsukiyama T., Mise K., Okuno T., Sasaki H., Minami N., Imai H. Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. Genes Dev. 2006;20(13):1732-1743.
- Yang H., Wang X., Liu X., Liu X., Li L., Hu X., Li N. Cloning and expression analysis of piRNA-like RNAs: adult testis-specific small RNAs in chicken. Mol. Cell Biochem. 2012;360(1/2):347-352.
- Zagris N., Kalantzis K., Guialis A. Activation of embryonic genome in chick. Zygote. 1998;6(3):227-231.
- Zhang Y., Li J., Chen R., Dai A., Luan D., Ma T., Hua D., Chen G., Chang G. Cloning, characterization and widespread expression analysis of testicular piRNA-like chicken RNAs. Mol. Biol. Rep. 2013;40(4):2799-2807.

Эффективный метод идентификации штаммов *Escherichia coli*, выделенных из различных органов домашней птицы (*Gallus gallus domesticus*)

В.П. Терлецкий^{1, 2}, В.И. Тыщенко^{1, 2}, О.Б. Новикова², Э.Д. Джавадов², И.Я. Шахтамиров³, Н.Л. Адаев⁴

¹ Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных Федерального агентства научных организаций, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

² Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства Федерального агентства научных организаций, Санкт-Петербург, Ломоносов, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Чеченский государственный университет Министерства науки и образования России, Грозный, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Чеченский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Грозненский район, пос. Гикало, Россия

Выяснение путей распространения инфекции и идентификация источников патогена являются актуальными проблемами в системе профилактических мероприятий, направленных на борьбу с инфекционными заболеваниями человека и животных. Быстрый и точный метод идентификации бактериальных штаммов (генотипирование) позволяет на научной основе планировать противозооотические мероприятия. Несмотря на обилие методов генотипирования микроорганизмов, не существует унифицированного подхода, применимого к разным видам патогенов. В исследовании была поставлена цель – разработать метод генотипирования, позволяющий идентифицировать штаммы *E. coli*, циркулирующие у кур различных птицефабрик России. Метод основан на ранее выдвинутой нами идее двойного расщепления и избирательного мечения рестрикционных фрагментов ДНК (ДРИМ). Геномная ДНК микроорганизма расщепляется одновременно двумя ферментами рестрикции и метится биотинилированным дезоксицитозинтрифосфатом с помощью ДНК-полимеразы. Ферменты подбираются *in silico* для каждого вида микроорганизма таким образом, чтобы в результате получить ограниченное число меченых фрагментов ДНК, которые легко разделить в обычном агарозном геле. В ходе выполнения экспериментальной работы на изолятах *E. coli* были доказаны воспроизводимость метода и его высокая дискриминационная способность. Данный подход был реализован при генотипировании ряда других патогенных микроорганизмов. К числу преимуществ предлагаемого метода относятся быстрота выполнения анализа, доступность реактивов и приборов. Показаны передача возбудителя между курами в пределах одной птицефабрики и возможность присутствия в разных органах одной особи генетически близких штаммов *E. coli*. Для генотипирования подходят бактериальные изоляты кур, выделенные из любых органов, кроме желудочно-кишечного тракта. В кишечнике присутствуют эндогенные бактериальные штаммы *E. coli*, что затрудняет интерпретацию результатов генотипирования. В работе показана возможность использования метода ДРИМ на полевых изолятах *E. coli* для решения вопросов молекулярной эпизоотологии.

Ключевые слова: генотипирование; ферменты рестрикции; расщепление ДНК; мечение; молекулярная эпизоотология; *E. coli*.

Efficient method for identification of *Escherichia coli* strains isolated from various chicken (*Gallus gallus domesticus*) organs

V.P. Terletskiy^{1, 2}, V.I. Tyshchenko^{1, 2}, O.B. Novikova², E.D. Dzhabadov², I.Ya. Shakhtamirov³, N.L. Adaev⁴

¹ Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding, Federal Agency for Scientific Organizations, St.-Petersburg, Pushkin, Russia

² All-Russia Research Veterinary Institute of Poultry Science, Federal Agency for Scientific Organizations, St.-Petersburg, Lomonosov, Russia

³ Chechen State University, Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Grozny, Chechen Republic, Russia

⁴ Chechen Agricultural Research Institute, Federal Agency for Scientific Organizations, Gikalo Village, Grozny raion, Chechen Republic, Russia

Tracing of transmission routes and identification of pathogen sources are important issues in preventive measures aimed at controlling human and animal infectious diseases. A fast and accurate method for bacterial strain identification (genotyping) allows scientifically sound planning of preventive schemes. Despite the existence of numerous bacterium genotyping techniques, there is still room for developing a unified typing approach that would be applicable to a variety of bacterial species. The aim is to develop a genotyping method allowing identification of *E. coli* strains circulating at Russian chicken farms. The method is based on the earlier proposed idea of double digestion and selective labeling of DNA restriction fragments (DDSL). Bacterial genomic DNA is simultaneously digested with two restriction enzymes and labeled with biotinylated deoxynucleoside triphosphates with the presence of DNA polymerase. The enzymes are chosen *in silico* for each bacterial species so that a limited number of DNA fragments be generated for subsequent separation in conventional agarose gel. After implementation of the study with *E. coli* isolates, adequate reproducibility and high discriminatory power of the technique were demonstrated. This

approach was previously applied to genotyping other pathogenic bacterial species. The advantages of the proposed technique are the short turn-around time of analysis and easy availability of reagents and equipment. Transmission of a pathogen among chicken within one farm and existence of slightly different *E. coli* genotypes in various organs of the same individual were observed. Bacterial isolates obtained from any organ except the intestine were suitable for genotyping. Chicken intestine contains endogenous *E. coli* strains, which hamper the interpretation of genotyping data obtained for a set of isolates. Thus, our work demonstrates the potential of the DDSL method for genotyping field *E. coli* isolates in the context of molecular epizootology.

Key words: genotyping; restriction enzymes; DNA digestion; labeling; molecular epizootology; *E. coli*.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Терлецкий В.П., Тыщенко В.И., Новикова О.Б., Джавадов Э.Д., Шахтамиров И.Я., Адаев Н.Л. Эффективный метод идентификации штаммов *Escherichia coli*, выделенных из различных органов домашней птицы (*Gallus gallus domesticus*). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):270-276.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Terletskiy V.P., Tyshchenko V.I., Novikova O.B., Dzhavadov E.D., Shahtamirov I.Ya., Adaev N.L. Efficient method for identification of *Escherichia coli* strains isolated from various chicken (*Gallus gallus domesticus*) organs. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(3):270-276.

В настоящее время циркулирование патогенных видов бактерий на птицефабриках России находится под жестким контролем ветеринарных служб. Очаги инфекции быстро локализируются, и устраняется опасность распространения инфекции. В то же время условно-патогенная микрофлора все чаще вызывает заболевания у животных. К наиболее часто встречающимся этиологическим факторам инфекционных заболеваний относят *Escherichia coli*, которая всегда является частью нормальной микрофлоры кишечника, но в определенных условиях возникают патогенные штаммы, наносящие экономический урон птицеводству (Борисенкова и др., 2012).

Актуальность исследований диктуется необходимостью быстро находить пути распространения, а также выявлять источники инфекции. Циркулирование возбудителей во внешней среде приводит к периодическим вспышкам заболеваний (Макаров, 2007; Добрина, 2011). Инфекционные заболевания, прежде всего колибактериоз, несут особую угрозу, так как на птицефабриках условия благоприятствуют передаче микроорганизмов между особями (скупенность содержания, запыленность помещений и т. д.). Кроме того, биологические особенности домашних кур современных промышленных кроссов предрасполагают к острому течению многих инфекционных заболеваний и существенному отходу птицы на птицефабриках и снижению рентабельности отрасли в целом. Использование современных методов генотипирования позволяет ответить на вопросы эпизоотологического плана, в частности, каким путем происходит передача возбудителя и где находится источник инфекции (Тапальский и др., 2005; van Belkum et al., 2007). Эти сведения необходимы для предотвращения новых вспышек заболеваний. Для надежной идентификации и паспортизации таких штаммов необходимо применение современных методик генотипирования микроорганизмов (Terletski et al., 2003; Жебрун и др., 2011). Генотипирование позволяет присвоить мо-

лекулярно-генетический «штрихкод» каждому штамму, что крайне важно при использовании их на практике, при решении спорных вопросов и при хранении коллекций штаммов в лабораторных условиях. Помимо этого, есть вероятность того, что определенный фрагмент ДНК может быть сцеплен с важной биологической или хозяйственно полезной особенностью штамма, что позволит использовать его в качестве маркера данного свойства при изучении других потенциально полезных штаммов.

Генотипирование применяется также при определении эффективности вакцинопрофилактики при использовании живых вакцин (сравниваются генотипы выделенных изолятов бактерий у птицы с клиническими признаками заболевания с генотипом вакцинного штамма). Генотипирование изолятов *E. coli* широко используется для решения ряда эпизоотологических вопросов в птицеводстве (Higgins et al., 2007; Lyhs et al., 2012; Hussein et al., 2013).

Существует множество методов типирования микроорганизмов. В настоящее время доказано, что методы, основанные на полиморфизме геномной ДНК (генотипирование), являются наиболее чувствительными и воспроизводимыми (Lukinmaa et al., 2004; van Belkum, 2007). Сейчас одним из самых распространенных методов генотипирования является метод пульс-гель электрофореза. К недостаткам метода можно отнести длительность проведения анализа, достигающую нескольких дней (Mitani et al., 2005); низкую типизируемость в отношении штаммов, экспрессирующих эндогенные нуклеазы (Koogt et al., 2002); недостаточный уровень дискриминации штаммов (Wilse et al., 2004). Метод мультилокусного секвенирования (MLST) обладает низкой дискриминационной способностью (Fahkg et al., 2005) и весьма дорогой (Foxman et al., 2005).

Самым точным методом генотипирования является метод ДРИМ (двойное расщепление и избирательное

мечение), который впервые был разработан для клинических изолятов патогенных микроорганизмов, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Salmonella* spp. (Terletskiy et al., 2008; Terletskiy et al., 2010). Результатом генотипирования методом ДРИМ является группа фрагментов ДНК в виде полос на фильтре, распределение которых специфично для каждого штамма. Точность идентификации штаммов, рассчитываемая по индексу дискриминации (Hunter, Gaston, 1988), превышает точность текущего «золотого стандарта» генотипирования (пульс-гель электрофорез) и достигает для псевдомонад 0,98, сальмонелл – 0,96. В России метод начал применяться при паспортизации коммерческих штаммов-продуцентов биопрепаратов *Bacillus subtilis*.

В нашей работе была поставлена цель – использование идеи двойного расщепления и избирательного мечения (ДРИМ) для разработки метода генотипирования *E. coli*, вызывающей заболевания у сельскохозяйственной птицы. Научная новизна предлагаемых исследований заключается в разработке методики генотипирования и ее оптимизации под данный вид патогена.

Материалы и методы

Материалом исследования служит чистая культура бактериальных изолятов *E. coli*, полученных из различных органов больных и павших кур породы Хайсекс коричневый (45 изолятов от 23 особей, 2012 и 2013 гг.) из 6 птицефабрик России и вивария ФГБНУ ВНИВИП (Санкт-Петербург – Ломоносов).

Высевы на мясопептонный бульон делали из отдельных колоний, выращенных в чашках Петри на твердой питательной среде. Источником микроорганизмов служили сердце, печень, легкие, селезенка, яичные фолликулы, двенадцатиперстная кишка и слепая кишка больных и павших кур.

Метод генотипирования (двойное расщепление и избирательное мечение, ДРИМ) основан на одновременном расщеплении геномной ДНК микроорганизма двумя эндонуклеазами рестрикции и избирательном мечении отдельных фрагментов ДНК с последующей их визуализацией (Terletskiy et al., 2008). Для каждого вида микроорганизма подбирается пара эндонуклеаз, дающих оптимальное число и распределение фрагментов ДНК и способных расщеплять ДНК в одном буфере (двойное расщепление). Поиск *in silico* позволил подобрать фермент рестрикции *XbaI* (SibEnzyme®), который можно использовать в качестве продуцента фрагментов ДНК с «липкими концами», которые могут включать метку «биотинилированный дезоксицитозинтрифосфат (Bio-14-dCTP, Invitrogen™)» в реакции достройки с помощью ДНК-полимеразы.

Теоретическую картину распределения фрагментов ДНК, получаемую при генотипировании методом ДРИМ, можно создать с помощью компьютерной программы, доступной на сайте <http://insilico.ehu.es/>. Необходимо выбрать опцию «DDSL», далее определить пару ферментов рестрикции для симуляции генотипирования. Эта программа позволяет теоретически оценить количество фрагментов ДНК и их распределение в агарозном геле. Естественно, реальное распределение фрагментов на полевых изолятах несколько отличается от картины, полу-

чаемой теоретически на референтном штамме из базы данных секвенированных бактериальных геномов.

В качестве второго фермента, необходимого для уменьшения размера фрагментов ДНК до оптимального при их разделении в агарозном геле, служила одна из рестриктаз – *Eco32I*, *Eco47III*, *DraI*, *PvuI*, *PvuII*, *Mph110I* (Thermo Fisher Scientific™) и *PstI* (SibEnzyme®) (табл. 1).

Эти ферменты отбирались *in silico* с учетом частоты расщепления геномной ДНК *E. coli* в пределах 800–2500 раз. Они производят тупые либо 3'-выступающие концы у фрагментов ДНК после рестрикции, которые не могут включать метку Bio-14-dCTP в ферментативной реакции с Taq-полимеразой (SibEnzyme®). Таким образом, в реакции ДРИМ образуется ограниченное число меченых фрагментов ДНК, которые впоследствии выявляются в виде полос на фильтре. Полимераза включает дезокси-нуклеозидтрифосфаты в растущую цепь ДНК в направлении 5' к 3'. Экзонуклеазная активность в обратном направлении выражена неизмеримо слабее, что позволяет широко использовать фермент для мечения ДНК в коммерческих наборах. В нашем случае при температуре всего 37 °C даже полимеризационная активность составляет всего 10 % от максимума, а экзонуклеазная активность не проявляется вовсе.

После испытания всех указанных рестриктаз был отобран оптимальный фермент *PstI*. Он хорошо расщепляет ДНК в буфере O, не чувствителен к метилированию геномной ДНК, не обладает «звездчатой» активностью, недорог и достаточно специфичен по критерию эффективности лигирования фрагментов ДНК после расщепления. Таким образом, в отношении *E. coli* оптимальным сочетанием является пара эндонуклеаз рестрикции *XbaI/PstI*, производящая около 40 фрагментов ДНК. Эти ферменты были использованы в дальнейших экспериментах. С учетом числа сайтов расщепления рестриктазами *XbaI* и *PstI*, средний размер меченых фрагментов ДНК составлял 2000 пар оснований. Такой размер являлся оптимальным с точки зрения разделения фрагментов ДНК электрофорезом в 0,8 %-м агарозном геле.

Реакция проводилась в одной микропробирке, куда последовательно вносили исследуемую ДНК, две эндонуклеазы рестрикции, Taq-полимеразу, Bio-14-dCTP. Общий объем смеси составлял 20 мкл. Инкубация проводилась в течение 1–2 ч при 37 °C. Затем полученные фрагменты ДНК разделяли по размеру электрофорезом в обычном 0,8 %-м агарозном геле в трис-ацетатном буфере. Сразу же после электрофореза ДНК переносили на нейлоновый фильтр. Процесс длился 30–60 мин и проводился в дистиллированной воде на приборе вакуумного переноса VacuGene XL Vacuum Blotting System™ (Amersham Biosciences™). После этого фрагменты ДНК на фильтре визуализировали в цветной реакции с применением конъюгата стрептавидин-щелочная фосфатаза (Streptavidin-AP, Bio-Rad™) для выявления активности щелочной фосфатазы. Данная цветная реакция основывалась на использовании двух коммерчески доступных красителей NBT и BCIP (Thermo Fisher Scientific™). После проявления фрагментов ДНК фильтр отмывали несколько раз в дистиллированной воде для удаления неспецифически связанных красителей. Заключительный этап работы – анализ распределения

Таблица 1. Ферменты рестрикции для уменьшения размера фрагментов ДНК в ферментативной реакции ДРИМ и их характеристики (все рестрикционные буфера производства Thermo Fisher Scientific™)

Фермент	Число сайтов в геноме <i>E. coli</i>	Оптимальный буфер	Эффективность в буфере O, %	Эффективность лигирования, %
<i>Eco32I</i>	2 440	R	50–100	95
<i>Eco47III</i>	902	R	50–100	95
<i>DraI</i>	2 017	Tango™	20–50	95
<i>PvuI</i>	1 463	R	50–100	90
<i>PvuII</i>	2 087	G	20–50	90
<i>Mph110I</i>	1 073	R	20–50	95
<i>PstI</i>	1 349	O	100	95

фрагментов ДНК для выявления идентичных, близкородственных и генетически далеких бактериальных генотипов (штаммов).

Результаты

После испытания различных рестриктаз была определена оптимальная комбинация для последующего использования в генетической паспортизации штаммов *E. coli* – *XbaI* и *PstI*. Метод генотипирования ДРИМ для кишечной палочки разрабатывали на примере 29 изолятов. Изоляты брали из различных органов больных и павших кур, которые ранее содержались на различных птичниках двух птицефабрик. Результаты генотипирования проявлялись в виде 30–40 четко различимых фрагментов ДНК в диапазоне 400–23 000 пар оснований (рисунок).

По результатам генотипирования в 2012 г. было выявлено 14 различных генотипов *E. coli*, включая близкородственные варианты. Изучение молекулярно-эпизоотологических вопросов на примере птицефабрик позволило выявить несколько групп идентичных бактериальных изолятов, имеющих одинаковый профиль всех фрагментов ДНК (генотип 1 – 12 изолятов; генотип 8 – 2 изолята, 21 и 22; генотип 9 – 3 изолята, 23, 25 и 26, генотип 10а – 2 изолята, 28 и 29). В отдельных случаях удалось выявить генетически близкородственные штаммы. Например, генотип 1 дополнительно имел варианты 1а и 1б (табл. 2).

Самой большой группой идентичных штаммов оказались изоляты из птицефабрики № 1 под номерами 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13 и 14, которые были отнесены к генотипу 1. Все перечисленные 12 изолятов были получены из разных органов 4 кур, содержащихся в одном птичнике. Идентичность изолятов свидетельствует о возможном перезаражении разных кур друг от друга в пределах одного птичника. Изолят 15 (генотип 1а) был получен из двенадцатиперстной кишки той же особи, что и изоляты с 1 по 4 (другие органы, генотип 1). Различия в профилях составило всего 2–3 фрагмента ДНК. В данном случае можно говорить о возникновении мутации у бактерий, специализирующихся на размножении в разных органах курицы либо об инфицировании особи одновременно двумя штаммами. Нельзя исключать также происхождение изолята из эндогенной микрофлоры, обитающей в двенадцатиперстной кишке кур. Вероятность последних двух сценариев невелика, так как соответствующие изоляты отличались друг от друга незначительно, а эндогенный штамм должен быть совершенно другим. Изолят 5 (генотип 1б) был выделен из сердца второй особи птичника 1 и отличался на три фрагмента ДНК от генотипа 1.

Изучение молекулярно-эпизоотологических вопросов на примере птицефабрики № 2 (изоляты 19–29) позволило выявить три группы идентичных изолятов (табл. 2). Например, генотип 9 включал три изолята: 23, 25 и 26. Кроме того, изолят 24 был генетически близок (различия – всего 2 фрагмента ДНК) к этому генотипу, соответствующему бактериальному штамму было присвоено наименование 9а. Все вышеуказанные изоляты выделялись из кур одного птичника. Таким образом, в пределах птичника № 13 цир-



Фрагмент фильтра с генотипированными изолятами *E. coli*.

Дорожки 1–3 – генетически идентичные изоляты; 4, 5 – генетически близкие изоляты; 6, 7 – генетически уникальные изоляты.

Таблица 2. Генотипы кишечной палочки, выявленные методом ДРИМ у кур породы Хайсекс коричневый из птицефабрики № 1 (изоляты с 1 по 18) и птицефабрики № 2 (изоляты с 19 по 29) Центрального федерального округа России

Генотипы (штаммы)	Изоляты	Органы	Особь/птичник
1	1, 2, 3, 4	Сердце, печень, легкие, фолликулы	1/1
1	6, 7	Печень, фолликулы	2/1
1	8, 10, 11	Сердце, фолликулы, костный мозг	3/1
1	12, 13, 14	Сердце, печень, фолликулы	4/1
1a	15	Двенадцатиперстная кишка	1/1
16	5	Сердце	2/1
2	16	Слепая кишка	1/1
3	9	Печень	3/1
4	17	Двенадцатиперстная кишка	4/1
5	18	Слепая кишка	4/1
6	19	Сердце	5/4
7	20	Двенадцатиперстная кишка	5/4
8	21, 22	Сердце, печень	6/10
9	23, 25, 26	Сердце, сердце, легкие	7/13, 8/13, 8/13
9a	24	Печень	7/13
10	27	Сердце	9/19
10a	28, 29	Печень, фолликулы	9/19, 9/19

Таблица 3. Генотипирование изолятов кишечной палочки, полученной из разных органов птицы методом ДРИМ в 2013 г.

Генотип	Изоляты	Хозяйство/корпус	Орган птицы
1	1	1/22	Общая масса внутренних органов
2	2	1/22	
3	3	1/22	
4	4	1/22	
4	5	1/22	
5	6	1/23	
6	7	1/23	
7	8	2/–	
8	9	3/–	
9	10	4/8	
10	11	Виварий ВНИВИП	Сердце, особь 1
10	12	Виварий ВНИВИП	Печень, особь 1
10a	13	Виварий ВНИВИП	Сердце, особь 2
10a	14	Виварий ВНИВИП	Печень, особь 2
106	15	Виварий ВНИВИП	Культура
106	16	Виварий ВНИВИП	Культура

кулируют два генетически близких штамма кишечной палочки. Подобная картина отмечалась и у кур другого птичника – № 19. Идентифицировался генотип 10 и пара изолятов идентичных, генетически близких к генотипу 10 (изоляты 28 и 29).

Различающиеся на большое число фрагментов ДНК изоляты 17 (генотип 4) и 18 (генотип 5) были получе-

ны от одной особи птичника 1 из двенадцатиперстной и слепой кишки соответственно. Это свидетельствует об инфицировании кур из различных источников либо об эндогенном характере изолятов. То же наблюдали на примере изолятов 19 и 20 в птичнике 4. В целом результаты свидетельствуют о возможном перезаражении кур друг от друга в пределах одного птичника. С другой

стороны, полученные данные показывают отсутствие циркулирования одинаковых генотипов между двумя птицефабриками и даже между разными птичниками на территории одной птицефабрики. Штаммы 2, 3, 4, 5, 6 и 7 (изоляты 16, 9, 17, 18, 19 и 20 соответственно) встречались только один раз и генетически сильно отличались как друг от друга, так и от всех остальных штаммов. В пределах птицефабрики № 1 в одном птичнике циркулируют несколько штаммов, соответствующих генотипам 1, 1а, 1б, 2, 3, 4, 5.

Работа по генотипированию изолятов от кур четырех географически удаленных птицеводческих хозяйств и вивария ФГБНУ ВНИВИП была продолжена в 2013 г. (табл. 3). Была выявлена группа близкородственных изолятов из вивария ГНУ ВНИВИП (генотипы 10, 10а и 10б). Различия между генотипами составляли всего 1–3 фрагмента ДНК. В остальных случаях различия были значительно более выраженными и измерялись многими фрагментами. Изоляты 1–10 выделялись из общей массы внутренних органов кур, включая кишечник. В этом случае наличие эндогенной кишечной микрофлоры привело к выявлению самых различных генотипов. Таким образом, использование такого подхода неоправданно с точки зрения молекулярной эпизоотологии, так как не позволяет идентифицировать пути передачи возбудителя. Культуры, выращенные из отдельных органов больных и павших кур, таких как сердце и печень, гораздо больше подходят для этих целей. Не удивительно, что пары изолятов 11 и 12; 13 и 14, выделенные из разных органов одной особи, были идентичными (генотип 10, 10а соответственно). Таким образом, в этом эксперименте снова установлен факт наличия двух генетически идентичных штаммов *E. coli* в разных органах одной и той же особи, что говорит о генерализации инфекционного процесса. Изоляты 15 и 16, составляющие один генотип, 10б, представляли собой бактерии, происходящие из одной культуры, которой были заражены два цыпленка.

Обсуждение

При появлении любых несовпадений в распределении фрагментов ДНК у двух изучаемых изолятов можно утверждать, что они относятся к двум генетически различным микробным штаммам. С другой стороны, если два образца не различаются, то есть некоторая вероятность, что они все-таки различны, так как ни один метод генотипирования (кроме полногеномного секвенирования) не анализирует целый геном, а скринирует лишь отдельные его участки. Не исключено, что другие методы анализа могут в каких-то случаях выявить разницу. Однако данные, полученные на нескольких видах клинически значимых микроорганизмов (*Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile*), указывают, что метод ДРИМ является самым высокочувствительным для выявления генетических различий между штаммами.

Метод ДРИМ основан на одновременном расщеплении геномной ДНК микроорганизма двумя рестрикционными эндонуклеазами и избирательном мечении отдельных фрагментов ДНК. Одна из рестриктаз при расщеплении ДНК образует ограниченное число фрагментов с так на-

зываемыми «липкими концами», которые включают метку Bio-14-dCTP. В то же время многочисленные фрагменты ДНК, образованные второй рестриктазой, не включают метку. Такая избирательность мечения позволяет уменьшить число фрагментов ДНК с нескольких тысяч до нескольких десятков и выявить это ограниченное число фрагментов на фильтре после их разделения по размеру в обычном агарозном геле. Преимуществом метода являются быстрота (одни сутки в сравнении с несколькими сутками при генотипировании пульс-гель-электрофорезом), высокая точность и отсутствие ПЦР этапа. В связи с тем, что у многих видов микроорганизмов геном к настоящему времени полностью секвенирован, т. е. определена последовательность нуклеотидов в геномной ДНК, есть возможность теоретически рассчитать количество фрагментов ДНК, получаемых при расщеплении каждой из рестриктаз, а также после двойного расщепления одновременно двумя рестриктазами. Для этого мы используем доступную в интернете программу (<http://insilico.ehu.es/DDSL>). Она была разработана исследователями из Испании (Bikandi et al., 2004), которые также участвовали в разработке метода ДРИМ для клинически важных видов патогенных бактерий в рамках совместных грантов НАТО. В настоящее время ДРИМ-генотипирование используется в клинических лабораториях зарубежных стран.

Возможные пути использования метода генотипирования методом ДРИМ:

генетическая идентификация/паспортизация штаммов различных видов микроорганизмов, используемых в практике и научной деятельности;

мониторинг способов распространения патогенов бактериальной природы (пути передачи, источники инфекции);

возможно выявление маркерных фрагментов ДНК, сцепленных с фенотипическими признаками микроорганизма.

Таким образом, разработанный метод генотипирования позволяет выявить пути распространения колибактериоза у кур в условиях птицефабрик. Его можно рекомендовать для решения вопросов эпизоотологии и эпизоотологии, генетической паспортизации бактериальных штаммов. Предложенный молекулярно-генетический метод носит универсальный характер, так как может быть адаптирован практически к любому микроорганизму.

Благодарности

Работа поддержана бюджетным финансированием по государственному заданию (этапу) 19.5 ФГБНУ ВНИИГРЖ.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Борисенкова А.Н., Новикова О.Б., Оконеvский П. Флорфеникол в птицеводстве. Птицеводство. 2012;3:43-45.
Добринина М.Н. Нужен постоянный контроль сальмонеллеза. Животноводство России. 2011;3:11-13.
Жебрун А.Б., Мукомолов С.Л., Нарвская О.В. Генотипирование и молекулярное маркирование бактерий и вирусов в эпизоотическом надзоре за актуальными инфекциями. Журн. микробиологии, эпизоотологии и иммунобиологии. 2011;4:28-36.

- Макаров В.В. Истоки и эволюция современной эпизоотологии. Ветеринар. патология. 2007;3:8-17.
- Тапальский Д.В., Осипов В.А., Жаворонок С.В. Фенотипическое и молекулярно-генетическое типирование сальмонелл: реалии и перспективы. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиологии. 2005;6:88-93.
- Bikandi J., San Millan R., Rementeria A., Garaizar J. *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction. Bioinformatics. 2004;20(5):798-799.
- Fakhr M.K., Nolan L.K., Logue C.M. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J. Clin. Microbiol. 2005; 43(5):2215-2219.
- Foxman B., Zhang L., Koopman J.S., Manning S.D., Marrs C.F. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiological studies. Epidemiol. Perspect. Innov. 2005;2(10). DOI: 10.1186/1742-5573-2-10
- Higgins J., Hohn C., Hornor S., Frana M., Denver M., Joeger R. Genotyping of *Escherichia coli* from environment and animal samples. J. Microbiol. Methods. 2007;70(2):227-235.
- Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J. Clin. Microbiol. 1988;26(11):2465-2466.
- Hussein A.H., Ghanem I.A., Eid A.A., Ali M.A., Sherwood J.S., Li G., Nolan L.K., Logue C.M. Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken flocks in Egypt. Avian Dis. 2013;57(3):602-611.
- Koort J.M.K., Lukinmaa S., Rantala M., Unkila E., Siitonen A. Technical improvement to prevent DNA degradation of enteric pathogens in pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 2002;40(9): 3497-3498.
- Lukinmaa S., Nakari U.-M., Eklund M., Siitonen A. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. APMIS. 2004;112(11/12):908-929.
- Lyhs U., Ikonen I., Pohjanvirta K., Raninen K., Perko-Mäkelä P., Pelkonen S. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in poultry meat products on the Finnish retail market. Acta Vet. Scand. 2012;54(64). DOI: 10.1186/1751-0147-54-64
- Mitani N., Koizumi A., Sano R., Masutani T., Murakawa K., Mikasa K., Okamoto Y. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by PCR-RFLP and its usefulness in an epidemiological study of an outbreak. Jpn. J. Infect. Dis. 2005;58(4):250-252.
- Terletski V., Schwarz S., Carnwath J., Niemann H. Typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Choleraesuis, Typhimurium, Dublin and laboratory strains of *Escherichia coli* using subtracted restriction fingerprinting (SRF). Microbiol. Res. 2003;158:135-142.
- Terletskiy V., Kuhn G., Francioli P., Blanc D. Application and evaluation of double digest selective label (DDSL) typing technique for *Pseudomonas aeruginosa* hospital isolates. J. Microbiol. Methods. 2008;72(3):283-287.
- Terletskiy V., Tyshchenko V., Martinez-Ballesteros I., Garaizar J., Bikandi J. Validation of Double Digest Selective Label database for sequenced prokaryotic genomes. Bioinformatics. 2010;26(3):417-418.
- Van Belkum A., Tassios P.T., Dijkshoorn L., Haeggman S., Cookson B., Fry N.K., Fusing V., Green J., Feil E., Gerner-Smidt P., Brisse S., Struelens M., Escmid E. Guidelines for the validation and application of typing methods for the use in bacterial epidemiology. Clin. Microbiol. Infect. 2007;13:Suppl.3:1-46.
- Willse A., Straub T.M., Wunschel S.C., Small J.A., Call D.R., Daly D.S., Chandler D.P. Quantitative oligonucleotide microarray fingerprinting of *Salmonella enterica* isolates. Nucl. Acids Res. 2004;32(5): 1848-1856.

Применение репродуктивных технологий для повышения эффективности геномной селекции молочного крупного рогатого скота

Н.С. Юдин^{1, 2, 3}, К.И. Лукьянов¹, М.И. Воевода^{1, 2, 3}, Н.А. Колчанов¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины», Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Геномная селекция – отбор, при котором племенная ценность животного предсказывается по маркерам, равномерно покрывающим весь геном. В работе обобщены сведения о некоторых современных тенденциях в области геномной селекции молочного крупного рогатого скота, а также о применении репродуктивных технологий для повышения эффективности отбора. Основные тенденции в развитии метода геномной селекции заключаются в повышении точности племенных оценок путем объединения референсных популяций; включении в селекционные программы генотипирования коров; предсказании генотипов отсутствующих SNP на основе чипов с более низкой плотностью маркеров и предсказании генотипов животных по генотипам родственников. В сочетании с современными репродуктивными биотехнологиями (сексирование семени, множественная овуляция и пересадка эмбрионов, трансвагинальная аспирация ооцитов с последующим экстракорпоральным оплодотворением, генотипирование эмбрионов, клонирование лучших животных-производителей и т.д.) отбор по геному потенциально способен давать еще большую экономическую выгоду. При геномной селекции молочного скота биотехнологические манипуляции с половыми клетками и эмбрионами делают возможным улучшение множества факторов, от которых зависит эффективность отбора: его интенсивности, надежности племенной оценки и интервала между поколениями. Разработаны успешные подходы для генотипирования эмбрионов по большому числу маркеров после биопсии на стадии морулы или бластоцисты, основанные на увеличении количества ДНК эмбриона путем предварительной полногеномной амплификации. В перспективе это позволит разработать новые подходы для снижения интервала между поколениями, селекции элитных маток, снижения степени инбридинга и т.д.

Ключевые слова: крупный рогатый скот; *Bos taurus*; геномная селекция; репродуктивная технология; признаки продуктивности; молочное животноводство; племенная оценка; бык-производитель; пересадка эмбриона; суперовуляция.

Application of reproductive technologies to the improvement of dairy cattle genomic selection

N.S. Yudin^{1, 2, 3}, K.I. Lukyanov¹, M.I. Voevoda^{1, 2, 3}, N.A. Kolchanov¹

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Internal and Preventive Medicine, SB RAMS, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Genomic selection is a direction of breeding in which the value of an animal is predicted from DNA markers evenly covering the entire genome. This review summarizes information on modern trends in the genomic selection of dairy cattle and on application of reproductive technologies to the improvement of breeding process. The main trends in the development of genomic selection include improvement of the accuracy of breeding value estimations by combination of reference populations; use genotyping of cows in breeding programs; imputation of genotypes for absent SNPs with low marker density microarrays, and prediction of animal genotypes from the genotypes of relatives. Genomic selection can be even more profitable in combination with up-to-date reproductive biotechnologies: semen sexing, multiple ovulation and embryo transfer, ovum pick-up followed by in vitro fertilization, embryo genotyping, cloning of best breeders, etc. In programs of dairy cattle genomic selection, biotechnological procedures with gametes and embryos allow improvement of a variety of parameters determining breeding efficacy: selection intensity, accurate breeding value assessment, and generation interval. Successful methods for embryo genotyping for numerous markers after biopsy at the morula or blastocyst stage are based on whole genome amplification of embryo DNA. Eventually, these achievements will provide grounds for new



approaches to the reduction of generation interval, selection of elite cows, reduction of inbreeding rate, etc.

Key words: cattle; *Bos taurus*; genomic selection; reproductive technology; production traits; dairy husbandry; breeding value; breeding bull; embryo transfer; superovulation.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Юдин Н.С., Лукьянов К.И., Воевода М.И., Колчанов Н.А. Применение репродуктивных технологий для повышения эффективности геномной селекции молочного крупного рогатого скота. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):277-285.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Yudin N.S., Lukyanov K.I., Voevoda M.I., Kolchanov N.A. Application of reproductive technologies to the improvement of dairy cattle genomic selection. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(3):277-285.

Достижения в генетическом анализе и методах картирования генов количественных признаков в XX веке позволили в начале нынешнего столетия разработать и успешно реализовать, в особенности на крупном рогатом скоте молочного направления, метод геномной селекции (Смарагдов, 2013; Bouquet, Juga, 2013; Meuwissen et al., 2013; Haskell et al., 2014; Pryce et al., 2014).

Геномная селекция – это форма отбора, при котором племенная ценность предсказывается по маркерам, охватывающим весь геном. С этой целью производится генотипирование особи по десяткам тысяч однонуклеотидных полиморфных маркеров (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), равномерно покрывающих все хромосомы. Первый этап геномной оценки животных-производителей состоит в создании контрольной референсной популяции, которая позволяет проанализировать связь между генотипами SNP и признаками. В молочном скотоводстве, как правило, эту калибровочную выборку формируют из генотипированных быков данной породы, имеющих оценки по потомству. Затем устанавливается статистическая зависимость между генотипами SNP и величиной признаков у потомства. Геномная оценка племенной ценности (Genomic Estimated Breeding Value, GEBV) вычисляется как сумма эффектов всех SNP-маркеров, которые распределены по геному примерно на одинаковом расстоянии. При высокой плотности SNP-маркеров большинство локусов количественных признаков (Quantitative Trait Loci, QTL) потенциально будут находиться в неравновесии по сцеплению с фланкирующими их генетическими маркерами.

Эффекты SNP-маркеров, выявленные в референсной популяции, можно использовать в течение нескольких поколений для достаточно точного предсказания геномных племенных оценок у молодых бычков, исходя только из результатов их генотипирования. По сравнению с традиционными методами селекции, основанными на оценке фенотипа и родословной животного, геномная селекция позволяет, во-первых, более эффективно отбирать животных по признакам, которые имеют низкую наследуемость, во-вторых, оценить большее число кандидатов для селекции и, в-третьих, повысить интенсивность селекции за счет сокращения интервала между поколениями. В настоящее время доля быков, которые продаются только на основании GEBV, без традиционного тестирования по потомству, в разных странах мира составляет от 25 до 50 % (Pryce, Daetwyler, 2012).

В последние два десятилетия для ограничения числа пересаживаемых эмбрионов племенные компании ис-

пользуют технологию биопсии эмбрионов с последующим определением пола методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Hasler, 2014). При использовании геномной селекции потенциальное преимущество объединения производства эмбрионов с их генотипированием становится еще выше. Современные репродуктивные технологии могут быть использованы как для повышения числа селекционных кандидатов, так и для сокращения интервала между поколениями.

К числу таких технологий, в первую очередь, относятся множественная овуляция и пересадка эмбрионов (Multiple Ovulation and Embryo Transfer, MOET), а также трансвагинальная аспирация ооцитов (Ovum Pick-Up, OPU) с последующим производством эмбрионов (In Vitro Production, IVP), которое включает экстракорпоральное оплодотворение (In Vitro Fertilization, IVF). Значительные надежды также возлагают на клонирование отдельных выдающихся животных-производителей с помощью пересадки ядер соматических клеток (Somatic Cell Nuclear Transfer, SCNT). Одна из основных проблем использования репродуктивных технологий при геномной селекции заключается в необходимости генотипирования большого числа SNP-маркеров в наименьшем числе клеток, полученных при биопсии эмбриона на доимплантационной стадии.

В обзоре обобщены сведения о некоторых современных тенденциях в области геномной селекции молочного скота, а также о применении репродуктивных технологий для повышения эффективности селекционного процесса.

Современные тенденции в геномной селекции молочного крупного рогатого скота

Повышение точности геномных племенных оценок путем объединения референсных популяций. Точность геномных племенных оценок зависит от степени неравновесия по сцеплению (linkage disequilibrium, LD) между маркерами и QTL, а также от размера референсной популяции. Поэтому геномная селекция наиболее эффективна для распространенных в мире пород, таких как голштинская. При этом повышение точности геномных оценок зависит от числа индивидов, добавленных к контрольной популяции; надежности их фенотипирования, а также их родственных отношений (Lund et al., 2011). Например, объединение голштинских референсных популяций по 4 тыс. быков каждая, из четырех основных европейских племенных компаний (UNCEIA, VikingGenetics, German Holstein Association и CRV Holding BV) повысило надеж-

ность геномных предсказаний в среднем на 10 % по сравнению с результатами, полученными при использовании только национальных референсных популяций (Lund et al., 2011). Для разных признаков и компаний выигрыш составил от 2 до 19 %. Увеличение размера контрольной выборки посредством объединения нескольких близкородственных популяций одной породы особенно важно для признаков с низкой наследуемостью.

Как известно, размер референсной популяции ограничен для местных малочисленных пород. Решить эту проблему можно только с помощью объединения животных нескольких пород в одну референсную группу. Такой подход возможен благодаря наличию у разных пород консервативных участков генома с высокой степенью LD, которое поддерживает ассоциацию между QTL и соседним SNP. Специально для анализа таких коротких блоков с высоким LD компания «Illumina» в 2010 г. выпустила биочип с высокой плотностью SNP BovineHD BeadChip, содержащий 777609 SNP (Illumina, 2015a).

Так, для 6 различных признаков повышение корреляции между предсказанными и наблюдаемыми племенными оценками для многопородной референсной популяции, состоявшей из быков нормандской, монбельярдской и голштинской пород, по сравнению с однопородной популяцией, составило от 1,6 до 2,9 % (Hoze et al., 2014). При этом средний выигрыш в точности генотипирования на HD чипе, по сравнению со стандартным 50K чипом, составил 2,2 %. Точность геномных племенных оценок для референсной популяции из четырех пород скандинавского красного скота повышалась для разных признаков молочной продуктивности от 1,3 до 9,3 %, по сравнению с однопородными популяциями (Zhou et al., 2014).

Современные методы вычисления геномных оценок, как правило, предполагают, что смешанная контрольная популяция является гомогенной в отношении QTL, контролирующих данные признаки. Исследования на модели, в которой предполагалось, что животные в этой объединенной популяции могут нести эффекты породоспецифических QTL, показали, что, по сравнению с гомогенной референсной популяцией, такая модель позволяла лишь незначительно повысить точность предсказания признаков молочной продуктивности (Makgahlela et al., 2013a). Эти же авторы отмечают, что учет различий в частоте аллелей между породами при построении матрицы родства по геномным данным не приводит к существенному повышению точности племенных оценок по сравнению с матрицей родства, построенной по родословным (Makgahlela et al., 2013b, 2014).

Таким образом, использование многопородных референсных популяций может улучшить точность оценок при геномной селекции у малочисленных пород, вероятно, благодаря наличию консервативных между породами блоков с высокой степенью LD. Дополнительное преимущество при расчете геномных племенных оценок дает использование информации о генотипах и фенотипах коров.

Генотипирование коров. Теоретическая оценка потенциальной выгоды от включения коров в программу геномной селекции показывает, что использование фенотипов и генотипов коров может вести к трехкратному

повышению генетического прироста по сравнению с традиционной селекцией и снизить интервал между поколениями быков, при этом должен поддерживаться приемлемый уровень инбридинга (Mc Hugh et al., 2011). Исследование математической модели показало, что одновременное применение данных в анализе по быкам и коровам, по сравнению с популяцией, состоявшей только из одних коров, повышало точность предсказания на 2–5 % и 1–2 % для количества жира и белка соответственно (Calus et al., 2013). Вероятно, этот эффект связан с более точной оценкой фенотипов быков в результате тестирования большого числа дочерей.

До настоящего времени геномная селекция успешно применялась в схемах разведения молочного скота по отцовской линии. Одним из наиболее важных достижений последнего времени является применение недорогих чипов для генотипирования SNP с низкой плотностью маркеров при селекции коров для получения молока и племенных коров (Boichard et al., 2012).

Предсказание генотипов отсутствующих SNP на основе чипов с более низкой плотностью маркеров. В настоящее время стандартный чип для геномной селекции крупного рогатого скота, BovineSNP50 Genotyping BeadChip, содержит зонды для анализа 54609 SNP (Illumina, 2015b). Стоимость генотипирования большой референсной популяции может быть снижена путем использования чипов с низкой плотностью SNP и предсказанием генотипов недостающих SNP для повышения числа генетических маркеров на основе предварительного генотипирования на чипах с высокой плотностью небольшой популяции животных. Недорогой чип для анализа SNP с низкой плотностью, Illumina Bovine LD chip, был специально выпущен для предсказания генотипов других SNP, которые чаще покрывают геном крупного рогатого скота (Illumina, 2015c). Чип содержит 6090 SNP, которые имеют высокую частоту редкого аллеля, а также равномерно распределены по геному, за исключением концов хромосом, где число SNP повышено.

На основании информации о генотипах 777962 SNP у 3122 быков, относящихся к 7 породам, с помощью компьютерной программы Beagle была проведена оценка точности предсказания генотипов недостающих SNP (Berry et al., 2014). Предварительно были сформированы выборки животных, для анализа которых использовали чипы с низкой (LD; 6501 SNP), средней (50K; 47770 SNP) и высокой (HD; 735151 SNP) плотностью маркеров. Средняя степень совпадения аллелей для породы при предсказании от LD до HD варьировала от 0,956 до 0,974 и от 0,947 до 0,967 при использовании однопородной или многопородной референсной популяции соответственно. Тот же параметр при предсказании от 50K до HD чипов варьировал от 0,987 до 0,994 и от 0,987 до 0,993, если контрольная выборка состояла из одной и нескольких пород соответственно.

По данным других авторов, при анализе обучающей выборки из 1115 голштинских, 61 гернзейского и 476 айрширских быков степень совпадения аллелей для предсказания генотипов от 50K до HD составляла 0,968–0,995 (Larmer et al., 2014). Исследование 5153 животных от 16 пород показало, что использование многопородной референсной

популяции практически не улучшает точности предсказания от 50К до HD, однако 99 % SNP могут быть точно предсказаны, если более 300 животных данной породы были генотипированы на HD-чипах (Hoze et al., 2013).

Исследование пяти компьютерных методов предсказания (Beagle, IMPUTE2, Findhap, AlphaImpute, FImpute) показало, что наиболее надежны методы Beagle и IMPUTE2 (Ma et al., 2013). При этом точность предсказания от LD до 50К была существенно ниже, чем от 50К до HD. Также было проведено исследование влияния размера референсной популяции и компьютерного метода на точность предсказания SNP в популяциях из 548 и 1289 животных голштинской породы, генотипированных на HD-чипе (Schrooten et al., 2014). Предсказание генотипов SNP проводили с помощью компьютерных программ Beagle и DAGPHASE. Наименьшая ошибка предсказания (0,41 %) была получена при использовании программы Beagle и референсной популяции размером 1289 животных. Некоторые авторы отмечают наличие в геноме областей с пониженной степенью совпадения аллелей после предсказания (Pryce et al., 2014). Одной из возможных причин этого может быть слабое неравновесие по сцеплению между SNP-маркерами в этих районах.

Включение HD-гаплотипов в процедуру получения геномных племенных оценок, предсказанных на основе генотипирования части животных с использованием HD-чипа, повышало их надежность на 1–2 % по сравнению с чипом 50К (Schopen, Schrooten, 2014). Использование геномных племенных оценок быков немецкой симментальской породы на основе предсказанных HD-генотипов вместо реальных 50К-генотипов позволило увеличить точность оценок на 1,5 % (Ertl et al., 2014). В другом исследовании было показано, что, хотя точность предсказания HD генотипов на основе LD генотипов довольно низка, это лишь незначительно снижает конечную точность геномных племенных оценок (Jimenez-Montero et al., 2013).

Предсказание генотипов у негенотипированных животных по генотипам родственников. При геномной селекции предсказание генотипов у животных может помочь включить выдающихся животных-производителей в процедуру расчета племенных оценок, особенно когда известна генетическая информация о родственниках. Теоретические расчеты показывают, что включение информации о генотипах отца и дедов повышает точность предсказания на 13%, а применение информации о генотипе одного, двух и четырех потомков повышает точность на 16, 23 и 35 % соответственно (Vouwman et al., 2014). В другой работе было правильно предсказано 93,5 % генотипов SNP на основе генотипов четырех потомков животного (VanRaden et al., 2013).

Использование репродуктивных технологий при геномной селекции крупного рогатого молочного скота

Скорость генетических изменений в популяции при искусственной селекции зависит от четырех основных факторов (Falconer, Maskey, 1996), классическое уравнение для описания генетического прироста при селекции:

$$\Delta G = (i \cdot r \cdot \sigma_A) / L,$$

где ΔG – ответ на отбор, т.е. разница между средним фенотипическим значением признака у потомков отобранных родителей и всего родительского поколения; i – интенсивность отбора; r – надежность племенной оценки; σ_A – аддитивное генетическое стандартное отклонение интересующего признака и L – интервал между поколениями.

При геномной селекции молочного скота биотехнологические манипуляции с половыми клетками и эмбрионами делают возможным улучшение всех параметров для ускорения генетического прироста (таблица).

По традиционной схеме селекции генетический прирост достигается путем использования искусственного осеменения спермой тестируемых по потомству быков. Поскольку в молочном скотоводстве селекция проводится по признакам, проявляющимся только у коров, тестирование по потомству необходимо для получения группы дочерей, чьи показатели используются для предсказания генетической ценности быков. Однако тестирование по потомству требует много времени (не менее 5 лет) и финансовых затрат на содержание быков и организацию проверки их дочерей. Поэтому при традиционной селекции число отбираемых молодых бычков (селекционных кандидатов) очень невелико.

В ходе геномной селекции резко снижается интервал между поколениями (рисунок). Например, компания «Nordic Cattle Genetic Evaluation» недавно снизила возраст геномного тестирования бычков всех пород до 10 мес (Nordic Cattle Genetic Evaluation ..., 2015). Представлена схема селекции, в основу которой положено геномное тестирование ооцитов, полученных от неполовозрелых телок (так называемая «велогенетика»). Считается, что при использовании такой схемы интервал между поколениями удастся сократить до 3–6 мес (Georges, Massey, 1991).

Поскольку стоимость генотипирования одного животного на стандартном 50К-чипе невелика (около 65 евро), геномная селекция позволяет существенно повысить число селекционных кандидатов, чтобы максимально увеличить шансы получения выдающихся индивидов. Геномная оценка большого числа кандидатов становится критически необходимой, когда животных анализируют по большому числу признаков с низкой наследуемостью (Humboldt et al., 2010).

Другой путь повышения эффективности геномной селекции заключается в генотипировании коров. Таким путем можно идентифицировать элитных коров-производительниц, которых впоследствии можно использовать как доноров для получения эмбрионов *in vitro* и *in vivo* (таблица). Применение сексированного семени, как было показано путем математического моделирования, существенно увеличивает ежегодный эффект селекции (Sorensen et al., 2011). Однако на уровне племенного ядра эффект сексирования оказался низким по сравнению с эмбриональными биотехнологиями. Действительно, использование сексированного семени действует главным образом через повышение числа селекционных кандидатов, приводя к изменению интенсивности селекции. Внедрение эмбриональных биотехнологий (МОЕТ, IVF) позволяет интенсифицировать процесс производства на ограниченном числе избранных элитных коров при

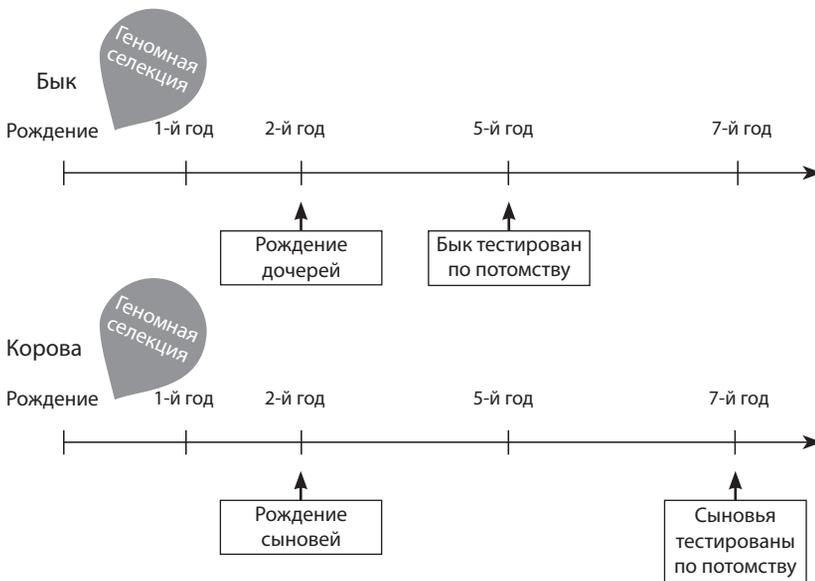
Влияние репродуктивных технологий на эффективность геномной селекции

Технология	Описание	Преимущества	Недостатки
Искусственное осеменение	Искусственное введение спермы в половые пути коровы. Сперму получают заблаговременно от элитных быков. Возможна транспортировка спермы в замороженном виде на большие расстояния	Увеличивается точность за счет фенотипирования родственников. Увеличивается интенсивность за счет снижения числа селекционных кандидатов	Повышается инбридинг за счет интенсивного использования одних и тех же элитных быков
Разделение семени по полу (сексирование)	Разделение сперматозоидов с X- и Y- хромосомой с помощью метода поточной цитометрии	Увеличивается интенсивность за счет контроля пола у потомков	Снижается фертильность спермы из-за применения флюоресцентного красителя
Множественная овуляция и пересадка эмбрионов	Метод получения большого числа потомков от выдающейся коровы <i>in vivo</i> . Включает искусственную стимуляцию коровы к образованию большого числа яйцеклеток (суперовуляцию), природное скрещивание или искусственное осеменение коровы, сбор эмбрионов хирургическим путем либо вымыванием через шейку матки и пересадку эмбрионов реципиентным коровам	Повышается интенсивность за счет использования элитных коров (процедуру можно повторять каждые 6–7 недель)	Повышается инбридинг за счет интенсивного использования одних и тех же маток-производительниц. Увеличение интервала между поколениями при хранении замороженных эмбрионов
Трансвагинальная аспирация ооцитов с последующим экстракорпоральным оплодотворением	Метод получения большого числа потомков от выдающейся коровы <i>in vitro</i> . Включает получение зрелых ооцитов путем трансвагинальной пункции фолликулов под контролем УЗИ, искусственное оплодотворение <i>in vitro</i> и пересадку эмбрионов реципиентным коровам	Повышается интенсивность за счет использования элитных коров (процедуру можно повторять 1–2 раза в неделю). Сокращается интервал между поколениями за счет проведения OPU у молодых препубертатных телок	Повышается инбридинг за счет интенсивного использования одних и тех же маток-производительниц
Клонирование	Искусственное получение генетически идентичных организмов путем переноса ядра соматической клетки в энуклеированную яйцеклетку.	Повышается интенсивность селекции за счет создания множества телят от ограниченного числа маток. Сокращается интервал между поколениями за счет использования эмбриональных стволовых клеток	Повышается инбридинг за счет интенсивного использования выдающихся элитных животных
Генотипирование эмбрионов	Генотипирование нескольких клеток, полученных при биопсии эмбрионов, с последующей пересадкой эмбрионов реципиентным коровам	Повышается интенсивность селекции и снижается инбридинг за счет тестирования большого числа селекционных кандидатов. Сокращается интервал между поколениями. Можно контролировать неаддитивные компоненты генетической изменчивости признака	Высокий процент ошибок при генотипировании менее 5–10 клеток. Необходимость проведения предварительной полногеномной амплификации

повышении интенсивности селекции коров-производительниц (Pedersen et al., 2012). Путем использования повторных процедур IVF число эмбрионов, продуцированных за определенный период времени, может быть увеличено в 2–3 раза по сравнению с технологией МОЕТ (Galli et al., 2014).

Однако МОЕТ может существенно повысить степень инбридинга, главным образом благодаря повторным процедурам получения эмбрионов от ограниченного числа элитных коров. Сокращение интервала между поколениями также может вести к повышению степени

инбридинга (Clark et al., 2013; Boichard et al., 2015). Поэтому применение генотипирования самок может ограничить инбридинг через использование схем скрещивания с учетом геномной информации. При этом родство между животными оценивается по матрице геномного сходства. Таким путем можно избежать моногенных генетических заболеваний, которые выщепляются при скрещивании животных, являющихся носителями патологического аллеля (Nicholas, Hobbs, 2014). Для противодействия повышению инбридинга также может применяться другая стратегия – межпородное скрещивание, повышающее



Сроки оценки животных-производителей при геномной селекции и традиционной оценке по потомству.

как молочную продуктивность, так и репродуктивные показатели животных (Jonas, de Koning, 2015).

Путем математического моделирования схемы геномной селекции, применявшейся в компании «Viking Red», было исследовано влияние числа быков, применявшихся для искусственного осеменения, числа телок, которым делалась процедура МОЕТ, количество процедур МОЕТ на одну телку и числа генотипированных телок на ежегодный генетический прирост (в евро) и степень инбридинга (Bouquet et al., 2015). Показано, что технология МОЕТ существенно увеличивает генетический прирост, не влияя на степень инбридинга, при условии, что размер ядерного стада, в котором проводится эта процедура, и число быков, применяемых для осеменения, достаточно велики. Увеличение числа процедур МОЕТ на одну телку оказывает более значительное влияние на генетический прирост, чем повышение числа телок, которым делалась эта процедура, однако при этом также возрастает степень инбридинга.

Биопсия эмбрионов – как сохранить их жизнеспособность?

Узким местом процедуры биопсии является необходимость достижения баланса между удалением наименьшего числа бластомеров для сохранения жизнеспособности эмбриона и получением достаточного для анализа количества ДНК. Проведение биопсии эмбрионов требует высококвалифицированного персонала и наличия дорогостоящего оборудования (например, снабженный микроманипуляторами инвертированный микроскоп). В зависимости от стадии развития эмбриона могут быть использованы три метода: биопсия с применением микроскальпеля, аспирационная биопсия и биопсия иглой. Биопсия иглой считается наиболее практичной и дает высокую частоту наступления беременности в условиях животноводческих ферм (Senariu et al., 2012).

При проведении биопсии в зависимости от метода удаляют 5–15 эмбриональных клеток. После биопсии эмбрионы культивируют *in vitro* в течение 3–48 ч и затем немедленно либо трансплантируют синхронизированным коровам-реципиентам, либо подвергают заморозке. Частота наступления беременности в результате пересадки живого или криоконсервированного эмбриона после процедуры биопсии варьирует от 31 до 62,3 % и не зависит от стадии развития эмбриона (Ponsart et al., 2014).

Замораживание эмбрионов после биопсии остается проблемой для методики генотипирования эмбрионов после экстракорпорального оплодотворения.

При использовании биопсии микроскальпелем наблюдались высокие проценты выживания после 48 ч культивирования *in vitro*, когда эмбрионы подвергали биопсии и замораживали на стадиях бластоцисты или морулы (97,1 и 88,4 % соответственно) (Ponsart et al., 2014).

Методы получения достаточного для генотипирования количества ДНК из эмбриональных клеток

Несколько исследователей сообщило, что ДНК одной или нескольких клеток, собранных при биопсии, достаточно для определения пола, анализа SNP или даже полногеномного секвенирования преимплантационного эмбриона (Carneiro et al., 2011; Van der Aa et al., 2013; Voet et al., 2013). Тем не менее количество геномной ДНК, которое выделено из нескольких клеток, может быть слишком мало для надежного анализа генетических маркеров в случае геномной селекции. Например, эффективность методики ПЦР для определения пола обратно связана с числом клеток: 85,5 % для трех и менее клеток, и 100 % для семи и более клеток (Ponsart et al., 2014). Поэтому были разработаны несколько методов для повышения количества геномной ДНК, необходимого для генотипирования множества маркеров.

Одним из первых методов для повышения выхода ДНК было использование пересадки ядер для клонирования клеток биоптатов. Для этого после биопсии клетки изолировали и смешивали с энуклеированными активированными ооцитами реципиентов. После использования пересадки ядер количество ДНК из одной бластоцисты позволяло провести множественное генотипирование панели из 45 микросателлитных маркеров со средней эффективностью 90 % (Ponsart et al., 2014). Этот дорогостоящий и трудоемкий метод, вероятно, не получит дальнейшего развития, поскольку не обеспечивает достаточного выхода геномной ДНК для анализа на чипах высокой плотности (несколько микрограммов).

Другой метод наработки большего количества ДНК основан на культивировании *in vitro* клеток, полученных путем биопсии от блас-

тоцист. Этот метод требует много времени и иногда не обеспечивает достаточного количества ДНК (Gamarra et al., 2010). Например было показано, что только 50 % клеток биоптатов способны пролиферировать после 10 дней культивирования *in vitro* (Ramos-Ibeas et al., 2014). Тем не менее недавно появилось сообщение о селекции эмбрионов по результатам геномных племенных оценок клеточных линий фибробластов с последующим благополучным клонированием наилучших индивидов путем переноса ядра соматической клетки в энуклеированную яйцеклетку (Kasinathan et al., 2015).

Наиболее распространенный в настоящее время метод заключается в предварительной полногеномной амплификации (Whole-Genome Amplification, WGA) эмбриональной ДНК перед генотипированием на чипах (Macauley, Voet, 2014). ДНК из биоптатов эмбрионов крупного рогатого скота в настоящее время амплифицируют с использованием коммерческих наборов для WGA, таких как GenomePlex (Sigma-Aldrich, USA) (Treff et al., 2011), REPLI-g UltraFast Mini Kit (Qiagen, France) (Le Bourhis et al., 2011) или GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare, USA) (Fisher et al., 2012). После WGA образуется 5–7 мкг ДНК, что представляет увеличение первоначального количества геномной ДНК, по крайней мере, в 40 тыс. раз (Ponsart et al., 2014).

Однако несбалансированная амплификация гетерозиготных локусов может приводить к «выпадению» отдельных аллелей, когда гетерозиготный генотип эмбриона ошибочно идентифицируют как гомозиготный. Доля таких ошибок генотипирования варьирует от 2 до 18 % (Le Bourhis et al., 2011; Humblot et al., 2010; Fisher et al., 2012; Lauri et al., 2013). Другие ошибки возникают в результате противоположного феномена, при котором гомозиготы ошибочно могут быть идентифицированы как гетерозиготы. Этот тип ошибок возникает примерно в 6,8 % случаев (Fisher et al., 2012). Показана достоверная обратная корреляция между числом ошибок генотипирования эмбриона и числом клеток, взятых при биопсии (Fisher et al., 2012). Для устранения влияния предпочтительной амплификации одного из аллелей при вычислении племенных оценок было предложено использовать только гетерозиготные маркеры (Le Bourhis et al., 2011). Качество генотипирования эмбрионов можно существенно улучшить при использовании генотипов родителей, например, такая информация может быть взята для предсказания недостающих SNP у эмбриона (Le Bourhis et al., 2011; Shojaei Saadi et al., 2014).

Ошибки генотипирования начинают возникать при снижении количества клеток перед WGA ниже 30–40 (Fisher et al., 2012; Lauri et al., 2013). Число таких ошибок при анализе ДНК, выделенной из 15 клеток, после WGA достоверно выше, чем при генотипировании интактной геномной ДНК этой же клеточной линии, и зависит от метода выделения ДНК и технологии WGA (Shojaei Saadi et al., 2014). Считается, что для надежного определения племенных оценок эмбрионов порог ошибок генотипирования не должен превышать 85 % (Le Bourhis et al., 2012). Недавно с помощью модифицированного метода полногеномного секвенирования удалось проанализировать биоптаты человека размером 5–10 клеток с точностью не более

10 ошибок на эмбрион (Peters et al., 2015). Несомненно, что дальнейшее усовершенствование методов работы с малыми количествами ДНК из биоптатов позволит решить проблему геномного анализа единичных клеток.

Использование генотипирования эмбрионов в племенной работе

При проведении анализа ДНК, включающего выделение, WGA-амплификацию и генотипирование на чипах, в условиях научного центра эмбриональные клетки после биопсии необходимо либо транспортировать в лабораторию в небольшом объеме среды, либо пересылать по почте. Условия транспортировки, как оказалось, являются критическим фактором успеха генотипирования. При анализе образцов, амплифицированных на месте забора материала, и образцов, отосланных по почте, выяснилось, что WGA-амплификацию лучше выполнять в месте проведения биопсии либо пересылать биоптаты в лабораторию по почте в замороженном состоянии (Le Bourhis et al., 2010).

Были вычислены племенные оценки для эмбрионов (молочная продуктивность и морфологические признаки) и проведено их сравнение с соответствующими оценками телят (Le Bourhis et al., 2011; Sargolzaei et al., 2012). В целом наблюдались незначительные различия между племенными оценками по данным биопсии эмбрионов и родившихся телят. Коэффициенты корреляции для разных признаков у животных голштинской породы варьируют от 0,985 до 0,997, а у монбеллиардской породы – от 0,937 до 0,998 (Ponsart et al., 2014). По данным других авторов, средний коэффициент корреляции между племенными оценками эмбрионов и телят после предсказания недостающих SNP составляет 0,991 (Sargolzaei et al., 2012).

Геномная селекция произвела революцию в молочном животноводстве. Благодаря ей значительно повысилась эффективность отбора за счет сокращения интервала между поколениями, тестирования большого числа селекционных кандидатов и улучшения точности оценок для признаков с низкой наследуемостью. Основные тенденции в развитии этого метода связаны с повышением точности племенных оценок путем объединения референсных популяций; включением в селекционные программы генотипирования коров; предсказанием генотипов отсутствующих SNP на основе чипов с более низкой плотностью маркеров и предсказанием генотипов животных по генотипам родственников.

Коммерческая выгода отбора по множеству ДНК-маркеров, равномерно распределенных по всему геному, многократно возрастает, если он сочетается с применением вспомогательных биотехнологий для получения племенной продукции от элитных животных-производителей. При геномной селекции молочного скота биотехнологические манипуляции с половыми клетками и эмбрионами позволяют улучшать множество факторов, от которых зависит эффективность отбора: его интенсивность, надежность племенной оценки и интервал между поколениями. Применение современного метода полногеномной амплификации для увеличения количества эмбриональной ДНК позволяет проводить анализ большого числа генетических маркеров у нескольких клеток,

полученных после биопсии на стадии морулы или бластоцисты. В будущем такие подходы приведут к дальнейшему снижению интервала между поколениями, эффективному контролю над степенью инбридинга, массовой селекции элитных маток и т. д.

Благодарности

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-00968а и бюджетным проектом VI.58.1.1.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Смарагдов М.Г. Геномная селекция молочного скота в мире. Пять лет практического использования. *Генетика*. 2013;49(11): 1251-1260.

Berry D.P., McClure M.C., Mullen M.P. Within- and across-breed imputation of high-density genotypes in dairy and beef cattle from medium- and low-density genotypes. *J. Anim. Breed. Genet.* 2014;131(3):165-172. DOI: 10.1111/jbg.12067

Boichard D., Chung H., Dassanneville R., David X., Eggen A., Fritz S., Gietzen K.J., Hayes B.J., Lawley C.T., Sonstegard T.S., Van Tassel C.P., VanRaden P.M., Viaud-Martinez K.A., Wiggans G.R. Design of a bovine low-density SNP array optimized for imputation. *PLoS One*. 2012;7:e34130. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0034130

Boichard D., Ducrocq V., Fritz S. Sustainable dairy cattle selection in the genomic era *J. Anim. Breed Genet.* 2015;132(2):135-143. DOI: 10.1111/jbg.12150

Bouquet A., Juga J. Integrating genomic selection into dairy cattle breeding programmes: a review. *Animal*. 2013;7(5):705-713. DOI: 10.1017/S1751731112002248

Bouquet A., Sorensen A.C., Juga J. Genomic selection strategies to optimize the use of multiple ovulation and embryo transfer schemes in dairy cattle breeding programs. *Livestock Sci.* 2015;174:18-25. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2015.01.014>

Bouwman A.C., Hickey J.M., Calus M.P., Veerkamp R.F. Imputation of non-genotyped individuals based on genotyped relatives: assessing the imputation accuracy of a real case scenario in dairy cattle. *Genet. Sel. Evol.* 2014;46:6. DOI: 10.1186/1297-9686-46-6

Calus M.P., de Haas Y., Veerkamp R.F. Combining cow and bull reference populations to increase accuracy of genomic prediction and genome-wide association studies. *J. Dairy Sci.* 2013;96(10):6703-6715. DOI: 10.3168/jds.2012-6013

Carneiro M.C., Takeuchi P.L., Araujo A., Lobo R.B., Elias F.P., Vila R.A., Miranda-Furtado C.L., Ramos E.S. Sexing single bovine blastomeres using TSPY gene amplification. *Genet. Mol. Res.* 2011;10(4):3937-3941. DOI: 10.4238/2011

Cenariu M., Pall E., Cernea C., Groza I. Evaluation of bovine embryo biopsy techniques according to their ability to preserve embryo viability. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012;2012:541384. DOI: 10.1155/2012/541384

Clark S.A., Kinghorn B.P., Hickey J.M., van der Werf J.H. The effect of genomic information on optimal contribution selection in livestock breeding programs. *Genet. Sel. Evol.* 2013;45:44. DOI: 10.1186/1297-9686-45-44

Ertl J., Edel C., Emmerling R., Pausch H., Fries R., Götz K.U. On the limited increase in validation reliability using high-density genotypes in genomic best linear unbiased prediction: observations from Fleckvieh cattle. *J. Dairy Sci.* 2014;97(1):487-496. DOI: 10.3168/jds.2013-6855

Falconer D.S., Mackay T.F.C. *Introduction to Quantitative Genetics*. Burnt Mill, England: Longman, 1996.

Fisher P.J., Hyndman D.L., Bixley M.J., Oback F.C., Popovic L., McGowan L.T., Berg M.C., Wells D.N. Brief communication: potential for genomic selection of bovine embryos. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 2012;72:156-158.

Galli C., Duchi R., Colleoni S., Lagutina I., Lazzari G. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology*. 2014;Jan. 1;81(1):138-151. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.008

Gamarra G., Le Bourhis D., Gall L., Laffont L., Ruffini S., Humblot P. Attempts to culture biopsied cells from *in vitro* bovine blastocysts for genotyping. *Reprod. Fertil. Dev.* 2010;22:238-239. DOI:10.1071/RDV22N1AB160

Georges M., Massey J.M. Velogenetics, or the synergistic use of marker assisted selection and germ-line manipulation. *Theriogenology*. 1991;35(1):151-159. DOI: 10.1016/0093-691X(91)90154-6

Haskell M.J., Simm G., Turner S.P. Genetic selection for temperament traits in dairy and beef cattle. *Front. Genet.* 2014;5:368. DOI: 10.3389/fgene.2014.00368

Hasler J.F. Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*. 2014;81(1):152-169. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.010

Hoze C., Fouilloux M.N., Venot E., Guillaume F., Dassonneville R., Fritz S., Ducrocq V., Phocas F., Boichard D., Croiseau P. High-density marker imputation accuracy in sixteen French cattle breeds. *Genet. Sel. Evol.* 2013;45: 33. DOI: 10.1186/1297-9686-45-33

Hoze C., Fritz S., Phocas F., Boichard D., Ducrocq V., Croiseau P. Efficiency of multi-breed genomic selection for dairy cattle breeds with different sizes of reference population. *J. Dairy Sci.* 2014;97(6):3918-3929. DOI: 10.3168/jds.2013-7761

Humblot P., Le Bourhis D., Fritz S., Colleau J.J., Gonzalez C., Guyader Joly C., Malafosse A., Heyman Y., Amigues Y., Tissier M., Ponsart C. Reproductive technologies and genomic selection in cattle. *Vet. Med. Int.* 2010;2010:1-8. DOI: 10.4061/2010/192787

Illumina. Bovine HD Genotyping BeadChip. 2015a. available at http://www.illumina.com/Documents/products/datasheets/datasheet_bovineHD.pdf

Illumina. Bovine SNP50 Genotyping BeadChip. 2015b. available at http://http://www.illumina.com/Documents/products/datasheets/datasheet_bovine_snp50.pdf. Illumina.%202011c.

Illumina. Bovine LD. 2015c. available at http://www.illumina.com/documents/products/product_information_sheets/product_info_bovineLD.pdf

Jimenez-Montero J.A., Gianola D., Weigel K., Alenda R., Gonzalez-Recio O. Assets of imputation to ultra-high density for productive and functional traits. *J. Dairy Sci.* 2013;96(9):6047-6058. DOI: 10.3168/jds.2013-6793

Jonas E., de Koning D.J. Genomic selection needs to be carefully assessed to meet specific requirements in livestock breeding programs. *Front Genet.* 2015;Feb. 20;6:49. DOI: 10.3389/fgene.2015.00049

Kasinathan P., Wei H., Xiang T., Molina J.A., Metzger J., Broek D., Kasinathan S., Faber D.C., Allan M.F. Acceleration of genetic gain in cattle by reduction of generation interval. *Sci. Rep.* 2015;5:8674. DOI: 10.1038/srep08674

Larmer S.G., Sargolzaei M., Schenkel F.S. Extent of linkage disequilibrium, consistency of gametic phase, and imputation accuracy within and across Canadian dairy breeds. *J. Dairy Sci.* 2014;97(5):3128-3141. DOI: 10.3168/jds.2013-6826

Lauri A., Lazzari G., Galli C., Lagutina I., Genzini E., Braga F., Mariani P., Williams J.L. Assessment of MDA efficiency for genotyping using cloned embryo biopsies. *Genomics*. 2013;101(1):24-29. DOI: 10.1016/j.ygeno.2012.09.002

Le Bourhis D., Mullaart E., Humblot P., Coppieters W., Ponsart C. Bovine embryo genotyping using a 50k SNP chip. *Reprod. Fertil. Dev.* 2010;23:197. DOI:10.1071/RDV23N1AB193

Le Bourhis D., Mullaart E., Schrooten C., Fritz S., Coppieters W., Ponsart C. Breeding values concordance between embryos and corresponding calves. *Reprod. Fertil. Dev.* 2011;24:180. DOI: 10.1071/RDV24N1AB135

Lund M.S., Roos A.P., Vries A.G., Druet T., Ducrocq V., Fritz S., Guillaume F., Guldbbrandtsen B., Liu Z., Reents R., Schrooten C., See-

- fried F., Su G. A common reference population from four European Holstein populations increases reliability of genomic predictions. *Genet. Sel. Evol.* 2011;43:43. DOI: 10.1186/1297-9686-43-43
- Ma P., Brondum R.F., Zhang Q., Lund M.S., Su G. Comparison of different methods for imputing genome-wide marker genotypes in Swedish and Finnish Red Cattle. *J. Dairy Sci.* 2013;96(7):4666-4677. DOI: 10.3168/jds.2012-6316
- Macaulay I.C., Voet T. Single cell genomics: advances and future perspectives. *PLoS Genet.* 2014;10(1):e1004126. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004126
- Makgahlela M.L., Mantysaari E.A., Strandén I., Koivula M., Nielsen U.S., Sillanpää M.J., Juga J. Across breed multi-trait random regression genomic predictions in the Nordic Red dairy cattle. *J. Anim. Breed. Genet.* 2013a;130(1):10-19. DOI: 10.1111/j.1439-0388.2012.01017.x
- Makgahlela M.L., Strandén I., Nielsen U.S., Sillanpää M.J., Mantysaari E.A. The estimation of genomic relationships using breedwise allele frequencies among animals in multibreed populations. *Dairy Sci.* 2013b;96(8):5364-5375. DOI: 10.3168/jds.2012-6523
- Makgahlela M.L., Strandén I., Nielsen U.S., Sillanpää M.J., Mantysaari E.A. Using the unified relationship matrix adjusted by breed-wise allele frequencies in genomic evaluation of a multibreed population. *J. Dairy Sci.* 2014;97(2):1117-1127. DOI: 10.3168/jds.2013-7167
- Mc Hugh N., Meuwissen T.H., Cromie A.R., Sonesson A.K. Use of female information in dairy cattle genomic breeding programs. *J. Dairy Sci.* 2011;94(8):4109-4118. DOI:10.3168/JDS.2010-4016
- Meuwissen T., Hayes B., Goddard M. Accelerating improvement of livestock with genomic selection. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2013;1:221-237. DOI: 10.1146/annurev-animal-031412-103705
- Nicholas F.W., Hobbs M. Mutation discovery for Mendelian traits in non-laboratory animals: a review of achievements up to 2012. *Anim. Genet.* 2014;45(2):157-170. DOI: 10.1111/age.12103
- Nordic Cattle Genetic Evaluation (NCGE). 2015. available at <http://www.nordicebv.info/News/NewsNAVroutineEvaluation-May2nd2014.htm>
- Pedersen L.D., Kargo M., Berg P., Voergaard J., Buch L.H., Sorensen A.C. Genomic selection strategies in dairy cattle breeding programmes: sexed semen cannot replace multiple oulation and embryo transfer as superior reproductive technology. *J. Anim. Breed. Genet.* 2012;129:152-163. DOI:10.1111/J.1439-0388.2011.00958.X
- Peters B.A., Kermani B.G., Alferov O., Agarwal M.R., McElwain M.A., Gulbahce N., Hayden D.M., Tang Y.T., Zhang R.Y., Tearle R., Crain B., Prates R., Berkeley A., Munne S., Drmanac R. Detection and phasing of single base *de novo* mutations in biopsies from human *in vitro* fertilized embryos by advanced whole-genome sequencing. *Genome Res.* 2015;25(3):426-434. DOI: 10.1101/gr.181255.114
- Ponsart C., Le Bourhis D., Knijn H., Fritz S., Guyader-Joly C., Otter T., Lacaze S., Charreaux F., Schibler L., Dupassieux D., Mullaart E. Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 2014;26(1):12-21. DOI: 10.1071/RD13328
- Pryce J.E., Daetwyler H.D. Designing dairy cattle breeding schemes under genomic selection: a review of international research. *Anim. Prod. Sci.* 2012;52:107-114. DOI: 10.1071/AN11098
- Pryce J.E., Wales W.J., de Haas Y., Veerkamp R.F., Hayes B.J. Genomic selection for feed efficiency in dairy cattle. *Animal.* 2014;8(1):1-10. DOI: 10.1017/S1751731113001687
- Ramos-Ibeas P., Calle A., Pericuesta E., Laguna-Barraza R., Moros-Mora R., Lopera-Vasquez R., Mailló V., Yanez-Mo M., Gutierrez-Adan A., Rizos D., Ramirez M.A. An efficient system to establish biopsy-derived trophoblastic cell lines from bovine embryos. *Biol. Reprod.* 2014;91(1):15. DOI: 10.1095/biolreprod.114.118430
- Sargolzaei M., Vigneault C., Blondin P., Schenkel F., Chesnais J. Results from the Boviteq embryo genotyping research project. Dairy Cattle Breeding and Genetics Committee Meeting, 18 September 2012. Available at: http://lirpa.aps.uoguelph.ca/elares/sites/default/files/msargol_Embryo_Genotyping_Project.pdf.
- Schopen G.C., Schrooten C. Reliability of genomic evaluations in Holstein-Friesians using haplotypes based on the BovineHD BeadChip. *J. Dairy Sci.* 2013;Dec;96(12):7945-7951.
- Schrooten C., Dassonneville R., Ducrocq V., Brondum R.F., Lund M.S., Chen J., Liu Z., Gonzalez-Recio O., Pena J., Druet T. Error rate for imputation from the Illumina BovineSNP50 chip to the Illumina BovineHD chip. *Genet. Sel. Evol.* 2014;46:10. DOI: 10.1186/1297-9686-46-10
- Shojaei Saadi H.A., Vigneault C., Sargolzaei M., Gagne D., Fournier E., de Montera B., Chesnais J., Blondin P., Robert C. Impact of whole-genome amplification on the reliability of pre-transfer cattle embryo breeding value estimates. *BMC Genomics.* 2014;15:889. DOI: 10.1186/1471-2164-15-889
- Sorensen M.K., Voergaard J., Pedersen L.D., Berg P., Sorensen A.C. Genetic gain in dairy cattle populations is increased using sexed semen in commercial herds. *J. Anim. Breed. Genet.* 2011;128:267-275. DOI:10.1111/J.1439-0388.2011.00924.X
- Treff N.R., Su J., Tao X., Northrop L.E., Scott R.T. Jr. Single-cell whole-genome amplification technique impacts the accuracy of SNP microarray-based genotyping and copy number analyses. *Mol. Hum. Reprod.* 2011;17(6):335-343. DOI: 10.1093/molehr/gaq103
- Van der Aa N., Zamani Esteki M., Vermeesch J.R., Voet T. Preimplantation genetic diagnosis guided by single-cell genomics. *Genome Med.* 2013;5(8):71. DOI: 10.1186/gm475
- VanRaden P.M., Null D.J., Sargolzaei M., Wiggans G.R., Tooker M.E., Cole J.B., Sonstegard T.S., Connor E.E., Winters M., van Kaam J.B., Valentini A., Van Doormaal B.J., Faust M.A., Doak G.A. Genomic imputation and evaluation using high-density Holstein genotypes. *J. Dairy Sci.* 2013;96(1):668-678. DOI: 10.3168/jds.2012-5702
- Voet T., Kumar P., Van Loo P., Cooke S.L., Marshall J., Lin M.L., Zamani Esteki M., Van der Aa N., Mateiu L., McBride D.J., Bignell G.R., McLaren S., Teague J., Butler A., Raine K., Stebbings L.A., Quail M.A., D'Hooghe T., Moreau Y., Futreal P.A., Stratton M.R., Vermeesch J.R., Campbell P.J. Single-cell paired-end genome sequencing reveals structural variation per cell cycle. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(12):6119-6138. DOI: 10.1093/nar/gkt345
- Zhou L., Heringstad B., Su G., Gulbrandsen B., Meuwissen T.H., Svendsen M., Grove H., Nielsen U.S., Lund M.S. Genomic predictions based on a joint reference population for the Nordic Red cattle breeds. *J. Dairy Sci.* 2014;97(7):4485-4496. DOI: 10.3168/jds.2013-7580

The *Canis* tangle: a systematics overview and taxonomic recommendations

V. Dinets

Department of Psychology, University of Tennessee, Knoxville, TN 37996 USA

Despite high research interest, the systematics and taxonomy of mammalian genus *Canis* are among the most convoluted and controversial: species boundaries are blurred and incongruent with any existing species concept, while genetic differences between species are low. I provide an overview of existing controversies, the most recent findings, and taxonomic possibilities, and recommend the most practical and well-substantiated solutions. The genus boundaries have to be changed, with two African jackals (*C. adustus* & *C. mesomelas*) moved to a separate genus *Lupulella*. The systematic status of taxa occurring in eastern North America has caused much argument; most recent data indicate that Algonquin (*C. lycaon lycaon*) and Red (*C. l. rufus* and recently exterminated subspecies) Wolves originate from ancient hybridization and should be considered a separate species, while two other populations are of more recent hybrid origin. The systematic position, intraspecific classification, origin and taxonomy of Dog (*C. familiaris*) are particularly controversial. It has been alternatively classified as a subspecies of Gray Wolf (*C. lupus*), a subspecies of Dingo (*C. dingo*), or a full species (*C. familiaris*) with Dingo as a subspecies. Analysis of available data shows that Dog should be classified as a full species with four subspecies, since its origin from a common ancestor with modern Gray Wolf has likely predated its domestication (contrary to the most popular view), and interbreeding between Dog and Gray Wolf in the wild is limited. It is possible that never-domesticated Dog populations have survived in southeastern Asia until very recently, or even exist today.

Key words: wolf; dog; jackal; coyote; dingo; domestication; history; phylogeny; systematic; taxonomy.

Собачий узел: систематический обзор рода *Canis* и предложения по таксономии

В. Динец

Факультет психологии, Университет Теннесси, Ноксвилль, TN 37996 США

Несмотря на значительное внимание исследователей, систематика и таксономия млекопитающих рода *Canis* относятся к наиболее спорным и запутанным. Многие таксоны, входящие в этот род, не соответствуют ни одной из существующих концепций вида, а генетические различия между видами малы. Обзор существующих противоречий, новейших данных и таксономических альтернатив позволяет рекомендовать наиболее обоснованные и практически целесообразные решения таксономических проблем. Границы рода подлежат пересмотру: два вида африканских шакалов (*C. adustus* и *C. mesomelas*) должны быть выделены в отдельный род *Lupulella*. Систематическое положение представителей рода, обитающих на востоке Северной Америки, вызывало ожесточенные дискуссии. Последние данные подтверждают видовую самостоятельность и древнее гибридное происхождение волков алгонкинского (*C. lycaon lycaon*) и рыжего (*C. l. rufus* и недавно истребленных подвидов), а также недавнее гибридное происхождение двух других популяций. Особенно противоречивы систематическое положение, внутривидовая классификация, происхождение и таксономия собаки. Ее классифицируют как подвид или группу подвидов серого волка (*C. lupus*), подвид динго (*C. dingo*) или, наоборот, как самостоятельный вид (*C. familiaris*) с динго в качестве подвида. Анализ имеющихся данных показывает, что собака должна классифицироваться как самостоятельный вид с четырьмя подвидами, поскольку ее происхождение от общего с современным серым волком предка, вопреки распространенному мнению, предшествовало доместикиции, а способность к гибридизации с серым волком в природе ограничена. Возможно, что первично популяции собак существовали в Юго-Восточной Азии до недавнего времени или даже существуют до сих пор.

Ключевые слова: волк; собака; шакал; койот; динго; одомашнивание; история; филогения; систематика; таксономия.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Динец В. Собачий узел: систематический обзор рода *Canis* и предложения по таксономии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):286-291.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Dinets V. The *Canis* tangle: a systematics overview and taxonomic recommendations. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(3):286-291.

УДК 599.742.1:591.612

Поступила в редакцию 12.01.2015 г.

Принята к публикации 28.01.2015 г.

© АВТОР, 2015

Carnivores of genus *Canis* are among the best-studied mammals (Nowak, 1999). The bibliography on their phylogeny is so extensive that its sheer volume can make it difficult to keep perspective, as illustrated by persistent misconceptions criticized by Koler-Matznick (2002), so it appears that a concise overview of the subject and the most recent developments in the area is needed. Despite all the research attention, the systematics of *Canis* still present numerous challenges due largely to high genetic similarity between taxa and to the ability of many species to produce fertile hybrids, and sometimes hybrid swarms, in the wild (Lindblad-Toh et al., 2005; Way, 2013). In addition, the genus includes the world's oldest domesticated species that has diversified, hybridized with many wild species, and evolved into a number of secondarily wild taxa, thus greatly complicating the taxonomic problems. (I will use the term «secondarily wild» for populations completely independent of human presence, and the term «feral» for populations that are human commensals at least to some extent.) These complications mean that the taxonomy of the genus cannot be adequately sorted out using any one of widely used species concepts, and a compromise approach is the most practical. Below is an overview of the systematics of extant *Canis* spp., with a list of major controversies and proposed taxonomic solutions.

Wolves, jackals and coyotes

Traditionally, seven primarily wild extant species of *Canis* have been recognized (Nowak, 1999); recently an eighth species is sometimes added (see below). A few more species, closely related to Gray Wolf and differing mostly in size and the degree of hypercarnivory, have gone extinct since 100 kya (Mech, Boitani, 2003). Below is the list of extant species, with brief accounts of distribution and taxonomic controversies.

Striped Jackal (*C. adustus* Sundevall 1847) and **Black-backed Jackal** (*C. mesomelas* Schreber 1775). Striped Jackal has a continuous range across the savanna zone of Africa from Mauritania to Ethiopia and south to KwaZulu-Natal, and although seven subspecies have been described, their validity is highly questionable (Sillero-Zubiri, 2009); only the animals from the Horn of Africa are highly distinctive phenotypically (pers. obs.). Black-backed Jackal has disjunct distribution, with two distinctive subspecies inhabiting eastern and southern Africa, respectively (Walton, Joly, 2003).

These two closely related (but widely sympatric) species have recently been found to be outside the clade that includes other *Canis* taxa, Dhole (*Cuon alpinus*), and African Wild Dog (*Lycaon pictus*) (Wayne, O'Braien, 1987; Lindblad-Toh et al., 2005). This means that they should be placed in a separate genus, for which the name *Lupulella* Hilzheimer 1906 is available (Walton, Joly, 2003), or, alternatively, that *Cuon* and *Lycaon* should be subsumed into *Canis*, as proposed many times for *Cuon* (Wayne et al., 1997; Vila et al., 1999), but never for *Lycaon*. Since African Wild Dog has very distinctive morphology (including dentition) and behavior (Sillero-Zubiri, 2009), the optimal solution seems to separate the two jackals into *Lupulella*, maintain *Lycaon* as a separate genus, but merge *Cuon* into *Canis*. Accidentally, Dhole has been reported to hybridize with one of *Canis* species in the wild, although only once (Pocock, 1941), while African Wild Dog is not known to hybridize with any other species even

in captivity (Sillero-Zubiri et al., 2004). All species of *Canis*, *Cuon* and *Lycaon* share the same chromosome number: $2n = 78$ (Wayne, 1993).

Simien Wolf (*C. simensis* Rüppell 1835). This distinctively marked species is a highly localized and critically endangered endemic of Ethiopian Highlands. There are two weakly differentiated subspecies, separated by the Rift Valley (Sillero-Zubiri, 2009). This species has been known as Ethiopian Wolf, but since now it is known that Gray Wolf also occurs in Ethiopia (see below), the name «Simien Wolf» is preferable as less ambiguous.

Golden Jackal (*C. aureus* Linnaeus 1758). Historically inhabiting the Balkan Peninsula, Africa south to Senegal and Tanzania, and southern Asia from Turkey and Russia's Black Sea coast to Sri Lanka and Myanmar, this species is currently expanding and has reached Italy, Austria, Vietnam and Malawi (Dinets, Rotshild, 1997; Sillero-Zubiri, 2009). A dozen subspecies have been described, but their validity is doubtful and the species is remarkably uniform phenotypically throughout its range (Sillero-Zubiri, 2009; also pers. obs.).

Coyote (*C. latrans* Say 1823). Historically interior Alaska, western Canada, western USA, Mexico, and Central America south to Honduras (Young, Jackson, 1978); in the last 300 years has colonized most of Alaska, Central America south to Panama, and eastern North America (Sillero-Zubiri, 2009). Coyotes in eastern USA and adjacent parts of Canada have some genes of the following three species, are somewhat wolf-like in appearance, and are known as «Eastern Coyotes» (a taxon never formally described). Within the historical range, nineteen subspecies have been described, but the variation between them is largely clinal (Young, Jackson, 1978), and the validity of many subspecies is highly questionable (Sillero-Zubiri, 2009).

Gray Wolf (*C. lupus* Linnaeus 1758). Historically northern and western North America south to Mexico (where recently extirpated), Eurasia except the tropical rainforest zone, and many islands such as Britain (where also extirpated) and Greenland (Sillero-Zubiri, 2009). The distinctive form *lupaster* of Egypt and Libya has been alternatively assigned to this species and *C. aureus*; recent studies have found that it belongs to the present species and occurs around the periphery of the Sahara and south to Senegal and Ethiopia (Gaubert et al., 2012). In Simien National Park of Ethiopia *C. l. lupaster* is sympatric with as many as four other *Canis* species, including all three jackals and the Simien Wolf, although the latter is altitudinally separated to some extent (pers. obs.). Other highly distinctive subspecies are known from Japan (extinct) (Walker, 2005), Italy (Randi et al., 2000), Haida Gwaii (Weckworth et al., 2010), and India (Aggarwal et al., 2007). Over 35 subspecies have been described (Sillero-Zubiri, 2009); the actual number is still highly controversial. Australian Dingo is often listed as *C. l. dingo*, while the domestic dog is often called *C. l. familiaris*, but this is not the optimal taxonomy, as discussed below.

Red Wolf (*C. rufus* Audubon & Bachman 1851) and **Algonquin Wolf** (*C. lycaon* Schreber 1775) are two forms from eastern North America; the latter is also known as Eastern Timber Wolf. Red Wolf historically inhabited the southeastern USA, was exterminated in the wild, and has recently been reintroduced in North Carolina (there is also a small, inten-

sively managed population on an offshore island in Florida); of the three described subspecies, only the nominate is extant (Nowak, 2002). Algonquin Wolf inhabits a relatively small area centered on Algonquin Provincial Park, Canada (Dinets, 2015). The status of these two forms has been a matter of intense controversy; they have been considered one or two independently evolved species (Wilson et al., 2004; Chambers et al., 2012), hybrid swarms (Wayne, 1991; Koblmuller et al., 2009), or subspecies of Gray Wolf (Lawrence, Bossert, 1975). The most recent data (Way, 2013) suggest that both forms result from ancient hybridization events between Gray Wolf and Coyote, with the share of wolf heritage higher in Algonquin Wolf and lower in Red Wolf. It is unclear if these two forms form a monophyletic lineage (Wilson et al., 2004) or have evolved independently from each other (Chambers et al., 2012).

All North American canids interbreed in the wild, although direct interbreeding between Gray Wolf and Coyote is extremely limited, and genetic exchange between these two forms occurs with Algonquin Wolf as a «conduit» (Way, 2013). Wolves inhabiting much of Great Lakes area have been recently found to be hybrids between Gray and Algonquin Wolves, while Coyotes inhabiting coastal areas from New Jersey to Nova Scotia are hybrids between Eastern Coyote and Algonquin Wolf (Way, 2013). Despite all this ongoing hybridization on all sides, Algonquin Wolves in the core part of their range maintain genetic and phenotypical distinctiveness (Rutledge et al., 2010), supporting the view that they deserve the status of full species (jointly with Red Wolf or separately). The existence of mammalian species of hybrid origin is now a well-known and universally recognized fact (Lavrenchenko, 2014), so the ancient hybrid origin of Algonquin and Red Wolves should not preclude their recognition as a full species or two. As they are very similar in appearance and behavior (Way, 2013; also pers. obs.), pending more data it seems reasonable to consider Algonquin Wolf a subspecies of Red Wolf. Since *C. lycaon* has a priority, the proper name for the only surviving subspecies of Red Wolf should be *C. lycaon rufus*, while Algonquin Wolf should be called *C. lycaon lycaon*.

Dog: history and controversies

Dog (*C. familiaris* Linnaeus 1758), originally described from a domestic European specimen, has occurred in association with humans on all continents (except the Antarctic) prior to European contact (Nowak, 1999). Feral populations exist in many areas, and some of them have become secondarily wild and independent of humans. Three of these have been scientifically described: Dingo of Australia (as *C. lupus dingo* Meyer, 1793), Singing Dog of New Guinea (as *Canis hallstromi* Troughton 1957), and Tengger Dog of Java (as *C. f. var. tenggerana* Kohlbrugge 1896). Feral populations of tropical Asia (the so-called Pariah Dog) are remarkably similar to Dingo and Singing Dog in appearance, and are included in species *C. dingo* in some classifications, such as Corbett (1995). It has been shown that a secondarily wild population known as Carolina Dog has originated from an ancient introduction of pariah-like dogs to North America (van Asch et al., 2013).

Due to the recent trend to name domestic animals as subspecies of their wild ancestors, Dog is sometimes called *C. lupus familiaris* or *C. l. dingo*, but this is wrong for reasons

mentioned below. Unfortunately many popular sources have followed this trend. Recently it's been proposed that Australian Dingo should be considered a full species *C. dingo* (Crowther et al., 2014), but the authors used Phylogenetic Species Concept which should not be used in vertebrates as it leads to gross taxonomic inflation and has numerous theoretical shortcomings (Zachos, Lovari, 2013).

Dog is known to hybridize in the wild and produce fully fertile hybrids with all *Canis* species except Striped and Black-backed Jackals, especially where the wild species is close to extinction (Lindblad-Toh et al., 2005). In parts of northern Eurasia, populations of Gray Wolf-Dog hybrids have become a serious problem for wildlife management and public safety (Dinets, Rotshild, 1998). There is ample evidence of Gray Wolf-Dog hybridization in ancient and modern times, with gene flow in both directions (Von Holdt et al., 2010; Galibert et al., 2011; Klütsch et al., 2011; Wayne, 2012). In some areas of the Arctic, crossing domestic Dogs with Gray Wolves is traditionally practiced (Dinets, Rotshild, 1998); such hybrids are still kept as pets in many Western countries (Willems, 1994/1995). However, there is conspicuous paucity of records of Gray Wolf-Dog hybrids from the Middle East, lowland India and China, even though local wolves often inhabit the vicinity of human settlements and are similar in size to feral Dogs (Koler-Matznick, 2002). Even in areas where Dogs are regularly cross-bred with Gray Wolves, gene flow in either direction can be very limited (Aghbolaghi et al., 2014) or at least restricted (Kopaliani et al., 2014). Where normal wolf pack structure is still maintained, wolves regularly hunt dogs, often preferring them to any other prey (Dinets, Rotshild, 1997). It appears that Gray Wolf-Dog hybridization, although possible and occasionally occurring, is strongly suppressed in the wild.

Originally, it was suggested that Golden Jackal and/or Coyote had played a part in Dog's origins (Darwin, 1859), but that theory is now largely rejected based on genetic evidence (Koler-Matznick, 2002). Gray Wolf is now generally believed to be the sole ancestor, although, as discussed below, this view might be overly simplistic.

When and where was Dog domesticated? The results of various studies contradict each other. The place of origin has been claimed to be the Middle East (Gray et al., 2011; Wayne, 2012), Europe (Wayne, 2012; Thalmann et al., 2013), and southeastern Asia (Savolainen et al., 2002; Ardalan et al., 2011; Ding et al., 2011). The time estimates vary from hundreds of thousands of years (Vila et al., 1997) to less than 10 kya (Thalmann et al., 2013). Notably, the oldest estimates are of the gray Wolf-Dog split, not domestication per se.

The oldest Dog remains associated with human settlements are the 36 kya Goyet specimen of Belgium and the 33 kya specimen from Razboinichya Cave in Altai Mountains (Ovodov et al., 2011), but these old specimens do not appear related to extant Dogs (Ovodov et al., 2011). Moreover, they are strangely rare. Dog remains become much more common at archeological sites around 14 kya (Ovodov et al., 2011).

The differences between Dog and Gray Wolf are larger than between any domestic animal and its wild ancestor. Dog has 30 % smaller relative brain size, noticeable differences in dentition, adaptations to an omnivorous diet in their digestive tract, and numerous other anatomical differences; even its gait

and tracks are different. There are very significant behavioral differences: for example, Dogs can't feed their puppies by regurgitating food (Dinets, Rotshild, 1998; Koler-Matznick, 2002).

Experiments on Red Fox (*Vulpes vulpes*) have shown that many of those differences can be reproduced simply by selection for friendliness to humans. By using this method over 30–40 generation of foxes, D. Belyaev produced animals with Dog-like tails, floppy ears, irregular coloration, early sexual maturity and many neotenic behavioral traits (see Trut, 1999, for English summary). However, some of the differences between Dog and Gray Wolf probably needed a very long time to evolve.

The “domesticated wolf” theory has serious problems. Some features of Dog anatomy, particularly brain structure, resemble Golden Jackal and Coyote, but not Gray Wolf (Darwin, 1859). Although the most primitive Dog breeds and the oldest feral populations all look somewhat similar, they do not particularly resemble Gray Wolf, having typical Dog anatomy and mostly reddish or yellowish coloration (Dinets, Rotshild, 1998). In fact, as many explorers have noticed (see, for example, Sykes, 1831), they can look remarkably similar to Dhole; such Dhole-like Pariah Dogs can be seen, for example, around some Tibetan monasteries (pers. obs.). And, most interestingly, Pariah Dog of Asia hardly ever hybridizes with sympatric Gray Wolf, despite the fact that both forms coexist in very close proximity and are similar in size (Koler-Matznick, 2002, also pers. obs.).

A much better explanation for all known facts is that Dog has existed in Asia as a wild animal prior to the arrival of modern-type humans and subsequent domestication. This idea has been well substantiated by Wayne, Ostrander (1999). In a little-noticed publication, Koler-Matznick (2002) provides an extensive summary of abundant evidence showing that the ancestor of Dog was not Gray Wolf *sensu stricto*, but a closely related, smaller extinct canid. The author suggests *Canis (lupus) variabilis*, an extinct wolf that occurred in present-day China 100–200 kya, as the most likely candidate, and notices that since it was sympatric with *C. lupus sensu stricto* in time and space, it was already a separate species. Although the specifics are uncertain, the idea that Dog has split from its common ancestor with modern Gray Wolf prior to its domestication is supported by virtually all recent data. The rarity of Dog remains at Pleistocene archeological sites indicates that it was hunted as a wild animal, rather than present at those settlements as commensal or domestic animal. Druzhkova et al. (2013) found that the unique haplotype of the Razboinichya Cave dog is more closely related to modern dogs and prehistoric New World canids than it is to contemporary wolves. It appears that wild Dog has been domesticated independently in southeastern Asia (Ding et al., 2011) and in the area stretching from Europe to Altai Mountains (Thalmann et al., 2013).

Extreme differences in morphology, physiology and behavior between Dog and Gray Wolf, as well as abundant data indicating that the split between the two taxa has occurred prior to Dog's domestication, and the fact that they are partially reproductively isolated in the wild, make it impossible to consider them conspecific, so the proper scientific name for Dog is *Canis familiaris*. It appears that four subspecies should be recognized.

Western Dog (*C. f. familiaris* Linnaeus 1758) includes most domestic dogs of the Holarctic, and almost all domestic breeds (see cladograms in von Holdt et al., 2010, and in Larson et al., 2012). This subspecies probably originated from domestication events in Europe and adjacent areas. Dogs in the northern parts of Asia and North America are heavily influenced by hybridization with Gray Wolf, while in Asia there is a broad zone of introgression with the next subspecies. Feral Western Dogs do not reverse to Dingo-like appearance over time (Barnett, 1986, also pers. obs.). There are countless commensal and feral populations, but the only ones known for sure to be secondarily wild are those on four islands in the Galapagos, now eradicated on Isabela, Floreana and San Cristobal and replaced by feral and commensal Dogs on Santa Cruz (Barnett, 1986; Reponen et al., 2014).

Pariah Dog (*C. f. indica* Sykes 1831). Exists as commensal and feral populations over much of tropical Asia and on islands as far as New Guinea (Miklouho-Maclay, 1882) and historically Polynesia, including Hawaii and New Zealand (Oskarsson et al., 2012). Pre-Colombian American breeds, Canaan breed of the Middle East, and some (but not all) native African and East Asian breeds also belong to this subspecies (Boyko et al., 2009; von Holdt et al., 2010; Larson et al., 2012). Feral Dogs of this subspecies reverse to Dingo-like rather than Gray Wolf-like appearance (Dinets, Rotshild, 1998). The only known secondarily wild population in the Americas, the Carolina Dog, might be extinct, although it was still present at Savannah River Site in South Carolina in 2007 (Dinets, 2015). Another wild (presumably secondarily) population, described from mountains of Java as *C. f. var. tenggerana* Kohlbrugge 1896, also appears to be extinct (Kohlbrugge, 1901). It could conceivably represent a relict population of primarily wild *C. familiaris*, but, although three specimens have been submitted to Leyden Museum of Natural History (Jentink, 1897), they have not been studied recently (S. van der Mije, pers. comm.). Other primarily wild populations of *C. familiaris* might still exist in remote areas of Southeast Asia or adjacent islands, although no wild (primarily or secondarily) Dogs exist in Indochina (Francis, 2008).

Singing Dog (*C. f. hallstromi* Troughton 1957). A secondarily wild subspecies endemic to New Guinea highlands. It has numerous morphological, physiological and behavioral differences from all other dogs, and has split from other lineages thousands of years ago (Koler-Matznick, 2003; von Hold et al., 2010). Unfortunately, it might be on the verge of extinction in the wild (Koler-Matznick et al., 2007).

Dingo (*C. f. dingo* Meyer, 1793). A secondarily wild subspecies inhabiting Australia and a few offshore islands. It shares many similarities with Pariah Dog, but is larger and heavier, and has consistent differences in morphology and behavior from all other Dogs (Fleming et al., 2001; Crowther et al., 2014). Mainland Australian Dingoes now increasingly show signs of hybridization with *C. f. familiaris*, but the ones on Frazer Island are thought to be unaffected by hybridization (Corbett, 1995), although this is disputed (Woodall et al., 1996).

Acknowledgements

I thank B. Elgulashvili, O. Kosterin, D. Naish, S. van der Mije, J. van Tol, B. Whitlock, and the anonymous reviewer for helpful discussions of the subject and editorial comments.

Conflict of interests

The author declares no conflicts of interest.

References

- Aggarwal R.K., Kivisild T., Ramadevi J., Singh L. Mitochondrial DNA coding region sequences support the phylogenetic distinction of two Indian wolf species. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 2007;45(2):163-172.
- Aghbolaghi M.A., Rezaei H.R., Scandurac M., Kabolia M. Low gene flow between Iranian Grey Wolves (*Canis lupus*) and dogs documented using uniparental genetic markers. *Zool. Middle East.* 2014; 60(2):95-106.
- Ardalan A., Kluetsch C.F., Zhang A.B., Erdogan M., Uhlén M., Houshmand M., Savolainen P. Comprehensive study of mtDNA among Southwest Asian dogs contradicts independent domestication of wolf, but implies dog-wolf hybridization. *Ecol. Evol.* 2011;1(3):373-385.
- Barnett B.D. Eradication and control of feral and free-ranging dogs in the Galapagos Islands. *Proc. Twelfth Vertebrate Pest Conf.* 1986;8. Lincoln: University of Nebraska. 358-368.
- Boyko A.R., Boyko R.H., Boyko C.M., Parker H.G., Castelhamo M., Corey L., Bustamante C.D. Complex population structure in African village dogs and its implications for inferring dog domestication history. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2009;106(33):13903-13908.
- Chambers S.M., Fain S.R., Fazio B., Amaral M. An account of the taxonomy of North American wolves from morphological and genetic analyses. *North American Fauna.* 2012;2012:1-67.
- Corbett L.K. The dingo in Australia and Asia. Ithaca: Comstock/Cornell Univ. Press, 1995.
- Crowther M.S., Fillios M., Colman N., Letnic M. An updated description of the Australian dingo (*Canis dingo* Meyer, 1793). *J. Zool.* 2014;293(3):192-203.
- Darwin C. On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. London: John Murray, 1859.
- Dinets V. Peterson guide to finding mammals in North America. Boston: Houghton Mifflin Harcourt, 2015.
- Dinets V., Rotshild V. Звери: Энциклопедия природы России [Mammals of Russia]. Moscow: ABF, 1997.
- Dinets V., Rotshild V. Домашние животные: Энциклопедия природы России [Domestic animals.] Moscow: ABF, 1998.
- Ding Z.L., Oskarsson M., Ardalan A., Angleby H., Dahlgren L.G., Tepeli C., Kirkness E., Savolainen P., Zhang Y.-P. Origins of domestic dog in Southern East Asia is supported by analysis of Y-chromosome DNA. *Heredity.* 2011;108(5):507-514.
- Druzhkova A.S., Thalmann O., Trifonov V.A., Leonard J.A., Vorobieva N.V., Ovodov N.D., Grafodatsky A.F., Wayne R.K. Ancient DNA analysis affirms the canid from Altai as a primitive dog. *PLoS One.* 2013;8(3):e57754.
- Fleming P., Corbett L., Harden R., Thomson P. Managing the impacts of dingoes and other wild dogs. Melbourne: Bureau of Rural Sciences, 2001.
- Francis C.M. A guide to the mammals of Southeast Asia. Princeton: Princeton University Press, 2008.
- Galibert F., Quignon P., Hitte C., André C. Toward understanding dog evolutionary and domestication history. *CR Biol.* 2011;334(3): 190-196.
- Gaubert P., Bloch C., Benyacoub S., Abdelhamid A., Pagani P., Djagoun C.A.M.S., Couloux A., Dufour A. Reviving the African wolf *Canis lupus lupaster* in North and West Africa: a mitochondrial lineage ranging more than 6,000 km wide. *PLoS One.* 2012;7(8):e42740.
- Gray M.M., Sutter N.B., Ostrander E.A., Wayne R.K. The IGF1 small dog haplotype is derived from Middle Eastern grey wolves. *BMC Biol.* 2011;8(1):16.
- Jentink O.F. The dog of the Tengger. Notes from the Leyden Museum. V. 18. Leiden: Rijksmuseum van Natuurlijke Historie te Leiden, 1897.
- Klütsch C.F.C., Seppälä E.H., Fall T., Uhlén M., Hedhammar Å., Lohi H., Savolainen P. Regional occurrence, high frequency but low diversity of mitochondrial DNA haplogroup d1 suggests a recent dog-wolf hybridization in Scandinavia. *Anim. Genet.* 2011;42(1):100-103.
- Koblmueller S., Nord M., Wayne R.K., Leonard J. Origin and status of the Great Lakes wolf. *Mol. Ecol.* 2009;18:2313-2326.
- Kohlbrugge J.H.F. Die Tenggeresen. Ein Alter Javanischer Volkstamm. Ethnologische Studie. The Hague: Martinus Nijhoff, 1901.
- Koler-Matznick J. The origins of the dog revisited. *Anthrozoös.* 2002;15(2):98-118.
- Koler-Matznick J., Brisbin I.L., Feinstein M., Bulmer S. An updated description of the New Guinea singing dog (*Canis hallstromi*, Troughton 1957). *J. Zool.* 2003;261(2):109-118.
- Koler-Matznick J., Yates B.C., Bulmer S., Brisbin L.I.Jr. The New Guinea singing dog: Its status and scientific importance. *Austr. Mammal.* 2007;29(1):47-56.
- Kopaliani N., Shakarashvili M., Gurielidze Z., Qurkhuli T., Tarkhnishvili D. Gene flow between wolf and shepherd dog populations in Georgia (Caucasus). *J. Heredity.* 2014;105(3):345-353.
- Larson G., Karlsson E.K., Perri A., Webster M.T., Ho S.Y., Peters J., Stahl P.W., Piper P.J., Lingaas F., Fredholm M., Comstock K.E., Modiano J.F., Schelling C., Agounik A.I., Leegwater P.A., Dobney K., Vigne J.D., Vilà C., Andersson L., Lindblad-Toh K. Rethinking dog domestication by integrating genetics, archeology, and biogeography. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2012;109(23):8878-8883.
- Lavrenchenko L.A. Hybrid speciation in mammals: illusion or reality? *Biol. Bull. Rev.* 2014;4(3):198-209.
- Lawrence B., Bossert W. Relationships of North American *Canis* shown by a multiple character analysis of selected populations. The wild canids: their systematics, behavioral ecology and evolution. Ed. M.V. Fox. N.Y.: Van Nostrand Reinhold, 1975.
- Lindblad-Toh K., Wade C.M., Mikkelsen T.S., Karlsson E.K., Jaffe D., Kamal M., Clamp M., Chang J.L., Kulbokas E.J. III, Zody M.C., Mauceli E., Xie X., Breen M., Wayne R.K., Ostrander E.A., Ponting C., Galibert F., Smith D.S.R., Jong P.J., Kirkness E., Alvarez P., Biagi T., Brockman W., Butler J., Chin C.W., Cook A., Cuff J., Daly M.J., DeCaprio D., Gnerre S., Grabherr M., Kellis M., Kleber M., Bardeleben C., Goodstadt L., Heger A., Hitte C., Kim L., Koepfli K.-P., Parker H.G., Pollinger J.P., Searle S.M.J., Sutter N.B., Thomas R., Webber C., Lander E.S. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature.* 2005;438:803-819.
- Mech L.D., Boitani L. Wolves: behaviour, ecology and conservation. Chicago: University of Chicago Press, 2003.
- Miklouho-Maclay N. Remarks about the circumvolutions of the cerebrum of *Canis dingo*. *Proc. Linnean Soc. New South Wales.* 1882.
- Nowak R.M. Walker's mammals of the world. 6th edition. V. 1. Baltimore and London: The John Hopkins Univ. Press, 1999.
- Nowak R.M. The original status of wolves in eastern North America. *Southeastern Nat.* 2002;1:95-130.
- Oskarsson M.C., Klütsch C.F., Boonyaparakob U., Wilton A., Tanabe Y., Savolainen P. Mitochondrial DNA data indicate an introduction through mainland Southeast Asia for Australian dingoes and Polynesian domestic dogs. *Proc. Roy. Soc. B: Biol. Sci.* 2012;279(1730): 967-974.
- Ovodov N.D., Crockford S.J., Kuzmin Y.V., Higham T.F., Hodgins G.W., van der Plicht J.A. 33,000-year-old incipient dog from the Altai Mountains of Siberia: Evidence of the earliest domestication disrupted by the last glacial maximum. *PLoS One.* 2011;6(7):e22821.
- Pocock R.I. The fauna of British India, including Ceylon and Burma. V. 2. Mammalia. London: Taylor and Francis, 1941.
- Randi E., Lucchini V., Christensen M.F., Mucci N., Funk S.M., Dolf G., Loeschke V. Mitochondrial DNA variability in Italian and east European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization. *Conservation Biol.* 2000;14(2):464-473.
- Reponen S.E., Brown S.K., Barnett B.D., Sacks B.N. Genetic and morphometric evidence on a Galápagos Island exposes founder effects and diversification in the first-known (truly) feral western dog population. *Mol. Ecol.* 2014;23(2):269-283.
- Rutledge L.Y., Garroway C.J., Loveless K.M., Patterson B.R. Genetic differentiation of eastern wolves in Algonquin Park despite bridging gene flow between coyotes and grey wolves. *Heredity.* 2010;2010:1-12.

- Savolainen P., Zhang Y., Luo J., Lundeberg J., Leitner T. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science*. 2002; 298:1610-1613.
- Sillero-Zubiri C. Family Canidae (Dogs). *Handbook of Mammals of the World*. V. 1. Carnivores. (Eds D.E. Wilson, R.A. Mittermeier). Barcelona: Lynx Edicions, 2009:352-447.
- Sillero-Zubiri C., Hoffmann M.J., Mech D. Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs: Status Survey and Conservation Action Plan. Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN/SSC Canid Specialist Group, 2004.
- Sykes W. H. Catalogue of the Mammalia of Dukhun (Deccan); with observations on their habits, etc., and characters of new species. *Proc. Zool. Soc. London*. 1831.
- Thalmann O., Shapiro B., Cui P., Schuenemann V.J., Sawyer S.K., Greenfield D.L., Germonpré M.B., Sablin M.V., López-Giráldez F., Domingo-Roura X., Napierala H., Uerpmann H-P., Loponte D.M., Acosta A.A., Giemsch L., Schmitz R.W., Worthington B., Buikstra J.E., Druzhkova A., Graphodatsky A.S., Ovodov N.D., Wahlberg N., Freedman A.H., Schweizer R.M., Koepfli K.-P., Leonard J.A., Meyer M., Krause J., Pääbo S., Green R.E., Wayne R.K. Complete mitochondrial genomes of ancient canids suggest a European origin of domestic dogs. *Science*. 2013;342(6160):871-874.
- Trut L.N. Early canid domestication: the farm-fox experiment. *Amer. Scientist*. 1999;87:160-169.
- van Asch B., Zhang A.-B., Oskarsson M.C.R., Klütsch C.F.C., Amorim A., Savolainen P. Pre-Columbian origins of Native American dog breeds, with only limited replacement by European dogs, confirmed by mtDNA analysis. *Proc. Roy. Soc. B*. 2013;280(1142). DOI: 10.1098/rspb.2013.1142
- Vila Á.C., Maldonado J.E., Wayne R.K. Phylogenetic relationships, evolution, and genetic diversity of the domestic dog. *J. Hered.* 1999;90:71-77.
- Vila C., Savolainen P., Maldonado J.E., Amorim I.R., Rice J.E., Honeycutt R.L., Crandall K.A., Lundeberg J., Wayne R.K. Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*. 1997;276:1687-1689.
- Von Holdt B.M., Pollinger J.P., Lohmueller K.E., Han E., Parker H.G., Quignon P., Degenhardt J.D., Boyko A.R., Earl D.A., Auton A., Reynolds A., Bryc K., Brisbin A., Knowles J.C., Mosher D.S., Spady T.S., Elkhoulou A., Geffen E., Pilot M., Jedrzejewski W., Greco C., Randi E., Bannasch D., Wilton A., Shearman J., Musiani M., Cargill M., Jones P.J., Qian Z., Huang J., Ding Z.-L., Zhang Y., Bustamante C.D., Ostrander E.A., Novembre J., Wayne R.K. Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature*. 2010;464(7290):898-902.
- Walker B.L. *The lost wolves of Japan*. Seattle: University of Washington Press, 2005.
- Walton L.R., Joly D.O. *Canis mesomelas*. *Mammalian Species*. 2003; 715:1-9.
- Way J.G. Taxonomic implications of morphological and genetic differences in northeastern coyotes (coywolves) (*Canis latrans* × *C. lycaon*), western coyotes (*C. latrans*), and eastern wolves (*C. lycaon* or *C. lupus lycaon*). *The Canadian Field Naturalist*. 2013;123(1):1-16.
- Wayne R.K. Mitochondrial DNA analysis supports extensive hybridization of the endangered red wolf (*Canis rufus*). *Nature*. 1991;351: 565-568.
- Wayne R.K. Molecular evolution of the dog family. *Trends in Genetics*. 1993;9(6):218-224.
- Wayne R.K. Evolutionary genomics of dog domestication. *Mamm. Genome*. 2012;23(1/2):3-18.
- Wayne R.K., Geffen E., Girman D.J., Koepfli K.P., Lau L.M., Marshall C.R. Molecular systematics of the Canidae. *Syst. Biol.* 1997; 46:622-653.
- Wayne R.K., O'Brien S.J. Allozyme divergence within the Canidae. *Syst. Zool.* 1987;36:339-355.
- Wayne R.K., Ostrander E.A. Origin, genetic diversity, and genome structure of the domestic dog. *BioEssays (PLOS Org)*. 1999;21(3): 247-257.
- Weckworth B.V., Talbot S.L., Cook J.A. Phylogeography of wolves (*Canis lupus*) in the Pacific Northwest. *J. Mammalogy*. 2010;91(2): 363-375.
- Willems R.A. The Wolf-dog hybrid - an overview of a controversial animal. *AWIC Newsletter*. Baltimore: USDA, 1994/1995;5(4):9-14.
- Wilson P.J., Grewal S., Lawford I.D., Heal J.N.M., Granacki A.G., Pennock D., Theberge J.B., Theberge M.T., Voigt D.R., Waddell W., Chambers R.E., Paquet P.C., Goulet G., Cluff D., White B.N. DNA profiles of the eastern Canadian wolf and the red wolf provide evidence for a common evolutionary history independent of the gray wolf. *Can. J. Zool.* 2004;78:2156-2166.
- Woodall P.F., Pavlov P., Twyford K.L. Dingoes in Queensland: skull dimensions and the identity of wild canids. *Wildlife Res.* 1996;23: 581-587.
- Young S.P., Jackson H.H.T. *The Clever Coyote*. Lincoln: University of Nebraska Press, 1978.
- Zachos F.E., Lovari S. Taxonomic inflation and the poverty of the Phylogenetic Species Concept – a reply to Gippoliti and Groves. *Hystrix. Italian J. Mammalogy*. 2013;24(2):142-144.

Репродуктивные способности и пути повышения плодовитости шиншиллы (*Chinchilla laniger* Molina)

М.В. Новиков, Н.Н. Шумилина

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина», Москва, Россия

Обзор мировой практики разведения шиншилл позволил систематизировать данные о показателях и условиях воспроизводства, предопределяющих рентабельность звероферм. Шиншиллы клеточного разведения полигамны и полиэстричны. О сохранении некоторой сезонности размножения шиншилл свидетельствуют различия в органо-соматических индексах, количестве жизнеспособных сперматозоидов у самцов, а также в продолжительности половых циклов самок в зависимости от времени года. Репродуктивные способности шиншилл сохраняются в течение 15 лет, при этом для сохранения потомства важно избегать преждевременного спаривания самок, не достигших шестимесячного возраста. Хотя в яичнике самок шиншилл созревают 10–16 фолликулов, средняя годовая плодовитость шиншилл составляет 2,2–4 щенка на самку в год. Естественному годовому ритму шиншилл соответствует получение от самки двух пометов при характерной для шиншилл способности приносить 1–3 приплода в год. На интервал рождаемости значительно влияют возраст самок, фотопериод и регулирование интенсивности освещения. Увеличение количества ежегодных щенений вызывает чрезмерное изнашивание организма самки и влечет за собой сокращение периода репродуктивности шиншиллы. На размер пометов шиншилл влияют генотип и экстерьер зверьков, а также паратипические факторы в период беременности и щенения. Для улучшения фертильности шиншилл особенно важен подбор самок и самцов. Повышению плодовитости шиншилл способствует применение репродуктивных технологий, в том числе электроэякуляция и криоконсервация спермы, индукция эструса, гормональное стимулирование овуляции и другие. Прибыльность промышленного разведения шиншилл в значительной мере зависит от совершенствования как качественных (окраски), так и количественных признаков (плодовитости) зверьков, что актуально для российского звероводства.

Ключевые слова: шиншилла, плодовитость, воспроизводство, сезонность размножения, полиэстричность, экстерьер, фотопериод, репродуктивные технологии.

Reproductive performance and increased fecundity in the chinchilla (*Chinchilla laniger* Molina)

M.V. Novikhov, N.N. Shumilina

Skryabin State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

Our overview of the global practice of breeding chinchillas systematizes information about performance and reproduction conditions that determine the profitability of fur farms. Captive chinchillas are polygamous and polyestrous. Seasonal differences in the organosomatic indexes, the number of spermatozooids in males, and the duration of the sexual cycle of females predetermine preservation of the seasonal habit of reproduction. Chinchillas retain their reproductive ability for 15 years. To save offspring, it is important to avoid premature mating of females younger than 6 months. Although 10–16 follicles ripen in the ovary of a chinchilla female, their average annual fecundity is 2.2–4 puppies per year. In accordance with the natural annual rhythm, a female chinchilla typically produces two litters, being able to have 1–3 litters annually. The interval between whelpings depends on photoperiod, illumination, and age of females. Too frequent whelpings exhaust the female organism and reduce its period of reproduction. Litter size is affected by the genotype and conformation of animals, as well as by paratypic factors acting during pregnancy and whelping. Proper selection of females and males is essential for fecundity improvement. To improve the fecundity of chinchillas, use of reproductive technologies is recommended, including electroejaculation, sperm cryopreservation, estrus induction, hormonal stimulation of ovulation, and others. The profitability of commercial breeding of chinchillas is dependent largely on the improvement of both qualitative (color) and quantitative (fecundity) traits, which is important for Russian fur farming.

Key words: chinchilla; fecundity; seasonality in reproduction; polyestrous; conformation; photoperiod; reproductive technologies.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Новиков М.В., Шумилина Н.Н. Репродуктивные способности и пути повышения плодовитости шиншиллы (*Chinchilla laniger* Molina). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):292–295.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Novikhov M.V., Shumilina N.N. Reproductive performance and increased fecundity in the chinchilla (*Chinchilla laniger*, Molina). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(3):292–295.

Эволюционный процесс «одомашнивания» шиншиллы основан на генетической адаптации животных к антропогенной среде через уменьшение стрессированности и наследственное преобразование поведения (рисунков) (Report EC, 2001). Экономическая эффективность разведения шиншиллы в значительной мере зависит от совершенствования как качественных (окраска мехового покрова), так и количественных признаков (плодовитость) (Sulik, Seremak, 2003). В отличие от мировой практики в России шиншилловодство пока не получило промышленного статуса и направлено, прежде всего, на продажу животных в качестве домашних питомцев (Новиков, 2010; ОЦП, 2013).

Особенности биологии размножения шиншиллы

Репродуктивная способность шиншиллы зависит от того, как ее генетическая программа плодовитости реализуется средовыми условиями (Ponzio et al., 2004). К примеру, осенний приплод у шиншиллы по численности уступает весеннему (Кирис, 1973; Seremak, 2007; Nistal et al., 2013). Потенциальная плодовитость шиншиллы достаточно высока: в яичнике овулирует около 16 фолликулов, но из-за эмбриональных потерь фактическая плодовитость значительно ниже: рождается 4–6 щенков (Jarosz, Rzewska, 1996; Socha, Kasjaiuk, 2003; Busso et al., 2012). Наиболее высокая плодовитость наблюдается в возрасте 2–5 лет, а самая низкая – старше 7 лет (Кирис, 1973; Горбунов, 2011). Отмечена закономерность: при взрослении самок до 5 лет размер помета увеличивается, после 5 лет – снижается (Felska-Błaszcyk, Kaczmarek, 2006). Средний размер помета на одну осевшуюся самку, по данным польских авторов, колеблется от 1,8 до 7 щенков (Socha, Wrona, 2000; Sulik, Seremak, 2002, 2003; Dzierzanowska-Gogyn et al., 2011).

Гены, контролирующие окраску меха у шиншиллы, затрагивают и плодовитость: самая высокая численность щенков в помете отмечена у самок *standard* – 2,1 щенка, самая низкая – у самок *black velvet* – 1,5 (Socha et al., 2010).

Установлены корреляции плодовитости шиншиллы с экстерьером и качеством волосяного покрова (Barabasz, 2001; Sulik, Seremak, 2003; Felska-Błaszcyk et al., 2008; Ślaska, Rozempolska-Rucińska, 2010a). По данным отдельных авторов, связь между плодовитостью и поведением отсутствует (Ślaska, Rozempolska-Rucińska, 2010b).

В естественных условиях на показатели размножения шиншиллы оказывает влияние фотопериод (Соколов, 1989; Nistal et al., 2009; Dominchin et al., 2014). Шиншиллы клеточного разведения полиэстричны, что позволяет заводчикам получать от одной самки до трех пометов в год (Sulik, Barabasz, 1995; Sulik, Seremak, 2002; Felska et al., 2002, 2008; Busso et al., 2012). По данным отдельных исследователей, спаривания шиншиллы происходят в любое время года (Misch, 1962; Barabasz, 2001; Барабаш, 2007). По другим данным воспроизводство шиншиллы носит сезонный характер (Sulik, Seremak, 2002; Nistal et al., 2009; Busso et al., 2012).

Существуют различия в продолжительности половых циклов самок в течение года: 31,9 дней осенью и 36,8 дней

летом (Seremak, 2007). В условиях клеточного разведения в северном полушарии в размножении шиншиллы в течение года выделяют периоды активности и покоя: зимний гон в декабре – январе с 37 % покрытий и с последующим массовым щенением в апреле – мае; период покоя в августе – ноябре, когда покрытий практически не наблюдается, отмечается лишь снижение частоты эструсов с минимальным числом покрытий в сентябре (1,5 %) (Weir, 1966; Кирис, 1973; Jarosz, Rzewska, 1996). По наблюдениям в южном полушарии сезонные фотопериодические изменения провоцируют изменения концентрации и функциональной активности сперматозоидов (Adaro et al., 1999; Dominchin et al., 2014).

По мере дальнейшей domestikации шиншиллы отмечается ежегодное увеличение полиэстричности: от общего поголовья самок по три приплода в год дают 9 %, более 40 % самок размножаются дважды, около 50 % самок дают один приплод (Jezewska et al., 2003; Dzierzanowska-Gogyn et al., 2011). При этом на интервал рождаемости значительное влияние оказывают такие факторы, как возраст шиншиллы (Felska-Błaszcyk, Kaczmarek, 2006), интенсивность освещения и длина светового дня (Felska-Błaszcyk, Brzozowski, 2005).

На настоящем этапе domestikации половая зрелость у шиншиллы наступает в возрасте от 5 до 8 месяцев (Misch, 1962; Кирис, 1973; Соколов, 1989; Report EC, 2001; Aleandri, 2002; Dzierzanowska-Gogyn et al., 2011). В норме эстральный цикл у шиншиллы длится 29–36 дней. Срок беременности составляет в среднем от 110 до 120 дней. Новорожденные щенки хорошо развиты и открыты ювенильным пухом, имеют полный набор зубов и открытые глаза, способны быстро передвигаться (Соколов, 1989; Павлова, 1971; Aleandri, 2002; Vanderlip, 2006). Среди новорожденных щенков самцов на 9,4 % больше, чем самок (Hillemann, 1959; Galton, 1968; Кирис, 1973; Morales et al., 2000). Период лактации – до 60 дней. Отсадка от матерей – в возрасте 2 месяца. Отсаженный молодняк держат однополыми группами по 3–5 зверьков, замаркированных на ушах специальными метками (Кирис, 1973). Сразу после щенения самки шиншиллы приходят в охоту, при этом покрывается 49–55 % самок (Кирис, 1973; Nordholm, 1992; Sulik, 1994). Наибольшая эффективность зачатия отмечена через 160 дней после щенения (Felska-Błaszcyk, Sulik, 2007).

Поскольку в дикой природе шиншиллы моногамны, на начальном этапе клеточного разведения использовалась моногамная схема разведения шиншиллы (Rzewski, 1988). В процессе domestikации стали использовать полигамную схему в соотношении 4–6 самок на одного самца (Berdux, Berdux, 1969; Rzewski, 1988; Барабаш, 2007).

Годовая плодовитость самок шиншиллы

Продолжительность жизни шиншиллы в дикой природе составляет около 10 лет, при разведении на специализированных фермах – около 20 лет, репродуктивные способности сохраняются до 15 лет (Report EC, 2001). В условиях клеточного разведения неонатальные и постнатальные потери составляют от 10 до 24 % (Hillemann, 1959; Berdux, Berdux, 1969; Sanotra, 1985; Sulik, Barabasz, 1995; Felska et al., 2002; Vanderlip, 2006). Возрастное бесплодие у са-



Одомашнивание шиншиллы идет через уменьшение стрессуемости и наследственное преобразование поведения (Барабаш, 2007).

мок начинается с 10–11 лет, у самцов – с 12 лет (Mischi, 1962). Самые старые оцененные самки наблюдались в возрасте 14 лет и самые старые самцы, участвующие в размножении, – в возрасте 12,5 лет (Кирис, 1973).

Показатели воспроизводства самок шиншилл составляют в среднем по 2,5 щенка в год (Романов-Ильинский, 1982). За 10 лет разведения шиншилл на опытной ферме ВНИИ охотничьего хозяйства и звероводства (г. Киров) показатели размножения шиншилл увеличились в среднем с 2,4 до 3,9 щенков на одну оцененную самку (Кирис, 1973).

По данным польских исследователей, средняя годовая продуктивность шиншилл увеличилась с 2,1 щенков на самку до 4,1 рожденных щенков на самку в год (Sulik, Varabasz, 1995; Dzierzanowska-Goryn et al., 2011). На датских и польских фермах размер приплода шиншилл составил 2,3–2,6 щенков на самку в год (Kersten, 1996; Felska-Błaszczuk et al., 2008). В целом на европейских шиншилловых фермах плодовитость составляет в среднем 2,2 щенка на самку в год (Report EC, 2001), по данным южноамериканских специалистов – в среднем 4 щенка на одну самку в год (Aleandri, 2002).

О возможности регуляции плодовитости шиншиллы

В течение жизни от одного самца шиншиллы при естественном спаривании получают в среднем 51 щенка (Morales et al., 2000). В настоящее время разработана технология искусственного оплодотворения и создан

банк спермы (Healey, Weir, 1967, 1970; Busso et al., 2012). Для гормонального стимулирования овуляции предложен метод внутривбрюшинного введения самкам гонадотропина сыворотки жеребой кобылы (*pregnant mare serum gonadotropin/PMSG*) и хорионического гонадотропина (*human chorionic gonadotropin/HCG*) (Weir, 1966, 1973; Jarosz, 1973; Seremak et al., 2008; Celiberti et al., 2013). Началась работа по поиску генетической компоненты, отвечающей за плодовитость (Polasik, 2013).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Барабаш Б. Доместикация шиншиллы (*Chinchilla laniger*). Информационный вестник ВОГиС. 2007;11(1):115-121.
- Горбунов В.В. Шиншилла от А до Я. М.: АСТ, 2011.
- Кирис И.Б. Биология длиннохвостой шиншиллы: дис. ... канд. биол. наук. Киров, 1973.
- Новиков М.В. Разработка методов оценки качества шкурки шиншиллы и совершенствование процессов их производства: дис. ... канд. тех. наук. М., 2010.
- ОЦП «Развитие клеточного пушного звероводства в РФ на 2013–20 гг.*/ утв. Приказом Минсельхоза РФ от 04.12.2013 г. N 450.
- Павлова Н.Р. Строение и изменчивость кожного и волосяного покрова шиншиллы (*Chinchilla l. M.*): дис. ... канд. биол. наук. М., 1971.
- Романов-Ильинский С.В. Шиншилла. М.: Лесн. пром-сть, 1982.
- Соколов В.Е.. Жизнь животных. Т. 7. Млекопитающие. М.: Просвещение, 1989.
- Adaro L., Orystegui C., Olivares R., Villanueva S. Morphometric variations in male reproductor system in chinchilla in captivity (*Chinchilla l.g.*). *Avan. Prod. An.* 1999;24(1/2):91-95.
- Aleandri F. Cría y comercialización de la chinchilla. El autor, 2002.
- Barabasz B. Szynszyle: hodowla i uzytkowanie. Chinchillas: breeding and management. PWRiL, 2001.
- Berdux C., Berdux V. The Berdux method of chinchilla raising. Fur Trade J. Canada, 1969.
- Busso J., Ponzio M., Cuneo M., Ruiz R. Reproduction in chinchilla (*Chinchilla l.*): Current status of environmental control of gonadal activity and advances in reproductive techniques. *Theriogenology.* 2012;78(1):1-11.
- Celiberti S., Gloria A., Contri A., Carluccio A., Peric T., Melillo A., Robbe D. Sexual hormone fluctuation in Chinchillas. *Vet. Clin. N. Amer.* 2013;16(1):197-209.
- Dominchin M., Ponzio M., Cuneo M., Ruiz R., Busso J. Seasonal evaluations of urinary androgen metabolites and semen quality in domestic long-tailed chinchilla (*Chinchilla l.*) under natural photoperiod. *Ann. Reprod. Sci.* 2014;145(1/2):99-104.
- Dzierzanowska-Goryn D., Goral K., Glogowski R. The analysis of chinchilla females reproduction (*Chinchilla l. M.*), on the example of Polish breeding farm. *An. Wars. Univ. Life Sci. SGGW/ An. Sci.* 2011;49:21-26.
- Felska L., Brzozowski M., Rzewuska E. Wyniki rozrodu szynszyli w zależności od poziomu ustawienia klatek i nateżenia światła. *Zesz. Nauk. Prz. Hod.* 2002;(64):97-102.
- Felska-Błaszczuk L., Brzozowski M. Effect of light intensity on reproduction of Polish, Swedish and Danish chinchillas. *Arch. Tierz.* 2005;48(5):494-504.
- Felska-Błaszczuk L., Kaczmarek J. Effect of age and breed on some reproduction performance traits in chinchillas (*Chinchilla l. M.*). *Acta Sci. Pol. Zoot.* 2006;5(2):27-37.
- Felska-Błaszczuk L., Sulik M. Effect of age and genetic group of chinchilla (*Chinchilla l. M.*) on the conception rate during postpartum oestrus. *Folia Univ. Agr. Stet., Agr., Alim., Pisc. Zootec.* 2007;255(2):43-50.

- Felska-Błaszczuk L., Sulik M., Semik A., Seremak B. Polish vs. Danish chinchillas (*Chinchilla l. M.*). An analysis of body conformation and reproduction performance in two populations. IX Intern. Sci. Congr. in Fur Animal Production. Ed. B. Benkel et al. Halifax, Canada: IFASA, 2008;42-46.
- Galton M. Chinchilla sex ratio. J. Reprod. Fert. 1968;16(2):211-216.
- Healey P., Weir B. A technique for electro-ejaculation in chinchillas. J. Reprod. Fert. 1967;13(3):585-588.
- Healey P., Weir B. Changes in the ultrastructure of chinchilla spermatozoa in different diluents. J. Reprod. Fert. 1970;21(1):191-193.
- Hillemann H.H. Reproductive biology in chinchilla. National Chinchilla Breeders of America, 1959.
- Jarosz S. The sexual cycle in chinchilla. Zool. Pol. 1973;23(1/2):119-128.
- Jarosz S., Rżewska E. Szynszyle: Chów i hodowla. W.: PWRiL, 1996.
- Jezewska G., Rozempolska-Rucińska I., Zieba G., Nowak M. Genetic conditions of the selected reproduction traits of chinchilla. Zesz. Nauk. Prz. Hod. 2003;68:35-41.
- Kersten A.M.P. Gedrag en welzijn van chinchillas in de bedrijfsmatige houderij: een voorstudie. Vakgroep Veehouderij, sectie Ethologie. Wageningen: Landbouwniversiteit. 1996.
- Mischi G. Il cincilla ed il suo allevamento. Edagricole, 1962.
- Morales M., Ibarra M., Vicas L., Biones A. Fertility in male chinchillas (*Chinchilla l.g.*) of commercial flocks. Avian. Cien. Vet. 2000;15(1/2):9-12.
- Nistal A., Masso R. Reproductive seasonality in captive *Chinchilla l.* XXXIX Jornadas de Estudio, XIII Jornadas sobre Producción Animal/Zaragoza: Asociaci3n Interprofesional para el Desarrollo Agrario, 2009;669-671.
- Nistal A., Zapata M., Bianchi F., Miranda J., Frana E., Masso R. Dynamic growth pattern of chinchilla (*Chinchilla l.*) kits during lactation. Anal. Vet. 2013;33(1):5-9.
- Nordholm J. Studies on the period from first mating to parturition in young chinchilla females. Vara Palsdjur. 1992;63(3):91-92.
- Polasik D. GHR gene polymorphism in breeding stocks of Chinchillas. Electron. J. Polish Agric. Universities. 2013;16(4). art 2. available at <http://www.ejpau.media.pl/volume16/issue4/abs-02.html>
- Ponzio M., Monfort S., Busso J., Dabbene V., Ruiz R., Cuneo M. A non-invasive method for assessing adrenal activity in the chinchilla (*Chinchilla l.*). J. Exp. Zool.: Comp. Exp. Biol. 2004;301A(3):218-227.
- Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare «The welfare of animals kept for fur production». EC: HCPDG, 2001.
- Rzewski W. Poligamia, monogamia oraz aktualne problemy chowu szynszyli. Hod. Drobn. Inwent. 1988;10:13-14.
- Sanother G. Chinchilla. Copenhagen, Inst. Agr. Sci. Kbh.: Statens Husdyrbrugsfors3g, 1985.
- Seremak B. Selected aspects of chinchilla (*Chinchilla l.M.*) reproduction under farm management. Wydaw. Akad. Roln. 2007.
- Seremak B., Sulik M., Felska-Błaszczuk L., Lasota B. Optimization of hormonal stimulation of ovulation in the chinchilla. IX International Scientific Congress in Fur Animal Production. Ed. B. Benkel et al. Halifax, Canada: IFASA, 2008.
- Ślaska B., Rozempolska-Rucińska I. Value of reproductive traits of Chinchillas in relation to animal conformation. J. Appl. An. Res. 2010a;38(1):17-21.
- Ślaska B., Rozempolska-Rucińska I. The level of chinchilla reproductive traits in relation to the behaviour of females. An. Univ. M.C. Skodowska: Sec. Zoot. Versita, 2010b;28(1):9-16.
- Socha S., Wrona A. The analysis of the seasonal character of the chinchilla (*Chinchilla v.M.*) reproduction. Scientifur. 2000;24(4):49-52.
- Socha S., Kasjajuk M. The analysis of factors which influence fertility of chinchillas of various colour type. Acta Sci. Pol. Zootech. 2003;2(2):113-124.
- Socha S., Wyjciek D., Koodziejczyk D., Gontarz A. Analysis of conformation characters in chinchillas of standard and Polish beige strains in the breeding farm «Raba» in Myślenice. Lucr. Stiin. Zooteh. Biotehn. 2010;43(2):272-275.
- Sulik M. Age at the first parturition of the Polish and Danish chinchilla females. Zesz. Nauk. Prz. Hod. 1994;15:185-191.
- Sulik M., Barabasz B. Por3wnanie system3w utrzymania rozplodowego na przykłdzie wybranych ferm. Zesz. Nauk. AR Krakow. 1995;297:159-165.
- Sulik M., Seremak B. Seasonal sexual activity of chinchilla females exemplified by the selected farms. Zesz. Nauk. Prz. Hod. 2002;64:89-96.
- Sulik M., Seremak B. Course and quality of reproductive career of selected chinchilla females as behavior indication of organism reaction. Zesz. Nauk. Prz. Hod. 2003;68:151-159.
- Vanderlip S. The Chinchilla Handbook. N.Y.: Barron's Ed. 2006.
- Weir B. Aspects of reproduction in chinchilla. J. Reprod. Fert. 1966;12:410-411.
- Weir B. The induction of ovulation and oestrus in the chinchilla. J. Reprod. Fert. 1973;33(1):61-68.

Модулирующее действие мутаций генов, затрагивающих окраску волосяного покрова, на генерацию и нейтрализацию активных форм кислорода. Американская норка (*Neovison vison*) как модель

С.Н. Сергина, В.А. Илюха, И.В. Баишникова, Т.Н. Ильина

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, Петрозаводск, Россия

Изучено плейотропное влияние генов, затрагивающих окраску меха, на показатели генерации активных форм кислорода (АФК) и антиоксидантной защиты в тканях органов американских норок четырех генотипов: *standard* (+/+), *royal pastel* (b/b), *silver blue* (p/p) и *sapphire* (a/a p/p). Показано, что директивная комбинация *sapphire* (a/a p/p) вызывает не только самые высокие показатели активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, но и на порядок величин повышает содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивных продуктов – ТБК-РП), по которому можно судить об уровне перекисного окисления липидов (ПОЛ). В сердечной мышце с преобладающим аэробным типом энергопродукции модулирующее действие мутаций проявляется как на уровне генерации АФК, так и на уровне низкомолекулярных антиоксидантов. Если мутация *royal pastel* (b/b) дает самый высокий уровень генерации АФК, то комбинация *sapphire* (a/a p/p) – самый низкий (по сравнению с норками *standard*). Мутации способны модулировать в легочной ткани напряженность генерации и нейтрализации АФК: *royal pastel* (b/b) в сравнении с нормой (+/+) , с одной стороны, снижает общий уровень генерации АФК, а с другой – повышает уровень генерации супероксидного аниона-радикала. Кластерный анализ, объединенный в общую дендрограмму, показал, что наиболее удаленные от норок *standard* (+/+) норки *royal pastel* (b/b) и *sapphire* (a/a p/p) характеризуются и наибольшим проявлением модулирующих эффектов. Можно допустить, что это обстоятельство вносит определенный вклад в генетическую пластичность американской норки в ходе успешного освоения различных экологических ниш первоначально на территории исторического ареала обитания в Северной Америке, а позже, в ходе интродукции, – на территории Северной Евразии и Южной Америки.

Ключевые слова: американская норка; *Neovison vison*; мутации окраски; активные формы кислорода; антиоксидантная система.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Сергина С.Н., Илюха В.А., Баишникова И.В., Ильина Т.Н. Модулирующее действие мутаций генов, затрагивающих окраску волосяного покрова, на генерацию и нейтрализацию активных форм кислорода. Американская норка (*Neovison vison*) как модель. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):296-302.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Sergina S.N., Ilyukha V.A., Baishnikova I.V., Ilyina T.N. The modulating effect of coat color mutations on the generation and neutralization of reactive oxygen species in the American mink (*Neovison vison*) as a model. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(3):296-302.

УДК 591.121.3:636.934.57

Поступила в редакцию 04.01.2015 г.

Принята к публикации 18.05.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

e-mail: cvetnick@yandex.ru

The modulating effect of coat color mutations on the generation and neutralization of reactive oxygen species in the American mink (*Neovison vison*) as a model

S.N. Sergina, V.A. Ilyukha, I.V. Baishnikova, T.N. Ilyina

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia

The influence of gene mutations encoding coat color on parameters of reactive oxygen species (ROS) generation and neutralization in six organs of the mink (*Neovison vison*) was evaluated. The study was conducted with *standard dark brown* (+/+), monorecessive *royal pastel* (b/b) and *silver-blue* (p/p), and direcessive *sapphire* (a/a p/p) mutant minks. It was found that the functioning of both ROS generation and neutralization systems was genotype-specific. The direcessive *sapphire* (a/a p/p) combination induced high levels of antioxidant enzymes' activities as well as of thiobarbituric acid-reactive products (TBA-RPs), characterizing lipid peroxidation level. In heart tissue, coat color mutations exerted modulating effects on both ROS generation and the level of low-molecular-weight antioxidants. The *royal pastel* (b/b) genotype showed the highest level of ROS generation, and the *sapphire* (a/a p/p), the lowest (statistically significant difference from standard). Coat color mutations modulate the intensity of ROS generation and neutralization in lung tissue. On the one hand, *royal pastel* (b/b) in comparison with *standard dark brown* (+/+) decreases the total level of ROS generation, and on the other hand, it increases the level of generation of superoxide anion-radicals. Cluster analysis, presented in a combined dendrogram, showed that *royal pastel* (b/b) and *sapphire* (a/a p/p) minks, the farthest from *standard* (+/+), had the greatest modulating effects. It is reasonable to suggest that such effects contributed to the genetic plasticity of American mink in the course of colonization of North America and then during mink introduction in Northern Eurasia and South America.

Key words: American mink; *Neovison vison*; coat color mutations; reactive oxygen species; antioxidant system.

Американская норка служит замечательной моделью генетико-популяционной конструкции, оказавшись способной за некоторое историческое время колонизовать обширное пространство Северной Америки, заполнив разнообразные экологические ниши: от субарктической Аляски до субтропической Флориды. Специалисты по систематике и экологии животных на основе фенотипических различий (размер тела, вариации в структуре и окраске мехового покрова) выделили в пределах ареала обитания вида *Mustela vison* 14 географических рас (Ness et al., 1988). Со времени становления в Северной Америке отрасли клеточного норководства часть этого популяционно-генетического материала попала на специализированные зверофермы. В ходе обмена между фермами племенными животными через некоторое время сформировался тип окраски американской норки клеточного разведения, получивший название *standard* (+/+), в котором уже невозможно было найти признаки какой-либо исходной географической расы.

Концентрация на небольшой площади значительного поголовья животных привела к ограничению свободы скрещивания, усилению генетико-автоматических процессов и инбридинга, что в свою очередь повысило частоту случаев гомозиготизации аллелей, затрагивающих окраску меха, прежде скрытых под покровом стандартного фенотипа. Создатель генетической азбуки норководства Ричард Шекельфорд (Wisconsin State University, Madison, USA) в 1941 г. сообщал, что в 1929 г. в условиях клеточного разведения было зафиксировано рождение первого мутанта платиновой окраски (*p/p*) (Shackelford, 1941). К настоящему времени на всех зверофермах мира у норок зарегистрировано 35 мутаций, затрагивающих окраску, на основе которых селекционерами для нужд пушно-мехового рынка синтезировано свыше 150 комбинативных окрасочных форм, вследствие чего фермерская норка вместе с зоологическим названием *Mustela vison* Schreber, 1777 получила синонимическое название *Neovison vison* (Трапезов, 2008).

В ходе клеточного разведения американских норок было выяснено, что мутации, затрагивающие окраску меха, обладают сильным плейотропным действием: 1) своим дезорганизующим эффектом они часто угнетают репродуктивную функцию норок вплоть до генетически детерминированной пренатальной и постнатальной смертности потомства (Ness, 1965; Беляев, Евсиков, 1967; Беляев, Железова, 1968, 1976; Беляев и др., 1968; Mink production, 1985; Евсиков, 1987; Харламова, Трапезов, 1999); 2) модулируют пространственную упаковку пигментных гранул в волосе (Зверева, Беляев, 1976; Зверева и др., 1976; Прасолова и др., 1994; Прасолова, Трапезов, 2007); 3) воздействуют в разных отделах мозга через изменение активности моноаминоксидазы на метаболизм биогенных аминов (серотонина и дофамина) и связанную с ними степень проявления доместикационного поведения (Попова и др., 1994, 1996; Войтенко, Трапезов, 2001; Трапезов и др., 2007, 2009; Трапезов, 2008); 4) снижают как общую жизнеспособность, так и резистентность к возбудителям вирусных и бактериальных заболеваний (Hadlow et al., 1983; Alexandersen et al., 1994; Колдаева и др., 2003); 5) влияют на эндокринную функцию надпочечников

(Трапезов, Маркель, 1989) и гонад (Гулевич и др., 1984); 6) воздействуют на активность пищеварительных ферментов (Свечкина, Тютюнник, 2007); 7) модифицируют субклеточную структуру лейкоцитов (Узенбаева и др., 2007); 8) затрагивают сезонные изменения состояния антиоксидантной системы и изоферментный спектр лактатдегидрогеназы в органах и тканях (Ильина и др., 2007; Унжаков и др., 2007).

Отдельного внимания заслуживает эффект, обнаруженный К.В. Макридиной (1967): почему норки, несущие рецессивную мутацию *hedlund white* (*h/h*), и норки дирессивной мутантной формы *sapphire* (*a/a p/p*) в сравнении с нормальными норками темно-коричневой окраски *standard* (+/+) нуждаются в более высоком уровне потребления кислорода. Здесь нужно иметь в виду, что в качестве платы за удовольствие дышать в клетках всех живых организмов (в том числе и американской норки) за счет утечки электронов из энергетических станций, митохондрий, и внутриклеточных включений, микросом, постоянно образуются свободные радикалы кислорода. Они повинны в развитии целого списка заболеваний и осложнений, поскольку способны повреждать ДНК, белки, липиды, наносить ущерб клеточным биополимерам и структурам клетки. Для защиты от реактивных производных кислорода в клетках существуют антиоксидантные ферменты, в том числе супероксиддисмутаза (СОД), которая катализирует превращение O_2^- в значительно менее реактивную перекись водорода (H_2O_2), которую затем специальные ферменты, каталаза и глутатионпероксидаза, расщепляют до абсолютно безвредных продуктов – кислорода и воды.

В связи с «Эффектом Макридиной» возникает вопрос: каков эволюционно-генетический смысл модулирования мутациями, затрагивающими окраску, механизмов генерации и нейтрализации активных форм кислорода? Для получения ответа нужно иметь в виду, что экологическая ниша американской норки всегда привязана к водоемам, при этом животное постоянно пребывает в условиях многократно повторяющихся ныряний с задержкой дыхания и чередующейся при этом гипоксией–реоксигенацией. Такой образ жизни в процессе эволюции отселекционировал у американских норок две разнонаправленные биохимические системы, регулирующие вовлечение кислорода в метаболические реакции. Первая представляет собой систему генерации активных форм кислорода (АФК), вторая представлена антиоксидантной системой (АОС), их нейтрализующей (Владимиров, Арчаков, 1972; Галанцев, 1977; Wilhelm Filho et al., 2002; Меньшикова и др., 2006).

В данной статье представлены отдельные фрагменты проекта по поиску генетического механизма, регулирующего баланс между этими двумя системами, с целью выяснения происхождения эволюционной адаптации американской норки к разнообразным экологическим нишам.

Материалы и методы

В исследование были взяты норки клеточного разведения: стандартные темно-коричневые, *standard dark brown* (+/+) (11 ♂♂ + 11 ♀♀); монорецессивные пастель, *royal pastel* (*b/b*) (6 ♂♂ + 5 ♀♀); монорецессивные серебристо-го-



Рис. 1. Генотипы норок, использованные в эксперименте.

a – *standard* (+/+), цвет мехового покрова обусловлен взаимодействием аллелей дикого типа. Остевые волосы у носителей таких аллелей темно-коричневые, однородно окрашенные по длине. Цвет пуховых волос коричнево-серый, варьирует по интенсивности пигментации. Нос и когти темно-коричневые, глаза темные, почти черные; *б* – *royal pastel* (*b/b*), окраска от светло- до глубоко коричневой с шоколадным оттенком, цвет глаз темно-коричневый; *в* – *silver blue* (*p/p*), пепельно-серая окраска с голубым оттенком, пуховой волос серый, глаза черные; *z* – *sapphire* (*a/a p/p*), окраска образована комбинацией двух мутантных генов: *aleutian* (*a/a*) и *silver-blue* (*p/p*). Аддитивное действие двух аллелей придает их носителям пигментацию волосяного покрова небесно-голубой (сапфировой) окраски, совмещающей особенности, свойственные одинарным гомозиготам (*a/a*) и (*p/p*).

лубые, *silver blue* (*p/p*) (2 ♂♂ + 3 ♀♀) и рецессивные сапфировые, *sapphire* (*a/a p/p*) (2 ♂♂ + 3 ♀♀) (рис. 1).

Животные содержались на опытной базе Института биологии Карельского научного центра РАН – специализированной звероферме ООО «Пряжинское» (Республика Карелия). Работа проведена в соответствии с требованиями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации 1964 г. с изменениями от 1975, 1983, 1989, 2000 гг. Исследование выполнено с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования Института биологии КНЦ РАН.

Показатели функционирования системы генерации АФК и АОС исследовались в образцах тканей печени, сердца и легких, характеризующихся разными способами извлечения энергии. Для определения общего уровня генерации АФК использовали хемилюминесцентный анализ с применением люминола и люцигенина как люминофоров и ионов железа (II) в качестве активатора свечения (Klinger et al., 1996). Присутствие люминола необходимо для оценки общего уровня генерации АФК, люцигенина – для оценки образования супероксидного

аниона радикала. Активность ферментов рассчитывали на 1 г сырой ткани (Bears, Sizes, 1952). При этом активность антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы (СОД) измеряли спектрофотометрически по модифицированной адренохромной методике (Misra, Fridovich, 1972). За 1 усл. ед. активности СОД принимали количество фермента, способное затормозить реакцию автоокисления адреналина на 50 %. Активность каталазы выражали в количестве мкмоль H_2O_2 , разложенной за 1 мин. Содержание восстановленного глутатиона (GSH) определяли спектрофотометрически по методу Элмана в присутствии 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) (Sedlak, Lindsay, 1968). Содержание ретинола и α -токоферола в печени норок *standard* и *royal pastel* определяли методом ВЭЖХ (Скурихин, Двинская, 1989), стандартами при этом служили ретинол и α -токоферол фирмы «Sigma» (США). Уровень соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивных продуктов – ТБК-РП), в число которых входит вторичный продукт перекисного окисления липидов (ПОЛ) – малоновый диальдегид – измеряли спектрофотометрически (Kitabchi et al., 1968).

Влияние мутаций, затрагивающих окраску меха, на активность антиоксидантных ферментов и уровень ТБК-РП в тканях печени, сердца и легких

Органы	Генотипы норок	Активность СОД, усл. ед./ г ткани	Активность каталазы, мкмоль H ₂ O ₂ ·мин/г ткани	Содержание ТБК-РП, мкмоль/г ткани
Печень	<i>standard</i> (+/+)	244,1 ± 34,3	560,1 ± 26,5	12,2 ± 3,4
	<i>royal pastel</i> (b/b)	161,6 ± 23,3	580,3 ± 42,3	4,1 ± 1,2
	<i>silver blue</i> (p/p)	243,8 ± 36,2	648,4 ± 17,2	3,7 ± 1,6*
	<i>sapphire</i> (a/a p/p)	273,7 ± 16,6 [◇]	684,9 ± 11,4* [◇]	47,2 ± 18,1 [■]
Сердце	<i>standard</i> (+/+)	76,4 ± 5,3	14,3 ± 1,8	5,0 ± 0,8
	<i>royal pastel</i> (b/b)	82,2 ± 8,2	18,7 ± 3,2	7,4 ± 1,4
	<i>silver blue</i> (p/p)	84,8 ± 3,9	11,6 ± 1,8	3,3 ± 0,3
	<i>sapphire</i> (a/a p/p)	83,5 ± 6,2	14,4 ± 2,3	2,8 ± 1,3
Легкие	<i>standard</i> (+/+)	75,5 ± 2,8	13,0 ± 1,5	11,4 ± 3,7
	<i>royal pastel</i> (b/b)	69,2 ± 5,6	12,8 ± 1,3	10,7 ± 2,5
	<i>silver blue</i> (p/p)	74,0 ± 13,6	24,6 ± 3,7* [◇]	4,1 ± 0,8
	<i>sapphire</i> (a/a p/p)	85,1 ± 6,5	20,2 ± 3,3	11,0 ± 4,7

Различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с норками: * – *standard*; [◇] – монорецессивными *royal pastel*; [■] – монорецессивными *silver blue*.

Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами вариационной статистики, при сравнении групп использовали непараметрический критерий (U) Вилкоксона – Манна – Уитни. Для оценки по изученным показателям генетической дистанции между норками различных окрасочных генотипов использовали кластерный анализ (метод ближайшего соседа).

Результаты и обсуждение

Модулирующее действие мутаций на генерацию и нейтрализацию активных форм кислорода в печеночной ткани

Как видно из таблицы, мутации генов, затрагивающих окраску, способны своим модулирующим действием создавать в ткани печени сильнейший размах в активности антиоксидантных ферментов. Так, директессивная комбинация *sapphire* (a/a p/p) не только отвечает за самый высокий показатель в активности СОД и каталазы, но и в разы повышает содержание ТБК-РП (по которому, в свою очередь, можно судить об уровне ПОЛ).

Монорецессивные мутации *royal pastel* (b/b) и *silver blue* (p/p) проявляют себя по-разному. В одном случае та и другая резко снижают содержание ТБК-РП в печени. Но если по активности СОД мутация (b/b) выступает как ингибитор, а мутация (p/p) сравнивается с нормой (+/+), то в отношении регуляции активности каталазы ранги меняются: активность фермента у *royal pastel* (b/b) приближается к норме (+/+), а *silver blue* (p/p) – к таковой у *sapphire* (a/a p/p).

При этом нужно иметь в виду, что СОД осуществляет защиту от свободных радикалов, катализируя дисмутацию супероксидного аниона-радикала в H₂O₂, а каталаза – антиперекисную, нейтрализуя H₂O₂, образующуюся как в предыдущей реакции, так и в реакциях, катализируемых

различными оксидазами (Beckman, Ames, 1998). Известно, что за генерацию супероксидного аниона-радикала в клетке ответственны различные оксидазы и оксигеназы (ферменты митохондриальной и микросомальной электронтранспортных цепей, дыхательные пигменты, склонные к аутоокислению, такие макромолекулы, как аскорбиновая кислота и биогенные амины).

Поскольку между компонентами АОС существуют взаимокompенсаторные отношения, то снижение концентрации или активности одних антиоксидантов приводит к соответствующему изменению других, благодаря чему сохраняется оптимальный уровень соотношения жизненно важных для поддержания гомеостаза радикальных процессов (Меньщикова и др., 2006).

Попутно мутация (b/b) в сравнении с нормой (+/+) резко снижает способность печени к депонированию жирорастворимых витаминов: если у норок *standard* она составляет 1,7 ± 0,2 ретинола и 15,6 ± 2,9 α-токоферола мкг/г ткани, то у норок *royal pastel*, соответственно, 0,4 ± 0,2 и 2,2 ± 0,2.

Модулирующее действие мутаций на генерацию и нейтрализацию активных форм кислорода в ткани сердечной мышцы

В сердечной мышце с преобладающим аэробным типом энергопродукции модулирующее действие мутаций генов окраски проявляется на уровне генерации как АФК (рис. 2), так и низкомолекулярных антиоксидантов (рис. 3). Если мутация *royal pastel* (b/b) дает самый высокий уровень генерации АФК (рис. 2, a), то директессивная комбинация *sapphire* (a/a p/p), напротив, дает самый низкий (достоверно ниже, чем у норок *standard* (+/+)). Норки *silver blue* (p/p) и *standard* (+/+) занимают по этому показателю промежуточное положение (рис. 2, a). По уровню генерации высокорекреационного соединения кислорода,

супероксидного аниона-радикала, в сердечной мышце дирекцессивная комбинация *sapphire* (*a/a p/p*) дает снижение в сравнении с монорецессивными *royal pastel* (*b/b*) и *silver blue* (*p/p*) (рис. 2, б).

Присутствие оптимального содержания GSH обеспечивает защиту кардиомиоцитов от характерного для них высокого уровня окислительного фосфорилирования (Halliwell, 1994). Но как объяснить тогда, почему показатель GSH в ткани сердечной мышцы норки *royal pastel* самый низкий (рис. 3)? Можно предположить, что в антиоксидантной защите ткани сердечной мышцы у норки *royal pastel* большую роль играют иные низкомолекулярные и ферментативные антиокислители. Преимущество низкомолекулярных антиоксидантов перед ферментативными обусловлено их способностью накапливаться в клетках и биологических жидкостях, а также их высокой миграционной способностью, за счет чего именно низкомолекулярные антиоксиданты играют ведущую роль в поддержании необходимой концентрации АФК. В условиях серьезного смещения баланса «прооксидант – антиоксидант» конститутивный пул антиоксидантных ферментов быстро инактивируется, и требуются значительное время и энергозатраты для их синтеза (Меньщикова и др., 2006).

Вместе с тем в других работах по таким показателям, как минутный объем сердца, кровяное давление, объем крови в работе сердечно-сосудистой системы, между норками *royal pastel* и *standard* различий не обнаружено (Ringer et al., 1974). Можно предположить, что этот внутривидовой полиморфизм, замаркированный генами окраски, реализуется на биохимическом или клеточном уровнях и не доходит до уровня отдельных органов.

Модулирующее действие мутаций на генерацию и нейтрализацию активных форм кислорода в легочной ткани

Как постулирует классическая сравнительная физиология животных, легочная ткань, подвергаясь в ходе длительной эволюции постоянным атакам свободных радикалов кислорода, сформировала промежуточный

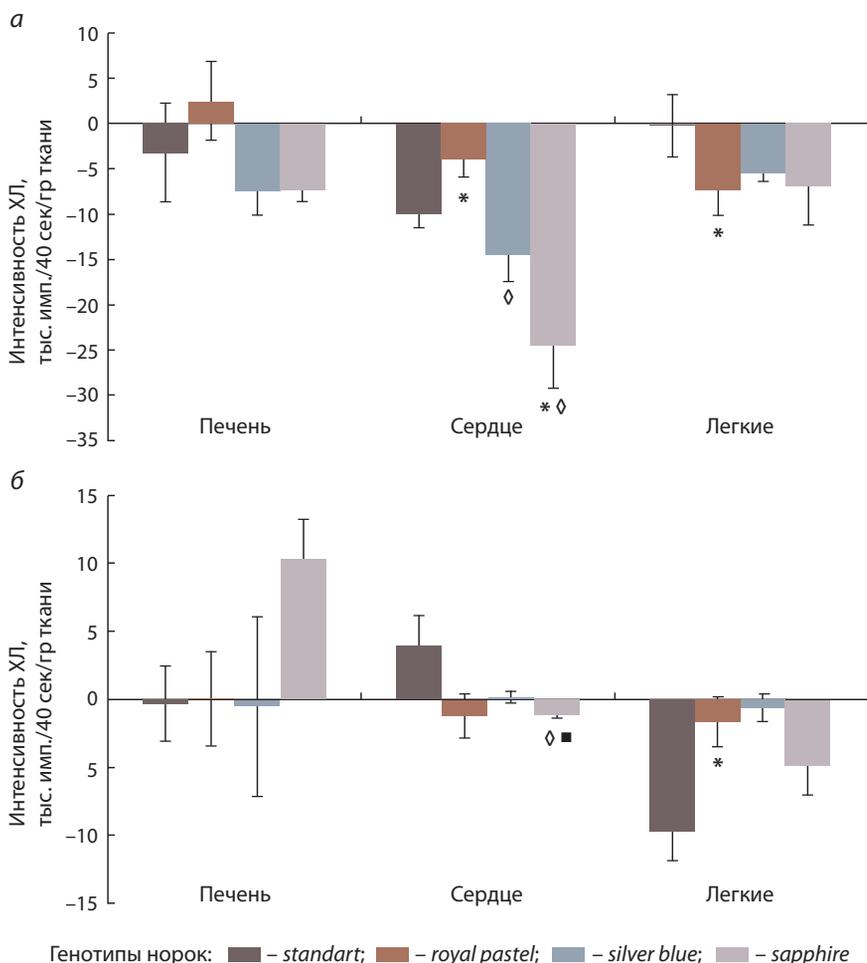


Рис. 2. Интенсивность люминол- (а) и люцигенин-зависимой (б) хемолуминесценции в тканях органов норок разных генотипов.

Различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с нормками: * – *standard*; \diamond – монорецессивными *royal pastel*; ■ – монорецессивными *silver blue*. Нулевой уровень отражает уровень люминесценции в холостой пробе, отрицательные или положительные значения показателей свидетельствуют о более низком или более высоком, соответственно, уровне люминесценции в гомогенатах по сравнению с холостой пробой.

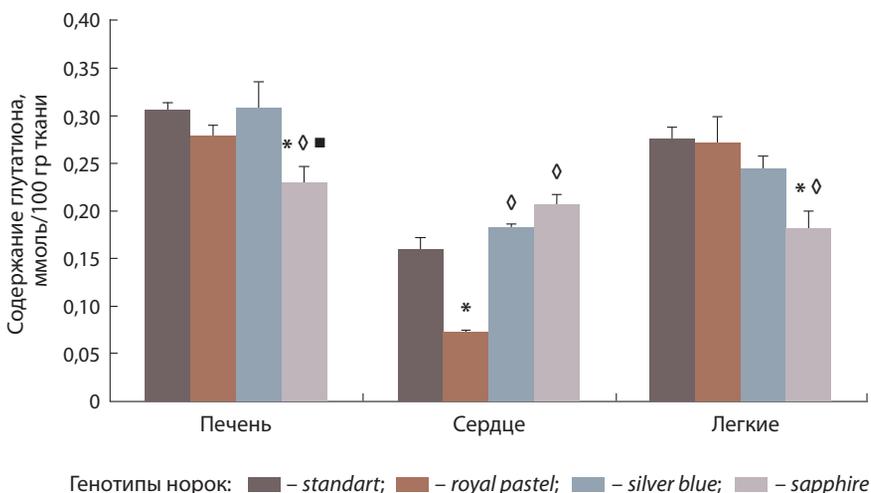


Рис. 3. Содержание глутатиона в печени, сердце и легких у норок разных генотипов.

Различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с нормками: * – *standard*; \diamond – монорецессивными *royal pastel*; ■ – монорецессивными *silver blue*.

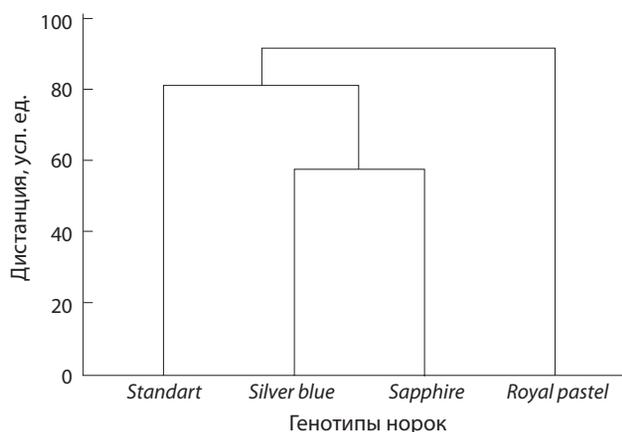


Рис. 4. Дендрограмма, иллюстрирующая дистанции между генотипами норки по изученным показателям (метод ближайшего соседа).

тип энергопродукции с совершенной антиоксидантной защитой (Сравнительная физиология ... , 1977). Экспериментальные данные, полученные нами на американских норках, дополняют эту парадигму: мутации генов, затрагивающих окраску, способны модулировать в легочной ткани напряженность генерации и нейтрализации АФК. Рис. 2 иллюстрирует то, что *royal pastel* (*b/b*) в сравнении с нормой (*+/+*), с одной стороны, снижает общий уровень генерации АФК, с другой стороны, повышает уровень генерации супероксидного аниона-радикала.

Увеличение активности каталазы в легочной ткани достигается за счет мутации (*p/p*) и ее комбинации с аллелем (*a/a*), в результате чего размах изменчивости по этому показателю получается внушительный – практически двукратное превышение активности фермента по сравнению с нормой (*+/+*) и с норками *royal pastel* (*b/b*) (таблица). В итоге можно допустить, что это приводит к большей генерации H_2O_2 в легких норки генотипа *silver blue* (*p/p*). В то же время содержание в легочной ткани норки *sapphire* (*a/a p/p*) восстановленного глутатиона (GSH) оказалось самым низким (рис. 3).

Полученные данные были объединены в общую дендрограмму с применением кластерного анализа (метод ближайшего соседа) (рис. 4). Длина ветвей кластерного дерева выражается в условных единицах и отражает различие по всем изученным показателям систем генерации и нейтрализации АФК среди исследованных генотипов норки. Из дендрограммы видно, что наиболее удаленные от норки *standard* (*+/+*) норки *royal pastel* (*b/b*) и *sapphire* (*a/a p/p*) характеризуются и наибольшим проявлением модулирующих эффектов. Можно допустить, что это обстоятельство вносит определенный вклад в генетическую пластичность американской норки в ходе успешного освоения ею различных экологических ниш первоначально на территории исторического ареала обитания в Северной Америке, а позже, в ходе интродукции, – на территории Северной Евразии и Южной Америки.

Благодарности

Авторы считают своим долгом выразить самую искреннюю признательность и особую благодарность рецен-

зентам за ценные замечания и помощь при подготовке рукописи к изданию.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (тема № 0221-2014-0001) и при поддержке гранта Президента РФ для Ведущей научной школы 1410.2014.4.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Беляев Д.К., Евсиков В.И. Генетика плодовитости животных. Сообщение I. Влияние мутаций окраски меха на плодовитость норки. *Генетика*. 1967;2:21-33.
- Беляев Д.К., Евсиков В.И., Шумный В.К. Генетико-селекционные аспекты моногибридного гетерозиса. *Генетика*. 1968;4(12):47-62.
- Беляев Д.К., Железова А.И. Генетика плодовитости животных. II. Некоторые физиологические особенности размножения мутантных норок. *Генетика*. 1968;4(1):45-58.
- Беляев Д.К., Железова А.И. Опыт экспериментальной регуляции эмбриональной жизнеспособности у норки. *Генетика*. 1976;12(6):55-59.
- Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биомембранах. М.: Наука, 1972.
- Войтенко Н.Н., Трапезов О.В. Влияние четырех мутаций (C_R , S , S^H , h) генов окраски норки на моноаминоксидазу мозга. *Генетика*. 2001;37(4):1-5.
- Галанцев В.П. Эволюция адаптаций ныряющих животных. Эколого- и морфофизиологические аспекты. Л.: Наука, 1977.
- Гулевич Р.Г., Осадчук Л.В., Ключков Д.В. Эндокринная функция гонад у самок двух генотипов норки *Mustela vison*. *Журн. эвол. биохим. и физиологии*. 1984;20(5):484-487.
- Евсиков В.И. Генетико-эволюционные аспекты проблемы гомеостаза плодовитости млекопитающих (на примере норки). *Генетика*. 1987;23(6):988-1002.
- Зверева Л.П., Беляев Д.К. Феногенетический анализ пигментации у мутантов американской норки (*Mustela vison* Schreber, 1777). I. Эффект мутации *стилблю*, *серебристо-голубой* и их комбинация на распределение пигмента в волосе. *Генетика*. 1976;12(2):97-103.
- Зверева Л.П., Беляев Д.К., Привалова Г.Н. Феногенетический анализ пигментации у мутантов американской норки (*Mustela vison* Schreber, 1777). Сообщение II. Эффект мутаций *алеутская* и взаимодействия генов *алеутской* и *серебристо-голубой* окраски в генотипе *санфириковых* норок. Влияние фактора «Стюарт» на пигментацию волоса. *Генетика*. 1976;12(2):104-109.
- Ильина Т.Н., Илюха В.А., Калинина С.Н., Горлякова Н.А., Беличева Л.А. Влияние генотипа на сезонные изменения антиоксидантной системы и изоферментного спектра лактатдегидрогеназы американских норок (*Mustela vison* Schreber, 1777). *Информационный вестник ВОГиС*. 2007;11(1):145-154.
- Колдаева Е.М., Милованов Л.В., Трапезов О.В. Породы пушных зверей и кроликов. М.: КолосС, 2003.
- Макридина К.В. Теплопродукция стандартных и цветных норок. *Ученые записки Петрозаводского университета*. 1967;XV(4):39-46.
- Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006.
- Попова Н.К., Войтенко Н.Н., Куликов А.В., Вышневицкая Г.В., Трапезов О.В., Харламова А.В. Влияние плейотропного действия однолокусной (*p/p*), двухлокусной (*a/a p/p*) мутаций генов окраски норки на метаболизм серотонина в мозге. *Генетика*. 1994;30(11):1513-1515.

- Попова Н.К., Никулина Э.М., Войтенко Н.Н., Куликов А.В., Августинович Д.Ф., Трапезов О.В. Влияние однолокусной мутации серебристо-голубой окраски норок (*p/p*) на дофаминовую систему мозга. *Генетика*. 1996;32(3):452-454.
- Прасолова Л.А., Тихомиров И.Б., Всеволодов Э.Б., Латыпов И.Ф., Трапезов О.В. Феногенетический анализ пигментации новой окрасочной мутации американской норки (*Mustela vison* Schr.) и комбинации ее с некоторыми известными. *Генетика*. 1994;30(2):255-260.
- Прасолова Л.А., Трапезов О.В. Влияние генов, контролирующих окраску меха, на морфологию пигментации волоса у американской норки (*Mustela vison* Schreber, 1777). *Генетика*. 2007;43(7):982-986.
- Свечкина Е.Б., Тютюнник Н.Н. Изменение в ходе промышленной доместики активности пищеварительных ферментов у различных генотипов американской норки (*Mustela vison* Schr., 1777). *Информационный вестник ВОГиС*. 2007;11(1):99-108.
- Скурихин В.Н., Двинская Л.М. Определение α -токоферола и ретинола в плазме крови сельскохозяйственных животных методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Сельскохозяйственная биология*. 1989;4:127-129.
- Сравнительная физиология животных. Под ред. Л. Проссера. М.: Мир, 1977.
- Трапезов О.В. Регуляторные эффекты генов поведения и управление окрасочным формообразованием у американских норок (*Mustela vison* Schr., 1777). *Информационный вестник ВОГиС*. 2008;12(1/2):63-82.
- Трапезов О.В., Маркель А.Л. Влияние мутаций окраски на функцию надпочечников при хроническом кормовом стрессе у американской норки. *Генетика*. 1989;25(3):508-512.
- Трапезов О.В., Трапезова Л.И., Алехина Т.А., Ключков Д.В., Иванов Ю.Н. Влияние моно- и диаллельности по мутациям, затрагивающим окраску меха, на уровень содержания моноаминов в мозге у американской норки (*Mustela vison* Schreber, 1777). *Генетика*. 2009;45(12):1641-1645.
- Трапезов О.В., Трапезова Л.И., Сергеев Е.Г. Влияние мутаций, затрагивающих окраску меха, на поведенческий полиморфизм в промышленных популяциях американской норки (*Mustela vison* Schreber, 1777) и соболя (*Martes zibellina* L., 1758). *Генетика*. 2007;37(4):516-523.
- Узенбаева Л.Б., Голубева А.Г., Илюха В.А., Тютюнник Н.Н. Особенности структуры лейкоцитов крови норок (*Mustela vison* Schr., 1777) различных генотипов. *Информационный вестник ВОГиС*. 2007;11(1):155-161.
- Унжаков А.Р., Кожевникова Л.К., Илюха В.А., Мелдо Х.И., Тютюнник Н.Н. Специфичность изоферментных спектров ЛДГ у норки окраски *белая-хедлунд*. *Информационный вестник ВОГиС*. 2007;11(1):139-144.
- Харламова А.В., Трапезов О.В. Плейотропный эффект мутации *Black crystal* на репродуктивные показатели у американской норки (*Mustela vison*). *Генетика*. 1999;35(6):765-770.
- Alexandersen S., Larsen S., Aasted B., Uttenthal A., Bloom M.E., Hansen M. Acute interstitial pneumonia in mink kits inoculated with defined isolates of Aleutian mink disease parvovirus. *Vet. Pathol.* 1994;31:216-228.
- Bears R.F., Sizes I.N. A spectral method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 1952;195(1):133-140.
- Beckman K.B., Ames B.N. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 1998;78(2):547-581.
- Hadlow W.J., Race R.E., Kennedy R.C. Comparative pathogenicity of four strains of Aleutian disease virus for pastel and sapphire mink. *Infection and Immunity*. 1983;41(3):1016-1023.
- Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.* 1994;52(8):253-265.
- Kitabchi A.E., Challoner D.R., Williams R.H. Respiration and lipid peroxidation in tocopherol deficient rat hearts. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1968;127:647-650.
- Klinger W., Karge E., Kretzschmar M., Rost M., Schulze H.P., Dargel R., Reinemann C., Rein H. Luminol- and lucigenin-amplified chemiluminescence with rat liver microsomes. Kinetics and influence of ascorbic acid, glutathione, dimethylsulfoxide, N-t-butyl-a-phenyl-nitron, copper-ions and a copper complex, catalase, superoxide dismutase, hexobarbital and aniline. *Exp. Toxicol. Pathol.* 1996;48(5):447-460.
- Mink production. Ed. Joergensen G. Denmark: Scientifur, 1985.
- Misra H.P., Fridovich F. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 1972;247(10):3170-3175.
- Ness N. Abnormalities of the female genital organs in mink heterozygous for the Heggedal factor (shadow factor). *J. Acta Veterin. Scand.* 1965;15:65-99.
- Ness N., Einarson E., Lohi O., Joergensen G. Beautiful fur animals and their color genetics. Scientifur, 1988.
- Ringer R.K., Aulerich R.J., Pittman R., Cogger E.A. Cardiac output, blood pressure, blood volume and other cardiovascular parameters in mink. *J. Anim. Sci.* 1974;38:121-123.
- Sedlak J., Lindsay R.H. Estimation of total, protein-bound and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 1968;25:192-205.
- Shackelford R.M. Mutations in mink. *Trans Wis. Acad. Sci. Art. Lett.* 1941;34-45.
- Wilhelm Filho D., Sell F., Ribeiro L., Ghislandi M., Carrasquedo F., Fraga C.G., Wallauer J.P., Simoes-Lopes P.C., Uhart M.M. Comparison between the antioxidant status of terrestrial and diving mammals. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 2002;133:885-892.

Разработка новых SSR-маркеров к локусам гомеологичных генов *WFZP* на основе изучения строения и локализации микросателлитов в богатых генами районах хромосом 2AS, 2BS, 2DS мягкой пшеницы

О.Б. Добровольская^{1, 2}, К. Понт³, Ю.Л. Орлов^{1, 2}, Ж. Сальс³

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

³ Национальный институт сельскохозяйственных исследований (INRA) – Университет Блеза Паскаля, объединенный исследовательский отдел 1095, Клермон-Ферран, Франция

Микросателлиты, или короткие tandemные (простые) повторы, широко распространены в геномах эукариот, включая геномы растений. Особенности строения и локализации микросателлитных локусов определяют их потенциал в качестве молекулярно-генетических маркеров и могут оказывать влияние на предполагаемые функции микросателлитов в важных биологических процессах. Идентификация и изучение распределения микросателлитных локусов в богатых генами районах генома мягкой пшеницы и разработка на их основе новых микросателлитных маркеров представляют практический интерес и важны для исследования организации генома мягкой пшеницы. Последовательности BAC-клонов, содержащие гомеологичные гены *WFZP* мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L., контролирующие развитие колоса, послужили основой для идентификации и локализации микросателлитных локусов в богатых генами районах хромосом 2AS, 2BS и 2DS. В изученных последовательностях наиболее распространены ди- и тринуклеотидные микросателлитные повторы. Среди динуклеотидных мотивов преобладают AG, GA/TC; динуклеотидные повторы встречаются в некодирующих областях генов, мобильных элементах и неаннотированных последовательностях ДНК. Большая часть тринуклеотидных повторов ассоциирована с мобильными генетическими элементами. Обнаружено, что гомеологичные микросателлитные локусы располагаются либо в генах, либо в неаннотированных последовательностях ДНК. Сравнение структуры гомеологичных локусов показало, что дивергенция в них связана как с изменением числа повторов, так и с нуклеотидными заменами. Разработаны новые микросателлитные маркеры, которые на генетических картах колокализуются с генами *WFZP-A-B-D* и могут использоваться для маркирования этих генов в молекулярно-генетических исследованиях и в контролируемой селекцией.

Ключевые слова: микросателлитные локусы; SSR-маркеры; BAC-клон; мягкая пшеница; *WFZP*.

Development of new SSR markers for homoeologous *WFZP* loci based on the study of structure and location of microsatellites in gene-rich regions of chromosomes 2AS, 2BS, 2DS

O.B. Dobrovolskaya^{1, 2}, C. Pont³, Yu.L. Orlov^{1, 2}, J. Salse³

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institut National de la Recherche Agronomique–Université Blaise Pascal Unité Mixte de Recherche–1095, 63100 Clermont-Ferrand cedex 2, France

Microsatellites, or simple sequence repeats (SSRs), are ubiquitous in genomes of eukaryotes, including plant genomes. The structure and location of SSR loci determine their potential as molecular genetic markers and may have impact on the potential function of microsatellites in important biological processes. Identification and study of the distribution of SSR loci in gene-rich regions of the bread wheat genome and development of novel SSR markers based on these data are of practical interest, being important for the study of bread wheat genome organization. Bread wheat BAC-clone sequences containing homoeologous *WFZP* genes that control spikelet development served as the base for the identification and localization of SSR loci in gene-rich regions of chromosomes 2AS, 2BS, and 2DS. It was found that di- and trinucleotide motifs were predominant. The most common dinucleotide motifs were AG and GA/TC. They were distributed in noncoding regions of genes, transposable elements (TEs) and unannotated sequences. Most identified trinucleotide motifs were associated with transposable elements. Homoeologous SSR loci



were found in either genes or unannotated sequences. Comparison of these loci showed that the divergence in their structure was caused both by changes in repeat number and nucleotide substitutions. New SSR markers were developed and mapped. On the genetic maps of chromosomes 2A, 2B and 2D, they collocated with the *WFZP-A-B-D* genes. Thus, they can be used for gene tagging in molecular research and in marker-assisted selection.

Key words: microsatellite loci; SSR markers; BAC-clones; bread wheat; *WFZP*.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Добровольская О.Б., Понт К., Орлов Ю.Л., Сальс Ж. Разработка новых SSR-маркеров к локусам гомеологичных генов *WFZP* на основе изучения строения и локализации микросателлитов в богатых генами районах хромосом 2AS, 2BS, 2DS мягкой пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):303-309.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Dobrovolskaya O.B., Pont C., Orlov Yu.L., Salse J. Development of new SSR markers for homoeologous *WFZP* loci based on the study of structure and location of microsatellites in gene-rich regions of chromosomes 2AS, 2BS, 2DS. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(3):303-309.

Микросателлиты, или короткие простые повторы (simple sequence repeats, SSR), – это участки ДНК, состоящие из тандемно повторенных коротких (1–6 п. н.) элементов (мотивов). Микросателлитные повторы классифицируют в зависимости от строения: 1) совершенные микросателлитные повторы представляют собой непрерывающуюся последовательность, состоящую из одинаковых мотивов; 2) несовершенные микросателлитные повторы состоят из блоков одинаковых мотивов, разделенных несколькими неповторяющимися основаниями; 3) сложные микросателлиты, или компаунды, представляют блоки из мотивов одного или разных типов, разделенных не более чем 100 п. н. В зависимости от длины микросателлиты бывают двух классов, класс I (≥ 20 п. н.) и класс II (≤ 19 п. н.) (Temnykh et al., 2001). Частота возникновения мутаций в микросателлитных локусах существенно превышает ожидаемую частоту спонтанного мутагенеза (Wierdl et al., 1997; Thuillet et al., 2002). Вариабельность SSR-локусов связана, прежде всего, с изменением числа простых повторов и возникает в результате ошибок репликации ДНК из-за «проскальзывания» ДНК-полимеразы или неравного кроссинговера (Sia et al., 1997). Обнаружено, что вариабельность микросателлитных локусов коррелирует с их длиной. Так, микросателлиты класса I более полиморфны, чем микросателлиты класса II (Temnykh et al., 2001; Webster et al., 2002). Превращение совершенных микросателлитов в несовершенные или компаунды стабилизирует их, вследствие чего они становятся менее вариабельными (Thuillet et al., 2002).

Микросателлиты широко распространены в геномах эукариот (Tautz et al., 1984); показано, что они составляют около 0,69 % генома риса (Grover et al., 2007). Микросателлитные локусы расположены как в кодирующих, так и в некодирующих областях генома, при этом плотность и распределение микросателлитов различных типов в разных фракциях генома неодинаковы (Li et al., 2002; Morgante et al., 2002; Grover et al., 2007).

Микросателлиты широко используют для анализа геномов растений, разработанные на их основе ДНК-маркеры являются одними из самых востребованных

маркеров в молекулярной генетике растений. Наиболее важной областью их применения является молекулярно-генетическое картирование, кроме того, они незаменимы в изучении генетического разнообразия и филогении близкородственных таксонов и представляют интерес для использования в программах по маркер-контролируемой селекции (Ganal, Röder, 2007). Это связано с их следующими качествами: широким распространением в геноме, мультиаллельностью, кодоминантной природой наследования, высокой воспроизводимостью результатов и возможностью автоматизировать генотипирование. Микросателлитные маркеры, полученные на основе геномных библиотек, называют геномными (genomic SSR, gSSR). Первый крупный пул микросателлитных маркеров пшеницы был получен М. Родер с соавт. в 1998 г. на основе геномной ДНК-библиотеки мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. (Röder et al., 1998). Другой путь создания микросателлитных маркеров – поиск *in silico* микросателлитных локусов в экспрессируемых последовательностях ДНК (expressed sequence tags, EST) и разработка на их основе маркеров. Такие маркеры называют EST-микросателлитами. Оба типа маркеров широко используются для картирования генов и геномов мягкой пшеницы и ее сородичей (Salina et al., 2006; Ganal, Röder, 2007; Леонова и др., 2008; Добровольская и др., 2009; Dobrovolskaya et al., 2011). В настоящее время использование накопленных массивов данных, полученных в результате выполнения проектов по секвенированию геномов растений, предоставляет новые возможности для идентификации микросателлитных последовательностей и разработки новых микросателлитных маркеров. BES (BACend sequences)-SSR – новый тип микросателлитных маркеров, полученных в результате концевое секвенирования BAC-клонов (bacterial artificial chromosome). Он широко применяется для интеграции физических и генетических карт растений, в том числе мягкой пшеницы (Paux et al., 2008). Определение референсной последовательности хромосомы 3B (Choulet et al., 2014) и получение результатов черногового секвенирования изолированных хромосом мягкой пшеницы (IWGSC, 2014) позволили сделать важные выводы о структурной и функциональной организации генома

Таблица 1. Микросателлитные маркеры

Маркер	Мотив	Праймеры	Полиморфизм (аллели, п.н.)
CS248B13-1	(AG)16	F: 5'-CTCCAAGAAGATCGAGGTGAACAT-3' R: 5'-TTGTTACCCTACCGATGATGTGTG-3'	163 ⁸ , 167 ^{1,2,3,7} 171 ^{5,6} , 175 ⁹
CS248B13-2	(AT)11	F: 5'-GTGCACCTTTGACCTCCCTACACT-3' R: 5'-ATTTTGGGTTAAGTGGACGTAGCA-3'	432 NP
CS248B13-4	(AGCC)4	F: 5'-CGCTGACTCTACACCTTACCTCGT-3' R: 5'-ACTTTTAATCGAATCGCACACG-3'	406 NP
CS248B13-3	(GCC)4(GCG)4	F: 5'-CGAGCTACATTTAGTCATCTGGA-3' R: 5'-TGACCGCTTTAGAGCCTTG-3'	427 NP
CS184F24-1	(TC)15	F: 5'-CCATGGTGATGTGTGAGTAGTTC-3' R: 5'-GTCGTAGAGTAAGGACACCGCAAT-3'	367 ^{2,6,7,9} 371 ^{1,3,4,5,8}
CS305H5-1	(TA)20	F: 5'-AACAAATGATGCAATGAAGGAACAA-3' R: 5'-CGGGTTTGATTCTGTAGGTTAG-3'	301 ^{1,2,3} , 325 ^{6,7,9} 334 ⁸ , null ^{4,5}
CS305H5-2	(GAG)8	F: 5'-ACTACACCGACACCAACGTCTTC-3' R: 5'-GAAGACTAAGGCATGACTTGGAGG-3'	351 NP

NP – непалиморфный фрагмент указанного размера; цифры верхнего индекса обозначают линии и сорта мягкой пшеницы, у которых данные аллели обнаружены: ^{1,2,3,4,5} – линии Ruc163, Ruc167, So149, Ruc204, Skle128 (Dobrovolskaya et al., 2009, 2015); ^{6,7,8,9} – сорта Саратовская 29, Скала, Чайниз Спринг и Ренан соответственно.

мягкой пшеницы. Более 5 тыс. известных микросателлитных маркеров были картированы в индивидуальных хромосомах физически (IWGSC 2014), разработаны новые SSR-маркеры хромосомы 3B (Paux et al., 2008). Изучение структуры и распределения микросателлитных повторов в отсекуированных последовательностях ДНК мягкой пшеницы даст возможность выявить закономерности их локализации в разных фракциях геномных последовательностей, установить функциональную роль этих повторов в биологических процессах и послужит для создания новых SSR-маркеров.

Целью настоящей работы являются изучение строения и локализации микросателлитных локусов в богатых генами районах хромосом 2A, 2B и 2D на примере последовательностей ДНК-локусов гомеологичных генов *WFZP-A-B-D* и разработка новых SSR-маркеров, маркирующих данные районы.

Материалы и методы

Объектом исследований в данной работе послужили последовательности ДНК районов хромосом 2AS, 2BS и 2DS, полученные в результате 454Roch- секвенирования ВАС-клонов, содержащих гомеологичные гены *WFZP-A, -B* и *-D* мягкой пшеницы. ВАС-клоны CS248B13, CS184F24 и CS305H5 были отобраны при скрининге геномной ВАС-библиотеки, полученной на основе мягкой пшеницы сорта Чайниз Спринг (<http://cnrgv.toulouse.inra.fr/>). Информация о скрининге, секвенировании и аннотировании последовательностей ДНК данных ВАС-клонов опубликована ранее (Dobrovolskaya et al., 2015). Для идентификации SSR-повторов использовали программу *SSR locator* (Maia et al., 2008) при следующих параметрах поиска: минимум 6 повторов для динуклеотидных микросателлитов, 5 повторов для тринуклеотидных микросателлитов и 4 повтора для тетра-/пента-/гексануклеотидных микросателлитов для совершенных повторов; максимум 3 неповторяющихся основания, разделяющих микросател-

литы, для несовершенных повторов; максимум 100 п. н. между блоками микросателлитов для компаундов. Праймеры к микросателлитным локусам разрабатывали при помощи программы Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Структура разработанных праймеров приведена в табл. 1. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на образцах суммарной ДНК, выделенных ранее из растений линий и сортов мягкой пшеницы, перечисленных в табл. 1, а также из индивидуальных растений картирующей популяции F₂, полученной от скрещивания сортов мягкой пшеницы Чайниз Спринг и Ренан (Dobrovolskaya et al., 2009; 2015) согласно протоколу Nicot с соавт. (Nicot et al., 2004). Разделение фрагментов ПЦР выполняли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Размер фрагментов рассчитывали с помощью компьютерной программы ABI GeneScan, version 2.1, разработанной компанией Applied Biosystems. Новые микросателлитные маркеры интегрировали в ранее сконструированные генетические карты хромосом 2A, 2B и 2D мягкой пшеницы (Dobrovolskaya et al., 2015) с помощью компьютерной программы MAPMAKER/EXP ver. 3.0b (Lander et al. 1987), используя картирующую функцию Косамби (Kosambi, 1943) при LOD ≥ 3,00.

Результаты и обсуждение

В ходе выполнения работ по определению первичной структуры генов-гомеологов *WFZP-A-B-D*, регулирующих развитие колоса пшеницы и определяющих судьбу колосковых меристем, было проведено секвенирование трех ВАС-клонов (CS248B13, CS184F24 и CS305H5), несущих целевые гены, и получены данные о структурной организации областей гомеологичных хромосом 2AS, 2BS и 2DS; аннотированы гены и мобильные элементы, входящие в состав данных последовательностей, определен порядок их взаимного расположения (Dobrovolskaya et al., 2015).

Ген *mrs1/WFZP-D* был локализован в богатом генами районе '2S0.8' 2-й гомеологической группы хромосом (Dobrovolskaya et al., 2009). Богатые генами районы хромосом были определены при изучении локализации фрагментов экспрессируемых последовательностей ДНК или EST-последовательностей (EST, expressed sequence tags) в делеционных бинах хромосом мягкой пшеницы (Erayman et al., 2004). Неравномерное распределение генов в хромосомах было подтверждено результатами секвенирования протяженных участков ДНК хромосомы пшеницы 3В, однако четкого деления на крупные блоки ген-богатых и ген-бедных районов в хромосоме 3В обнаружено не было. Показано, что большая часть генов (75 %) образуют небольшие генные островки, состоящие в среднем из трех генов, разделенные блоками из мобильных элементов, а участки, не содержащие гены, протяженностью более 800 тыс. п.н. встречаются очень редко (Choulet et al., 2010, 2014).

В настоящем исследовании последовательности ВАС-клонов, содержащих гомеологические гены *WFZP*, послужили основой для идентификации и локализации микросателлитных локусов в богатых генами районах хромосом 2AS, 2BS и 2DS. Было обнаружено, что среди динуклеотидных повторов преобладают AG, GA/TC (61,5 %) и TA/AT (27 %) (табл. 2). Ранее было показано, что те же классы динуклеотидных повторов (AG/CT и AT/TA) являются преобладающими динуклеотидными повторами в геноме риса (Grover et al., 2007), геномах девяти видов злаковых, включая виды *Triticum urartu* (донор генома А пшеницы) и *Aegilops tauschii* (донор генома D пшеницы) (Wang et al., 2015), и в целом характерны для геномов растений (Lagercrantz et al., 1993). Идентифицированные нами динуклеотидные микросателлиты локализованы как в генных локусах, так и в локусах мобильных элементов (transposable elements, TE) и неаннотированных последовательностях ДНК. Тринуклеотидные микросателлитные повторы встречались реже, чем динуклеотидные, преобладающие мотив/мотивы обнаружены не были. Большая часть тринуклеотидных микросателлитов была представлена короткими SSR-повторами класса II (≤ 19 п.н.), ассоциированными с TE (табл. 2).

В целом большая часть обнаруженных нами микросателлитных локусов была ассоциирована с TE класса I (ретротранспозоны) и располагалась непосредственно во внутренних областях TE. Нами не было обнаружено ни одной серии гомеологических микросателлитных локусов, ассоциированных с TE (гомеологические микросателлитные локусы – микросателлитные локусы одного типа с гомологичными фланкирующими последовательностями, локализованные в гомеологических хромосомах разных субгеномов пшеницы). Это связано, по-видимому, с тем, что TE являются быстро эволюционирующей фракцией геномов, которая вносит основной вклад в межвидовую дивергенцию. Высокий процент ассоциированных с ретротранспозонами микросателлитных повторов был обнаружен ранее при получении насыщенной микросателлитными повторами геномной библиотеки ячменя (Ramsay et al., 1999).

Тетра- (три локуса) и пентануклеотидные (один локус) микросателлиты были обнаружены только в неанноти-

рованных последовательностях ДНК (табл. 2). Из девяти микросателлитов, обнаруженных в генных локусах, пять находились в 5'-некодирующих областях генов, два – в кодирующей области и по одному – в 3'-области и интроне, при этом в кодирующей области локализован тринуклеотидный повтор, в остальных – динуклеотидные микросателлиты. Результаты многих исследований свидетельствуют о том, что различные типы микросателлитных локусов распределены в геноме растений неравномерно. Так, было обнаружено, что в кодирующих последовательностях арабидопсиса, риса, кукурузы и пшеницы наиболее часто встречаются три- и гексануклеотидные повторы, в то время как некодирующая фракция содержит остальные типы микросателлитов (Morgante et al., 2002). Высокую плотность микросателлитов в последовательностях, примыкающих к стартовому кодону, включая 5'-UTR (5'-untranslated region, 5'-нетранслируемый район), обнаружили у риса, при этом наиболее представленными оказались динуклеотидные микросателлиты (AG)_n и (CT)_n, в то время как преобладающим динуклеотидом в геноме риса является (AT)_n (Grover et al., 2007). Высокая частота микросателлитов в областях, примыкающих к стартовому кодону, может предполагать их функциональную роль. Микросателлитные маркеры, полученные на основе таких локусов, представляют интерес для разработки функциональных генетических маркеров с целью использования их в фундаментальных исследованиях и селекции.

Отметим, что обнаруженные нами гомеологические микросателлитные локусы располагались либо в генах, включая 5'-районы, примыкающие к стартовому кодону, либо в неаннотированных последовательностях (табл. 2), что отражает консервативность этих областей. Сравнение структуры данных локусов показало, что дивергенция в них связана как с изменением числа повторов, так и с нуклеотидными заменами (рис. 1); наличие инсерционно-делеционного полиморфизма и однонуклеотидных замен в областях, фланкирующих микросателлитные повторы, позволяет разрабатывать локус-специфичные SSR-маркеры (табл. 1, 2).

С. Темных с соавт. (Temnykh et al., 2001) предложили разделить микросателлитные локусы на два класса в зависимости от длины – класс I (≥ 20 п.н.) и класс II (≤ 19 п.н.). Такое деление на классы отражает потенциал микросателлитов в качестве молекулярных маркеров, так как класс I высокополиморфен, а класс II по частоте мутаций не отличается от уникальных последовательностей ДНК (Temnykh et al., 2001). Среди идентифицированных нами микросателлитов 14 локусов принадлежали к классу I (табл. 2), пять из них были ассоциированы с TE (табл. 2) и непригодны для разработки маркеров, так как неконсервативные фланкирующие последовательности не позволяют разрабатывать локус-специфичные SSR-маркеры. Для нескольких локусов класса I, расположенных на границе контигов, было невозможно разработать один из праймеров (табл. 2). Пары праймеров были разработаны к семи микросателлитным локусам и протестированы на девяти линиях и сортах мягкой пшеницы. Информация о разработанных маркерах представлена в табл. 1.

Полиморфные маркеры были использованы для генотипирования индивидуальных растений популяции F₂,

Таблица 2. Тип и локализация микросателлитных локусов

Мотив	SSR-локус	Локализация	SRR-маркер
2AS (CS248B13)			
AG/GA/CT	(GA)6	na	
	(GA)20^a	G (5'-район)	*
	(GA)4(GA)6 ^b	na	
	(AG)6	TE (I)	
	(AG)16^c	na	CS248B13-1
	(CT)6	G (3'-район)	
AT/TA	(AT)11	na	CS248B13-2
	(AT)7	na	
	(TA)8	TE (II)	
	(TA)19	TE (I)	
	(TA)6 ¹	G (интрон)	
TG/GT	(TG)6	TE (I)	
AGG/GGA	(AGG)6	TE (I)	
	(GGA)5	TE (II)	
TGA	(TGA)7	TE (I)	
	(TGA)2(TGA)4	TE (I)	
CTT	(CTT)5	TE (I)	
ACA	(ACA)5	TE (I)	
GCC, GCG	(GCC)4(GCG)4 ^d	G (CDS)	CS248B13-3
AGCC	(AGCC)4 ¹	na	
AAGAA	(AAGAA)4	na	
2BS (CS184F24)			
AG/GA/TC	(AG)7	na	
	(AG)7	TE (I)	
	(GA)7	TE (I)	
	(GA)10	TE (I)	
	(GA)34	na	*
	(TC)6 ^a	G (5'-район)	*
	(TC)5-CA-(TC)10^b	na	CS184F24-1
GGC/CGG/GCG	(GGC)5	TE (I)	
	(GGC)19 imp	TE (I)	
	(CGG)5	TE (I)	
	(CGG)5(CGG)4	TE (I)	
	(GCG)4(GCG)4	TE (I)	
GTG	(GTG)5	TE (I)	
TTTA	(TTTA)4(TTTA)2		
2DS (CS305H5)			
AG/GA/TC	(GA)9 ^c	na	
	(GA)7(GA)3 ^b	na	
	(AG)8-G-(GA)12	TE (I)	
GC	(GC)6	G (5'-район)	
TCC	(TCC)5	TE (II)	
GAG	(GAG)8	na	CS305H5-2
GCC, GCG	(GCC)5, (GCG)4 ^d	G (CDS)	
TTAT	(TTAT)4	na	
	(TC)12 ^a	G (5'-район)	*
AT/TA	(TA)20	G (5'-район)	CS305H5-1
	(TA)7	TE (II)	

Выделены микросателлитные локусы класса I (длина ≥ 20 п.н.). Буква в верхнем индексе (^{a, b, c} или ^d) обозначает гомеологические микросателлитные локусы. ¹ – для данного локуса идентифицирован гомеологичный локус с числом повторов меньшим, чем в заданных критериях поиска; G – ген, TE – мобильный элемент класса I или II, na – неаннотированные последовательности ДНК; 5'- и 3'-районы – некодирующие районы ДНК протяженностью до 1800 п.н. (в данном исследовании), примыкающие к стартовому и терминальному кодонам гена, соответственно; CDS – кодирующая область гена; imp – несовершенный повтор; * – локус расположен на границе контига.

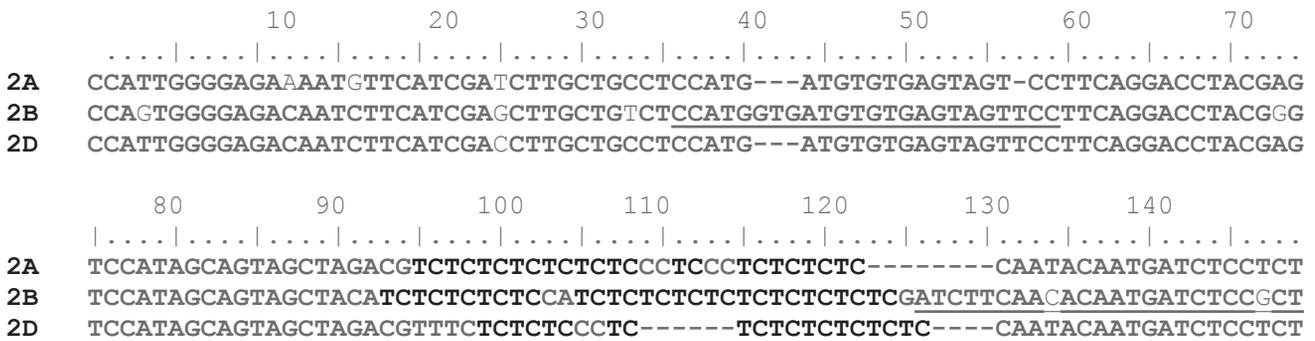


Рис. 1. Структура гомеологичных микросателлитных локусов.

Подчеркнуты области праймеров микросателлитного маркера CS184F24-1. Для выравнивания использованы комплементарные последовательности контигов ВАС-клонов CS248B13 (2A) и CS305H5 (2D), содержащих микросателлитные локусы.

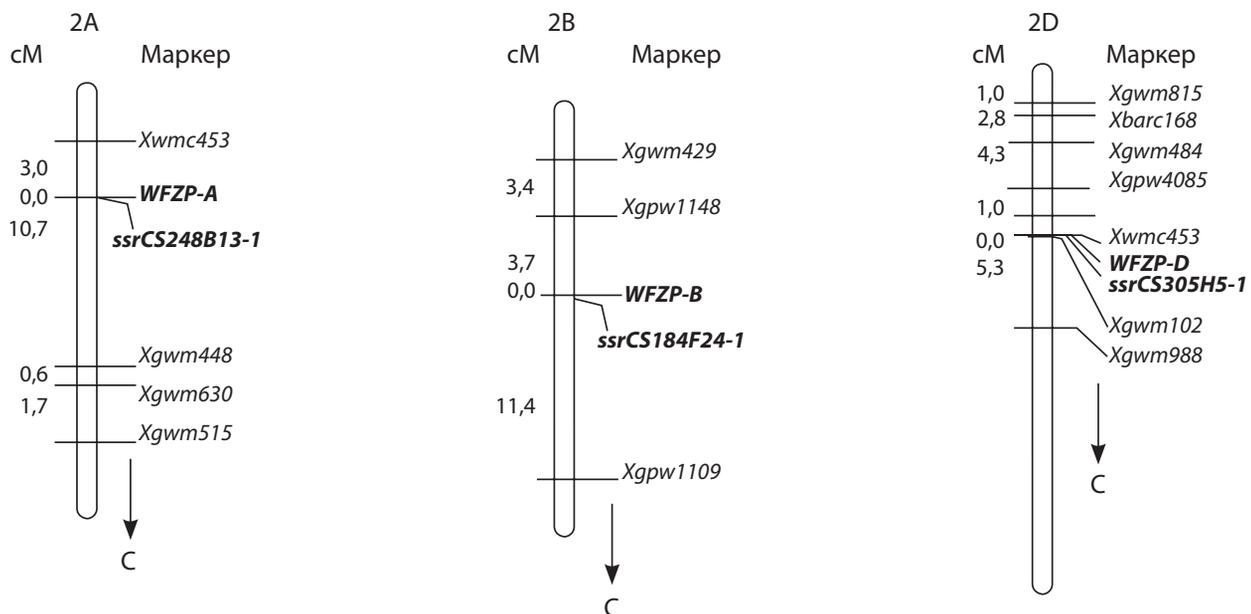


Рис. 2. Микросателлитные карты хромосом 2AS, 2BS и 2DS, включающие гены *WFZP-A-B-D*.

C – центромера, слева от каждой карты – генетические расстояния в сМ, справа – названия микросателлитных маркеров и генов.

полученной от скрещивания сортов мягкой пшеницы Чайниз Спринг и Ренан, и интегрированы в построенные ранее генетические карты хромосом 2AS, 2BS и 2DS (Dobrovolskaya et al., 2015). Обнаружено, что они колокализуются с генами *WFZP-A*, *WFZP-B* и *WFZP-D* (рис. 2). Микросателлитные маркеры CS248B13-1 и CS305H5-1 могут быть использованы в дальнейшем для маркирования локусов генов *WFZP-A* и *WFZP-D* в генотипической среде разных сортов пшеницы, в том числе при маркер-контролируемом переносе данных генов наряду с разработанными ранее аллель-специфичными маркерами (Dobrovolskaya et al., 2015). Кроме того, новые микросателлитные маркеры представляют интерес для маркирования ВАС-клонов и генетического картирования генов, локализованных в богатом генами районе ‘2S0.8’ 2-й гомеологической группы хромосом.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 14.604.21.0107 от 07.07.2014).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Добровольская О.Б., Сурдий П., Бернард М., Салина Е.А. Синтезия хромосом генома А двух эволюционных линий пшеницы. *Генетика*. 2009;45:1548-1555.
- Леонова И.Н., Родер М.С., Калинин Н.П., Будашкина Е.Б. Генетический анализ и локализация локусов, контролирующих устойчивость интрогрессивных линий *Triticum aestivum* × *Triticum timopheevii* к листовой ржавчине. *Генетика*. 2008;44:1652-1659.

- Choulet F., Alberti A., Theil S., Glover N., Barbe V., Daron J. Pingault L., Sourdille P., Couloux A., Paux E., Leroy P., Mangenot S., Guilhot N., Le Gouis J., Balfourier F., Alaux M., Jamilloux V., Poulain J., Durand C., Bellec A., Gaspin C., Safar J., Dolezel J., Rogers J., Vandepoele K., Aury J.M., Mayer K., Berges H., Quesneville H., Wincker P., Feuillet C. Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B. *Science*. 2014;345:1249721–1–7. DOI: 10.1126/science.1249721
- Choulet F., Wicker T., Rustenholz C., Paux E., Salse J., Leroy P., Pingault L., Sourdille P., Couloux A., Paux E., Leroy P., Mangenot S., Guilhot N., Le Gouis J., Balfourier F., Alaux M., Jamilloux V., Poulain J., Durand C., Bellec A., Gaspin C., Safar J., Dolezel J., Rogers J., Vandepoele K., Aury J.M., Mayer K., Berges H., Quesneville H., Wincker P., Feuillet C. Megabase level sequencing reveals contrasted organization and evolution patterns of the wheat gene and transposable element spaces. *Plant Cell*. 2010;22:1686–701. DOI: 10.1105/tpc.110.074187
- Dobrovolskaya O., Boeuf C., Salse J., Pont C., Sourdille P. Bernard M., Salina E. Microsatellite mapping of *Ae. speltooides* and map-based comparative analysis of the S, G, and B genomes of Triticeae species. *Theor. Appl. Genet.* 2011;123:1145–1157. DOI: 10.1007/s00122-011-1655-z
- Dobrovolskaya O., Martinek P., Voylokov A.V., Korzun V., Röder M.S., Börner A. Microsatellite mapping of genes that determine supernumerary spikelets in wheat (*T. aestivum*) and rye (*S. cereale*). *Theor. Appl. Genet.* 2009;119:867–874. DOI: 10.1007/s00122-009-1095-1
- Dobrovolskaya O., Pont C., Sibout R., Martinek P., Badaeva E. Chosson A., Watanabe N., Prat E., Gautier N., Gautier V., Poncet C., Orlov Y.L., Krasnikov A.A., Bergès H., Salina E., Laikova L., Salse J. *FRIZZY PANICLE* drives supernumerary spikelets in bread wheat (*T. aestivum* L.). *Plant Physiol.* 2015;167:189–199. DOI: 10.1104/pp.114.250043
- Erayman M., Sandhu D., Sidhu D., Dilbirligi M., Baenziger P.S., Gill K.S. Demarcating gene-rich regions of the wheat genome. *Nucl. Acids Res.* 2004;32:3546–3565. DOI: 10.1093/nar/gkh639
- Ganal M.W., Röder M.S. Microsatellite and SNP markers in wheat breeding. Eds R.K. Varshney, R. Tuberosa. *Genomics Assisted Crop Improvement, V. 2. Genomics Applications in Crops*. Springer, Dordrecht, the Netherlands. 2007.
- Grover A., Aishwarya V., Sharma P.C. Biased distribution of microsatellite motifs in the rice genome. *Mol. Gen. Genom.* 2007;277:469–480. DOI 10.1007/s00438-006-0204-y
- IWGSC (International Wheat Genome Sequencing Consortium). A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science*. 2014;345:1251788–1–11. DOI: 10.1126/science.1251788
- Kosambi D.D. The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 1943;12:172–175.
- Lagercrantz U., Ellegren H., Andersson L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucl. Acids Res.* 1993;21:1111–1115.
- Lander E.S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M.J., Lincoln S.E., Newburg L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*. 1987;1:174–181.
- Leonova I.N., Kalinina N.P., Budashkina E.B., Röder M.S. Genetic analysis and localization of loci controlling leaf rust resistance of *Triticum aestivum* × *Triticum timopheevii* introgression lines. *Genetika (Moscow)*. 2008;44:1431–1437.
- Li Y.-C., Korol A.B., Beiles A., Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 2002;11:2453–2465. DOI: 10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x
- Maia L.C.D., Palmieri D.A., Souza V.Q.D., Kopp M.M., Carvalho F.I.F.D., Costa de Oliveira A. SSR Locator: tool for simple sequence repeat discovery integrated with primer design and PCR simulation. *Int. J. Plant Genomics*. 2008;412696. DOI: 10.1155/2008/412696
- Morgante M., Hanafey M., Powell W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat. Genet.* 2002;30:194–200. DOI: 10.1038/ng822
- Nicot N., Chiquet V., Gandon B., Amilhat L., Legeai F., Leroy F., Bernard M., Sourdille P. Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs). *Theor. Appl. Genet.* 2004;109:800–805. DOI 10.1007/s00122-004-1685-x
- Paux E., Sourdille P., Salse J., Saintenac C., Choulet F., Leroy P., Korol A., Michalak M., Kianian S., Spielmeier W., Lagudah E., Somers D., Kilian A., Alaux M., Vautrin S., Bergis H., Eversole K., Appels R., Safar J., Simkova H., Dolezel J., Bernard M., Feuillet C. A physical map of the 1-gigabase bread wheat chromosome 3B. *Science*. 2008;322:101–104. DOI: 10.1126/science.1161847
- Ramsay L., Macaulay M., Cradle L., Morgante M., Ivanisovich S.D., Maestri E., Powell W., Waugh R. Intimate association of microsatellite repeats with retrotransposons and other dispersed repetitive elements in barley. *Plant J.* 1999;17:415–425. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1999.00392.x
- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat. *Genetics*. 1998;149:2007–2023.
- Salina E.A., Leonova I.N., Efremova T.T., Röder M.S. Wheat genome structure: translocations during the course of polyploidization. *Funct. Integr. Genomics*. 2006;6:71–80. DOI 10.1007/s10142-005-0001-4
- Sia E.A., Jinks-Robertson S., Petes T. Genetic control of microsatellite stability. *Mutat. Res.* 1997;383:61–70.
- Tautz D., Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucl. Acids Res.* 1984;12:4127–4138.
- Temnykh S., DeClerck G., Lukashova A., Lipovich L., Cartinhour S., McCouch S. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon association, and genetic marker potential. *Genome Res.* 2001;11:1441–1452. DOI: 10.1101/gr.184001
- Thuillet A.C., Bru D., David J., Roumet P., Santoni S., Sourdille P., Bataillon T. Direct estimation of mutation rate for 10 microsatellite loci in durum wheat, *Triticum turgidum* (L.) Thell. ssp durum Desf. *Mol. Biol. Evol.* 2002;19:122–125.
- Wang Y., Yang C., Jin Q., Zhou D., Wang S., Yu Y., Yang L. Genome-wide distribution comparative and composition analysis of the SSRs in Poaceae. *BMC Genet.* 2015. DOI: 10.1186/s12863-015-0178-z
- Webster M.T., Smith N.G.C., Ellegren H. Microsatellite evolution inferred from human-chimpanzee genomic sequence alignments. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2002;99:8748–8753. DOI: 10.1073/pnas.122067599
- Wierdl M., Dominska M., Petes T.D. Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite. *Genetics*. 1997; 140:769–779.

Пребридинговые исследования почти изогенных линий яровой мягкой пшеницы с комбинацией транслокаций от *Agropyron elongatum* (Host.) P.B. и *Aegilops ventricosa* Tausch.

С.Н. Сибикеев, А.Е. Дружин

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока, Саратов, Россия

Для защиты мягкой пшеницы от патогенов, и в первую очередь от ржавчинных болезней, широко привлекают интрогрессивные гены устойчивости, локализованные в чужеродных транслокациях. Для использования их в практической селекции необходимы пребридинговые исследования, которые определяют влияние транслокаций на адаптационные свойства растений, элементы продуктивности, урожайности зерна и качества конечной продукции. С целью решения этих задач изучались почти изогенные линии Л653 и Л654 сорта яровой мягкой пшеницы Добрыня, устойчивые к листовой ржавчине и несущие комбинацию транслокаций T7DS•7DL-7Ae#1L + T2AL•2AS-2M^V#1 с генами Lr19/Sr25 от *Agropyron elongatum* (Host.) P.B. и Lr37/Sr38/Yr17 от *Aegilops ventricosa* Tausch. В качестве контролей использовали сорт-реципиент Добрыня и сорт-стандарт Фаворит. Фитопатологические тесты показали, что Л653 и Л654 высокоустойчивы к *Puccinia triticina* и к расе Ug99 + Lr24 (ТТКСТ) *Puccinia graminis*, но умеренно восприимчивы к саратовской популяции патогена. Пребридинговые исследования линий Л653 и Л654 выявили, что комбинация транслокаций T7DS•7DL-7Ae#1L + T2AL•2AS-2M^V#1: 1) увеличивает продолжительность периода всходы – колошение на 7 дней и высоту растений в среднем на 10 см; 2) не влияет на устойчивость к полеганию, массу 1000 семян и продуктивность зерна как в засушливые годы, так и в годы с эпифитотией листовой ржавчины; 3) уменьшает адаптивность растений к резко меняющимся условиям вегетации; 4) уменьшает количество клейковины, не изменяя ее силу, при этом не влияет на показатели упругости теста, отношение упругости теста к растяжимости, силу муки, объем и пористость хлебцев. Таким образом, комбинация транслокаций T7DS•7DL-7Ae#1L + T2AL•2AS-2M^V#1 в генотипе сорта яровой мягкой пшеницы Добрыня определяет высокую устойчивость к листовой ржавчине и расе Ug99 + Lr24 (ТТКСТ) стеблевой ржавчины и нейтральна в отношении комплекса агрономических показателей.

Ключевые слова: почти изогенные линии мягкой пшеницы; комбинация транслокаций T7DS•7DL-7Ae#1L + T2AL•2AS-2M^V#1; устойчивость к листовой ржавчине; пребридинговые исследования агрономических показателей.

Prebreeding research of near-isogenic lines of spring bread wheat with a combination of translocations from *Agropyron elongatum* (Host.) P.B. and *Aegilops ventricosa* Tausch.

S.N. Sibikeev, A.E. Druzhin

Agricultural Research Institute for South-East Regions of Russia, Saratov, Russia

To protect bread wheat from pathogens and, in particular, rust diseases, introgressive resistance genes located in alien translocations are commonly used. However, their application in practical breeding demands prebreeding studies. They reveal effects of translocations on the adaptive properties of plants, performance indices, yield, and the quality of the final product. For this purpose, we studied the L653 and L654 near-isogenic lines of spring bread wheat cultivar Dobrynya, resistant to leaf rust and carrying the combination of translocations 7DS•7DL-7Ae#1L + 2AL•2AS-2M^V#1, which host genes Lr19/Sr25 from *Agropyron elongatum* (Host.) P. B. and Lr37/Sr38/Yr17 from *Aegilops ventricosa* Tausch. The recipient cv. Dobrynya and standard cv. Favorite were used as references. Phytopathological tests showed that L653 and L654 were highly resistant to *Puccinia triticina* at all stages of plant development and to *Puccinia graminis* race Ug99 + Lr24 (ТТКСТ), but they were moderately susceptible to the Saratov population of this pathogen. The prebreeding research of lines L653 and L654 showed that the combination of 7DS•7DL-7Ae#1L + 2AL•2AS-2M^V#1 translocations: (1) prolonged the seedling emergence – heading time by 7 days and increased the mean plant height by 10 cm; (2) did not affect lodging resistance or 1000 kernel weight; (3) affected grain yield in neither drought years nor years of leaf rust outbreaks; (4) reduced plant adaptation to abrupt vegetation condition changes; (5) reduced gluten amount without affecting its strength, dough tenacity,

tenacity : extensibility ratio, flour strength, bread volume, or bread porosity. Thus, the combination of 7DS•7DL-7Ae#1L + 2AL•2AS-2M^V#1 translocations in the genotype of spring bread wheat cv. Dobrynya determines high resistance to leaf rust and stem rust race Ug99 + Lr24 (TTKST), being neutral with regard to agronomic performance indices.

Key words: near-isogenic lines of bread wheat; combination of 7DS•7DL-7Ae#1L + 2AL•2AS-2M^V#1 translocations; high leaf rust resistance; prebreeding study of agronomic traits.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Сибикеев С.Н., Дружин А.Е. Пребридинговые исследования почти изогенных линий яровой мягкой пшеницы с комбинацией транслокаций от *Agropyron elongatum* (Host.) P.B. и *Aegilops ventricosa* Tausch. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):310-315.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Sibikeev S.N., Druzhin A.E. Prebreeding research of near-isogenic lines of spring bread wheat with a combination of translocations from *Agropyron elongatum* (Host.) P.B. and *Aegilops ventricosa* Tausch. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(3):310-315.

Одним из основных направлений повышения урожайности возделываемых растений является получение форм, устойчивых к биотическим факторам, в число которых входит большая группа фитопатогенов. Для уменьшения экономически значимых потерь от болезней растений необходимо проводить постоянную научно обоснованную селекцию на устойчивость к патогенам, причем она должна базироваться на знании биологии патогена, его вирулентных свойств, генетики устойчивости возделываемых сортов культурных растений и достаточном количестве и разнообразии генов устойчивости к патогенам, т.е. она должна быть опережающей (McIntosh, 1992; McIntosh, Brown, 1997). Вторая половина XX века и первое десятилетие XXI века показали, что наибольшие результаты в защите мягкой пшеницы от патогенов получены при интрогрессии генов устойчивости от родственных видов. В настоящее время из общего количества идентифицированных генов устойчивости к видам ржавчины пшеницы из «дикарей» перенесены: к желтой из 67 – 15 генов, к стеблевой из 58 – 26, к листовой из 74 – 39 (McIntosh et al., 2013). Однако, несмотря на то что получено достаточно большое количество межвидовых и чужеродных переносов генного материала в генофонд мягкой пшеницы, они еще редко успешно используются в коммерческих сортах. Большинство чужеродных транслокаций либо не компенсируют отсутствие пшеничного хроматина, либо содержат нежелательные сцепления. Так, по данным В. Friebe с соавт. (2000), из 29 транслокаций с генами устойчивости к листовой ржавчине (*Lr*-генами), интрогрессированных из видов рода *Aegilops*, а также от *T. timopheevii*, *S. cereale*, *Ag. intermedium* и *Ag. elongatum*, компенсируют отсутствие пшеничного сегмента хромосом – 17, имеют значение для сельского хозяйства – 6 и широко используются в коммерческих сортах – 3. Влияние интрогрессивных транслокаций на агрономически важные признаки (селекционную ценность) определяют в пребридинговых исследованиях, причем наиболее точно – на основе почти изогенных линий. К сожалению, несмотря на их необходимость, таких исследований немного. Как пример можно привести исследования влияния транслокаций 1BL-1R#1S с генами *Pm8/Sr31/*

Lr26/Yr9, 7DS•7DL-7Ae#1L с генами *Lr19/Sr25* (*Lr19*-транслокация), 2AL•2AS-2M^V#1 с генами *Sr38/Lr37/Yr17* (*Lr37*-транслокация), 6DS•6DL-7Ai#2L с геном *Lr38* (Rajaram et al., 1983; Dyck., Fribe, 1993; Villareal., 1995; Singh et al., 1998; Labuschagne et al., 2000; Sibikeev et al., 2000). Отметим, что не во всех исследованиях проведены комплексные оценки показателей зерновой продуктивности мягкой пшеницы совместно с оценками ее хлебопекарных свойств. Недостаточно информации о пребридинговых исследованиях на линиях, несущих комбинации интрогрессивного генного материала, несмотря на то что таким линиям в настоящее время уделяется большое внимание. Известно об изучении у почти изогенных линий яровой мягкой пшеницы влияния на агрономические показатели комбинаций транслокаций 7DS•7DL-7Ae#1L и 1BL-1R#1S (Singh et al., 1998; Сибикеев и др., 2009). Кроме того, проведены пребридинговые исследования ряда комбинаций транслокаций М. Абдряевым (Абдряев, 2006) и 1BL-1R#1S + 5AS-5RL, а также 1BL-1R#1S + 5R(5D) на наборе идентифицированных линий Т. Ефремовой с соавт. (Efremova et al., 2014). К числу чужеродных транслокаций, имеющих значение для сельского хозяйства, относятся *Lr19*- и *Lr37*-транслокации. Причем набор сортов с первой транслокацией в основном сосредоточен в европейской части России (Коваленко и др., 2003), а со второй – в странах Западной Европы (Sumikova et al., 2010). Влияние на агрономические признаки обеих транслокаций оценивалось как положительное (Sibikeev et al., 2000; Labuschagne et al., 2002). К положительным свойствам этих транслокаций, значительно увеличивающих их привлекательность для селекционеров, надо отнести то, что они несут сцепленные блоки генов устойчивости к стеблевой, листовой и желтой ржавчинам – *Lr19/Sr25* и *Sr38/Lr37/Yr17* (McIntosh et al., 2013). Однако в этих транслокациях гены устойчивости к листовой ржавчине были преодолены патогеном (Sibikeev et al., 1996; Bayles et al., 2000). Тем не менее, как показали исследования лаборатории генетики и цитологии ФБГНУ НИИСХ Юго-Востока, комбинация этих транслокаций обуславливает устойчивость к возбудителю листовой ржавчины с типом реакции на патоген ИГ = 0;. Исходя из этого, а также

с учетом положительного влияния на агрономические признаки *Lr19*- и *Lr37*- транслокаций в лаборатории генетики и цитологии был получен набор почти изогенных линий яровой мягкой пшеницы, несущих комбинацию этих транслокаций. Результаты пребридинговых исследований, проводимых в течение 2011–2014 гг. на наборе этих линий, представлены в данной статье.

Материал и методы

Используемый материал включал следующие генотипы: сорта яровой мягкой пшеницы Добрыня (как сорт-реципиент) и Фаворит (как официальный сорт-стандарт при Государственном сортоиспытании для Нижневолжского региона); почти изогенные линии яровой мягкой пшеницы Л653 и Л654 = Добрыня * 5//Milan/Prinia, устойчивые к листовой ржавчине, несущие комбинацию транслокаций 7DS • 7DL-7Ae#1L с генами *Lr19/Sr25* и 2AL • 2AS-2M^V#1 с генами *Sr38/Lr37/Yr17*, у которых донором *Lr19*-транслокации и сортом-реципиентом яровой мягкой пшеницы был сорт Добрыня, а донором *Lr37*-транслокации являлась линия яровой мягкой пшеницы Milan/Prinia селекции международного центра СИММИТ.

Присутствие комбинации чужеродных транслокаций у изучаемых почти изогенных линий определяли по наличию у них маркерных признаков транслокаций: желтого цвета муки, тесно сцепленного с геном *Lr19* (Prins et al., 1996), а также по реакции на саратовскую популяцию возбудителя листовой ржавчины пшеницы *Puccinia triticina* IT = 0;. Так как ген *Lr19* преодолен патогеном с 1994 г. (Sibikeev et al., 1996), одновременное наличие типа реакции на патоген IT = 0 и желтого цвета муки обуславливалось только комбинацией чужеродных транслокаций. Кроме того, наличие комбинации *Lr19* + *Lr37*-транслокаций было подтверждено ПЦР анализом с использованием праймеров VENTRIUP и LN2, предложенных для идентификации гена *Lr37*, и STS-маркера Gb *Lr19* для идентификации гена *Lr19*. Характерные фрагменты амплификации были выявлены у почти изогенных линий Л653 и Л654 (Гульязева и др., 2012). Оценка устойчивости растений к листовой ржавчине проводилась в поле при естественном заражении и в теплице при искусственном инокулировании патотипами, содержащими ген вирулентность к гену *Lr19-pp19*, собранными с сортов Л503 и Добрыня.

Оценку интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы селекции ФБГНУ НИИСХ Юго-Востока, среди которых были линии Л653 и Л654, на устойчивость к расе возбудителя стеблевой ржавчины Ug99 + Lr24 (ТТКСТ) проводили в инфекционном питомнике KARI в Njoro, Кения. Материал испытывали в 2012 г. Линии сеяли двухрядковыми деланками метровой длины, перпендикулярно которым размещали рядки из смеси восприимчивых линий с генами *Sr31* и *Sr24*. Оценку проводили дважды по модифицированной шкале Cobba и реакции хозяина на внедрение патогена (Roelfs et al., 1992): R = устойчивый – 1 балл; TR = единичные пустулы, некротичные пятна, устойчивый – 1 балл; MR = умеренно устойчивый – 2 балла; MS = умеренно восприимчивый – 2–3 балла; M = промежуточный между устойчивым и восприимчивым – 2–3 балла; MSS = от умеренно воспри-

имчивого до восприимчивого – 4 балла; TS = единичные пустулы, восприимчивый – 3–4 балла; S = восприимчивый – 4 балла.

Пребридинговые исследования включали оценку продуктивности зерна и ее элементов, а также оценку физических свойства теста и хлебопекарных показателей. Исследования проводились в 2011–2014 гг. Периоды вегетации в эти годы характеризовались разнообразием температурного и водного режимов. Наиболее благоприятным был 2014 г., жесткой жарой и засухой выделялся 2012 г. Эпифитотии листовой ржавчины от слабой до сильной степени отмечались во все годы исследований. Экспериментальный материал высевался в семирядковые деланки длиной 7 м, с междурядьем 15 см, рендомизированно, в четырехкратной повторности. Полученные данные подвергли соответствующему статистическому анализу с использованием программ «Agros-2.10».

Результаты и обсуждение

Оценка устойчивости почти изогенных линий Л653 и Л654 к возбудителю листовой ржавчины

Исследования лаборатории генетики и цитологии ФБГНУ НИИСХ Юго-Востока 2008–2014 гг. состава саратовской популяции *Puccinia triticina* Eгiкs по генам вирулентности показали, что популяцию можно охарактеризовать как высоковирулентную. Количество генов вирулентности достигало 32, а постоянно высокоэффективными генами устойчивости были *Lr9*, *24*, *28*, *29*, *40*, *41*, *42*, *43*, при этом у растений с геном *Lr19* тип реакции на патоген (IT) менялся по годам: в 2008, 2013 и 2014 наблюдался IT = 3•3, а в 2009 и 2011 гг. – 0,0;. У растений с геном *Lr37* все годы наблюдался IT = 3 в стадии как проростков, так и взрослых растений, однако степень поражения была в пределах 10 %. Линии Л653 и Л654 с комбинацией *Lr*-генов (*Lr19*+*37*) проявляли IT = 0,0; во всех стадиях развития растения как при естественном заражении, так и при искусственном в условиях теплицы. Тем не менее необходимо уточнить, что ген *Lr37* характеризуется в основном как возрастной (устойчивость к патогену экспрессируется со стадии флаг-листа), редко проявляет IT = 1,2•N в стадии проростков, при этом наблюдается температурочувствительность (большая экспрессия при температуре 17 °C) (Bariana, McIntosh., 1993). По данным ряда авторов, ген *Lr37* в стадии проростков устойчив лишь к некоторым редким патотипам *P. triticina* (Ambrozova et al., 2002). Ген *Lr19* – ювенильный, температурочувствительность отсутствует (McIntosh et al., 1995). При инокулировании патотипами *P. triticina*, вирулентными как к *Lr19*, так и к *Lr37* в стадии проростков (3–4 листа) в условиях теплицы, линии Л653 и Л654 проявляли IT = 0, 0;. При температуре воздуха от 17 до 22 °C изменение типа реакции на патоген не наблюдалось. В полевых условиях в стадии молочной спелости при температуре выше 25 °C линии Л653 и Л654 были устойчивыми, с IT = 0, 0;. Есть основания предполагать, что при комбинировании *Lr19*+*37* возникает новое качество устойчивости к патогену, эффективной на всех стадиях развития растений без температурочувствительности. Отметим, что данный эффект наблюдался, когда в качестве донора *Lr37* исполь-

зовалась не только линия Milan/Prinia, но и сорт Trident и почти изогенная линия сорта Thatcher с геном *Lr37* (McIntosh et al., 2013), а донором *Lr19* служил не только сорт Добрыня, но и Л503. Таким образом, влияние искажающих факторов родителей линий Л653 и Л654 (Добрыня и Milan/Prinia) на проявление устойчивости к листовой ржавчине в комбинации *Lr19+37* маловероятно.

Оценка устойчивости почти изогенных линий Л653 и Л654 к расе Ug99 + Lr24 (ТТКСТ) и саратовской популяции возбудителя стеблевой ржавчины

В 2012 г. в фитопитомнике Njoro KARI, Кения, эпифитотия стеблевой ржавчины оценивалась как сильная, степень поражения сортов-контролей, содержащих гены *Sr31* и *Sr24*, достигала 80 %. На этом фоне степень устойчивости Л653 и Л654 в 2012 г. оценивалась как IRMR. Таким образом, обе линии устойчивы к расе стеблевой ржавчины Ug99 + Lr24 (ТТКСТ). Эти линии несут комбинацию *Sr*-генов – *Sr25+38*. Однако известно, что ген *Sr25* эффективен против ТТКСТ, а *Sr38* – нет (Singh et al., 2008). В связи с этим вероятно, что в комбинации *Sr25+38* защитное действие к данной расе стеблевой ржавчины обуславливает лишь ген *Sr25*. При оценке линий Л653 и Л654 на устойчивость к местной саратовской популяции *P. graminis* Pers. в 2008 и 2013 гг. на фоне естественной эпифитотии последние показали тип реакции IT = 3•3 и степень поражения 15–20 %, при этом сорт-контроль Саратовская 68 проявил тип реакции IT = 3 и степень поражения 50 %. Сорт-реципиент Добрыня с геном *Sr25* проявил IT = 3•3 и степень поражения 20 %. Таким образом, комбинация *Sr*-генов – *Sr25+38* в линиях Л653 и Л654 высокоэффективна к расе Ug99 + Lr24 (ТТКСТ), однако к саратовской популяции возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы оценивается как умеренно восприимчивая.

Влияние комбинации Lr19+37-транслокаций у почти изогенных линий Л653 и Л654

на элементы продуктивности и урожайность зерна
Период исследований влияния комбинаций транслокаций 7DS•7DL-7Ae#1L + 2AL•2AS-2M^V#1 (*Lr19+37*-транслокация) на агрономические признаки можно разделить на годы с эпифитотиями листовой ржавчины (2013 и 2014 гг.) и годы с засухой средней (2011 г.) и сильной (2012 г.) степени. Результаты исследований представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, комбинация *Lr19+37*-транслокаций увеличила продолжительность периода «всходы–колошение», различие составило более 7 сут. Отметим, что влияние *Lr19*-транслокации на этот признак неоднозначно. Так, по данным Singh с соавт. (1998), присутствие этой транслокации увеличивает срок выколашивания на 7 дней, а созревания – на 5 дней, в то же время имеется информация, что *Lr19*-транслокация не влияет на эти признаки (Sibikeev et al., 2000; Miralles et al., 2007). По-видимому, в данном случае наблюдается генотип-зависимая реакция. К сожалению, из доступной нам литературы неизвестно о влиянии *Lr37*-транслокации на период «всходы–колошение». Таким образом, можно предполагать, что увеличение срока выколашивания у почти изогенных линий яровой мягкой пшеницы с ком-

бинацией *Lr19+37*-транслокаций является результатом не прямого действия *Lr19*-транслокации в генотипах линий Л653 и Л654, а взаимодействия двух транслокаций, так как после пяти беккроссов генотип сорта Добрыня теоретически восстановлен более чем на 98 %. Из табл. 1 видно, что комбинация *Lr19+37*-транслокаций значимо увеличивает высоту растений, не влияет на устойчивость к полеганию растений и не изменяет массу 1 000 зерен.

Как видно из табл. 2, по продуктивности зерна линии Л653 и Л654 в среднем за период 2011–2014 гг. значимо не отличаются от сорта-реципиента Добрыня и сорта-стандарта для Саратовской области Фаворит.

Анализ урожайности зерна по годам показывает, что Л653 и Л654 не уступили сорту-реципиенту и сорту Фаворит в условиях средней и сильной засухи 2011 и 2012 гг. Таким образом, наличие комбинации *Lr19+37*-транслокаций в генотипе сорта Добрыня не приводит к снижению засухоустойчивости, что имеет важное значение в условиях юго-восточной зоны России. Урожайность зерна линий Л653 и Л654 в годы эпифитотий листовой ржавчины (2013 и 2014 гг.) была неоднозначной. Если в 2013 г. линии значимо не отличались от сортов Добрыня и Фаворит, то в 2014 г. – уступили как сорту-реципиенту, так и сорту-стандарту. Отметим, что эпифитотии листовой ржавчины в 2013 и 2014 гг. оценивались как средние. Условия вегетации 2014 г. отличались от таковых в 2013 г. прохладным и дождливым июнем, на который пришлось стадии трубкования, выколашивания и цветения растений пшеницы, но с начала июля наблюдались резкий подъем температуры воздуха и дефицит осадков, следовательно, налив зерна проходил в жестких условиях. В 2013 г. распределение осадков и температурный режим были более равномерными в течение вегетативного периода. Таким образом, комбинация *Lr19+37*-транслокаций уменьшает адаптивность яровой мягкой пшеницы к резко меняющимся условиям – от избытка влаги и нормальной температуры воздуха к жаре и дефициту влаги.

Влияние комбинации Lr19+37-транслокаций у почти изогенных линий Л653 и Л654 на физические и хлебопекарные свойства муки и хлеба

Одним из наиболее важных агрономических признаков возделываемых растений является качество конечной продукции, у мягкой пшеницы это качество муки и хлеба. Линии Л653, Л654, а также сорт-реципиент Добрыня и сорт Фаворит оценивались по физическим свойствам муки и хлебопекарным показателям с 2011 по 2013 гг. По данным ряда авторов, *Lr19*-транслокация повышает содержание в зерне белка (Сайфуллин, 1990; Singh et al., 1998; Sibikeev et al., 2000) и клейковины (Sibikeev et al., 2000), а *Lr37*-транслокация увеличивает содержание белка в зерне, объем хлеба, не влияет на показатели седиментации и уменьшает отношение упругости теста к растяжимости (P/L) (Labuschagne et al., 2002). Таким образом, исходя из вышеперечисленных факторов влияния *Lr19* и *Lr37* транслокаций на показатели качества в отдельности, есть основания предполагать, что у линий Л653 и Л654 наблюдается взаимодействие двух транслокаций (табл. 3). Как видно из табл. 3, присутствие комбинации *Lr19+37*-транслокаций значимо понизило

Таблица 1. Влияние комбинации *Lr19+37*-транслокаций на элементы продуктивности, среднее за 2011–2014 гг.

Сорт, изолиния	Продолжительность периода «всходы – колошение», сутки	Высота, см	Устойчивость к полеганию, балл	Масса 1000 зерен, г
Добрыня	45 а*	89,1а	4,73b	36,9
Л653	52,75 с	99,2bc	4,9b	35,4
Л654	52,50 bc	100,0с	4,85b	36,4
Фаворит	47,25 а	91,4а	4,4а	33,4
НСР	3,34	6,4	0,17	NS**

* Здесь и далее в табл. 2–3 числа внутри колонок, сопровождаемые разными буквами, значимо различаются при $p > 0,5$; ** NS – значимые различия отсутствуют.

Таблица 2. Продуктивность зерна у сортов и линий Л653 и Л654 за период 2011–2014 гг.

Сорт, изолиния	Урожайность, кг/га				
	2011 г.	2012 г.	2013 г.	2014 г.	в среднем
Добрыня	2 694	2 053	2 988	4 451 bc	3 046,5
Л653	2 646	2 077	2 941	3 980 а	2 911
Л654	2 864	2 099	3 009	4 132 а	3 026
Фаворит	2 571	2 104	2 997	4 731 с	3 095,8
НСР	NS	NS	NS	281	NS

Таблица 3. Физические свойства муки и хлебопекарные показатели сортов и почти изогенных линий мягкой пшеницы, среднее за 2011–2013 гг.

Сорт, изолиния	Клейковина		P/L***	W***, ед	V***, см ³	Пористость	
	%	ИДК-1					
Добрыня	40,17 с	74,7	138,67	2,27	302 b	827	5,0
Л653	35,43 а	73,7	128,33	2,27	288 b	797	4,7
Л654	36,63 ab	70,3	137,00	2,63	303 b	803	4,7
Фаворит	39,33 bc	79,3	102,00	1,63	244 а	790	4,9
НСР	2,97	NS	NS	NS	40,50	NS	NS

*** P – упругость теста; P/L – отношение упругости теста к растяжимости; W – сила муки; V – объем хлебцев.

содержание клейковины, при этом не изменив ее свойств. Кроме того, эти транслокации не влияли на упругость теста (P), отношение упругости теста к растяжимости (P/L), а также силу муки (W). По последнему показателю сорт Добрыня и его почти изогенные линии значимо превзошли сорт Фаворит. Не было обнаружено различий между сортом Добрыня и линиями Л653 и Л654 по хлебопекарным показателям: объему хлебцев (V) и пористости. Однако необходимо отметить, что по этим показателям у Л653 и Л654 было некоторое снижение по сравнению с сортом-реципиентом. Таким образом, показатели качества муки и хлеба при взаимодействии *Lr19 + Lr37*-транслокаций в генотипе сорта Добрыня отличались от таковых при простом аддитивном эффекте каждой транслокации в отдельности.

В целом исследования комбинации транслокаций 7DS•7DL-7Ae#1L + 2AL•2AS-2M^V#1 в генотипе сорта яровой мягкой пшеницы Добрыня показали, что комбинация *Lr19/Sr25 + Lr37/Sr38/Yr17* блоков генов определяет высокую устойчивость к листовой ржавчине и расе

Ug99 + *Lr24* (ГТКСТ) стеблевой ржавчины и нейтральна по отношению к комплексу показателей продуктивности зерна и качества муки и хлеба. С учетом установленных эффектов данная комбинация транслокаций может использоваться в практической селекции мягкой пшеницы.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Абдряев М.Р. Селекционная ценность интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы в Поволжье: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Саратов, 2006.
- Гульятеева Е.И., Иванова О.В., Маркелова Т.С., Сибикеев С.Н. Идентификация генов устойчивости к бурой ржавчине у интрогрессивных сортов и линий мягкой пшеницы, созданных в НИИСХ Юго-Востока. Вестник защиты растений. 2012;(1):38-44.
- Коваленко Е.Д., Макаров А.А., Жемчужина М.И., Коломиец Т.М., Соломатин Д.А., Киселева М.И. Современная стратегия иммунногенетической защиты зерновых культур от болезней. Современные системы защиты растений от болезней и перспективы

- использования достижений биотехнологии и генной инженерии. Голицыно, 2003;52-54.
- Сайфуллин Р.Г. Генетический контроль содержания белка в зерне яровой мягкой пшеницы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Одесса, 1990.
- Сибикеев С.Н., Воронина С.А., Крупнов В.А., Дружин А.Е. Влияние *Lr19+Lr26*-транслокаций на продуктивность и качество зерна яровой мягкой пшеницы. Сб. науч. тр. ГНУ НИИСХ Юго-Востока РАСХН. Саратов, 2009;122-125.
- Ambrozova M., Dedryver F., Dumalasoova V., Hanzalova A., Bartos P. Determination of the cluster of wheat rust resistance genes *Yr17*, *Lr37* and *Sr38* by molecular marker. *Plant Protection Sci.* 2002;38:41-45.
- Bariana H.S., McIntosh R.A. Cytogenetic studies in wheat. XV. Location of rust resistance genes in VPM1 and their genetic linkage with other disease resistance genes chromosome 2A. *Genome.* 1993;36:476-482.
- Bayles R.A., Flath K., Hovmoller M.S., Vallavielle-Porta C. Breakdown of the *Yr17* resistance to yellow rust of wheat in northern Europe. *Agronomie.* 2000;20:805-811.
- Dyck P.L., Friebe B. Evaluation of leaf rust resistance from wheat chromosomal translocation lines. *Crop Sci.* 1993;33:687-690.
- Efremova T., Trubacheeva N., Chumanova E., Badaeva E., Rosseeva L., Arbuzova V., Pershina L. Development and characterization of wheat-rye lines combining T1RS·1BL translocation and 5R(5D) chromosome substitution or T1RS·1BL and T5AS·5RL translocations. *Cereal Res. Commun.* 2014. DOI 10.1556/CRC.2014.0013
- Friebe B., Raupp W.J., Gill B.S. Wheat – alien translocation lines. *Annu. Wheat Newslett.* Kansas State University, USA. 2000;46:191.
- Labuschagne M.T., Pretorius Z.A., Grobbelaar B. The influence of leaf rust resistance genes *Lr29*, *Lr34*, *Lr35* and *Lr37* on bread making quality in wheat. *Euphytica.* 2002;124:65-70.
- McIntosh R.A. Preemptive breeding to control wheat rusts. *Euphytica.* 1992;63:103-113.
- McIntosh R.A., Brown G.N. Anticipatory breeding for resistance to rust diseases in wheat. *Annu. Rev. Phytopatol.* 1997;35:311-326.
- McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. Wheat Rusts. An atlas of resistance genes. CSIRO, Australia, 1995.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of Gene Symbols for Wheat. Proc. of the 12th Intern. Wheat Genet. Symp., 8–13 September 2013. Yokohama, Japan.
- Miralles D.J., Resnicoff E., Carretero R. Yield improvement associated with *Lr19* translocation in wheat. Scale and complexity in plant systems research: Gene-Plant-Crop Relations. Eds J.H.J. Spiertz, P.C. Struik, H.H. van Laar. 2007;171-178.
- Prins R., Marais G.F., Janse B.J.H., Pretorius Z.A., Marais A.S. A physical map of the *Thinopyrum* – derived *Lr19* translocation. *Genome.* 1996;39:1013-1019.
- Rajaram S., Mann C.E., Ortis Ferrara G., Mujeeb-Kazi A. Adaptation, stability and high yield potential of certain 1B/1R CIMMYT wheats. Proc. of Intern. Wheat Genet. Symp., Kyoto, Japan. 1983:613-621.
- Roelfs A.P., Singh R.P., Saari E.E. Rust Diseases of Wheat. Concepts and Methods of Disease Management. Mexico.1992. DF: CIMMYT.
- Sibikeev S.N., Druzhin A.E. The agronomic performance of *Lr19+Lr37* translocations in the set of NILs in the genetic background of the spring bread wheat cultivar Dobrynya. *Annu. Wheat Newslett.* Kansas State University (USA). 2013;58:208.
- Sibikeev S.N., Voronina S.A., Krupnov V.A. Effects from 7DL-7Ae#1 translocation on resistance to environmental factors and grain quality of bread wheat. Proc. of the 11th EWAC Intern. Conf. Novosibirsk, Russia. 2000;188-189.
- Sibikeev S.N., Krupnov V.A., Voronina S.A., Elesin V.A. First report of leaf rust pathotypes virulent to highly effective *Lr*-genes transferred from *Agropyron* species to bread wheat. *Plant Breeding.* 1996;115:276-278.
- Singh R.P., Huerta-Espino J., Rajaram S., Crosa J. Agronomic effects from chromosome translocations 7DL – 7AG and 1BL – 1RS in spring wheat. *Crop Sci.* 1998;38:27-33.
- Singh R.P., Huerta-Espino J.H., Jin Y., Herrera-Foessel S., Njau P., Wanyera R., Ward R.W. Current resistance sources and breeding strategies to mitigate Ug99 threat. Proc. of the 11th Intern. Wheat Genet. Symp., Brisbane, QLD, Australia. 2008.
- Sumikova T., Hanzalova A. Multiplex PCR assay to detect rust resistance genes *Lr26* and *Lr37* in wheat. *Czech. J. Genet. Plant Breeding.* 2010;46:85-89.
- Villareal R.L., del Toro E., Mujeeb-Kazia., Rajaram S. The 1BL/1RS chromosome translocation effect on yield characteristics in a *Triticum aestivum* L. cross. *Plant Breeding.* 1995;114:497-500.

Идентификация генов *Sr* у новых источников устойчивости мягкой пшеницы к расе стеблевой ржавчины Ug99 с использованием молекулярных маркеров

О.А. Баранова¹, И.Ф. Лапочкина², А.В. Анисимова¹, Н.Р. Гайнуллин², И.В. Иорданская², И.Ю. Макарова²

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений», Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

² Московский научно-исследовательский институт сельского хозяйства «Немчиновка», Московская область, Россия

В связи с угрозой проникновения на территорию Российской Федерации агрессивной расы возбудителя стеблевой ржавчины *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Eriks. et Henn, Ug99 необходим поиск новых доноров устойчивости к этой опасной болезни. У 6 источников устойчивости к стеблевой ржавчине, в том числе к расе Ug99, имеющих в своей родословной генетический материал чужеродных видов (*Aegilops speltoides*, *Ae. triuncialis*, *Secale cereale*), проведена идентификация 17 генов *Sr* с использованием молекулярных маркеров как к эффективным против расы Ug99 генам (*Sr2*, *Sr22*, *Sr24*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr32*, *Sr35*, *Sr36*, *Sr39*, *Sr40*, *Sr44* и *Sr47*), так и к не эффективным, но обеспечивающим устойчивость к местным популяциям возбудителя стеблевой ржавчины (*Sr9a*, *Sr15*, *Sr17*, *Sr19* и *Sr31*). На основании анализа молекулярных маркеров постулировано присутствие в изученных линиях от 2 до 7 известных генов *Sr*: в 113/00i-4 – *Sr2*, *Sr36*, *Sr39*, *Sr40*, *Sr44*, *Sr47* и *Sr15*; в 119/4-06rw – *Sr22*, *Sr32*, *Sr44*, *Sr9a*, *Sr17* и *Sr19*; в GT 96/90 – *Sr24*, *Sr36*, *Sr40*, *Sr47*, *Sr15*, *Sr17* и *Sr31*; в 9/00w – *Sr22*, *Sr44*, *Sr32* и *Sr15*; в 141/97w – *Sr22* и *Sr44*. У сорта Донская полукарликовая идентифицированы эффективные к расе Ug99 гены *Sr32* и *Sr44*, а также неэффективные *Sr9a*, *Sr17* и *Sr19*. Изученные образцы могут быть использованы в качестве доноров генов устойчивости к стеблевой ржавчине в селекционных программах на иммунитет.

Ключевые слова: мягкая пшеница; стеблевая ржавчина; раса Ug99; гены *Sr*; молекулярные маркеры.

Identification of *Sr* genes in new common wheat sources of resistance to stem rust race Ug99 using molecular markers

O.A. Baranova¹, I.F. Lapochkina², A.V. Anisimova¹, N.R. Gajnullin², I.V. Iordanskaya², I.Yu. Makarova²

¹ All-Russia Institute for Plant Protection (FSBSI VIZR), Saint-Petersburg, Pushkin, Russia

² Moscow Agricultural Research Institute «Nemchinovka», Moscow Oblast, Russia

The need for new donors of resistance to aggressive race Ug99 of *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Eriks. et Henn has arisen because the pest approaches the territory of Russian Federation. Identification of seventeen known *Sr* genes was performed with use of molecular markers in six sources of resistance to stem rust race Ug99. They included five common wheat lines and Donskaya Polukarlikovaya cv. The investigated accessions carried genetic material of alien species (*Aegilops speltoides*, *Ae. triuncialis*, *Secale cereale*). We used molecular markers associated with effective genes to race Ug99: *Sr2*, *Sr22*, *Sr24*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr32*, *Sr35*, *Sr36*, *Sr39*, *Sr40*, *Sr44*, *Sr47*, and with genes that were ineffective but protected wheat cultivars against local pathogen populations: *Sr9a*, *Sr15*, *Sr17*, *Sr19* and *Sr31*. On the grounds of the analysis of molecular markers the presence of two to seven known *Sr* genes was postulated in analyzed wheat lines: *Sr2*, *Sr36*, *Sr39*, *Sr40*, *Sr44*, *Sr47*, and *Sr15* in line 113/00i-4; *Sr22*, *Sr32*, *Sr44*, *Sr9a*, *Sr17* and *Sr19* in line 119/4-06rw; *Sr24*, *Sr36*, *Sr40*, *Sr47*, *Sr15*, *Sr17* and *Sr31* in line GT 96/90; *Sr22*, *Sr44*, *Sr32* and *Sr15* in line 9/00w; *Sr22* and *Sr44* in line 141/97w. Genes *Sr32* and *Sr44* effective against Ug99 and ineffective genes *Sr9a*, *Sr17* and *Sr19* were identified in Donskaya Polukarlikovaya cv. The accessions studied may be recommended as donors of resistance to race Ug99 in wheat breeding programs.

Key words: common wheat; stem rust, Ug99; *Sr* genes; molecular markers.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Баранова О.А., Лапочкина И.Ф., Анисимова А.В., Гайнуллин Н.Р., Иорданская И.В., Макарова И.Ю. Идентификация генов *Sr* у новых источников устойчивости мягкой пшеницы к расе стеблевой ржавчины Ug99 с использованием молекулярных маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):316-322.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Baranova O.A., Lapochkina I.F., Anisimova A.V., Gajnullin N.R., Iordanskaya I.V., Makarova I.Yu. Identification of *Sr* genes in new common wheat sources of resistance to stem rust race Ug99 using molecular markers. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(3):316-322.

УДК 632.4:633.1

Поступила в редакцию 01.12.2014 г.

Принята к публикации 31.03.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

Стеблевая ржавчина (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Erik. et Henn) распространена во многих регионах мира. При эпифитотийном развитии болезни потери урожая могут достигать 50–70 %. В период с 50-х до середины 90-х годов прошлого века ее вредоносность была значительно снижена благодаря эффективной генетической защите (Плахотник, 1969; Койшыбаев и др., 2008; Bernardo et al., 2013).

В 1999 г. в Уганде отмечено появление новой агрессивной расы, получившей название Ug99 (ТТКСК), которая поразила сорта пшеницы с геном *Sr31*, а позднее появились ее биотипы, поражающие сорта с генами *Sr24* (ТТКСТ) и *Sr36* (ТТТСК) (Jin et al., 2008, 2009). Потери урожая при эпифитотии расы стеблевой ржавчины Ug99 на восприимчивых сортах достигали 80 % и более (Jin et al., 2008). К настоящему времени раса Ug99 распространена в странах Ближнего Востока и мигрирует к среднеазиатским странам, возможен ее занос и в Российскую Федерацию через Урал и Западную Сибирь.

Известно более 50 генов устойчивости к стеблевой ржавчине, часть из них уже потеряли эффективность. По данным СИММИТ (СИММУТ), эффективность к расе Ug99 сохраняют гены *Sr28*, *Sr29*, *SrTmp*, *Sr2*, *Sr13*, *Sr14*, *Sr22*, *Sr35*, *Sr36*, *Sr37*, *Sr32*, *Sr39*, *Sr47*, *Sr33*, *Sr45*, *Sr40*, *Sr24*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr43*, *Sr44*, *Sr27* и *1A.1R* (Singh et al., 2006). К большинству этих генов подобраны молекулярные маркеры (<http://maswheat.ucdavis.edu/Index.htm>), часть из которых используется в маркер-вспомогательной селекции (marker assisted selection – MAS).

Одним из методов создания исходного материала для селекции является отдаленная гибридизация пшеницы с дикорастущими и культурными видами злаков: *Thinopyrum intermedium*, *Th. bessarabicum*, *Th. junceum*, *Agropyron elongatum* (Xu et al., 2012; Zheng et al., 2012), *Secale cereale*, *Leymus ramosus*, *L. mollis* (Rahmatov et al., 2012). Ранее интрогрессивные озимые и яровые линии мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) были созданы в Московском НИИСХ «Немчиновка» с привлечением видов *Aegilops speltoides*, *Ae. triuncialis*, *T. kiharae*, *S. cereale* (Лапочкина, Волкова, 1994; Лапочкина, 2012). Образцы являются частью коллекции мягкой пшеницы «Арсенал», которая отличается широким полиморфизмом по устойчивости к грибным болезням (Лапочкина, 2000; Hsam et al., 2003; Лапочкина и др., 2008; Дженин и др., 2009). Из коллекции выделены доноры с идентифицированными генами устойчивости к бурой ржавчине (Lapochkina et al., 2003; Гайнуллин и др., 2007), а также источники устойчивости к желтой и стеблевой ржавчине. После оценки образцов мягкой пшеницы из коллекций ВИР и «Арсенала» на устойчивость к расе стеблевой ржавчины Ug99 на стадии проростков были выделены устойчивые образцы. Работа была проведена совместно с учеными Миннесотского университета, США (Анисимова и др., 2010). Однако до настоящего времени информация о том, какие гены *Sr* определяют устойчивость изученных линий к стеблевой ржавчине, отсутствует.

Цель настоящего исследования состояла в идентификации генов устойчивости к стеблевой ржавчине у образцов мягкой пшеницы, устойчивых к расе Ug99 (ТТКСК).

Материалы и методы

Объектами исследования в настоящей работе служили 6 образцов мягкой пшеницы, устойчивых к расе стеблевой ржавчины Ug99 на стадии проростков. Тип реакции растений определяли по шкале Стекмана (Stakman et al., 1962). Происхождение образцов и их характеристика приведены в табл. 1.

Для проверки эффективности генов *Sr* к популяции *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Центрального района Нечерноземной зоны РФ была использована коллекция из 35 линий мягкой пшеницы, содержащих единичные известные гены *Sr* или их комбинации. Проверка проводилась на естественном инфекционном фоне в 2013 г. в Московской области. Степень поражения растений стеблевой ржавчиной оценивали по шкале Петерсона (Peterson et al., 1948). Стандартом восприимчивости служили сорт яровой пшеницы Чернява 13 и линия Хакасская, поражение которых составляло 40 и 70 % соответственно.

ДНК выделяли из пятидневных проростков растений пшеницы с использованием цетилтриметиламмонийбромида (СТАВ) по известному методу (Murray, Thompson, 1980). В работе использовали молекулярные маркеры к 17 генам *Sr*. Условия ПЦР приведены в оригинальных работах, но для каждого маркера проводили подбор наиболее оптимальных условий. Список маркеров приведен в приложении (см. Доп. материалы)¹.

Разделение продуктов амплификации проводили в 2 %-м агарозном или 8 %-м полиакриламидном гелях, окрашенных бромистым этидием. В качестве маркеров молекулярных весов использовали GeneRuler™ 50bp DNA Ladder и GeneRuler™ 1kb DNA Ladder («Fementas»). Положительным контролем служили изогенные линии и сорта с известными генами *Sr*, негативным контролем – восприимчивый сорт Саратовская 29.

Результаты и обсуждение

Оценка устойчивости коллекции линий яровой мягкой пшеницы с известными генами *Sr* к природной популяции возбудителя *P. graminis* f. sp. *tritici* в Московской области показала, что в 2013 г. эффективными генами оказались *Sr2*, *Sr9e*, *Sr13*, *Sr22*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr28kt*, *Sr30*, *Sr31*, *Sr32*, *Sr36*, *Sr44*, *SrWld* и комбинации генов *Sr13+Sr17* и *Sr31+Sr38*. В условиях Западной Сибири высокоэффективными остаются гены *Sr31*, *Sr9e*, *Sr25*, *Sr27*, *Sr29*, *Sr32*, *Sr33*, *Sr36*, *Sr38*, *SrWld*, а также комбинации генов *Sr7a*, *Sr12*, *Sr6* (Шаманин и др., 2012). Остается эффективным ген *Sr31* и в Северо-Кавказском регионе России (Синяк и др., 2013), хотя спектр эффективных генов для этого региона гораздо уже (Волкова и др., 2014). Эффективность гена *Sr31* указывает на то, что заноса расы стеблевой ржавчины Ug99 в эти регионы пока не произошло.

Идентификация генов *Sr* с использованием молекулярных маркеров

Для идентификации гена *Sr2* (происходящего от *T. turgidum*) нами был использован SSR-маркер *Xgwm533*, тесно сцепленный с этим геном, широко применявшийся в работах других авторов и рекомендованный для MAS (Hayden

¹ Дополнительные материалы см. в Приложении по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2015-06/appx4.pdf>

Таблица 1. Происхождение и характеристика образцов пшеницы, взятых в эксперимент

Образец (происхождение)	Характеристика
Донская полукарликовая (Русалка/Северодонская)	Озимый сорт мягкой пшеницы, короткостебельный (50–60 см), устойчив к популяциям бурой и стеблевой ржавчины в условиях Московской области, восприимчив к мучнистой росе. Устойчив к расе Ug99 на стадии проростков (тип реакции 0 _i ; 1)
GT 96/90 (Жировка/Мироновская полуинтенсивная)	Озимая селекционная линия (Болгария), устойчива к популяциям бурой и стеблевой ржавчины в условиях Московской области. Устойчива к расе Ug99 на стадии проростков (тип реакции 0 _i ; 0)
9/00w [<i>T. aestivum</i> (Родина)/ <i>Ae. speltoides</i> (10kR)]	Озимая дисомно-замещенная линия (2n = 42) с парой хромосом от <i>Ae. speltoides</i> . Высоко устойчива к популяции бурой ржавчины в условиях Московской области. Наличие генов <i>Lr37</i> , <i>Lr46</i> . Устойчива к расе Ug99 на стадии проростков (тип реакции 0 _i ; 1)
141/97w [<i>T. aestivum</i> (Родина)/ <i>Ae. speltoides</i> (10kR)]	Озимая дисомно-дополненная линия (2n = 44), восприимчива к мучнистой росе, но высоко устойчива к бурой ржавчине на стадии проростков (тип реакции – 0). Устойчива к расе Ug99 на стадии проростков (тип реакции 1, 2)
113/00i-4 [<i>T. aestivum</i> (Родина)/ <i>Ae. triuncialis</i> (5 kR)]	Яровая линия (2n = 42). Имеет дисомное замещение и транслокацию от <i>Ae. triuncialis</i> . Устойчива к мучнистой росе; устойчива к бурой ржавчине на стадии проростков и взрослого растения. Устойчива к расе Ug99 стеблевой ржавчины на стадиях проростков (тип реакции 0 _i ; 1) и взрослого растения (тип реакции 0)
119/4-06rw [<i>T. aestivum</i> (Родина)/ <i>Ae. speltoides</i> (10kR)/ <i>S. cereale</i> (0,75 kR)]	Озимая пшенично-эгилопсно-ржаная линия, высоко устойчива к бурой ржавчине и мучнистой росе. Устойчива к расе Ug99 стеблевой ржавчины на стадии проростков (тип реакции 2)

Таблица 2. Полиморфизм по величине амплификационных фрагментов молекулярных маркеров гена устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr22*

Образцы пшеницы	Маркеры, размер ампликона (п. н.)								
	<i>Xbarc121</i>			<i>Xcfa2123</i>			<i>Xcfa2019</i>		
	170	197	215	230	234	240	200	238	250
SWSR22TB (контроль)	170	197	215	–	234	–	–	238	250
113/00i-4	–	–	215	–	–	240	–	–	–
119/4-06rw	170	–	215	–	234	–	–	238	250
GT 96/90	170	–	–	230	–	240	–	238	250
Донская полукарликовая	170	–	215	–	–	240	–	238	250
141/97w	170	–	215	–	234	–	200	238	250
9/00w	170	197	215	–	234	–	200	238	250

«–» – отсутствие ампликона.

et al., 2004; McNeil et al., 2008; Yu et al., 2010; Кохметова, Атишова, 2012). Рецессивный ген *Sr2* определяет возрастную устойчивость, что затрудняет отбор его носителей. В настоящее время *Sr2* широко используется в комбинациях с другими генами в селекционных программах на устойчивость ко всем вирулентным расам стеблевой ржавчины (Haile, Roder, 2013b). Этот ген распространен в коммерческих сортах пшеницы США (Hope, Arthur 71, Ottawa, Scout), Канады (Lancer, Selsirk, Pembina), Австралии (Baxter, Diamondbird, Hartog, Sunbrook), Индии (Sonalika), а также сортах СИММИТ (Nuri 70, Ravon76, Siete-Cerros). Ожидаемый размер диагностического фрагмента для *Xgwm533* (120 п. н.) наблюдался в нашей работе только у контрольных сортов Ravon76 и Buck Buck и у линии 113/00i-4.

Ген *Sr22* интрогрессирован от *T. monococcum* L. ssp. *Aegilopoides* (синоним *T. boeoticum* Boiss.). Для идентификации этого гена, локализованного на длинном плече

хромосомы пшеницы 7A, обычно используют 3 тесно сцепленных молекулярных маркера, *Xcfa2019*, *Xcfa2123* и *Xbarc121*, с размером диагностических фрагментов 235, 245 и 215 п. н. соответственно (Miranda et al., 2007). Гаплотип по всем трем маркерам, 235, 245, 215, свидетельствует о наличии *Sr22* в образце (Yu et al., 2010).

Размер продуктов ПЦР с маркерами *Xbarc121*, *Xcfa2123* и *Xcfa2019*, полученных в нашей работе, представлен в табл. 2. Амплифицируются фрагменты разного размера и не только те, которые заявлены как диагностические. Для маркера *Xbarc121* только одна линия – 9/00w – полностью повторила гаплотип контрольной линии SWSR22TB, содержащей ген *Sr22*. Ампликон размером 215 п. н., описанный как диагностический фрагмент в работе Yu с соавт. (2010), наблюдался у линий 113/00i-4, 119/4-06rw, 141/97w и у сорта Донская полукарликовая. При анализе продуктов ПЦР для маркера *Xcfa2123* наши результаты совпали с данными Haile с соавт. (2013a). У контрольной

линии SWSR22TB амплифицировался фрагмент размером 234 п.н. Аналогичный фрагмент наблюдался у линий 119/4-06gw, 141/97w и 9/00w. У остальных образцов размер ампликона был несколько больше – 240 п.н.

При амплификации маркера *Xcfa2019* у линии SWSR22TB в нашей работе выявлялись два фрагмента – 238 и 250 п.н. Амплификация диагностического фрагмента 238 п.н. для *Xcfa2019* показана и в работе Olson с соавт. (2010), что не совпадает с данными Haile с соавт. (2013a). Гаплотип, аналогичный линии SWSR22TB для маркера *Xcfa2019*, наблюдался почти у всех исследованных образцов, кроме линии 113/00i-4. Поскольку выявлены ампликоны по трем маркерам к *Sr22*, то можно предположить, что три линии (119/4-06gw, 141/97w и 9/00w) содержат этот ген.

Гены *Sr24* и *Sr36* интрогрессированы в пшеницу от *A. elongatum* и *T. timopheevii*. Ген *Sr24* тесно сцеплен с геном устойчивости к бурой ржавчине *Lr24* и локализован на 3DL-хромосоме пшеницы, *Sr36* локализован в коротком плече хромосомы 2B. Данные гены широко используются в селекции и распространены в западных коммерческих сортах. Оба гена эффективны к расе Ug99, но преодолеваются ее разновидностями (ТТКСТ и ТТТСК) (Jin et al., 2008, 2009). Эти гены эффективны к большинству остальных рас стеблевой ржавчины, их используют для создания пирамид в сочетаниях с другими генами *Sr* при селекции устойчивых сортов пшеницы.

Для идентификации *Sr24* мы использовали два STS-маркера, Sr24#12 и Sr24#50, из них Sr24#12 тесно сцеплен с *Sr24* и более надежен для его идентификации. В настоящее время эти маркеры широко используются для скрининга сортов в США и международном центре СИММИТ (William et al., 2007; Singh et al., 2008). Диагностические фрагменты размером 500 и 200 п.н. для Sr24#12 и Sr24#50 соответственно (Mago et al., 2005) были выявлены у положительного контроля (линии BТSR24AG) и у линии GT 96/90, что свидетельствует о наличии у нее данного гена.

Для идентификации *Sr36* использовали два маркера – кодоминантный *Xstm 773-2* и доминантный *Xwmc477*, тесно сцепленные с *Sr36* (Tsilo et al., 2008). Диагностические фрагменты для *Xstm 773-2* и *Xwmc477* (155 и 190 п.н. соответственно) наблюдались у положительного контроля *Sr36* (линий W2691SR36TT1 и Sr36(CI12632)/8*LMPG) и линий 113/00i-4 и GT 96/90.

Нами не установлены эффективные гены *Sr25* и *Sr26* (интрогрессированные от *A. elongatum*) в анализируемом материале. Для их идентификации были применены широко используемые маркеры Gb (для *Sr25*) и Sr26#43 (для *Sr26*) (размер диагностических фрагментов 130 и 207 п.н. соответственно). Амплификацию данных фрагментов наблюдали только у контрольных линий LC-SR25-ARS и EAGLE-SR26.SR9G.

Анализ продуктов ПЦР показал наличие гена *Sr35* только у контрольных линий W3763-SR35 и Mq(2)5*G2919. Ни в одном из анализируемых образцов эффективный ген *Sr35* (от *T. monocosmum*) не выявлен. Для его идентификации были использованы маркеры *Xcfa2170* и BF485004, свидетельствующие о наличии или отсутствии гена соответственно.

Присутствие эффективного против расы Ug99 гена *Sr32* (от *Ae. speltooides*) было проанализировано с использованием двух маркеров: *Xstm773* и *Xbarc55* (диагностический фрагмент для маркера *Xstm773* – ампликон 209 п.н., а для маркера *Xbarc55* – 128 п.н.) (Dundas et al., 2007; Bernardo et al., 2013). Результаты анализа продуктов ПЦР по обоим маркерам совпали. Оба маркера идентифицировали *Sr32* у контрольных линий C77.19.SR32 и CnsSr32AS, несущих транслокацию от *Ae. speltooides* в хромосоме 2B (McIntosh et al., 1995; Bernardo et al., 2013), а также у анализируемых линий 119/4-06gw, 9/00w и сорта Донская полукарликовая.

Для идентификации гена *Sr39* (от *Ae. speltooides*) был взят маркер Sr39#22. Ген *Sr39* выявлен у положительного контроля – линии RL6082, несущей генетический материал от *Ae. speltooides* (Yu et al., 2010) и пшенично-эгилопной линии 113/00i-4. Полученные результаты будут уточняться в дальнейшем с использованием других маркеров. Для идентификации гена *Sr40* (от *T. timopheevii*) был применен тесно сцепленный (0,7 cM) маркер *Xgwm344*, в качестве положительного контроля была взята линия RL6088, несущая *Sr40* (Wu et al., 2009). Ген *Sr40* был идентифицирован у линий 113/00i-4 и GT 96/90. Гены устойчивости *Sr39* и *Sr40* локализованы на хромосоме 2B, предполагается их сцепление (Bernardo et al., 2013). Те же авторы сообщили о том, что ампликон маркера Sr39#22 размером 820 п.н. диагностирует *Sr40*, в то время как фрагмент 818 п.н. диагностирует *Sr39*. Так как в агарозном и полиакриламидном гелях разница в 2 нуклеотида не выявляется, то весьма вероятно, что мы идентифицировали у линии 113/00i-4 только *Sr40*, что будет проверяться в ходе дальнейших исследований.

Ген *Sr47* (от *Ae. speltooides*) был также идентифицирован с помощью маркера *Xgwm501* (Faris et al., 2008) у линий 113/00i-4 и GT 96/90. Мы не располагаем линией – положительным контролем *Sr47* – и о его наличии судили по присутствию диагностического фрагмента (109 п.н.) при анализе ПЦР. Кроме того, известно, что тип реакции в ответ на заражение расой ТТКСК (Ug99) у линий с геном *Sr47* – «0». У линии 113/00i-4 тип реакции при заражении расой ТТКСК (Ug99) был «0» в первой повторности и «1» во второй на стадии проростков, а у GT 96/90 – «0» в первой и «0» во второй повторности, что совпадает с типом реакции линий, носителей *Sr47*, и может быть косвенным доказательством наличия данного гена.

Для выявления гена *Sr44* (от *Th. intermedium*) был идентифицирован DArT маркер wPt-2565 с диагностическим фрагментом 380 п.н. (Crossa et al., 2007). Характерные ампликоны выявлены при анализе материала всех линий (кроме GT 96/90), однако присутствие гена *Sr44* будет проверяться в дальнейшей работе с использованием других маркеров.

Ген *Sr31* (от *S. cereale*) не эффективен против расы Ug99, но обеспечивает защиту от популяций возбудителя стеблевой ржавчины на территории Российской Федерации. Этот ген был выявлен только у линии GT 96/90. Ген *Sr9a* (от *T. aestivum*) выявлен в 2 образцах из 6 – линии 119/4-06gw и сорте Донская полукарликовая. Ген *Sr15* (от *T. aestivum*) идентифицирован у 3 линий – 113/00i-4, 9/00w и GT 96/90, а *Sr17* (от *T. turgidum*) – у 3 образцов: в линиях

Таблица 3. Идентификация генов *Sr* у образцов мягкой пшеницы с использованием молекулярных маркеров

Образцы	Гены устойчивости к расе возбудителя стеблевой ржавчины Ug99	
	эффективные	неэффективные
9/00w	<i>Sr22, Sr32, Sr44</i>	<i>Sr15</i>
141/97w	<i>Sr22, Sr44</i>	–
119/4-06gw	<i>Sr22, Sr32, Sr44</i>	<i>Sr9a, Sr17, Sr19</i>
GT 96/90	<i>Sr24, Sr36, Sr40, Sr47</i>	<i>Sr15, Sr17, Sr31</i>
Донская полукарликовая	<i>Sr32, Sr44</i>	<i>Sr9a, Sr17, Sr19</i>
113/00i-4	<i>Sr2, Sr36, Sr39, Sr40, Sr44, Sr47</i>	<i>Sr15</i>

119/4-06gw и GT 96/90 и в сорте Донская полукарликовая. Ген *Sr19* (от *T. aestivum*) был идентифицирован у 2 образцов: в линии 119/4-06gw и сорте Донская полукарликовая. Результаты идентификации генов устойчивости показаны в табл. 3.

Широкий спектр генов устойчивости, выявленный в селекционных линиях мягкой пшеницы и в сорте Донская полукарликовая, возможно, обусловлен интрогрессиями чужеродных видов, использованных при их создании. Сорт Донская полукарликовая – результат скрещивания сорта Русалка (S13 × Бан 54) и сорта Северодонская (Безостая 1 × Мироновская 808). Устойчивость к стеблевой ржавчине, вероятно, пришла от итальянского сорта S13. Этот сорт – результат скрещивания Wase-Nibay/Sterling-B, а Wase-Nibay, в свою очередь, происходит от сорта LV(Львовская)/JPN. Последний, возможно, имеет материал *Ae. tauschii*. Селекционная линия из Болгарии GT 96/90 получена от скрещивания сортов (Жировка × Мироновская полуинтенсивная). Сорт Жировка выведен путем ступенчатых скрещиваний Кавказ/*T. miguschovae*/Безостая-1/3/Лютесценс-4473-h-122/4/Лютесценс-4473-h-122 и имеет в своей родословной генетический материал вида *T. miguschovae* (иммунный гомолог мягкой пшеницы). Этот синтетический вид представляет собой гибрид между *T. militinae* (естественный мутант *T. timopheevii*) и *Ae. tauschii* (Дорофеев и др., 1987). Линия GT 96/90 обладает групповой устойчивостью к бурой и стеблевой ржавчинам, а также к желтой пятнистости (Гультьева, 1992; Коваленко, 2005).

Линия 113/00ⁱ-4 ($2n = 42$) была получена в результате скрещивания ярового сорта Родина (World Seeds 1877 × Кавказ) с *Ae. triuncialis* ($2n = 28$, CCUU), пыльца которой перед опылением была облучена γ -лучами в дозе (5,0 кР) (Лапочкина, 1998). Цитологическое изучение характера конъюгации хромосом в мейозе у гибридов F₁ от скрещивания линии 113/00ⁱ-4 с исходным сортом мягкой пшеницы Родина выявило транслокацию и дисомное замещение, с которыми мы и связываем наличие устойчивости к группе болезней, в том числе и к расе Ug99. У этой линии идентифицировано 6 генов устойчивости к расе UG99, первоначально обнаруженных у других видов: *Sr2* (*T. turgidum*), *Sr36* (*T. timopheevii*), *Sr39* (*Ae. speltooides*), *Sr40* (*T. timopheevii*), *Sr44* (*Th. intermedium*), *Sr47* (*Ae. speltooides*). Однако у исходных образцов *Ae. triuncialis* к-1652 и к-1640 диагностические фрагменты маркеров к этим генам обнаружены не были. Это дает повод пред-

полагать наличие переопыления исходной формы с образцами, содержащими геном G, например с *T. kiharae*. Отметим, что в родословной гетерогенного сорта Родина (World Seeds 1877 × Кавказ) имеется генетический материал ржи (<http://genbank.vurv.cz/wheat/pedigree/default.htm>), что также вносит генетическое разнообразие в геном донорской линии 113/00ⁱ-4. У сорта Родина нами предварительно идентифицирован ген *Sr44* с использованием маркера wPt-2565. Линия пшеницы 113/00i-4 была протестирована в Эфиопии в полевых условиях на устойчивость к расе Ug99 и проявила иммунитет к стеблевой ржавчине, что подтверждает наличие у нее эффективных генов *Sr*. Линию 113/00ⁱ-4 планируется передать в ВИР в качестве донора устойчивости к стеблевой ржавчине под названием «Свиток» для использования в селекционных и генетических исследованиях.

Таким образом, мы охарактеризовали источники устойчивости к угандийской расе *P. graminis* f. sp. *tritici* по наличию маркеров, сцепленных с генами *Sr*, что позволяет с определенной вероятностью предполагать детерминацию устойчивости к стеблевой ржавчине перечисленными генами *Sr* (табл. 3). Ранее данные образцы были охарактеризованы по некоторым хозяйственно-биологическим признакам. Все они устойчивы к бурой ржавчине, линии 113/00i-4 и 119/4-06gw устойчивы к мучнистой росе, характеризуются достаточно высокой продуктивностью колоса (1,5–1,9 г) и крупнозерностью (масса 1000 зерен 40–42 г). Кроме того, сорт Донская полукарликовая и линия GT 96/90 имеют короткий стебель и раннее выколашивание.

Изученные источники устойчивости могут быть использованы в селекционных программах при создании сортов мягкой пшеницы с длительной устойчивостью к стеблевой ржавчине, а также для создания пирамид генов *Sr2, Sr22, Sr32, Sr36, Sr40, Sr44* и *Sr47* с использованием молекулярных маркеров.

Благодарности

Данное исследование проведено при поддержке РФФИ (проект № 13-04-00922).

Авторы выражают благодарность заведующей лабораторией иммунитета растений к болезням ФГБНУ ВИЗР доктору биологических наук, профессору, члену-корреспонденту РАН Ольге Сильвестровне Афанасенко и заведующей сектором молекулярно-генетические взаимоотношения паразита и хозяина лаборатории им-

муниципалитета растений к болезням ФГБНУ ВИЗР, доктору биологических наук Нине Васильевне Мироненко за ценные советы и замечания, а также помощь в интерпретации полученных данных.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Анисимова А.В., Стеффенсон Б., Митрофанова О.П., Лапочкина И.Ф., Афанасенко О.С. Устойчивость сортифта пшеницы и образцов эгилопса из коллекции ВИР к расе стеблевой ржавчины Ug 99 (TTKSK). Технологии создания и использования сортов и гибридов с групповой и комплексной устойчивостью к вредным организмам в защите растений. СПб., 2010.
- Волкова Г.В., Шумилов Ю.В., Синяк Е.В., Ваганова О.Ф., Данилова А.В. Эффективные гены устойчивости пшеницы и ячменя к возбудителям ржавчины и их идентификация в перспективных сортообразцах. Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем: Матер. Междунар. науч.-практ. конф. Краснодар, 2014.
- Гайнуллин Н.Р., Лапочкина И.Ф., Жемчужина А.И., Киселева М.И., Коломиец Т.М., Коваленко Е.Д. Использование фитопатологического и молекулярно-генетических методов для идентификации генов устойчивости к бурой ржавчине у образцов мягкой пшеницы с чужеродным генетическим материалом коллекции «Арсенал». Генетика. 2007;43(8):1-7.
- Гульятеева Е.И. Наследование устойчивости сортов и линий пшеницы к ржавчинам: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.; Пушкин, 1992.
- Дженин С.В., Лапочкина И.Ф., Жемчужина А.И., Коваленко Е.Д. Доноры яровой мягкой пшеницы к бурой ржавчине и мучнистой росе с генетическим материалом видов *Aegilops speltoides*, *Aegilops triuncialis*, *Triticum kiharae* Dorof. et Migusch. Докл. РАСХН. 2009;5:3-7.
- Дорофеев В.Ф., Удачин Р.А., Семенова Л.В., Новикова М.В., Градчаннинова О.Д., Шитова И.П., Мережко А.Ф., Филатенко А.А. Пшеницы мира. Л.: Агропромиздат, 1987.
- Коваленко Н.М. Устойчивость видов *Triticum L.* и *Aegilops L.* к возбудителю желтой пятнистости листьев пшеницы (*Rugophthora tritici-repentis* (Died.) Drechs.). Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.; Пушкин, 2005.
- Койшыбаев М., Болтыбаева Л.А., Копирова Г.И. Гермоплазма пшеницы с групповой устойчивостью к болезням с воздушно-капельной инфекцией. Агромеридиан. 2008;3(9):34-42.
- Кохметова А.М., Атишова М.Н. Идентификация источников устойчивости к стеблевой ржавчине с использованием молекулярных маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012;16(1):132-141.
- Лапочкина И.Ф. Цитогенетические и морфологические особенности гибридов мягкой пшеницы, полученных с использованием облученной пыльцы вида *Aegilops triuncialis L.* Генетика. 1998;34(9):1263-1268.
- Лапочкина И.Ф. Реконструкция генома мягкой пшеницы (*Triticum aestivum L.*) при отдаленной гибридизации (с использованием *Aegilops L.* и других видов). Бюл. ВАК. 2000;1:46-47.
- Лапочкина И.Ф. Разнообразие коллекции мягкой пшеницы «Арсенал» и его использование в селекционно-генетических исследованиях. Иммуногенетическая защита сельскохозяйственных культур от болезней: теория и практика. Матер. междунар. науч.-практ. конф., посвященной 125-летию со дня рождения Н.И. Вавилова. Большие Вяземы Моск. обл., 2012.
- Лапочкина И.Ф., Волкова Г.А. Создание коллекций замещенных и дополненных хромосомами *Aegilops speltoides* Tausch. линий яровой мягкой пшеницы. Генетика. 1994;30:86-87.
- Лапочкина И.Ф., Гайнуллин Н.Р., Дженин С.В., Руденко М.И., Макарова И.Ю., Иорданская И.В., Кызласов В.Г., Коваленко Е.Д., Жемчужина А.И., Куркова Н.Н. Идентификация генотипа устойчивости к бурой ржавчине у доноров мягкой пшеницы с чужеродным генетическим материалом сорочичей для целенаправленного использования в селекции на иммунитет. Матер. конф. «Ориентированные фундаментальные исследования и их реализация в АПК России», СПб., 2008.
- Плахотник В.В. Стеблевая ржавчина на Севере Казахстана и устойчивость к ней образцов коллекции яровой пшеницы ВНИИЗХ. Тр. Всесоюз. совещ. по иммунитету растений. Киев, 1969;3:72-75.
- Синяк Е.В., Волкова Г.В., Надыкта В.Д. Характеристика популяции *Puccinia graminis f. sp. tritici* по вирулентности в Северо-Кавказском регионе России. Докл. РАСХН. 2013;6:27-30.
- Шаманин В.П., Моргунов А.И., Манес Я., Зеленский Ю.И., Чурсин А.С., Левшунов М.А., Потоцкая И.В., Лихенко И.Е., Манько Т.А., Каракоз И.И., Табаченко А.В., Петуховский С.Л. Селекционно-генетическая оценка популяций яровой мягкой пшеницы Сибирского питомника челночной селекции СИММИТ. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012;16(1): 21-32.
- Bernardo A.N., Bowden R.L., Rouse M.N., Newcomb M.S., Marshall D.S., Bai G. Validation of molecular markers for new stem rust resistance genes in U.S. Hard winter wheat. Crop Sci. 2013;53:755-764. DOI:10.2135/cropsci2012.07.0446
- Crossa J., Burgueco J., Dreisigacker S., Vargas M., Herrera-Foessel S.A., Lillmo M., Singh R.P., Trethowan R., Warburton M., Franco J., Reynolds M., Crouch J.H., Ortiz R. Association analysis of historical bread wheat germplasm using additive genetic covariance of relatives and population structure. Genetics. 2007;177:1889-1913. DOI: 10.1534/genetics.107.078659
- Dundas I.S., Anugrahwati D.R., Verlin D.C., Park R.F., Bariana H.S., Mago R., Islam A.K.M.R. New sources of rust resistance from alien species: Meliorating linked defects and discovery. Aust. J. Agric. Res. 2007;58:545-549.
- Faris J.D., Xu S.S., Cai X., Friesen T.L., Jin Y. Molecular and cytogenetic characterization of a durum wheat-*Aegilops speltoides* chromosome translocation conferring resistance to stem rust. Chromosome Research. 2008;16:1097-1105. DOI: 10.1007/s10577-008-1261-3
- Haile J.K., Hammer K., Badebo A., Singh R.P., Röder M.S. Haplotype analysis of molecular markers linked to stem rust resistance genes in Ethiopian improved durum wheat varieties and tetraploid wheat landraces. Genet. Resour. Crop. Evol. 2013a;60:853-864. DOI: 10.1007/s10722-012-9880-0
- Haile J.K., Roder M. Status of genetic research for resistance to Ug99 race of *Puccinia graminis f.sp.tritici*: A review of current research and implications. African J. Agr. Res. 2013b;8(50):6670-6680. DOI: 10.5897/AJAR2013.7257
- Hayden M.J., Kuchel H., Chalmers K.J. Sequence tagged microsatellites for the *Xgwm533* locus provide new diagnostic markers to select for the presence of stem rust resistance gene *Sr2* in bread wheat (*Triticum aestivum L.*). Theor. Appl. Genet. 2004;109:1641-1647. DOI: 10.1007/s00122-004-1787-5
- Hsam S.L.K., Lapochkina I.F., Zeller F.J. Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum L. em. Thell*). 8. Gene *Pm32* in a wheat-*Aegilops speltoides* translocation line. Euphytica. 2003;133:367-370.
- Jin Y., Szabo L.J., Pretorius Z.A., Singh R.P., Ward R., Fetch T. Detection of virulence to resistance gene *Sr24* within race TTKS of *Puccinia graminis f. sp. Tritici*. Plant Dis. 2008;92:923-926. DOI: 10.1094/PDIS-92-6-0923
- Jin Y., Szabo L.J., Rouse M.N., Fetch T., Jr., Pretorius Z.A., Wanyera R., Njau P. Detection of virulence to resistance gene *Sr36* within the TTKS race lineage of *Puccinia graminis f. sp. Tritici*. Plant Dis. 2009;93:367-370. DOI: 10.1094/PDIS-93-4-0367
- Lapochkina I.F., Iordanskaya I.V., Yatchevskaya G.L., Zemchuzhina A.I., Kovalenko E.D., Solomatin D.A., Kolomiets T.M. Identification of alien genetic material and genes of resistance to leaf rust in wheat (*Triticum aestivum L.*) stocks. Proc. of Tenth Int. Wheat Genetics Symp. 2003;3:1190-1192.

- Mago R., Bariana H.S., Dundas I.S., Spielmeyer W., Lawrence G.J., Pryor A.J., Ellis J.G. Development of PCR markers for the selection on wheat stem rust resistance genes *Sr24* and *Sr26* in diverse wheat germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 2005;111:496-504. DOI: 10.1007/s00122-005-2039-z
- McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. Wheat rusts: An atlas of resistance genes. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Clayton, South Victoria, Australia, 1995.
- McNeil M.D., Kota R., Paux E., Dunn D., McLean R., Feuillet C., Li D., Kong X., Lagudah E., Zhang J.C., Jia J.Z., Spielmeyer W., Bellgard M., Appels R. BAC-derived markers for assaying the stem rust resistance gene, *Sr2*, in wheat breeding programs. *Mol. Breeding.* 2008;22:15-24. DOI: 10.1007/s11032-007-9152-4
- Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids. Res.* 1980;8(19):4321-4326.
- Olson E.L., Brown-Guedira G., Marshall D., Stack E., Bowden R.L., Jin Y., Rouse M., Pumphrey M.O. Development of wheat lines having a small introgressed segment carrying stem rust resistance gene *Sr22*. *Crop Sci.* 2010;50:1823-1830. DOI: 10.2135/cropsci2009.11.0652
- Peterson R.F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals. *Can. J. Res. Sec. C Bot. Sci.* 1948;26:297-311.
- Rahmatov M., Andrsson S., Gustavsson L., Wanyera R., Steffenson B., Johansson E. Analysis of adult plant and seedling stem rust resistance in wheat-alien introgression lines. *Disease Risk and Food Security: Proc. of the 13th Int. Cereal Rusts and Powdery Mildew Conf.* 28 Aug.–1 Sept. 2012, Beijing. 2012.
- Singh R.P., Hodson D.P., Jin Y., Huerta-Espino J., Kinyua M.G., Wanyera R., Njau P., Ward R.W. Current status, likely migration and strategies to mitigate the threat to wheat production from race Ug99 (TTKS) of stem rust pathogen. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources.* 2006;1(054). DOI: 10.1079/PAVSNNR20061054
- Singh R.P., Hodson D.P., Huerta-Espino J., Jin Y., Njau P., Wanyera R., Herrera-Foessel S.A., Ward R.W. Will stem rust destroy the world's wheat crop? *Advanced Agronomy.* 2008;98:271-309. DOI: 10.1016/S0065-2113(08)00
- Stakman E.C., Stewart D.M., Loegering W.Q. Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. U.S. Dep. Agric. Agric. Res. Serv. E-617. U.S. Gov. Print. Office, Washington, DC, 1962.
- Tsilo T.J., Jin Y., Anderson J.A. Diagnostic microsatellite markers for detection of stem rustresistance gene *Sr36* in diverse genetic backgrounds of wheat. *Crop Sci.* 2008;48:253-261. DOI: 10.2135/cropsci2007.04.0204
- William H.M., Trethowan R., Crosby-Galvan E.M. Wheat breeding assisted by markers: CIMMYT's experience. *Euphytica.* 2007;157:307-319. DOI: 10.1007/s10681-007-9405-7
- Wu S., Pumphrey M., Bai G. Molecular mapping of stem-rust-resistance gene *Sr40* in wheat. *Crop Sci.* 2009;49:1681-1686. DOI: 10.2135/cropsci2008.11.0666
- Xu S.S., Klindworth D., Niu Z.-X., Zhang Q.-J., Chao S.-M., Friesen T., Jin Y., Zhong S.-B., Faris J., Cai X.-W., Larkin P. Introgression of alien genes for resistance to Ug99 stem rust in wheat. *Disease Risk and Food Security: Proc. 13th Int. Cereal Rusts and Powdery Mildew Conf.* 28 Aug.–1 Sept. 2012, Beijing. 2012.
- Yu L.X., Liu S., Anderson J.A., Singh R.P., Jin Y., Dubcovsky J., Brown-Guidera G., Bhavani S., Morgounov A., He Z., Huerta-Espino J., Sorrells M.E. Haplotype diversity of stem rust resistance loci in uncharacterized wheat lines. *Mol. Breeding.* 2010;26:667-680. DOI: 10.1007/s11032-010-9403-7
- Zheng Q., Klindworth D., Niu Z.-X., Rouse M., Yu J., Friesen T., Li Z.-Z., Xu S. Stem rust resistance in *Thinopyrum* species. *Disease Risk and Food Security. Proc. 13th Int. Cereal Rusts and Powdery Mildew Conf.* 28 Aug.–1 Sept. 2012, Beijing. 2012.

Формирование ассоциаций генов, контролирующих общий гомеостаз и элементы продуктивности твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.)

П.Н. Мальчиков, М.Г. Мясникова

Федеральное государственное научное учреждение «Самарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. Н.М. Тулайкова», пос. Безенчук, Самарская область, Россия

Селекция твердой пшеницы в Среднем Поволжье с 1912 г. прошла несколько этапов. Ускорение селекционного процесса наблюдалось на этапах объединения генетических пулов из Безенчука (Среднее Поволжье), Харькова (Украина) и Саратова (Нижнее Поволжье) при наиболее значительном увеличении уровня адаптивности и продуктивности сортов. Целью настоящего исследования были определение вклада исходных родительских генотипов в создание наследственной основы современных сортов и доказательство формирования и эволюции коадаптированного блока генов твердой пшеницы в Среднем Поволжье. Для выполнения этих задач применяли диаллельный анализ элементов продуктивности и гомеостатичности признака «масса зерна с растения» и кластерный анализ родословных современных сортов. В результате проведенных исследований показано, что в процессе селекции твердой пшеницы в Среднем Поволжье происходит формирование коадаптированного блока генов, контролирующего элементы продуктивности растений и их гомеостатическое регулирование путем поэтапной эволюции. В структуре этой полигенной системы коадаптированного блока современных сортов преобладают доминантные гены с аддитивными эффектами и максимальной экспрессией в условиях засухи и высокой температуры среды. На 7-м этапе селекции (1989–2013 гг.) формирование генплазмы большинства сортов Самарского НИИСХ проходило на фоне сильного влияния саратовского генетического пула, что, однако, не стало препятствием для группировки генотипов по степени сходства зародышевой плазмы. Сорта делятся на 3 кластера (А, В, С), различия между ними определяются главным образом вкладом в их наследственную основу «саратовской генплазмы» и наличием различных долей наследственности других сортов и видов пшеницы. На современном этапе необходимо расширение генетической базы исходного материала в селекции твердой пшеницы в Среднем Поволжье.

Ключевые слова: пшеница твердая яровая; гомеостаз; диаллельный анализ; коадаптированный блок генов; селекция.

Formation of gene associations that code for general homeostasis and performance components of durum wheat (*Triticum durum* Desf.)

P.N. Malchikov, M.G. Myasnikova

Tulaikov Research Institute of Agriculture, Russian Agricultural Academy, Bezenchuk, Samara oblast, Russia

Since 1912, durum wheat breeding in the Middle Volga region has passed several stages. Acceleration of the breeding process was observed during the period of joining gene pools from Bezenchuk (the Middle Volga region), Kharkov (Ukraine) and Saratov (the Lower Volga region), when the level of varietal adaptivity and productivity increased to the greatest extent. In this regard, the aim of our research was the evaluation of the impact of original parental genotypes on the building of the hereditary base of cultivars, as well as the demonstration of the formation and evolution of co-adaptive gene blocks of durum wheat in the Middle Volga region. To fulfil the tasks, diallelic analysis of yield elements, homeostatic characteristics of the trait “grain weight per plant” and cluster analysis of the pedigrees of modern cultivars were applied. The study showed that the process of durum wheat breeding was followed by the building of a co-adaptive gene block encrypting elements of plant performance and their homeostatic regulation by means of step-by-step evolution. Dominant genes with additive effects and maximal expression under drought and high temperatures prevailed in the structure of the polygenic system of co-adaptive block of modern cultivars. At the recent stage of breeding (1989–2013), germplasm development in the majority of cultivars bred at the Samara Research Institute of Agriculture occurred under strong influence of the Saratov gene pool, but it did not hamper the gene pool clustering according to germplasm similarity. The resulting clusters of varieties differed in the contribution of the “Saratov germplasm” to their heredity. This contribution was considered as weak (cluster A), moderate (cluster B) and strong (cluster C), corrected for different contributions of germplasms from

other wheat accessions. The main inference from the results of the investigation is that at the modern stage it is necessary to extend the genetic basis of original material for durum wheat breeding in the Middle Volga region.

Key words: *Triticum durum*; homeostasis; diallel analysis; co-adapted genes; breeding.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Мальчиков П.Н., Мясникова М.Г. Формирование ассоциаций генов, контролирующих общий гомеостаз и элементы продуктивности твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):323-332.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Malchikov P.N., Myasnikova M.G. Formation of gene associations that code for general homeostasis and performance components of durum wheat (*Triticum durum* Desf.). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(3):323-332.

В период с 1912 г. до 1990 г. научная селекция твердой пшеницы в Безенчуке прошла несколько этапов (Вьюшков, 2004; Мальчиков, Мясникова, 2012). За это время удалось сформировать блок коадаптированных генов, обеспечивший высокий уровень адаптивности сортов, созданных в 1980-е гг. Генеалогическое дерево лучших сортов 1980-х гг. (Безенчукская 139, Безенчукская 182 и Безенчукский янтарь) основывается на двух генетических пулах – безенчукском и харьковском. Харьковский пул был представлен выдающимся сортом 1960–1970-х гг. – Харьковская 46, а безенчукский – сортами Безенчукская 121 и Безенчукская 105, которые унаследовали специфический комплекс генов адаптивности к условиям Среднего Поволжья от Леукурум БГ-40, созданного исключительно на основе местного исходного материала.

Начиная с 1990-х гг. для гибридизации в значительной доле от общего объема скрещиваний привлекались саратовские сорта из НИИСХ Юго-Востока. К тому времени в Саратове сформировался оригинальный генетический пул, основанный на местных сортах Поволжья (Белотурка, Черноуска), Ближнего Востока, Пакистана; харьковских сортах (Харьковская 46, Харьковская 51); сибирских (Ракета); иностранных – из США (WSMP-13), Канады (СВ-8020), Италии (Леукурум 983). Высокое качество сортов НИИСХ Юго-Востока (содержание каротиноидов, реологические свойства теста и кулинарные достоинства) было основной причиной включения их в селекционный процесс в Самарском НИИСХ.

В первом цикле скрещиваний на основе Безенчукской 182, Безенчукского янтара (Самарский НИИСХ), Саратовской золотистой и Валентины (НИИСХ Юго-Востока) создана группа сортов и селекционных линий, которую условно назовем «первой волной», с высоким уровнем развития не только признаков качества зерна и макарон, но также продуктивности и жаро- и засухоустойчивости. В соответствии с принципом ступенчатой гибридизации генотипы – носители нового комплекса признаков – были включены в следующий цикл скрещиваний. В результате этого в настоящее время получены сорта и перспективные селекционные линии, которые при отсчете от первых скрещиваний с саратовскими сортами в начале 1990-х годов можно обозначить «второй волной».

Поскольку современные сорта обладают высоким уровнем адаптивности, продуктивности и качества зерна, правомерно предположение о функционировании у них

новых или более сложных и совершенных блоков генов в сравнении с сортами 1980-х гг. В период с 1989-го по 2005-й гг. получено около 2 тыс. гибридных популяций, на основе которых созданы современные сорта и селекционные линии. Такое количество скрещиваний обеспечивает значительный объем и разнообразие генетической информации для интенсивного формообразовательного процесса. В то же время через «сито» отбора так же, как в любом эволюционном процессе, проходит лишь незначительная часть генов и генных ассоциаций.

Задачей настоящего исследования было определение вклада исходных родительских генотипов в формирование наследственной основы систем адаптивности современных сортов и доказательство эволюции или усложнения коадаптированных блоков генов.

Материал и методы

Для выполнения поставленных задач применили диаллельный анализ полигенных систем продуктивности и гомеостаза и кластерный анализ родословной современных сортов. Тест на идентификацию уровня адаптивности и продуктивности исследуемых генотипов проведен в многолетнем эксперименте в контрастных условиях внешней среды в двух экологических пунктах (Волгоград, 2005–2006 гг.; Безенчук, 2005–2006 гг., по двум предшественникам – пару и овсу на зерно) по методике А.В. Кильчевского и Л.В. Хотылевой (1997). Условия экологического пункта «Волгоград» (Нижеволжский НИИСХ) отличались в периоды трубкования – цветения и налива зерна от условий экологического пункта «Безенчук» (Самарский НИИСХ) более высокими среднесуточными температурами (+2,1–2,7 °С) при практически равном количестве атмосферных осадков, что позволило в эксперименте идентифицировать жаростойкие сорта.

Исследуемые генотипы высевались рендомизированно в Безенчуке в 6 полевых повторностях и в Волгограде – в 4, на делянках с учетной площадью 20,0 м². Уровень общего гомеостаза сортов оценивали по коэффициенту мультипликативности (a_i) признака «масса зерна с растения» (Драгавцев и др., 1984). Наследование этого параметра и элементов продуктивности в диаллельных скрещиваниях (Науман, 1954), 6 сортов (только прямые скрещивания) использовали для доказательства поэтапного усложнения (эволюции) коадаптированного блока генов общего гомеостаза. В диаллельный анализ были включены сорта, отнесенные к 6-му и 7-му этапам селекции твердой пше-

Таблица 1. Параметры адаптивной способности и стабильности генотипов твердой пшеницы. Безенчук – Волгоград, 2005–2006 гг.

Сорт	$U + V_i^*$	OAC_i	$\sigma^2_{G \cdot Eg_i}$	σ_{CAC_i}	L_{gi}	S_{gi}	ЦГ _i
Харьковская 46	6,49	-4,21	4,09	3,42	0,35	52,7	3,12
Безенчукская 139	8,04	-2,66	2,50	4,13	0,15	51,4	3,97
Безенчукский янтарь	8,75	-1,95	5,56	5,52	0,18	63,1	3,32
Безенчукская 182	10,25	-0,45	2,21	5,32	0,08	51,9	5,02
Безенчукская 200	10,55	-0,15	1,00	4,66	0,05	44,1	5,96
Безенчукская степная	11,55	0,85	1,63	5,04	0,06	43,6	6,59
Памяти Чеховича	13,39	2,69	16,03	5,04	0,63	37,6	8,43
Марина	12,35	1,65	1,31	5,37	0,05	43,5	7,06
Безенчукская 205	13,21	2,51	3,62	5,95	0,10	45,1	7,35
Безенчукская 209	10,73	0,03	0,81	4,31	0,04	40,2	6,48
Безенчукская 207	12,50	1,80	4,51	5,37	0,12	43,0	7,21
Безенчукская Нива	12,79	2,09	10,98	5,96	0,31	46,6	6,92
Гордеиформе 1761	13,45	2,75	5,01	4,25	0,28	31,6	9,28
Леукурум 1751	12,15	1,45	5,89	4,92	0,24	40,5	7,30
Леукурум 1753	12,58	1,88	4,44	5,49	0,15	43,6	7,18
Леукурум 1756	11,45	0,75	5,45	5,49	0,18	47,9	6,05

* Биологический смысл и значимость параметров в таблице обсуждаются в тексте статьи.

ницы в Среднем Поволжье: Безенчукская 182, Гордеиформе 1634 – аналог Безенчукской 182 с выполненной соломиной (6-й этап), Безенчукская степная, Памяти Чеховича, Безенчукская 205, Безенчукская 202 (7-й этап). Полевые испытания родительских сортов и гибридных поколений F_1 , F_2 проведены в условиях Безенчука (Самарская область) в 2004, 2005 гг. и в условиях Волгограда (Нижневолжский НИИСХ) в 2005 г. Посев семян родительских сортов и гибридов выполнен на метровых делянках с рендомизированным размещением в двух- и трехкратной повторности с площадью питания 37,5 см² в расчете на одно растение. Уборка проводилась на стадии восковой спелости зерна подкапыванием на 10 см и извлечением из почвы растений с неповрежденными узлами кушения. Растения каждого генотипа (родители, гибриды) с каждого повторения в количестве 20–30 шт., за исключением больных, поврежденных и крайних в рядке, объединяли в один сноп, этикировали, подвешивали в разборочном цехе на 3 недели и после высухания зерна приступали к структурному анализу. Анализировали по четырем признакам: 1) «число зерен с растения»; 2) «масса 1 000 зерен»; 3) «выход зерна из надземной биомассы» (К.хоз.); 4) «масса зерна с растения».

В качестве исходных данных по генеалогии родительских компонентов, участвовавших в создании наследственной основы сортов, использовали имеющуюся в литературе информацию (Васильчук, 2001; Martynov et al., база данных GRIS с 1997 г. по настоящее время). Первая группа сортов («первая волна») включала: Безенчукскую степную, Памяти Чеховича, Безенчукскую 205, Марину, Безенчукскую 209, Безенчукскую Ниву, Леукурум 1751

и Леукурум 1753. Вторая («вторая волна») включала: Безенчукскую 210, Безенчукскую золотистую, 1307д-51, 1307д-54, 1389да-1, 1368д-18, 1477д-4, 1437д-1, 1464д-11 и 1594д-3. Для формирования кластеров по степени родства применяли Q-технику кластерного анализа по максимуму коэффициентов корреляции между объектами с определением меры сходства между ними. Расчеты выполнены на основе пакета программ селекционно-ориентированных и биометрико-генетических методов «Agros» для ПК (Мартынов и др., 1993).

Результаты и обсуждение

Оценка сортов, созданных после первого цикла скрещиваний, по адаптивности и продуктивности на основе комплекса параметров А.В. Кильчевского, Л.В. Хотылевой (1997), проведенная в 2005–2006 гг. по градиенту среды, включавшего условия Безенчука (предшественники – пар, овес на зерно) и Волгограда (Нижневолжский НИИСХ), представлена в табл. 1. Наибольшими эффектами OAC_i (общая адаптивность генотипа) обладали сорта Гордеиформе 1761, Памяти Чеховича, Безенчукская 205, Безенчукская Нива, Леукурум 1753, Безенчукская 207 и Марина. Самыми нестабильными по вариансе ($\sigma^2_{CAC_i}$ – варианса специфической адаптивной способности) оказались Безенчукская 205, Безенчукская Нива, Безенчукский янтарь, Леукурум 1753. Однако корреляция между средней продуктивностью и стабильностью отсутствовала ($r = 0,172$). Это говорит о том, что в исследуемой популяции могут быть стабильными как высокопродуктивные, так и низкопродуктивные генотипы. Коэффициент корреляции между вариансой взаимодействия генотип–среда

и показателем σ_{AC_i} , характеризующим стабильность, также был невысоким ($r = 0,496$), что предполагает наличие генотипов с дестабилизирующим эффектом. Относительная стабильность генотипов S_{gi} варьировала от 31,6 у Гордеиформе 1761 до 63,1 % у Безенчукского янтаря. Коэффициент нелинейности (L_{gi}) у всех сортов был меньше единицы, что объясняется преобладанием линейной реакции генотипа на среду. Лучшими сортами, сочетающими высокую продуктивность со стабильностью формирования урожая, если судить по селекционной ценности генотипа ($СЦГ_i$) – комплексному параметру, который оценивает оба свойства одним цифровым значением, оказались сорта: Гордеиформе 1761, Памяти Чеховича, Безенчукская 205, Леукурум 1751, Безенчукская 207, Леукурум 1753, Безенчукская Нива, Марина, Безенчукская степная и Безенчукская 209.

Большинство новых сортов имеют явное преимущество по продуктивности, общей адаптивности и селекционной ценности над сортами предшествовавших периодов селекции – Харьковской 46, Безенчукской 139, Безенчукским янтарем и Безенчукской 182. Эти данные можно рассматривать как доказательство экспрессии соответствующих генетических систем у новых сортов. Если подобные ассоциации генов передаются при гибридизации потомству, то можно с большой уверенностью утверждать, что в данных условиях среды функционирует коадаптированный блок генов (Жученко, 2001), контролируемый мейотическими процессами и отбором в конкретных условиях. После многолетних процедур отбора и изучения потомков селекционер-исследователь в большинстве случаев обнаруживает этот блок генов при анализе сортообразующей способности родительских генов. Однако, учитывая то, что свойства сортов, формирующиеся на основе функционирования подобных ассоциаций генов, можно довольно точно описать (измерить) в генетико-статистических параметрах, то, видимо, наследование наиболее информативных из них будет являться экспериментальным доказательством присутствия этих ассоциаций в исследуемых сортах. Показатели, рассчитанные на основе средовой вариации, не связанной с относительной изменчивостью всего исследуемого набора сортов, наиболее адекватно описывают гомеостатичность количественных признаков и хорошо наследуются (Lin, Binns, 1988, 1991).

В.А. Драгавцев с соавт. (1984) как меру общего гомеостаза предложили использовать параметр мультипликативности $a_i = (Y_i + B_i \cdot X_{ij})/Y_i$ (где Y_i – среднее значение признака i -го сорта по пунктам испытания; B_i – коэффициент линейной регрессии i -го сорта; X_{ij} – среднее значение признака по всем родителям и гибридам для всех пунктов испытания). Этот параметр, довольно тесно коррелировавший с комплексом генетико-статистических показателей – OAC_i , $СЦГ_i$, S_{gi} – исследуемого набора генотипов твердой пшеницы (Мальчиков, 2009), был включен в наши исследования как наиболее удобный в расчетах. Экспериментальные данные диаллельных скрещиваний сгруппировали в две экологические повторности: первая представлена данными «Волгоград 2005 г., Безенчук 2004 г.»; вторая – «Волгоград 2005 г., Безенчук 2005 г.». Полученные значимые различия между сортами и гибридами (табл. 2) использовали для изучения наследования

гомеостатичности признака «масса зерна с растения» по параметру мультипликативности a_i . Первые три места по гомеостатичности заняли Безенчукская 205, Памяти Чеховича и Безенчукская степная, 5-е и 6-е место – Гордеиформе 1734 и Безенчукская 202 соответственно. Безенчукская 182 имела промежуточное значение между крайними вариантами. Параметры $Wr - Vr$ и $Wr + Vr$ соответствовали аддитивно-доминантной модели наследования коэффициента мультипликативности, значимая неаддитивная генетическая дисперсия объяснялась доминантными эффектами генов. Коэффициент корреляции между выраженностью признака у сортов и суммой $Wr + Vr$ был высоким ($r = 0,763$) и указывал на положительное действие доминантных генов, усиливших гомеостатичность исследуемого признака (табл. 3).

Все компоненты генетической дисперсии были значимы на 5 %-м уровне. Доминирование было полным, параметр $(H_1/D)^{0.5}$ близок к единице, наблюдалась значительная асимметрия частот доминантных и рецессивных аллелей – параметр $H_2/4H_1$ значительно отклонялся от 0,25, параметр $F > 0$.

Доминантных генов в популяции больше, чем рецессивных. Параметры Ft значимы для всех сортов, при этом только у сорта Безенчукская 202 превалировали рецессивные гены, снижавшие гомеостатичность. Наиболее эффективными донорами доминантных генов гомеостатичности могут быть сорта Безенчукская 205 и Памяти Чеховича. Генетико-статистическая характеристика сортов по основным элементам продуктивности растений дополняет эту информацию и формирует целостное представление о наличии коадаптированного блока генов. В 2005 г. в условиях Волгограда на фоне высоких температур воздуха и при практически таком же количестве осадков в периоды трубкования, цветения и налива зерна, что и в условиях Безенчука, наиболее ярко проявились свойства изучаемых сортов. Жаростойкость процессов гаметогенеза и налива зерна определила четкую дифференциацию сортов по урожайности с 1 м^2 и элементам продуктивности (табл. 4).

Наибольший интерес представляли признаки «число зерен с растения», «К.хоз.» (выход зерна из воздушно-сухой надземной биомассы) и «масса 1 000 зерен».

По всем признакам получены статистически значимые различия между родительскими сортами и гибридами (табл. 2). Результаты оценки эффектов генетических параметров представлены в табл. 5. Комплементарный эпистаз имел место в наследовании числа зерен с растения, после исключения из анализа Безенчукской 205 наследование признака было адекватно аддитивно-доминантной модели. «К.хоз.» и «масса 1 000 зерен» наследовались по аддитивно-доминантному типу. По всем признакам отмечен положительный эффект доминантных генов – коэффициент корреляции (r) между доминированием и средним значением признака был отрицательным. По признакам «число зерен с растения» и «масса 1 000 зерен» наблюдалось полное доминирование в локусах $(H_1/D)^{0.5} \approx 1,0$, по «К.хоз.» – неполное доминирование $(H_1/D)^{0.5} < 1,0$. Тем не менее аддитивные эффекты в наследовании признаков были значимы на 5 %-м уровне. Существенная асимметрия частот доминантных и рецессивных аллелей (параметр $H_2/4H_1$) наблюдалась только по «К.хоз.». Носи-

Таблица 2. Значения количественных признаков у сортов, включенных в диаллельные скрещивания и гибридов F₁, F₂ по годам и экологическим пунктам

Сорта и гибриды	Год и географический пункт проведения эксперимента									Коэффициент мультипликативности, a_i
	Безенчук, 2004			Безенчук, 2005			Волгоград, 2005			
	M1 000	ЧЗР	К.хоз.	M1 000	ЧЗР	К.хоз.	M1 000	ЧЗР	К.хоз.	
ПЧ	32,4	29,8	36,3	31,7	27,1	34,0	28,4	28,6	29,5	1,62
ПЧ/БС	35,3	31,1	35,2	33,8	29,2	33,6	29,1	33,5	24,9	1,73
ПЧ/Б205	36,2	28,4	30,7	37,3	28,1	33,8	29,6	38,2	26,7	1,71
ПЧ/Г1734	35,6	28,2	35,7	32,6	26,6	31,8	28,4	33,1	22,3	1,83
ПЧ/Б182	37,5	28,4	33,0	34,0	29,1	34,0	31,6	36,6	26,7	1,36
ПЧ/Б202	38,5	25,4	35,7	34,2	26,5	35,0	27,7	27,4	25,2	1,65
БС	34,3	24,5	29,7	34,4	25,0	30,8	25,2	24,4	17,4	1,86
БС/Б205	32,5	22,5	27,9	37,1	30,9	36,5	32,8	26,0	22,8	1,62
БС/Г1734	30,9	25,7	28,5	34,5	27,6	31,2	26,7	24,8	18,0	2,01
БС/Б182	30,4	26,5	31,0	33,0	27,8	31,1	27,6	29,2	21,9	1,63
БС/Б202	36,1	21,2	26,0	34,0	29,2	33,9	22,2	23,4	15,2	1,75
Б205	36,9	28,3	32,5	38,8	26,3	34,8	28,7	37,3	27,7	1,57
Б205/Г1734	33,2	35,8	30,5	34,4	29,1	33,6	26,4	17,5	16,5	2,49
Б205/Б182	34,1	31,3	33,0	41,2	29,4	37,1	24,0	24,0	17,0	2,43
Б205/Б202	40,3	30,5	34,8	35,6	30,0	33,1	28,1	31,9	19,9	2,08
Г1734	31,8	29,4	30,1	27,7	25,3	27,1	18,1	15,8	9,8	2,79
Г1734/Б182	31,2	22,4	22,5	30,6	30,7	29,4	20,2	17,6	13,8	2,58
Г1734/Б202	32,7	30,2	31,6	31,8	29,8	32,1	25,9	20,8	18,3	2,24
Б182	30,6	30,4	28,1	32,4	28,4	29,4	22,5	24,3	19,5	2,15
Б182/Б202	31,6	26,3	28,3	35,6	30,3	32,1	20,6	23,7	12,4	2,36
Б202	35,9	30,1	33,7	26,5	24,4	24,8	15,6	5,6	3,7	3,30
m%	2,15	2,01	3,63	2,29	3,96	4,55	1,68	5,83	6,17	5,10
HCP _{0,05}	2,20	1,65	3,34	2,22	3,19	4,21	1,27	4,51	3,64	0,38

Признаки: M1 000 – масса 1000 зерен, г; ЧЗР – число зерен с растения; К.хоз. (HI) – уборочный индекс (доля зерна в надземной массе растения, %); a_i – коэффициент мультипликативности, мера гомеостаза; ПЧ – Памяти Чеховича; Б – Безенчукская; С – степная; Г – Гордеиформе.

Таблица 3. Генетические параметры гомеостатичности признака «масса зерна с колоса» по параметру мультипликативности (a_i). Безенчук – Волгоград, 2004–2005 гг.

Генетические параметры						
D	H_1	$(H_1/D)^{0,5}$	H_2	$H_2/4H_1$	F	R
0,62*	0,64*	1,02	0,41*	0,16	0,55*	0,763

* Эффекты значимы на 5 %-м уровне.

телями большинства доминантных генов, действовавших в популяции и контролировавших изучаемые признаки, были сорта: Безенчукская степная и Памяти Чеховича – по «числу зерен с растения», Памяти Чеховича, Безенчукская 205 и Безенчукская степная – по «К.хоз.», Памяти Чеховича, Безенчукская 205 – по «массе 1000 зерен». Сорта Памяти Чеховича и Безенчукскую 205 можно считать донорами жаростойкости процессов гаметогенеза и налива зерна.

В условиях Безенчука в 2004–2005 гг. получены достоверные различия по исследуемым признакам структуры урожая сортов и гибридов (табл. 2). Генетические параметры, определенные на этом же наборе сортов и диаллельных гибридах F₁ (2004 г.) и F₂ (2005 г.) (табл. 6), показали отсутствие эффектов генов на признак «число зерен с растения» в оба года исследований. В наследовании признака «К.хоз.» превалировали доминантные гены, проявившие аддитивные эффекты и действовавшие

Таблица 4. Элементы продуктивности сортов, включенных в ДИАС, при посеве 400 шт./м² всхожих семян на делянках 20,0 м², в 4 рендомизированных повторениях. Волгоград, 2005 г.

Сорт	Оценка плотности стеблестоя (1–9 балл)		Урожайность, г/м ²		К.хоз., %	М1000, г	Число зерен на 1 м ²
	по всходам	по продукт. стеблестою	биомассы	зерна			
ПЧ*	6,3	2,0	740,0	188,3	25,3	31,4	5998
БС	7,7	1,7	608,3	83,3	13,4	27,7	3005
Б205	7,7	2,0	678,3	118,3	17,4	31,2	3789
Г1734	6,3	1,0	306,7	21,7	6,9	28,5	761
Б182	7,0	1,5	505,0	58,3	10,1	26,9	2171
Б202	7,7	1,3	518,3	33,3	6,0	26,2	1271
m%	7,59	10,1	1,5	6,88	5,09	0,47	5,53
НСР _{0,05}	Ff < Ft	0,54	29,0	21,0	2,53	0,44	572

*Сокращения см. в табл. 2.

Таблица 5. Генетические параметры элементов продуктивности растений. Волгоград, 2005 г.

Признак	Генетические параметры						
	D	H ₁	(H ₁ /D) ^{0,5}	H ₂	H ₂ /4H ₁	F	R
Число зерен с растения	82,3*	87,6*	1,03	77,6*	0,222	11,8	-0,897
К.хоз.	97,7*	57,4*	0,766	37,1*	0,162	64,3*	-0,611
Масса 1000 зерен	28,9*	35,2*	1,10	31,9*	0,227	9,2*	-0,826

* Эффекты значимы на 5 %-м уровне.

Таблица 6. Генетические параметры элементов продуктивности растений. Безенчук, 2004–2005 гг.

Признак	Генетические параметры						
	D	H ₁	(H ₁ /D) ^{0,5}	H ₂	H ₂ /4H ₁	F	R
Число зерен с главного колоса	4,4	22,8	–	23,5	–	1,5	0,209
	0,18	8,5	–	9,2	–	-1,42	-0,875
К.хоз.	7,49*	26,9*	1,89	26,5*	0,25	-7,23	-0,46
	9,8*	18,5*	1,38	14,1	–	9,0	-0,876
Масса 1000 зерен	4,70*	5,2	–	5,4	–	-1,97	0,489
	18,3*	10,0	–	11,0	–	0,39	-0,528

* Эффекты значимы на 5 %-м уровне, в числителе – данные 2004 г., в знаменателе – 2005 г.

в направлении отбора. Показатель степени доминирования $(H_1/D)^{0,5}$ превышал единицу. Аддитивные эффекты генов преобладали в оба года в контроле «массы 1000 зерен». В 2004 г. рецессивные, а в 2005 г. доминантные гены увеличивали этот признак. Максимальное количество положительно действовавших в 2004 г. на «массу 1000 зерен» рецессивных генов имел сорт Безенчукская 202. Однако если учесть, что коэффициент корреляции между доминированием и величиной признака у родителей был невысокий, можно предположить наличие у других сортов положительно действовавших на признак доминантных генов. В 2005 г. доминирование было сильнее, но его уровень также был недостаточен для однозначной системы генов. Тем не менее максимальное количество доминантных генов имели сорта Безенчукская степная,

Памяти Чеховича, Безенчукская 205. Рецессивные аллели преобладали у сорта Безенчукская 182.

Итак, в условиях Волгограда формирование всего комплекса признаков проходило под влиянием хорошо скоррелированной с ним физиологической системы жаростойкости и засухоустойчивости ростовых процессов и под контролем доминантных генов с аддитивными эффектами. В условиях Безенчука, несмотря на значительную схожесть рангов сортов по степени выраженности признаков с результатами, полученными в Волгограде, не обнаружено столь однозначной системы генов по всем признакам, а по числу зерен в колосе эффекты среды превысили эффекты генов. Контрастные условия экспериментальных экопунктов позволили идентифицировать функционирование разных генетических систем

у исследуемых генотипов, при этом отчетливо проявилась более широкая наследственная основа продуктивности и устойчивости новых сортов.

Синхронное наследование в условиях высоких температур и продолжительной засухи признаков продуктивности и гомеостаза массы зерна с растения, высокая концентрация доминантных генов у современных сортов, показывают, что они несут полигенные системы, передаваемые потомству в виде единого комплекса, т. е. блока сцепленных генов. Следовательно, блок генов, обеспечивающий адаптивность и продуктивность сортов 6-го этапа (Безенчукская 182 и Безенчукский янтарь), был дополнен (улучшен) на 7-м этапе селекции полигенными системами жаро-, засухоустойчивости и гомеостаза формирования зерновой продуктивности растений. Эти результаты можно рассматривать как экспериментальное доказательство эволюции или усложнения коадаптированных блоков генов твердой пшеницы в Среднем Поволжье в процессе селекции.

Леукурум 33 и Леукурум БГ-40, полученные на 3-м этапе селекции на основе местного материала с участием генплазмы мягкой пшеницы, были первыми сортами с высокой сортообразующей способностью, определявшейся ассоциацией генов адаптивности твердой пшеницы к условиям Поволжья.

Создание сортов Безенчукская 139, Безенчукская 182, Безенчукский янтарь, Оренбургская 2, Оренбургская 10 было связано с объединением генных пулов твердой пшеницы, сформировавшихся в Харькове и Безенчуке.

Интенсивное включение в скрещивания сортов НИИСХ Юго-Востока сопровождалось межвидовой гибридизацией и использованием коллекционных образцов. Поэтому для определения вклада родительских компонентов и связанных с ними эколого-географических ассоциаций генов, генетического материала других видов в формирование коадаптированного блока генов сортов «первой» и «второй волны», полученных от скрещиваний 1989–2006 гг., был использован метод кластерного анализа степени сходства.

Несмотря на значительную роль блоков генов в передаче наследственной информации потомкам, предполагается, что в популяциях с небольшой численностью, ограниченной несколькими десятками или сотнями особей, наиболее вероятны рекомбинантные генотипы, сочетающие примерно половину зародышевой плазмы каждого из родителей. Положение о равном вкладе родителей в потомство выполняется даже в условиях давления отбора в процессе гомозиготизации (Мартынов и др., 2005). В связи с этим правомерен простой подсчет вклада (в долях или процентах) в наследственность исследуемых сортов родителей и их предков при оценке сходства или уровня их родства.

Вклады исходных сортов (21 генотип) в формирование наследственной основы 18 современных сортов, выраженные в процентах, оценили с помощью однофакторного дисперсионного анализа для плана неорганизованных повторений (табл. 7).

Получены статистически достоверные различия по относительному вкладу исходных форм в генофонд современных сортов и селекционных линий ($F_f = 24,7 > F_{0,01} = 2,0$

для $df_{\text{вариантов}} = 19$; $df_{\text{ошибки}} = 340$). Генотипы с наиболее существенным вкладом, а также вклады других видов пшеницы представлены в табл. 8.

Значительный вклад (44,1 %) вносит Саратовская золотистая, наследственный материал которой присутствует во всех изученных сортах. В современных сортах вклад Безенчукской 105 (8,2 %) меньше, чем Харьковской 46 (18,1 %). Это связано с тем, что Безенчукская 105 и ее потомки не входят в родословную около 40,0 % сортов «второй волны».

Существенно больший вклад Харьковской 46 определяется участием этого сорта в безенчукском и саратовском генетических пулах. Вклад Гордеиформе 740, который несет зародышевую плазму сортов из США WSMP-13 и Wells, объясняется высокой сортообразующей способностью Гордеиформе 1434, в родословную которого входит Гордеиформе 740 с участием 25,0 %. Значительный вклад сорта Валентина определяется сортообразующей способностью его потомков (Безенчукская 205, Марина). Вклад Мелянопус 26 – сорта Краснокутской СОС – опосредован через Саратовскую золотистую и Валентину. Роль других видов пшеницы (*Triticum aestivum* L., *Triticum dicoccum* (Srank) Shuebl., *Triticum timopheevii* (Zhuk.) Zhuk.) незначительна по объему, но проявляется достаточно отчетливо в фенотипах современных сортов. Например, сорт Памяти Чеховича содержит 62,5 % наследственной плазмы от Саратовской золотистой и только 15,6 % от образца *T. dicoccum* (Srank) Shuebl. к-46995, но его особенности хорошо проявляются в фенотипе в виде выживаемости растений и плотности продуктивного стеблестоя. Этот же образец (*T. dicoccum*) передат современным сортам устойчивость к мучнистой росе. Транслокация от *Triticum timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. (источник 1678Б-21), подтвержденная гибридологическим анализом и молекулярным маркированием (Malchikov et al., 2013), обеспечивающая устойчивость к мучнистой росе, присутствует в 4 изученных сортах. Таким образом, современный безенчукский генофонд имеет узкую генетическую основу – сформирован на базе нескольких сортов, предшествующей селекции и транслокаций от других видов пшеницы. Тем не менее при помощи Q техники кластерного анализа удалось разделить 18 современных сортов и селекционных линий на достоверно различающиеся по степени родства (сходства) кластеры (табл. 9; рисунок).

Кластер «А» образован на основе исходных предков Харьковской 46 и Безенчукской 105 (33,5–62,5 %) с включением генплазмы Саратовской золотистой и других генотипов. Кластер «В» сформирован на основе преваляирования генплазмы Саратовской золотистой (37,5–50,0 %) со значительным вкладом мягкой пшеницы 1678Б-21 (6,25–12,5 %) и *Triticum timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. (0,4–0,8 %). В кластер «С» включены сорта с самой высокой долей Саратовской золотистой (43,8–62,5 %) и других видов пшеницы – *Triticum dicoccum* (Srank) Shuebl. (15,6–7,8 %), *Triticum aestivum* L., (6,25 %), *Triticum timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. (0,4 %) и мексиканского сорта Anhinga (0,4–0,8 %). Три сорта не вошли в кластеры – это Безенчукская 209, Безенчукская 210 и Безенчукская золотистая. Безенчукская 209 получена на основе Харьковской 9 (46,9 %) с включением донора гена *Rht1*

Таблица 7. Вклад предковых генотипов в наследственность современных сортов

Сорт	Предковые генотипы и их вклад в наследственность современных сортов, %*																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
БС	32	25	50	25	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
ПЧ	16	2	0	63	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	11	0	0	25	25	0,8
М	22	12	25	25	0	0	13	0	50	0	0	0	0	0	3	0	50	0	0	0	0
Б205	22	13	25	25	0	0	13	0	50	0	0	0	0	0	3	0	50	0	0	0	0
Б209	16	12	25	13	0	0	12	0	50	0	0	47	0,5	0	0	1	0	0	0	0	0
БН	9	0	0	50	0	13	12	0	0	0	3	0	0	0	6	9	0	0	0	0	0
Б210	20	1	0	62	6	0	6	0	0	3	0	6	0	13	8	11	0	0	0	0	0,4
Б3	16	3	6	56	6	0	14	6	0	0	0	0	0	8	7	0	0	0	0	0	0,4
1307д-51	13	1	0	57	6	6	6	0	0	0	2	0	0	0	8	7	5	0	13	13	0,4
1307д-54	13	1	0	57	6	6	6	0	0	0	2	0	0	0	8	7	5	0	13	13	0,4
Л1751	9	0	0	50	0	13	13	0	0	0	3	0	0	0	6	9	0	0	0	0	0
Л1753	9	0	0	50	0	12	12	0	0	0	3	0	0	0	6	9	0	0	0	0	0
1389да-1	29	14	25	50	0	0	19	0	25	0	0	0	0	0	6	6	0	25	0	0	0
1368д-18	19	19	12	44	7	0	6	0	25	0	0	0	0	0	8	5	0	25	13	13	0,4
1477д-4	23	14	13	50	0	0	19	0	25	0	0	0	0	0	6	6	0	25	0	0	0
1437д-1	19	18	12	44	7	0	6	0	25	0	0	0	0	0	8	5	0	25	13	13	0,4
1464д-11	16	6	12	37	0	6	13	0	25	0	1	0	0	0	5	5	25	0	0	0	0
1594д-3	16	6	13	38	0	6	13	0	25	0	1	0	0	0	5	5	25	0	0	0	0

* Цифрами (1, 2, 3... 21) в ячейках таблицы во второй строке обозначены предковые генотипы современных сортов; для удобства восприятия вклады в таблице округлены до целых значений. Б – Безенчукская; ПЧ – Памяти Чеховича; З – Золотистая; С – Степная; Н – Нива.

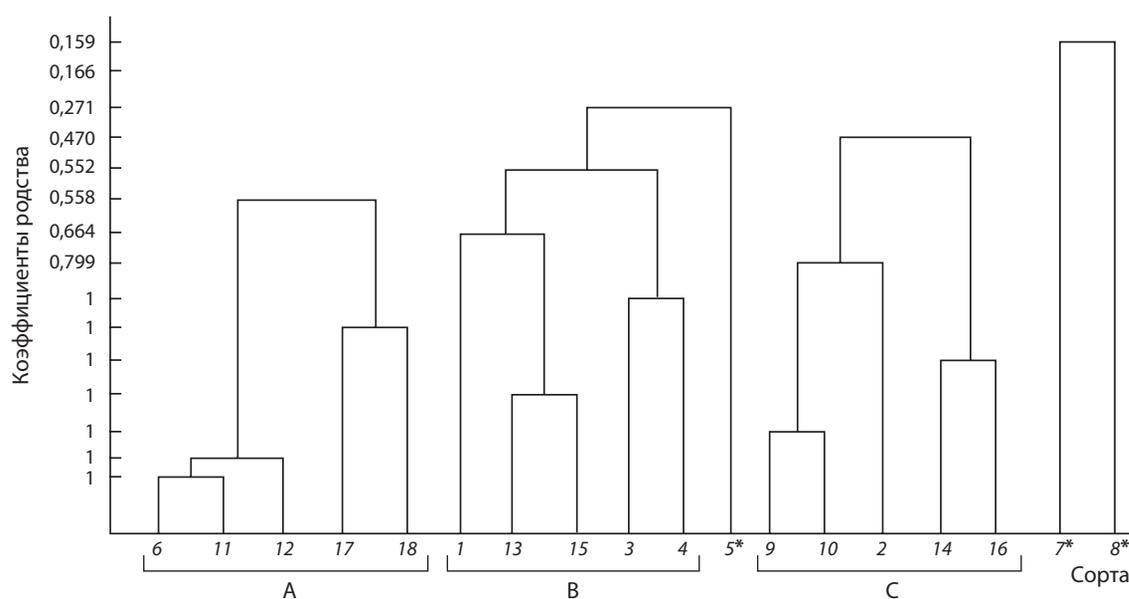
Таблица 8. Вклад наиболее значимых исходных форм в наследственность 18 современных сортов и селекционных линий Самарского НИИСХ

Генотип	Оригинатор (генетический пул)	Вклад, %	Критерий Дункана
Саратовская золотистая	НИИСХ Юго-Востока (саратовский)	44,1	h
Харьковская 46	Украинский НИИР (харьковский)	18,1	g
Гордеiforme 1434	Самарский НИИСХ (безенчукский)	16,8	fg
Валентина	НИИСХ Юго-Востока (саратовский)	13,9	e-g
Безенчукская 182	Самарский НИИСХ (безенчукский)	12,6	d-g
Гордеiforme 740	Самарский НИИСХ (безенчукский)	11,5	c-f
Безенчукская 105	Самарский НИИСХ (безенчукский)	8,2	b-e
Месянопус 26	Краснокутская СОС (саратовский)	5,6	abc
2125Б-4	Самарский НИИСХ (безенчукский)	4,2	ab
92д-4	Самарский НИИСХ (безенчукский)	4,2	ab
<i>T. dicoccum</i> – к-46995	ВИР (мировая коллекция)	4,2	ab
<i>T. aestivum</i> – 1678Б-21	Самарский НИИСХ (безенчукский)	3,5	ab
<i>T. aestivum</i> – Л1293	Самарский НИИСХ (безенчукский)	0,35	a
<i>T. timopheevii</i> (через ИТ-3)	ВИР (мировая коллекция)	0,03	a

Таблица 9. Внутрикластерное сходство 18 сортов и селекционных линий, созданных в Самарском НИИСХ в период 1989–2013 гг.

Сорта	Кластер	Сходство сортов внутри кластера*
Марина, Безенчукская 205, Безенчукская степная, 1389да-1, 1477д-4	A	0,555–1,0
Безенчукская Нива, Леукурум 1751, Леукурум 1753, 1464д-11, 1594д-3	B	0,541–1,0
Памяти Чеховича, 1307д-51, 1307д-54, 1368д18, 1437д-1	C	0,470–1,0
Безенчукская 209, Безенчукская 210, Безенчукская золотистая	Вне кластеров	–

* Критическая величина значимости на 5 %-м уровне составляет 0,46.



Дендрограмма кластеризации 18 сортов яровой твердой пшеницы по коэффициентам родства.

Выделено 3 кластера по критическому коэффициенту 0,46. Сорта, не вошедшие в кластер, обозначены звездочкой. Цифрами обозначены: по оси ординат – коэффициенты родства; по оси абсцисс – сорта: 1 – БС; 2 – ПЧ; 3 – Марина; 4 – Б.205; 5 – Без.209; 6 – БН; 7 – Б210; 8 – Б3; 9 – 1307д-51; 10 – 1307д-54; 11 – Л1751; 12 – Л1753; 13 – 1389ДА-1; 14 – 1368д-18; 15 – 1477д-4; 16 – 1437д-1; 17 – 1464д-11; 18 – 1594д-3. Сокращения см. в табл. 7.

мексиканского сорта Cocorit 71 (0,05 %); Безенчукская 210 и Безенчукская золотистая, созданные на основе сорта Памяти Чеховича, несут генплазму редких предков современных сортов – Апуликум 341, Леукурум 33, Харьковская 9, Лютесценс 1293, что, по-видимому, и определило обособленность этих сортов.

Сорта распределялись по кластерам независимо от принадлежности к первой или второй «волнам». Это показывает равнозначность исходных предков на протяжении всего периода селекции в 1989–2013 гг.

Таким образом, формирование современного генофонда твердой пшеницы Самарского НИИСХ в значительной степени отличается от предыдущих этапов сильным влиянием саратовского генетического пула при сохранении влияния в качестве «каркаса» адаптивности трансгрессий, полученных на основе сортов Харьковская 46 и Безенчукская 105. Существенная роль в этом процессе принадлежит зародышевой плазме других видов. Неоспоримой является выдающаяся роль Харьковской 46 в формировании генофонда не только безенчукских сортов, но и дру-

гих селекционных учреждений России. Это необходимо учитывать в селекционных программах и вести работы по расширению исходной генетической базы.

Скращивания сортов, принадлежащих к разным кластерам, дают популяции с большим выходом адаптированных селекционно-ценных форм, чем внутрикластерные, что подтверждает необходимость учитывать при подборе родительских компонентов в селекции на общую адаптивность степень их генетической дивергентности.

В процессе селекции твердой пшеницы в Среднем Поволжье происходит формирование коадаптированного блока генов, контролирующего элементы продуктивности растений и их гомеостатическое регулирование, путем поэтапной эволюции. В структуре полигенной системы современных сортов превалируют доминантные гены с аддитивными эффектами и максимальной экспрессией в условиях засухи и высокой температуры среды. На последнем этапе селекции (1989–2013 гг.) формирование генплазмы большинства сортов Самарского НИИСХ проходило на фоне сильного влияния саратовского ге-

нетического пула, что, однако, не стало препятствием для кластеризации генофонда по степени сходства зародышевой плазмы. Сорты распределяются на 3 кластера (А, В, С), различия между ними определяются главным образом вкладом в их наследственную основу саратовской генплазмы и наличием различных долей наследственности других сортов и видов пшеницы. При планировании скрещиваний необходимо учитывать меру сходства (родства) современных сортов и вести работы по расширению генетической базы исходного материала.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Васильчук Н.С. Селекция яровой твердой пшеницы. Саратов, 2001.
- Вьюшков А.А. Селекция яровой пшеницы в Среднем Поволжье. Самара, 2004.
- Генетика признаков продуктивности яровых пшениц в Западной Сибири/В.А. Драгавцев, Р.А. Цильке, Б.Г. Рейтер, В.А. Воробьев, А.Г. Дубровская, Н.И. Коробейников, В.В. Новохатин, В.П. Максименко, А.Г. Бабакишев, В.Г. Илющенко, Н.А. Калашник, Ю.П. Зуйков, А.М. Федотов. Новосибирск: Наука, 1984.
- Жученко А.А. Адаптивная система селекции растений (эколого-генетические основы). М.: РУДН, 2001.
- Кильчевский А.В., Хотылева Л.В. Экологическая селекция растений. Минск: Тэхналогія, 1997.
- Мальчиков П.Н. Селекция яровой твердой пшеницы в Среднем Поволжье: Дис. ... д-ра с.-х. наук. Безенчук, 2009.
- Мальчиков П.Н., Мясникова М.Г. Относительное развитие признаков продуктивности твердой пшеницы в процессе селекции. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012;16(4/2):987-997.
- Мартынов С.П., Доброводская Т.В., Пухальский В.А. Анализ генетического разнообразия сортов яровой твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.), районированных на территории России в 1929–2004 гг. Генетика. 2005;41(10):1358-1368.
- Мартынов С.П., Мусин Н.Н., Кулапина Т.В. Пакет программ селекционно-ориентированных и биометрико-генетических методов «Agros». Тверь, 1993.
- Hayman B.I. The theory and analyze of diallel crosses. Genetics. 1954; 39(4):789-809.
- Lin C.S., Binns M.R. A superiority measure of cultivar performance for cultivar × location data. Canad. J. Plant Sci. 1988;68(1):193-198.
- Lin C.S., Binns M.R. Genetic properties of four types of stability parameter. Theor. Appl. Genet. 1991;82(4):505-509.
- Malchikov P.N., Myasnikova M.G., Leonova I.N., Salina E.A. Introgression of resistans to powdery mildew (*Blumeria graminis* DC.F Triticici) from *T. timopheevii* Zhuk. into the genome of *T. durum* desf. Intern. Plant Breeding Congr. 10–14 November 2013. Antalya, Turkey. 2013.
- Martynov S.P., Dobrotvorskaya T.V., Hon I., Faberova I. <http://genbank/vurv.cz/wheat/pedigree>

Маркер-контролируемое выявление генотипов кукурузы с улучшенным качеством белка

О.А. Орловская, С.В. Кубрак, С.И. Вакула, Л.В. Хотылева, А.В. Кильчевский

Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь

В настоящее время более 70% кукурузы используется для производства пищевых продуктов и кормов, поэтому улучшение качественных показателей зерна может повысить пищевую и энергетическую ценность данной культуры. Дефицит двух незаменимых аминокислот, лизина и триптофана, существенно снижает питательное качество белка кукурузы. Однако мутанты кукурузы *opaque2* (*o2*) имеют увеличенное содержание лизина и триптофана в белке эндосперма по сравнению с традиционными сортами, что повышает биологическую ценность кукурузного белка. Цель исследования – выявление образцов с высоким качеством белка в коллекции кукурузы различного эколого-географического происхождения с использованием молекулярно-генетических методов для повышения эффективности селекции данной культуры. Создана коллекция из 54 генотипов кукурузы с различными качественными показателями зерна. С помощью трех специфических маркеров к гену *opaque-2* (*phi* 057, *phi* 112 и *umc* 1066) выявлены генотипы кукурузы, гомозиготные по рецессивному аллелю *o2*, который связан с улучшенными питательными свойствами белка. Электрофоретический анализ зеинов позволил отобрать образцы Quality Protein Maize (QPM), которые содержат наряду с мутантным аллелем *o2* генетические модификаторы, преобразующие крахмальный эндосперм *o2*-мутанта в твердый, стекловидный фенотип. Выделенные в результате исследования QPM-образцы представляют интерес для селекционных программ кукурузы, направленных на повышение качества зерна. Применение маркеров к гену *opaque-2* и генам-модификаторам позволяет сократить сроки создания QPM-гибридов кукурузы, а также значительно уменьшает трудоемкость и финансовые затраты на их создание.

Ключевые слова: кукуруза; QPM-генотип; SSR-маркеры; электрофоретический анализ зеинов.

Marker-assisted identification of maize genotypes with improved protein quality

O.A. Orlovskaya, S.V. Kubrak, S.I. Vakula, L.V. Khotyleva, A.V. Kilchevsky

Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Currently, more than 70% of maize is used for food and fodder; therefore, grain quality improvement can increase its nutritive and energy value. Deficiency of two essential amino acids (lysine and tryptophan) significantly reduces the nutritional quality of maize proteins. However, in comparison to conventional maize varieties, *opaque2* (*o2*) mutants have greater contents of lysine and tryptophan in their endosperm proteins and their bioavailability is better. The aim of the study was identification of maize accessions with high-quality protein. A collection of maize accessions of various ecogeographical origins was studied by molecular methods. This approach was expected to improve maize breeding efficiency. We collected 54 maize genotypes differing in grain quality performance. Amplification with three specific markers to the *opaque-2* gene (*phi*057, *phi*112 and *umc*1066) revealed homozygous recessive *o2* genotypes, associated with improved nutritional quality of the protein. UREA-PAGE electrophoresis of zein proteins was used for Quality Protein Maize (QPM) identification. In addition to the mutant *o2* allele, QPM contains genetic modifiers that convert starchy endosperm of *o2* mutant to the hard vitreous phenotype. The selected QPM accessions are of interest for maize breeding programs aimed at grain quality improvement. The use of the markers to *o2* and modifier genes accelerates the development of QPM varieties and significantly reduces the labor and financial costs of their production.

Key words: maize; QPM genotype; SSR markers; UREA-PAGE; zeins.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Орловская О.А., Кубрак С.В., Вакула С.И., Хотылева Л.В., Кильчевский А.В. Маркер-контролируемое выявление генотипов кукурузы с улучшенным качеством белка. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):333-338.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Orlovskaya O.A., Kubrak S.V., Vakula S.I., Khotyleva L.V., Kilchevsky A.V. Marker-assisted identification of maize genotypes with improved protein quality. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(3):333-338.

УДК 577.21:631.524.6:633.15

Поступила в редакцию 16.04.2015 г.

Принята к публикации 28.05.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015



e-mail: O.Orlovskaya@igc.by

Кукуруза (*Zea mays* L.) является одной из ценных сельскохозяйственных культур по продуктивности и кормовым качествам. Она отличается хорошей отзывчивостью на интенсификацию производства, что способствует росту урожайности и увеличению ее посевных площадей во всем мире. Основные усилия специалистов в странах СНГ направлены на создание новых гибридов, обладающих высоким потенциалом продуктивности, холодостойкостью, устойчивостью к болезням, при этом не уделяется должного внимания целенаправленной селекции на качество зерна кукурузы (содержание белка, крахмала, масла, витаминов). С нашей точки зрения, это направление является очень перспективным, так как кукуруза – ценный пищевой продукт, концентрированный корм для всех видов сельскохозяйственных животных, и улучшение качественных показателей ее зерна значительно повысит пищевую и энергетическую ценность данной культуры. Таким образом, необходимость повышения эффективности селекционной работы по созданию отечественных гибридов кукурузы с высокими показателями качества зерна очевидна.

Известно, что основными запасными белками зерна кукурузы являются зеины, компоненты которых растворяются в спирте и характеризуются аминокислотным составом с высоким содержанием глутамина, пролина, аланина и лейцина и почти полностью лишены лизина и триптофана (Gibbon, Larkins, 2005). Дефицит двух незаменимых аминокислот (лизина и триптофана) и высокое соотношение лейцин–изолейцин существенно снижает питательное качество белка кукурузы. Однако описано несколько мутантов с измененными сроками и скоростью синтеза запасных белков, которые приводят к общему снижению накопления зеинов и увеличению содержания лизина и триптофана в зерне. Например, рецессивная мутация *opaque-2* (*o2*) индуцирует специфическое снижение накопления 22-kDa α -зеинов. Установлено, что *O2* кодирует главный транскрипционный регуляторный белок bZIP, который специфически экспрессируется в эндосперме, прямо или косвенно регулирует ряд генов, не связанных с запасанием белка, а также регулирует уровень лизин-кетоглютарат редуктазы и аспартат киназы1. Это позволяет предположить, что *O2* играет важную роль в развитии зерна как координатор экспрессии генов, контролирующих запасание белка, метаболизм азота и углерода (Motto et al., 2010).

Несмотря на то что усилия по получению *opaque* мутаций коммерчески выгодны, многочисленные недостатки, такие как мягкая текстура эндосперма, низкая урожайность, повышенная восприимчивость семян к патогенам и механическим повреждениям, ограничивают их использование (Vasal, 2000). Для преодоления этих недостатков были созданы формы Quality Protein Maize (QPM), содержащие генетические модификаторы, преобразующие крахмальный эндосперм *o2*-мутанта в твердый, стекловидный фенотип. Проведенные исследования выявили наличие как минимум двух генов-модификаторов. Один из них тесно сцеплен с последовательностью, кодирующей гамма-зеины, расположенной рядом с центромерой хромосомы 7, а другой находится в теломерном участке 7L (Babu, Prasanna, 2014).

Преобразование коммерческих линий кукурузы в QPM формы с помощью традиционных методов селекции – очень трудоемкий и длительный процесс. Применение молекулярных маркеров к гену *opaque-2* и генам-модификаторам позволяет проводить быстрый и надежный скрининг образцов кукурузы с высоким качеством белка на ранних стадиях выращивания, а также исключает необходимость рутинного биохимического анализа для определения уровня содержания лизина и триптофана в зерне на каждом этапе селекции, что значительно сокращает сроки и финансовые затраты на создание QPM-форм кукурузы. Цель этого исследования состояла в выявлении образцов с высоким качеством белка в коллекции кукурузы различного эколого-географического происхождения с использованием молекулярно-генетических методов.

Материалы и методы

Нами создана коллекция из 54 генотипов кукурузы различного эколого-географического происхождения, включающая 10 самоопыленных линий из ГНУ «Всероссийский НИИ кукурузы» (г. Пятигорск, Россия), 20 самоопыленных линий селекции РНДУП «Полесский институт растениеводства» (Гомельская область, Беларусь), 22 образца селекции России, Молдовы, Украины, Италии, Венгрии, США и других стран из коллекции ГНУ «Всероссийский институт растениеводства» (г. Санкт-Петербург, Россия), 2 образца из Maize Genetics Cooperation Stock Center (USA).

Для оценки аллельного состояния локуса *Opaque-2* у данных образцов кукурузы использовали кодоминантные SSR-маркеры *phi 057* и *umc 1066*, а также доминантный маркер *phi 112* (Danson et al., 2006). Выделение ДНК осуществляли из зерна при помощи набора реагентов Genomic DNA Purification Kit (Thermoscientific), согласно инструкции производителя. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в реакционной смеси объемом 15 μ l, содержащей: 0,25 мМ каждого dNTP, 10 пМ каждого праймера, 2,5 мМ $MgCl_2$, 40 нг ДНК, 0,15 ед. Taq-полимеразы в 1 \times буфере. Температурный профиль ПЦР для *phi 057*, *umc 1066* и *phi 112* представлен в табл. 1.

Анализ флюоресцентно-меченных продуктов амплификации с маркерами *phi 057* и *umc 1066* проводился на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500, США. Размер продуктов амплификации определяли с применением размерного стандарта молекулярного веса S450 (Синтол). Полученные данные анализировали с помощью пакета прикладных программ GeneMapper Software Version 4.1. Продукты амплификации с маркером *phi 112* разделяли в 4 %-м агарозном геле в 1 \times TAE буфере и документировали в системе GelDoc (BioRad).

Электрофоретический анализ запасных белков эндосперма (зеинов) проводили согласно СТБ 1710-2006 (Семена кукурузы ..., 2006). Зеины экстрагировали 70 %-м этанолом из зерновок, предварительно очищенных от семенной кожуры и зародыша. Высушенные экстракты растворяли в буфере (48 %-я мочевины, 1,2 %-я уксусная кислота, 5 %-й 2-меркаптоэтанол), перед нанесением в гель прогревали 5 мин при 100 °С. Электрофорез проводили в кислом ацетат-глициновом буфере без охлаждения

Таблица 1. Температурный профиль ПЦР

ПЦР	phi 057		umc 1066		phi 112	
Преденатурация	× 1 цикл	94 °С, 3 мин	× 1 цикл	94 °С, 2 мин	× 1 цикл	94 °С, 2 мин
Денатурация		94 °С, 1 мин		94 °С, 1 мин		94 °С, 2 мин
Отжиг	× 35 циклов	64 °С, 2 мин	× 40 циклов	60 °С, 2 мин	× 35 циклов	65 °С, 1 мин
Элонгация		72 °С, 2 мин 30 с		72 °С, 2 мин		72 °С, 1 мин
Заключительная элонгация	× 1 цикл	72 °С, 5 мин	× 1 цикл	72 °С, 2 мин	× 1 цикл	72 °С, 3 мин

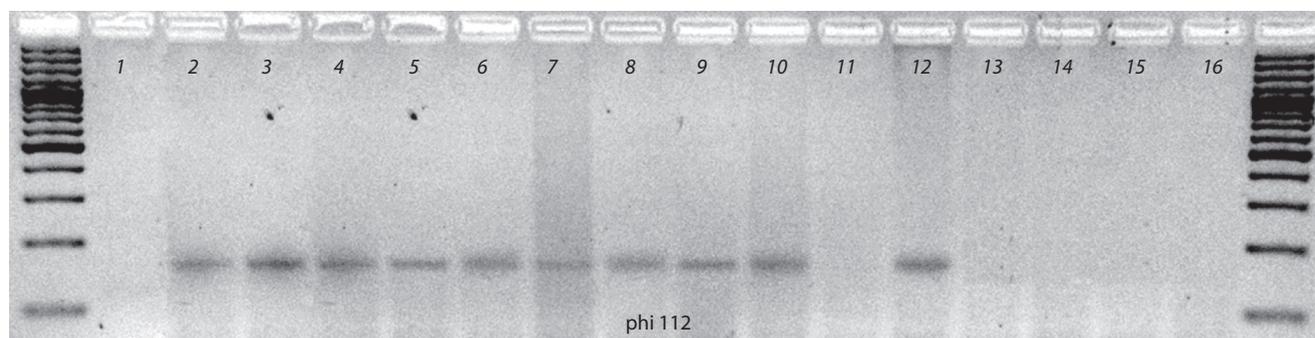


Рис. 1. Результаты амплификации ДНК образцов кукурузы с маркером phi 112.

1 – o2^A619 (стандарт); 2 – Cinquantino rouge; 3 – Natal 8 Row; 4 – W152Eo2; 5 – Од124ВЛ; 6 – Ky22L21-6; 7 – Ом275; 8 – Куб301; 9 – Синтетик 802-3; 10 – Синтетик 6 а; 11 – Ку43Т45; 12 – Г. популяция 7-1LP; 13 – Ку12L19; 14 – Ку12L62; 15 – W629o2; 16 – Coroico Flor.

в течение 7 ч при напряжении 300 В. Гелевая пластина содержала 10 % акриламида и 8 М мочевины. Гели фиксировали и окрашивали в растворе кумасси G-250 (0,08 % кумасси G-250, 2N H₂SO₄, 10N KOH, 10,8 % ТХУ) в течение 2–3 ч и затем отмывали в проточной воде.

В качестве стандарта использовали образец o2^A619 из «Maize Genetics Cooperation Stock Center», USA, который является гомозиготой по o2 аллелю.

Результаты и обсуждение

Высокое качество белка кукурузы в первую очередь обусловлено наличием рецессивного аллеля гена *opaque-2*, кодирующего транскрипционный фактор синтеза зеинов (Schmidt et al., 1990). Мутация *opaque-2* существенно снижает уровень 22-кДа альфа-зеинов при увеличении содержания незееиновых белков, что положительно коррелирует с содержанием лизина в эндосперме (Habben et al., 1993). В работе использовали маркеры phi 112, phi 057 и umc 1066, которые, согласно литературным данным, являются наиболее эффективными для оценки аллельного состояния локуса *Opaque-2* (Yang et al., 2004).

Phi 112 – доминантный маркер, который не позволяет различить гетерозиготы и доминантные гомозиготы данного гена. У большинства проанализированных образцов при амплификации с праймерами к этому маркеру выявлены фрагменты размером 145 и 151 п. н., что свидетельствует о том, что они не являются рецессивными гомозиготами по гену *opaque-2*. Отсутствие продуктов амплификации, напротив, указывает на то, что данные генотипы – гомозиготы по рецессивному аллелю o2 (рис. 1). Количество таких образцов в исследованной коллекции было невелико – 8. Phi 057 и umc1066 являются кодоминантными маркерами и позволяют различать гомо- и гетерозиготы

гена *opaque-2*. У генотипов с рецессивным аллелем o2 размер ампликона phi 057 составляет 161 п. н. (рис. 2), а umc1066 – 143 п. н. Анализ продуктов амплификации с данными праймерами выявил наличие этих фрагментов у 22 из 54 исследованных образцов кукурузы. Однако у большинства генотипов аллели phi 057¹⁶¹ и umc1066¹⁴³ находились в гетерозиготном состоянии. Только 8 образцов кукурузы оказались рецессивными гомозиготами (o2o2). Как правило, такие образцы встречались в коллекции ВИР (7 из 8).

На следующем этапе исследований с помощью маркера phi 057 и umc1066 проанализировано по 10 растений у выделенных нами 22 образцов с рецессивным аллелем o2. Установлено, что из 8 образцов, выделенных нами как рецессивные гомозиготы, 3 (Синтетик 802-3, Ку43Т45 и Г. популяция 7-1LP) расщеплялись по данному гену. Частота встречаемости аллелей phi 057¹⁶¹ и umc1066¹⁴³ у таких образцов варьировала от 60 до 85 % (табл. 2). Результаты анализа показали, что все изученные растения образцов коллекции ВИР Cinquantino rouge и Natal 8 Row, линии кукурузы Всероссийского НИИ кукурузы RDL-2, RDL-3 и линий белорусской селекции К 410, БКР 710, БЛ 22, были гетерозиготами по гену *opaque-2*. У остальных предполагаемых гетерозиготных генотипов частота встречаемости маркерных аллелей находилась в интервале 25–65 %, что говорит о расщеплении по данному гену. Можно отметить, что у образцов Синтетик 802-1 и o2^B45 наряду с гетерозиготными выявлено по 3 растения, гомозиготных по рецессивному аллелю o2 (табл. 2).

Таким образом, в результате SSR-анализа 54 образцов кукурузы различного эколого-географического происхождения выявлены генотипы, гомозиготные по o2-аллелю, который связан с улучшенными питательными свойствами

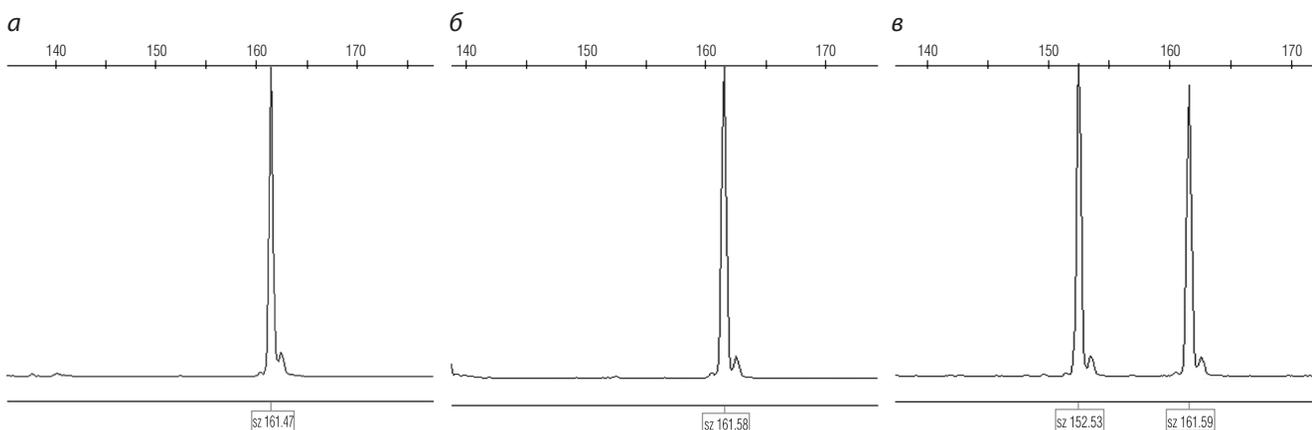


Рис. 2. Результаты фрагментного анализа образцов кукурузы с маркером phi 057.

а – гомозигота *o2* (стандарт *o2*^{A619}), *б* – гомозигота *o2* (Г. популяция 7-1LP, размер фрагмента 161 п.н.), *в* – гетерозигота *O2* (Синтетик 6 al, размер фрагмента 161 п.н. и 152 п.н.).

Таблица 2. Частота встречаемости аллелей phi 057¹⁶¹ и umc1066¹⁴³ в популяции образцов кукурузы

Генотип	Страна происхождения	% растений с генотипом <i>o2o2</i>	Частота аллелей, %
Cinquantino rouge	Италия	0	50
Natal 8 Row	Судан	0	50
W152Eo2	Чехия	0	25
Од124ВЛ,	Украина	0	35
Ку22L21-6	Россия	0	35
Ом275	Россия	0	30
Синтетик 802-1	Россия	30	60
Синтетик 802-3	Россия	40	60
Синтетик 6 al	Россия	0	25
Ку43Т45	Россия	70	85
Г. популяция 7-1LP	Россия	60	70
Ку12L19	Россия	100	100
Ку12L62	Россия	100	100
W629o2	Молдова	100	100
Coroico Flor	США	100	100
К 410	Беларусь	0	50
БКР 710	Беларусь	0	50
БЛ 22	Беларусь	0	50
RDL-2	Россия	0	50
RDL-3	Россия	0	50
<i>o2</i> ^{B45}	США	30	65
<i>o2</i> ^{A619}	США	100	100

ми белка. Однако QPM наряду с *o2*-мутацией содержат гены-модификаторы, преобразующие крахмальный эндосперм *o2*-мутанта в твердый, стекловидный фенотип. Мутантное зерно, как правило, имеет крахмалистую текстуру эндосперма и низкую плотность. По сравнению со стекловидным и прозрачным зерном традиционных сортов кукурузы этот вид эндосперма не пропускает свет.

Селекционеры отбирают QPM зерна, просвечивая их на специальных установках и классифицируя на классы от 1 до 5. Класс 1 – это полностью твердые, стекловидные зерна, а класс 5 – опаловые и мягкие семена. Все зерна 2-го–5-го классов – это *o2* гомозиготы, но зерна только 2-го–3-го классов имеют достаточно модифицированный твердый эндосперм для отбора на QPM.

В связи с этим нами проведен фенотипический отбор на модификацию зерна 5 образцов кукурузы, гомозиготных по *o2*-аллелю, в проходящем свете. Известно, что *o2*^{A619}, который использовался нами в качестве стандарта, не содержит гены-модификаторы и имеет опаловые семена (5-й класс), что было подтверждено нами при просвечивании зерен (рис. 3). Образец Ку12L19 из коллекции ВИР также характеризовался 100 %-й опаловостью семян, что указывает на отсутствие генов-модификаторов в данном генотипе. Для Ку12L62 и Согоiсo Flog обнаружены частично модифицированные зерна более чем с 50 % опаловости. Скрининг семян образца кукурузы W629o2 в просвечивающем свете выявил зерна с разной долей опаловости: 25 % (рис. 4) и 25–50 %. Необходимо отметить, что такие зерна имеют достаточно твердый эндосперм (2–3-й класс модификации зерна) и представляют интерес для отбора на QPM.

Так как QPM-формы выглядят как традиционные сорта и могут быть выявлены только с использованием лабораторных тестов, то необходим быстрый и надежный метод скрининга образцов с улучшенным качеством белка на ранних стадиях выращивания, вместо того чтобы ждать результатов просвечивания после уборки урожая. Установлено, что степень стекловидности QPM эндосперма тесно коррелирует с уровнем 27-кДа γ -зеина (Holding, 2014). В QPM-эндосперме накапливается большее количество мелких γ -зеин-обогащенных белковых телец, которые, вероятно, способствуют формированию жесткого стекловидного матрикса, сходного по текстуре со зрелым эндоспермом зерна дикого типа. Таким образом, γ -зеины необходимы для модификации эндосперма в QPM (Wu et al., 2010), хотя степень этой потребности еще не выяснена.

В результате анализа электрофоретических спектров запасного белка семян кукурузы, зеина, американские ученые установили, что QPM-линии содержат в 2,0–2,5 раза больше 27-кДа γ -зеина, чем традиционные и мутантные *opaque-2* линии (Geetha et al., 1991). В связи с этим у отобранных нами рецессивных гомозигот по гену *opaque-2* был проведен электрофо-

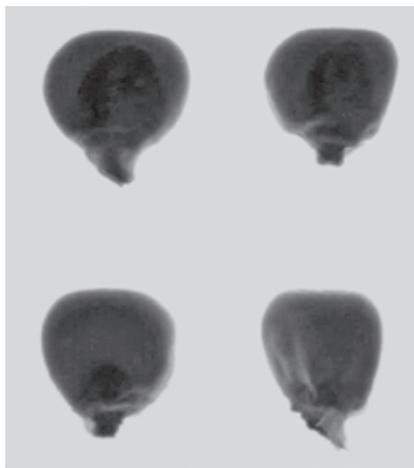


Рис. 3. Полностью опаловые зерна кукурузы образца *o2*^{A619} (5-й класс модификации зерна).

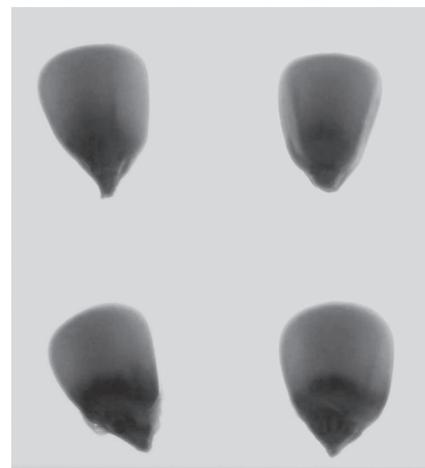


Рис. 4. Менее 25 % опаловости зерна образца кукурузы W629o2 (2-й класс модификации зерна).

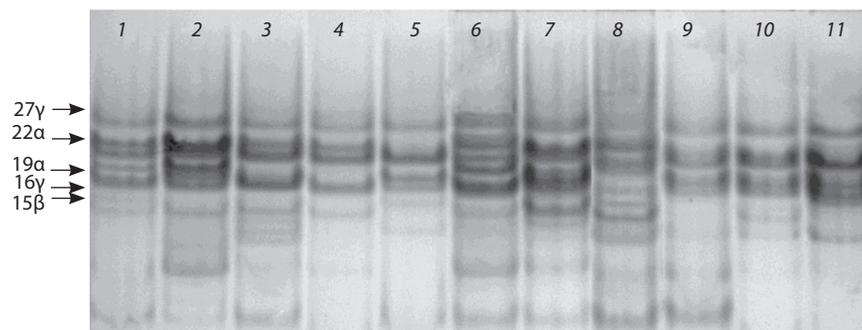


Рис. 5. Электрофоретический спектр зеинов образцов кукурузы.

1 – Ку43Т45; 2 – Ку32Т48; 3 – Г. популяция 7-1LP; 4 – Ку12L62; 5 – W629o2; 6 – Ку12L19; 7 – Coroico Flor; 8 – *o2*^{A619}; 9 – *o2*^{AВ45}; 10 – ДК 276; 11 – Со 124-1.

ретический анализ зеинов с целью выявления QPM-образцов. В качестве традиционных генотипов кукурузы в анализ включены две линии селекции РНДУП «Полесский институт растениеводства»: ДК 276, Со 124-1.

При разделении в полиакриламидном геле α -, β -, γ - и δ -классы зеинов распадаются на субфракции, различающиеся по электрофоретической подвижности и молекулярной массе (Esen, 1987). Полиморфизм электрофоретических спектров зеинов связан как с отсутствием одного или нескольких компонентов спектра, так и с вариабельностью в интенсивности окрашивания фракций в геле. В белковом профиле эндосперма линии Со 124-1 (№ 11 на рис. 5), имеющей генотип *O2O2*, отмечена высокая интенсивность компонентов, соответствующих 19-кДа, 22-кДа α -зеинам и 27-кДа γ -зеинам. По литературным данным, размер и форма белковых гранул эндосперма главным образом определяются соотношением γ - и α -зеинов (Holding et al., 2007). Вероятно, близкое к эквивалентному соотношение 19-кДа, 22-кДа α -зеинов и 27-кДа γ -зеинов способствует формированию твердой стекловидной структуры эндосперма дикого типа. В зерне мутанта *opaque-2* (№ 8 на рис. 5) снижено накопление α -зеинов, что в электрофоретическом спектре проявляется как в общем снижении интенсивности окраски, так и в сокращении числа компонентов спектра. Также для мутантного генотипа отмечается отсутствие компонента 27-кДа γ -зеинов. Сравнение полученных белковых спектров позволяет отнести образцы Ку12L62, W629o2, Согоiсo Flog к QPM формам, так как разделение α -зеинов в целом соответствует особенностям, отмеченным для мутантов *opaque-2*

(низкая интенсивность, малокомпонентность спектра). Кроме того, компонент 27-кДа γ -зеинов характеризовался достаточно высокой интенсивностью, что является наиболее известной биохимической особенностью QPM эндосперма (рис. 5). Следует отметить, что эти генотипы, по данным скрининга семян в проходящем свете, обладают разной долей опаловости зерна.

Таким образом, анализ зеинов подтвердил результаты, полученные при просвечивании зерен кукурузы, что позволяет рекомендовать использование электрофоретического анализа зеинов для выявления QPM-образцов кукурузы.

Толчком к исследованию опаловых мутантов являлась перспектива создания кукурузы с высоким качеством белка, для того чтобы улучшить пищевой рацион населения развивающихся стран, где данная культура является основным источником белка. Например, по оценкам ФАО, в 12 странах Африки кукуруза составляет от 17 до 60 % от общего объема ежедневного потребления белка. В связи с этим большое количество созданных QPM-образцов кукурузы адаптированы к условиям субтропической Африки. Хотя кукуруза с высоким качеством белка выращивается во многих развивающихся странах, в нашем регионе ее потенциал не реализован. Вероятно, QPM-образцы получают более широкое признание, если наряду с высокими пищевыми качествами они будут обладать высокой урожайностью и рядом других хозяйственно полезных признаков (раннеспелость, устойчивость к неблагоприятным факторам). Для этого необходимо разработать селекционные программы по созданию QPM-гибридов, адаптированных к регионам умеренного климата. Использование молекулярно-генетических подходов при преобразовании коммерческих линий в QPM-гибриды будет способствовать повышению эффективности данного процесса.

В результате проведенного исследования с помощью трех специфических маркеров к гену *opaque-2* выявлены генотипы кукурузы, гомозиготные по рецессивному аллелю *o2*, который связан с улучшенными питательными свойствами белка. Электрофоретический анализ зеинов позволил отобрать QPM-образцы, содержащие наряду с мутантным аллелем *o2* генетические модификаторы, преобразующие крахмальный эндосперм *o2*-мутанта в твердый, стекловидный фенотип. Выделенные QPM-образцы представляют интерес для селекционных программ кукурузы, направленных на повышение качества зерна. Применение маркеров к гену *opaque-2* и генам-модификаторам позволяет сократить сроки создания QPM-гибридов кукурузы, а также значительно уменьшает трудоемкость и финансовые затраты на их создание.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Семена кукурузы. Метод определения уровня гибридности семян первого поколения, оценка типичности и маркирование инбредных линий: СТБ 1710–2006. утв. и введ. в действие Постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 30 декабря 2006 г. № 66. Минск, 2006.
- Babu R., Prasanna B.M. Molecular breeding for Quality Protein Maize (QPM). *Genom. Plant Genetic Res.* 2014;2:489-505. DOI: 10.1007/978-94-007-7575-6_21
- Danson J.W., Mbogori M., Kimani M., Lagat M., Kuria A., Diallo A. Marker assisted introgression of *opaque2* gene into herbicide resistant elite maize inbred lines. *African J. Biotechnol.* 2006;5(24):2417-2422. DOI: 10.5897/AJB06.499
- Esen A. A proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins(zeins) of maize (*Zea mays* L.). *J. Cereal Sci.* 1987;5(2):117-128. DOI: 10.1016/S0733-5210(87)80015-2
- Geetha K.B., Lending G.R., Lopes M.A., Wallace J.C., Larkins B.A. *opaque-2* modifiers increase γ -zein synthesis and alter its spatial distribution in maize endosperm. *Plant Cell.* 1991;3(11):1207-1219. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.3.11.1207>
- Gibbon B.C., Larkins B.A. Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. *Trends Genet.* 2005;21(4):227-233. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2005.02.009>
- Habben J.E., Kirleis A.W., Larkins B.A. The origin of lysine-containing proteins in opaque-2 maize endosperm. *Plant Mol. Biol.* 1993;23(4):825-838. DOI: 10.1007/BF00021537
- Holding D.R. Recent advances in the study of prolamin storage protein organization and function. *Front Plant Sci.* 2014;5:276. DOI: 10.3389/fpls.2014.00276
- Holding D.R., Otegui M.S., Li B.L., Meeley R.B., Dam T., Hunter B.G., Jung R., Larkins B.A. The maize *floury1* gene encodes a novel endoplasmic reticulum protein involved in zein protein body formation. *Plant Cell.* 2007;19(8):2569-2582. DOI: 10.1105/tpc.107/053538
- Motto M., Balconi C., Hartings H., Rossi V. Gene discovery for improvement of kernel quality-related traits in maize. *Genetika.* 2010;42(1):23-56. DOI:10.2298/GENSR1001023M
- Schmidt R.J., Burr F.A., Aukerman M.J., Burr B. Maize regulatory gene *opaque2* encodes protein with a «leucine zipper» motif that binds to zein DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990;87(1):46-50.
- Vasal S.K. The quality protein maize story. *Food Nutr. Bull.* 2000;21:445-450.
- Wu Y., Holding D.R., Messing J. Gamma-zein is essential for endosperm modification in quality protein maize. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2010;107(29):12810-12815. DOI: 10.1104/pp.113.230961
- Yang W., Zheng Y., Ni S., Wu J. Recessive allelic variations of three microsatellite sites within the *O2* gene in maize. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2004;22(4):361-374. DOI: 10.1007/BF02772679

К 160-летию со дня рождения Ивана Владимировича Мичурина

Н.П. Гончаров^{1, 2}, Н.И. Савельев³

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный аграрный университет», Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и селекции плодовых растений им. И.В. Мичурина, Мичуринск, Россия

В октябре 2015 г. исполняется 160 лет со дня рождения Ивана Владимировича Мичурина – естествоиспытателя, селекционера, внесшего значительный вклад в улучшение плодовых, ягодных и декоративных растений, в разработку и совершенствование методов их селекции, создание новых сортов и в значительное продвижение садоводства на север и восток страны. Он ввел в культуру ряд новых видов ягодных культур, таких как актинидия и арония, и первым в стране стал использовать карликовые и полукарликовые плодовые в качестве подвоя. Мичурин стал инициатором массового движения пловодоводов-опытников СССР, изменивших и значительно расширивших сортимент и ареалы возделывания плодовых и ягодных культур страны. Он не только собрал обширную коллекцию сортов и видов плодовых растений из разных частей земного шара, но и организовал их вовлечение и широкое использование в селекционном процессе посредством гибридизации. Он создал новые рукотворные виды растений, такие как *Cerapadus*, представляющий собой гибрид вишни и черемухи Маака, а также новые для региона персик, миндаль и др. Всего им создано 132 сорта, 11 из них до сих пор не только выращиваются, но и включены в «Государственный реестр охраняемых селекционных достижений РФ». И.В. Мичурин, прожив долгую плодотворную жизнь, все же не застал времен, когда его не только объявили «великим преобразователем» природы, но и «назначили» творцом «передового мичуринского учения», так называемого советского творческого дарвинизма. Позже его имя хотя и робко, но все-таки попытались отделить от «учения» Т.Д. Лысенко.

Ключевые слова: И.В. Мичурин; селекция; садоводство; мичуринская биология.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Гончаров Н.П., Савельев Н.И. К 160-летию со дня рождения Ивана Владимировича Мичурина. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):339-358.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Goncharov N.P., Savel'ev N.I. On the 160th anniversary of Ivan V. Michurin's birth. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(3):339-358.

УДК 58.631.52(092)

Поступила в редакцию 03.04.2015 г.

Принята к публикации 13.05.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

On the 160th anniversary of Ivan V. Michurin's birth

N.P. Goncharov^{1, 2}, N.I. Savel'ev³

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

³ I.V. Michurin All-Russia Research Institute of Fruit Crop Genetics and Breeding, Michurinsk, Russia

October 2015 marks the 160th anniversary of the birth of Ivan V. Michurin. As a scientist and plant breeder, he made a significant improvement of many varieties of fruit, berry, and flowers. He developed methods of plant breeding, promoted gardening to the north and east of Russia, including Siberia. He introduced some new berry species as *Actinidia* and black chokeberry and was the first in the country who used dwarf and semi dwarf stocks of apples. Michurin initiated the mass movement of fancier gardeners and horticulture experimenters in USSR who changed and significantly extended the species and geographic ranges of fruit and berry cultivation in Russia. He not only made a vast collection of species and varieties of fruit plants from around the world but also organized their involvement and widespread use in the breeding by hybridization, including interspecific crosses. He created some new artificial interspecific hybrids such as *Cerapadus* (cherry and bird cherry hybrid), and others. Michurin created 132 cultivars. Eleven of them are not only cultivated but also included in the "National Register of Protected Plant breeding Achievements of the Russian Federation". Michurin, having lived a long productive life, did not come to the time when he was not only declared "the great nature transformer", but also "appointed" creator of "Michurin's theory", so-called "Creative Darwinism". However, thirty years later, scientists, though rarely, but still tried to separate his name from Lysenkoism and rehabilitate the scientist.

Key words: I.V. Michurin; plant breeding; horticulture; Michurin's biology.

Есть несколько способов разбивать сады; лучший из них – поручить это дело садовнику.
Карел Чапек

Широко, с государственным размахом, отметив в 1955 г. 100-летие со дня рождения своего великого сына и «поупоминав» имя И.В. Мичурина к месту, а в основном не к месту еще около десятка лет, страна практически забыла о его существовании (Рудкевич, 1993)¹. Только многочисленные улицы в российских городах и садоводческие товарищества, названные именем Мичурина, уже много лет ничего не говорящим молодому поколению, существуют неммым укором нашей забывчивости. За последние полвека ни о самом И.В. Мичурине, ни о его методах работы ничего принципиально нового не публиковалось. О его былом величии напоминают только появляющиеся время от времени эссе особо дотошных популяризаторов аграрной науки (Компанеец, 1976; Дудолкин, 1992) да по инерции переиздававшаяся брошюра «Мичурин в жизни» его личного секретаря А.Н. Бахарева (1980). Ряд специальных работ к юбилеям ученого был выпущен сотрудниками двух мичуринских институтов (Савельев, 2000, 2005).

Исторически сложилось так, что выдающийся американский селекционер Лютер Бербанк известен у нас как «американский Мичурин», в то время как И.В. Мичурин в США – как «русский Бербанк». Это касается не только отечественной публицистической, но и научной литературы. «В глуши уездного городка, на краю пыльных улиц обыкновенного русского городка Средней России живет и работает в области садоводства и плодородства Иван Владимирович

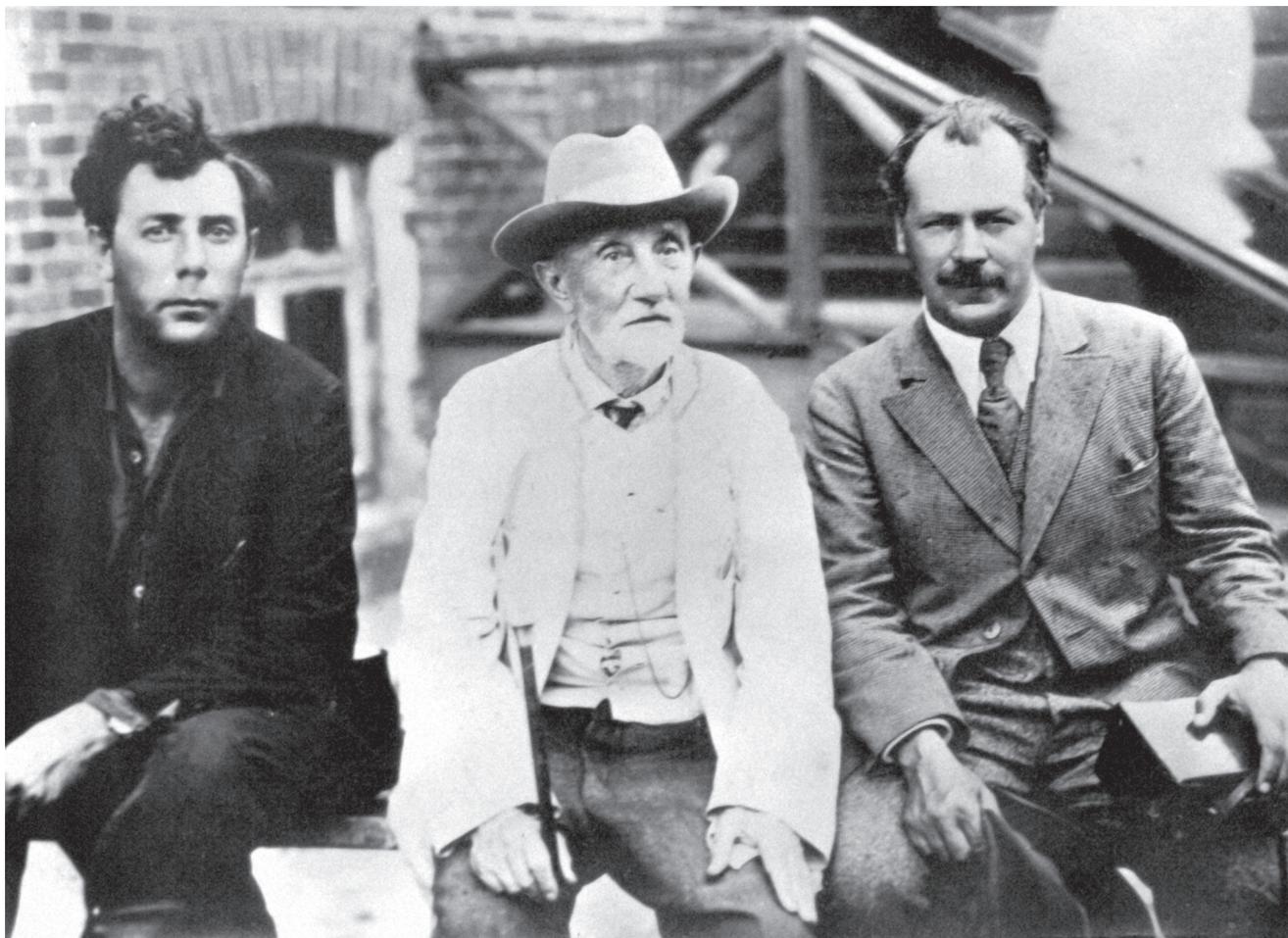
¹ К этому времени, хотя после смерти И.В. Сталина Т.Д. Лысенко еще некоторое время и остался у власти, тем не менее в связи со сменой руководства страны нужда в передовой сталинской биологии отошла на второй план. А после отстранения от власти Н.С. Хрущева «мичуринское учение» само по себе, вообще без внешнего воздействия «приказало долго жить».



Иван Владимирович Мичурин (1855–1935) (из: Савельев, 2005).

Мичурин. Не благодатный климат Калифорнии, а суровые условия Средней России – знойное лето и зимние стужи, примитивная обстановка убогой русской действительности – удел русского Бербанка. Условия русского оригинатора неизмеримо труднее, но много поразительно сходного в духовном облике того и другого», – писал в 1924 г. в предисловии к первому изданию избранных работ Ивана Владимировича Н.И. Вавилов (1924. С. 3). Так кто из них кто? И кто он, почти забытый обществом в нынешней России великий русский садовод Мичурин?

И.В. Мичурин значительный промежуток времени был очень политизированной фигурой. Он был символом выдуманной постреволюционными и поддерживаемой советскими пропагандистами «отсталости» садоводства при царизме и подвижнического, беззаветного и самоотверженного труда уже не очень здорового шестидесятилетнего ученого на благо нового социалистического государства. При этом образ, не только созданный властью предрержащими, но и поддержанный и растиражированный нашими выдающимися учеными-биологами (Баранов, Лебедев, 1955). Жизнеописание И.В. Мичурина – один из ярких примеров в истории отечественной аграрной науки, как не следует смешивать факты и вымысел. Основная проблема, вероятно, состоит в том, что «...вокруг имени Мичурина накопилось много лишнего, наносного. Все это заслоняет истинное существо дела, которым он обессмертил свое имя» (Компанеец, 1976. С. 90). Можно утверждать, что к самому И.В. Мичурину



Вице-президент ВАСХНИЛ А.С. Бондаренко (слева) и президент ВАСХНИЛ Н.И. Вавилов (справа) в гостях у И.В. Мичурина, 1932 г. (из: Савельев, 2005).

«передовая мичуринская биология»² имеет довольно косвенное отношение (см.: Алиханян, 1966; Дубинин, 1966; Шумный, 1987)³. И хотя уже покойный на момент создания передового сталинского биологического учения И.В. Мичурин⁴ и имел к нему косвенное отношение, никто из историков аграрной науки ни в нашей стране, ни за рубежом его трудами профессионально не занимался. Особняком стоят две «реабилитационные» работы наших выдающихся генетиков С.И. Алиханяна (1966) и Н.П. Ду-

² По возможности будем использовать самоназвания «передовая мичуринская биология» или «советский творческий дарвинизм», которые вполне адекватно отражают суть рассматриваемого вопроса, и будем стараться не использовать никакие другие термины, в том числе «агробология», которые на сегодняшний день не определены так однозначно, как два вышеупомянутых. Термин «мичуринская генетика» – более узкий и требует специального рассмотрения. Заметим, что это была не первая попытка создания И.В. Сталиным новой «пролетарской» биологии. Предыдущая провалилась еще раньше (см., например, Колчинский, 2000) и была им отменена вместе с несостоявшейся «культурной революцией».

³ Самые ярые критики Т.Д. Лысенко, будучи сами дарвинистами, вывели термин «творческий дарвинизм» из употребления. Хотя И.В. Мичурин виноват в создании «мичуринской биологии» не более, чем Дарвин в создании «творческого дарвинизма».

⁴ И.В. Мичурин никогда не претендовал на создание нового направления в биологии. Его имя было использовано Т.Д. Лысенко и др. уже после его смерти.

бина (1966), вышедшие после Октябрьского пленума ЦК КПСС 1964 г.⁵ В них рассматривается ряд положений «мичуринского учения» и дается их описание в рамках современных им постулатов генетики и селекции. Для истории аграрной и биологической науки в СССР все еще важно отделение И.В. Мичурина от Т.Д. Лысенко как в зарубежном (Roll-Hansen, 2005), так и в российском (Шумный, 1987) дискурсе, и определение места первому в истории российской аграрной науки. В декабре 1932 г. на первой странице журнала «Яровизация» Т.Д. Лысенко впервые в пропагандистских целях опубликовал посвящение И.В. Мичурину номера своего журнала: «Дорогому учителю Ивану Владимировичу от неизвестного Вам ученика Т. Лысенко»⁶. Известно, что «в момент создания нового учения» к И.В. Мичурину ездил «с разговорами» только «правая рука» Т.Д. Лысенко – его

⁵ При этом представители старшего поколения генетиков нашли для себя компромисс: «История лысенковщины не имеет отношения к истории как науке. Это материал к политической истории нашей страны» (Александров, 1993. С. 382). Интересно в этом плане отношение к мичуринской биологии не обремененных властью российских селекционеров в 1940–1960 гг. (см. Елина, 2002).

⁶ Вторично в первую годовщину смерти И.В. Мичурина, 6 июня 1936 г., в газете «Комсомольская правда» была опубликована статья Т.Д. Лысенко и И.И. Презента «Множьте ряды мичуринцев».

идеолог И.И. Презент. По легенде, отношения между будущим предтечей новой пролетарской биологии и одним из его будущих «апостолов» не сложились и взаимопонимание не было достигнуто, поэтому к созданию новой пролетарской биологии И.В. Мичурин имеет куда меньше отношения, чем другой символ творческого дарвинизма – российский воинствующий апологет Ч. Дарвина К.А. Тимирязев.

Уже не единожды отмечалось, что И.В. Мичурин недостаточно четко формулировал свои положения, поэтому некоторые его высказывания, особенно в ранних работах, можно истолковать в том духе, что «воспитание» гибрида приводит к направленному изменению его наследственной природы. Так и истолковывали его высказывания Т.Д. Лысенко, И.И. Презент и др., утверждая, что его успехи в селекции объясняются не подбором пар для скрещивания и не использованием географически отдаленных родительских форм, а направленным изменением наследственности путем целенаправленного «воспитания» гибридов. Через некоторое время воспитание станет основным методом селекции у многих представителей «передовой мичуринской агробиологии», заявивших о полной независимости «мичуринской селекции» от достижений мировой агрономической и биологической наук (Лысенко, 1948; Долгушин, 1949).

И.В. Мичурину были свойственны характерные для большинства самоучек низвержение авторитетов и непоследовательность в выражении собственных взглядов: «Напротив, я прямо утверждаю, что мы должны общими усилиями идти вперед в деле улучшения как по качеству, так и по количеству сортов плодовых растений нашей местности... Мы же готовы весь век пестаться с Антоновкой и Анисом, посланными нам случайно судьбой» (Мичурин, 1948в. С. 47). Были у И.В. Мичурина и откровенные антигенетические высказывания. В 1915 г. в журнале «Садовод» № 5 он опубликовал статью «По поводу неприменимости законов Менделя в деле гибридной селекции», в будущем широко используемую лысенковцами при дискуссиях о проблемах генетики. В то время



И.И. Презент у И.В. Мичурина, начало 1930-х гг. (из: Вавилов, 2002).

среди отечественных растениеводов неприятие законов Менделя было не большой редкостью (см., например, работы А.К. Тимирязева, Б.А. Кёллера, В.В. Пашкевича и др.).

И отечественная, и зарубежная аграрная историография невероятно избирательна даже в пределах биографии отдельных лиц. Двойное отношение к И.В. Мичурину было и у Н.И. Вавилова: «Вопрос этот тем более сложен, что, конечно, в писаниях Ивана Владимировича при всех его больших заслугах есть много элементов ненаучности, так же как и у Бербанка. Дискутировать эти вопросы можно только в спокойной обстановке при достаточной подготовленности аудитории и судей, что, как Вы знаете, бывает не всегда» (Научное наследство ..., 1987. С. 159). «Несомненно, наследство Мичурина велико и интересно и заслуживает изучения. Но в настоящее время это наследство находится в крайне хаотическом состоянии» (Любишев, б. г. С. 142). К сожалению, высказывания А.Н. Бахарева (1938, 1948, 1955а, б, 1956, 1980), личного секретаря И.В. Мичурина, во многих случаях являются претенциозными, часто отражающими его собственные представления и положения «мичуринской биологии». Другая информация о И.В. Мичурине для массового читателя практически недоступна (Мичурин ..., 1952). По свидетельству А.Н. Бахарева (1955б), до нас дошли высказывания И.В. Мичурина о том, что «кто не владеет техникой какого-нибудь искусства, науки или ремесла, тот никогда не будет способен создать что-нибудь выдающееся» (С. 35) и что «Садоводство... является после полеводства одним из самых полезных для здоровья народонаселения занятий и самым продуктивным в смысле доходности, не говоря уже об облагораживающем и смягчающем влиянии его на характер человека» (Бахарев, 1936. Цит по: http://imichurin.narod.ru/Itogi60/Michurin_1936.htm).

В настоящее время и в ближайшем будущем вряд ли появятся новые научно-популярные работы об И.В. Мичурине и снимут с его имени налет сложившихся стереотипов и штампов, так как никакой дополнительной информации, кроме переизданных после августовской сессии ВАСХНИЛ 1948 г. под редакцией Т.Д. Лысенко трудов самого Ивана Владимировича, не опубликовано. В это четырехтомное 2-е издание сочинений И.В. Мичурина вошло более сотни его ра-

бот, несистематизированных и весьма неполно и однобоко отражающих его научное наследие. Во-первых, несмотря на их значительное число, они были, на наш взгляд, изначально довольно тенденциозно подобраны редколлекцией во главе с Т.Д. Лысенко. Очевидна необходимость переиздания его трудов без искусственного укладывания их в прокрустово ложе лысенковской агробиологии. Во-вторых, сам И.В. Мичурин, казалось бы, при наличии весьма значительного числа опубликованных работ⁷ считал, что «<...> Издатели и их редакторы не в состоянии выплачивать такой гонорар, который мог бы быть выгодным для лиц, серьезно занятых практическим делом садоводства. Нам решительно нет никакого смысла сидеть над составлением статей и затрачивать время, в течение которого каждый из нас заработает на грядках в саду в несколько раз больше, чем он получит гонорар от издателя. Ведь нам, смешно сказать, платят гораздо дешевле, чем любому сапожнику за его работу» (Мичурин, 1948в. С. 7). Кроме того, «...Для того, чтобы писать, мало одной наблюдательности, нужно и умение облечь свои наблюдения в стройную и законченную форму» (Мичурин, 1948а. С. 678).

Кратко остановимся на основных моментах биографии И.В. Мичурина. Заметим, что она в значительной степени основана на интерпретации событий и фактов, отредактированных после революции в определенном ключе (Бахарев, 1980; Дудолкин, 1992). Очевидно, что она требует дополнительной проработки архивных документов.

Биография

Иван Владимирович Мичурин родился 15 (27) октября 1855 г. в поместье Вершина около деревни Долгое Пронского уезда Рязанской губернии (ныне д. Мичуровка Пронского района Рязанской области) в семье обедневшего помещика Владимира Ивановича Мичурина и его супруги Марии Петровны.

Иван Владимирович был потомственным плодоводом («оригинатором»), как предпочитал он сам себя

⁷ При жизни им было опубликовано более 150 научных работ (из них более 100 – до Великой октябрьской революции 1917 г.).



И.В. Мичурин, 1885 г. (из: Савельев, 2005).

называть)⁸. И его прадед Иван Наумович Мичурин, и его дед Иван Иванович после завершения обязательной для дворян того времени военной службы занимались садоводством, и, по свидетельству самого И.В. Мичурина (1948в), довольно успешно, так как «до сих пор существует несколько сортов груш под названием Мичуринских...» (С. 3). Во время наполеоновского нашествия 1812 г. его дед Иван Иванович перевез семью в окрестности Пронска из-под Калуги. По выходу в отставку в чине майора он занимался садоводством в соседнем с поместьем Юмашевском саду. Отец И.В. Мичурина, Владимир Иванович, получил домашнее образование и некоторое время служил на Тульском оружейном заводе в качестве приемщика оружия для армии. Женившись на девушке из мещанского сословия, он вскоре вышел в отставку в чине губернского секретаря и навсегда поселился в своем поместье Вершина, доставшемся ему после раздела с братьями и сестрами отцовского наследства. В семье Иван Владимирович был седьмым ребенком, но все его братья и сестры умерли в младенчестве. В 1859 г., когда Ване не исполнилось еще и пяти лет, умерла и его мать.

⁸ И.В. Мичурин называл себя не селекционером, а оригинатором, так как считал, что сорта создаются не только отбором, но и гибридизацией. Кроме того, слово «селекционер» тогда еще не было популярным в российской агрономической среде.



Дочь И.В. Мичурина Мария
(из: Савельев, 2005).

И.В. Мичурин с сыном, 1935 г.
(из: Савельев, 2005).

Владимир Иванович Мичурин считался в округе «просвященным человеком». Он выписывал из С-Петербурга «Труды Императорского Вольного экономического общества», получал от него же семена зерновых, плодовых и овощных культур и трудился в саду, ставя различные опыты с плодовыми деревьями и декоративными растениями. Иван Владимирович унаследовал эту семейную страсть и с самого раннего детства проводил много времени в саду⁹, занимаясь выращиванием из семян плодовых деревьев, овощных и декоративных растений: «...я, как помню себя, всегда и всецело был поглощен только одним стремлением к занятиям выращивать те или другие растения, и настолько сильно было такое увлечение, что я почти даже не замечал многих остальных деталей жизни; они как будто все прошли мимо меня и почти не оставили следов в памяти» (Мичурин, 1948в. С. 3). Обучая крестьянских детей грамоте, Владимир Иванович по вечерам преподавал сыну предметы, которые ему предстояло изучать в гимназии.

Обучаясь дома, а позже четыре года в Пронском уездном училище, И.В. Мичурин весь свой досуг отдавал работам в саду и на пасеке. После окончания училища в 1869 г. он готовился к поступлению в Александровский (бывший Царскосельский) лицей («домашняя подготовка по курсу гимназии с целью поступления в Петербургский лицей»). Однако в семье наступили тяжелые времена. Неожиданно заболел Владимир Иванович, и для погашения долгов их «поместье» продается. В 1872 г. в возрасте 17 лет И.В. Ми-

чурин поступает в Рязанскую гимназию, в которую ему помог определиться его родной дядя Лев Иванович. Но уже через несколько месяцев он был исключен из нее «за непочтительность к начальству».

С 1873 г. начинается его трудовая деятельность. Он устраивается коммерческим конторщиком товарной станции Козлов Рязано-Тамбовской железной дороги и одновременно обучается часовому делу¹⁰. На следующий год он женится на Александре Васильевне Петрушиной (1858–1915), дочери рабочего Винокуренного завода братьев Пеговых. Через год после женитьбы делает первые шаги в садоводстве на небольшом арендованном в городе Козлове (ныне г. Мичуринск) земельном участке, на котором им за короткий срок была собрана значительная коллекция плодовых и ягодных растений – более 600 сортов. Этому способствовала его работа на железной дороге, дававшая возможность разъезжать по ближайшим губерниям: в 1877–1889 гг. он монтер часов и сигнальных аппаратов на железнодорожном участке Козлов–Рязань–Данков–Лебедянь. Для изучения состояния среднерусского садоводства он посещает сады Воронежской, Орловской, Курской, северных районов Киевской и Харьковской губерний, Донбасса, южных уездов Тамбовской и Пензенской губерний, объезжает все Среднее Поволжье (Саратовскую, Самарскую и Симбирскую губернии), а также Казанскую и Рязанскую губернии.

Иваном Владимировичем были начаты работы по получению новых сортов отбором гибридов из потомств, полученных из гибридных семян яблони, груши, вишни и сливы от свободного опыления. К этим опытам он

⁹ Методически к 8 годам он был обучен отцом основным техникам садового дела. Мог сделать прививку любым способом и организовать правильный уход за привитым растением. Что касается теоретической подготовки, то мы не знаем чему, кроме предметов по курсу классической гимназии, обучал его отец.

¹⁰ Это позволит ему в 1877 г. открыть часовую мастерскую «Чиню часы и прочие механизмы», а позже часовую и оптическую мастерскую.

готовился несколько лет, в течение которых изучал специальную литературу по вопросам садоводства, создавал материальную основу. Для того чтобы отложить деньги на книги, журналы, каталоги садовых фирм, семена и растения, которые он выписывал со всех концов света, семья живет скромно, добровольно отказавшись от многого. «Он забывал о своем костюме, о нужде и безденежье, царивших в нашей семье, и все свои мизерные доходы продолжал закладывать в любимое дело, на выписку интересовавших его семян и растений. Мать всегда шла ему навстречу» (Мичурина, 1963. С. 36). Весь тяжелый физический труд в питомниках семья вынесет вместе с И.В. Мичуриным на своих плечах. Поэтому его подвижнический труд был не только его личным подвигом, но и подвигом всей его семьи, в том числе и ближайших родственников его жены. Всю жизнь помогала И.В. Мичурину сестра жены Анастасия Васильевна Петрушина и ее племянница Александра Семеновна Платенкина (Тихонова). Перипетии его труда и подвижничества его родных хорошо известны (Вавилов, 1935а). В 1888 г. умирает отец, в 1890 г. уходит из семьи в С-Петербург его единственный четырнадцатилетний сын Николай (род. 1876 г.), который выучится на инженера и всю жизнь проживет в Ленинграде. С отцом он не общался и встретился с ним почти через 60 лет, всего за несколько месяцев до смерти И.В. Мичурина. Дочь Ивана Владимировича Мария (1877–1959) через несколько лет после замужества вернется к отцу.

Знакомясь с состоянием садоводства в России, И.В. Мичурин, основываясь на своих личных наблюдениях, делает вывод об отсталости этой отрасли в Центральной России, о бедности сортамента плодовых растений: «После тринадцати лет (считая с 1875 г.)¹¹ всестороннего теоретического и практического изучения жизни растений и главным образом дела садоводства, его нужд в Средней России <...> я пришел к заключению о слишком низком уровне состояния садоводства у нас.

Сортименты были крайне бедны и, кроме того, засорены различными полукультурными, а иногда и прямо дикими лесными деревьями. <...> Стала очевидной крайняя необходимость пополнения их количества новыми лучшими сортами. <...> Эти соображения и вынудили меня в 1888 году основать садовый питомник с исключительной целью выведения новых лучших и более продуктивных сортов плодовых растений» (Мичурин, 1948в. С. 10-12). Как и большинство других популистских заявлений И.В. Мичурина, данное требует специального анализа.

Положение садоводства в России того времени было не блестящим, хотя и не столь плачевным, как пишет об этом Мичурин и как представлялось садоводу-самоучке (см., например, обзорную монографию В.И. Кашина с соавт., 1999). В питомниках и садах России уже в XVIII в. было собрано значительное число сортов плодовых культур, а именно: яблони – Антоновка, Боровинка, Скрижапель, Анис, Грушовка и др.; груши – Бессемянка,

¹¹ И.В. Мичурин неоднократно указывает на этот год как год начала создания им собственного питомника. Он же является официально принятой датой (Васильченко, 1963). До этого Мичурин занимался гибридизацией плодовых в саду своего тестя. Однако из многих источников известно, что в 1876 г. он с женой на год уезжает на жительство в г. Ржев. И только по возвращении в г. Козлов с 1877 г. всю свою жизнь занимался созданием новых сортов плодово-ягодных культур.

Тонковетка, Лимонка и др.; вишни – Владимирка. В своем капитальном труде «Помология» А.Т. Болотов описал 561 сорт яблони и 39 сортов груш (Бердышев, 1988). Никитское садовое училище в своих питомниках имело около 400 сортов плодовых деревьев (Берлянд, 1947). Екатеринбургский казенный сад предлагал для продажи в каталоге 1830 г. 654 сорта плодовых (Берлянд, 1947). П.Г. Шитт (1928) дает подробное описание сортового состава питомников первой половины XIX в. К концу XIX в. сортимент плодовых культур еще более расширился. Да и сам И.В. Мичурин в начале своей деятельности с легкостью собрал коллекцию из более чем 600 сортов плодовых и ягодных растений. Поскольку из И.В. Мичурина будет сделан сначала образ угнетаемого царским правительством новатора-самоучки, а позже – «создателя» нового пролетарского учения, передовой мичуринской биологии, нужно с очень большой осторожностью относиться к характеристике окружения И.В. Мичурина, и состоянию садоводства в «тюрьме народов»¹².

Среди наиболее известных селекционеров-пловодоводов последней четверти XIX в. – Кузьмин (Ветлуга Костромской губернии), М.Г. Никифоров (хутор Благодатный, Минусинский уезд Енисейской губернии), Олониченко (г. Красноярск), Комиссаров (г. Омск), Спириин (г. Никольск Вологодской губернии), Копылов (Сызранский уезд Симбирской губернии), Решетников (г. Самара). Кузьмин вывел сорта яблонь Ветлужанка и Сеянец № 20, Копылов – Красная репка, Олониченко – Ермак, Непобедимое, № 2, 4, 5, 8, 17, М.Г. Никифоров – зимостойкие формы старых русских сортов яблони Белый налив и Пудовщина. Известно значительное число фирм, таких как воронежский «Рамм», киевский «Мейер», курский «Гангардт». Даже в Козлове, где жил и работал сам И.В. Мичурин, процветала фирма промышленника-садовода Романа Дюльно. Так что в конце XIX–начале XX вв. ему было с кем конкурировать. Можем с полным основанием говорить, что Мичурин не был одиночкой и слой селекционеров-пловодоводов России не был тонок.

В 1900 г. И.В. Мичурин переносит весь свой питомник на новый участок, который он приобрел около слободы Донское, недалеко от г. Козлова. На нем он и проработал до конца своей жизни.

И.В. Мичурин интенсивно публикуется: его статьи выходят в журналах «Вестник садоводства», «Прогрессивное садоводство и огородничество», «Сад и огород», «Садоводство». Крупнейшие российские ученые-плодоводы В.В. Пашкевич и Н.И. Кичунов высоко оценивали его деятельность. Они неоднократно пытались оказать содействие в получении государственного финансирования его новаторских работ¹³. 15 ноября 1905 г. И.В. Мичурин

¹² Уничижительный фразеологизм, используемый В.И. Лениным и его соратниками, на основе идеи французского писателя и путешественника маркиза Астольфа де Кюстина, сформулированной в его книге «Россия в 1839 году» (Кюстин де, 2008).

¹³ Тоже советские легенды. У И.В. Мичурина было желание получить госсубсидии ДЗ, но ничего не делая по заданию ведомства, которое бы ему эти деньги давало. В пику лично вождем трудового народа В.И. Ленин выделил такую «бесцельную» субсидию на его работы (Горбунов, 1924). Более успешный помещик Д.Д. Арцыбашев, так же одновременно с ним получивший ленинский «грант» на дендрологические работы (Горбунов, 1924), хотя и успевший превратить свое поместье Мещера в дендрологическое опытное учреждение при ВИР, погиб в сталинских лагерях (Вехов, 2004).

представляет записку в Департамент земледелия Главного управления земледелия и землеустройства (ДЗ ГУЗиЗ) на получение субсидирования своих работ. А 14 февраля 1908 г. директор департамента Крюков предложил ему в виде исключения, как частному лицу, оклад в 3 тыс. руб. «... если бы Вы признали возможным принять на себя постановку опытов по садоводству по инициативе департамента и вообще исполнять некоторые поручения его в этой области» (Мичурин, 1948а. С. 43). Однако И.В. Мичурин, по его собственным словам, наотрез отказался. 12 июня 1908 г. (повторно – 26 октября 1910 г.) он обращается во все тот же ДЗ ГУЗиЗ с другим предложением – открыть на базе его питомника селекционную помологическую станцию.

У И.В. Мичурина не сложились отношения и с Департаментом земледелия США, хотя первый заказ на поставку сортов и гибридов Мичурин получил от него еще в 1890 г. В начале XX столетия его питомник посещает американский профессор Н.Е. Ганзен¹⁴. Один из самых успешных американский охотников за растениями профессор Франк Мейер (Frank N. Meyer) также неоднократно знакомился с работами Мичурина и закупал партиями его новые сорта и гибриды. 8 января 1913 г. он посещает И.В. Мичурина с предложением продать все гибриды ДЗ США и переехать в Америку на постоянное место жительства. «<...> Дело в том, что я не нахожу для себя удобным, хотя по значительно повышенным ценам, ежегодно отправлять в Америку все новые растения самому и при том расценивать каждое растение отдельно. Поэтому я, со своей стороны, предложил им назначить постоянную ежегодную плату вообще за мой труд по выводке нужных им выносимых новых сортов плодовых растений и описанию их происхождения, независимо от большего или меньшего количества новых сортов, растения которых пусть их агент приезжает каждый год и берет лично для отправки в Америку. Эти условия показали им трудно приемлемыми – говорят, что у них еще не было



И.В. Мичурин (слева) с проф. Н.Е. Ганзеном, 1934 г. (из: Савельев, 2005).

такого примера...», – описал эту ситуацию И.В. Мичурин (1948в. С. 483). Позже за него приняли решение российские чиновники. Вот что по этому поводу пишет Мичурин в своем письме к сибирскому плодоводу И.П. Бедру: «Все это не понравилось и самим американцам и отчасти послужило тому, что ездивший от Департамента ко мне в течение 18 лет до войны старший ботаник, профессор Мейер в последний свой приезд в 1913 г. предложил официально мне от с.-х. Департамента С-Американских Соединенных Штатов переехать в Америку и продолжать мою работу в Квебеке с условием платы за труды 8000 долларов в год и отдельный пароход от Виндавы до Вашингтона давали для переезда меня и моего семейства. Я, при моих летах и плохом здоровье, не мог сразу решиться на такой путь, а затем, через полмесяца приехал придворный генерал и передал мне запрещение высших сфер выезда в Америку..., обещая дать мне от казны средства на расширение дела в России, но ничего не сделали, а ограничились присылкой в течение года двух орденов, Анны и Креста за заслуги по сельскому хозяйству¹⁵ с предложением переселиться в Петроград на службу в Сельскохозяйственный Департамент на 3000 годового жалованья, от чего я, конечно, отказался» (Мичурин, 1948в. С. 539, 540). Вероятно, американцы не прекращали попыток купить его материал: известно фото И.В. Мичурина с Хаммером в 1930-е годы (см. Дудолкин, 1992) и Н.Е. Ганзеном в 1934 г. (Савельев, 2005).

Несомненно, И.В. Мичурин был неординарен, и деятельность его была замечена как отечественными, так и зарубежными учеными и садоводами-практиками. Его избирают почетным членом ряда отделений Императорского Российского общества садоводов. В 1911 г. за участие во Всемирной выставке в г. Тулоне (Франция) он был награжден медалью «За выдающиеся работы в сельском хозяйстве». Тем не менее до Октябрьской революции И.В. Мичурин не был столь широко известен и популярен, как после нее¹⁶. Хотя и не был настолько безвестен, как это обычно считается: к этому времени он опублико-

¹⁵ От Советской власти И.В. Мичурин также имел две правительственные награды. В 1925 г. за плодотворную работу по селекции он был награжден орденом Трудового Красного Знамени, а в 1931 г. – орденом Ленина.

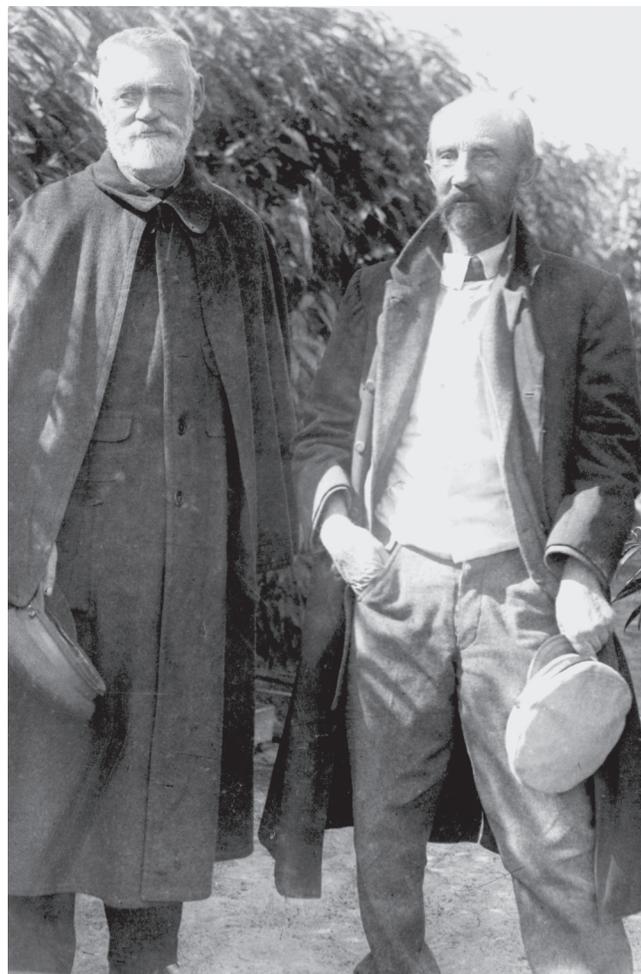
¹⁶ «Советская власть и руководимая Вами партия, – писал И.В. Мичурин И.В. Сталину в сентябре 1934 г., – превратили также меня из одиночки-опытника, непризнанного и осмеянного официальной наукой и чиновниками царского департамента земледелия, в руководителя и организатора опытов с сотнями тысяч растений» (Мичурин, 1948а. С. 599). Ранее И.В. Мичурин создает сорт вишни и дает ему название Надежда Крупская, а сорту актинидии – Клара Цветкин.

¹⁴ Н. Ганзен – известный американский плодовод. Кроме того, успешно интродуцировал ряд сортов люцерны из России.

вал более 100 статей в русских садоводческих журналах (Библиография ..., 1958), а в предреволюционные годы питомник обеспечивал ему и его семье безбедное существование. В то же время отечественным растениеводам был более известен и симпатичен американский садовод Лютер Бербанк, посвятивший жизнь селекции плодово-декоративных и цветочных культур и поставивший на широкую ногу «выпуск в тираж» новинок, в том числе и экзотических для Калифорнии (см. например, А.И. Стебут, 1909). Хотя отношение потомков к И.В. Мичурину более похоже на таковое к отцу практической селекции плодовых голландцу Ван-Монсу (1765–1842), вряд ли любознательный читатель найдет имя последнего даже в специальной литературе. А ведь он вывел около 400 сортов, из которых около 40 возделывались еще и в 1930-х гг.

С началом Первой мировой войны произошло существенное сокращение сбыта посадочного материала и семян и, как следствие, сворачивание работ по гибридизации растений. К Октябрьской революции сложилась ситуация, когда востребованность промышленного плодоводства не была удовлетворена практической работой, так как этой отраслью государство целенаправленно не занималось, а частные питомники не справлялись с задачей индустриализации плодоводства. Даже при Сельскохозяйственном ученом комитете сельскохозяйственного ведомства страны Бюро по садоводству будет создано только в пост-революционном 1918 г. (Гончаров, 2012).

Уже в первом законе Советской власти – «Декрете о земле» от 26 октября 1917 г. – все дореволюционные опытные учреждения получили статус «национального достояния». И.В. Мичурину было 62 года¹⁷, когда произошла революция. После Октябрьской революции он пришел в только что организованный уездный земельный отдел г. Козлова, где встретился с комиссаром земотдела Дедовым и заявил ему, что хочет работать для новой власти. Комиссар в тот же день созвал «по делу Мичурина» заседание коллегии, пообещал поставить в известность Наркомзем РСФСР и предложил земкому Донской слободы города принять меры к охране питомника Мичурина. И.В. Мичурину и его семье была оказана материальная помощь и помощь продовольствием. «Препровождая при сем копию постановления Коллегии от 29 июня и копии отношений в местный совет и Московский комиссариат земледелия, агрономический отдел просит Вас, Иван Владимирович, покойно продолжать Вашу исключительно полезную для родины работу...», которое гласило: «Вследствие того, что плодовой питомник Мичурина при Донской слободе, в количестве 9 дес., по имеющимся в комиссариате документальным сведениям является единственным¹⁸ в России по выводе новых сортов плодовых растений <...> признать питомник неприкосновенным, оставив его временно до передачи в ведение Центрального комитета (Наркомзем) за уездным комиссариатом, о чем известить соответствующие волостной и местный советы, Мичурину предоставить право на пользование питомником в размере 9 дес. и просить продолжать полезную для государства работу по своему усмотрению. На производство работ выдать пособие в размере 3 000 руб., одновременно с сим



И.В. Мичурин (справа) и Н.И. Кичунов, 1927 г. (из: Савельев, 2005).

сообщить о состоявшемся постановлении Московскому комиссариату земледелия с просьбой о принятии указанного питомника в свое ведение и под свое руководство» (цит. по: Бахарев, 1948. С. 58).

29 июня 1918 г. было принято постановление Козловского уездного комиссариата земледелия о передаче питомника И.В. Мичурина в свое ведение. Осенью 1918 г. для ознакомления и выяснения положения дел в питомнике к И.В. Мичурину был командирован специалист опытного отдела Наркомзема РСФСР профессор Н.И. Кичунов (их первая встреча состоялась в 1908 г.), который после этой поездки на коллегии Наркомзема сделал доклад, отметив важность и пользу достижений И.В. Мичурина для страны и необходимость всяческой поддержки его работ со стороны государства. 18 ноября Наркомзем РСФСР официально принял питомник в свое ведение, а И.В. Мичурин был утвержден старшим специалистом Опытного отдела НКЗ (заведующий Г.И. Гоголь-Яновский) и пожизненным директором питомника: «<...> несмотря на то, что мой питомник по выводе новых улучшенных сортов плодовых деревьев – единственный во всей России и притом дело это имеет огромное значение в смысле большого увеличения продуктивности и доходности почти всех сельскохозяйственных культур

¹⁷ И еще долгих 18 лет он трудился на благо отечества.

¹⁸ См. выше.



Обсуждение новых сортов. Верхний ряд (слева направо): 1-й – И.С. Горшков, 3-я – А.С. Тихонова;
нижний ряд (слева направо): И.В. Мичурин и Н.И. Кичунов (из: Савельев, 2005).

в России, он едва не погиб в общем водовороте: питомник запросто намеривались выкорчевать и засадить капустой или картофелем соседние села. Только благодаря быстрому вмешательству местного агронома Н.Н. Узбякова, человека чрезвычайно выдающегося по своей полезной и крайне энергичной деятельности, удалось спасти все дело, а при помощи горячего сочувствия к делу Н.И. Кичунова питомник перешел в ведение Опытного Отдела Народного Комиссариата Земледелия, с назначением меня заведующим питомником и ассигновкой по смете расходов на казенный счет» (Мичурин, 1948б. С. 338).

В то же время большинство других российских успешных в коммерческом отношении питомников: «Эйлер и Сим», «Помологический питомник доктора Регеля и Я. Кессельринга» в Петрограде, питомники Мейера, Иммера и Шульца в Москве, Карлсона в Воронеже, Клейнмихеля, Гангардта и Вагнера в Курске, Шнееберга в Казани, Кристер и Мейера в Киеве, Рамма в Кременчуге, Шика в Краснодаре, Роте и Штапельберга в Одессе, Романа Дюльно в мичуринском Козлове – после революции были «ликвидированы». И.В. Мичурин в данном случае выступил прообразом будущих «маяков» нового социалистического производства, на которые должно равняться все остальное население страны.

В 1919 г. в своей статье И.В. Мичурин призывал агрономов работать на пользу нового общественного строя: «... и настоящим работникам дела садоводства явится возможность продолжать свою деятельность при новом строе, быть может, еще в более широком масштабе; лишь

было бы искреннее желание работать для общей пользы» (Бахарев, 1936. Цит. по: http://imichurin.narod.ru/Itogi60/Michurin_1936.htm). В 1920 г. И.В. Мичурин приглашает на работу в питомник в качестве старшего помощника И.С. Горшкова, который до этого работал уездным специалистом по садоводству в г. Козлове. Расширяются площади питомника, и организуется репродукционное отделение.

В этом же 1920 г., т. е. через два года после принятия питомника на баланс Наркомзема РСФСР, о работах И.В. Мичурина доложили В.И. Ленину, вероятно, через управляющего делами СНК Н.П. Горбунова: «<...> Едва только окончилась гражданская война, – писал Мичурин, – как на мои работы обратил внимание не кто иной, как светлой памяти Владимир Ильич Ленин» (Мичурин, 1948а. С. 610). Мать Н.П. Горбунова Софья Васильевна и его сестра Вера Петровна явились первыми распространителями мичуринских сортов плодово-ягодных культур в Московской губернии, начиная со своих партийных дач. Даже кремлевского поэта Демьяна Бедного не обошло это веяние: он нанял специального садовника для выращивания мичуринских сортов. Вероятно, «близость к власти», патронаж работ лично Лениным и сыграли позже с именем Мичурина злую шутку. После смерти он будет официально назначен «основателем» нового, передового пролетарского учения – «мичуринской биологии».

В том же 1920 г. состоялось первое посещение И.В. Мичурина профессором Саратовского университета Н.И. Вавиловым, возвращавшимся из Воронежа с 1-го Все-

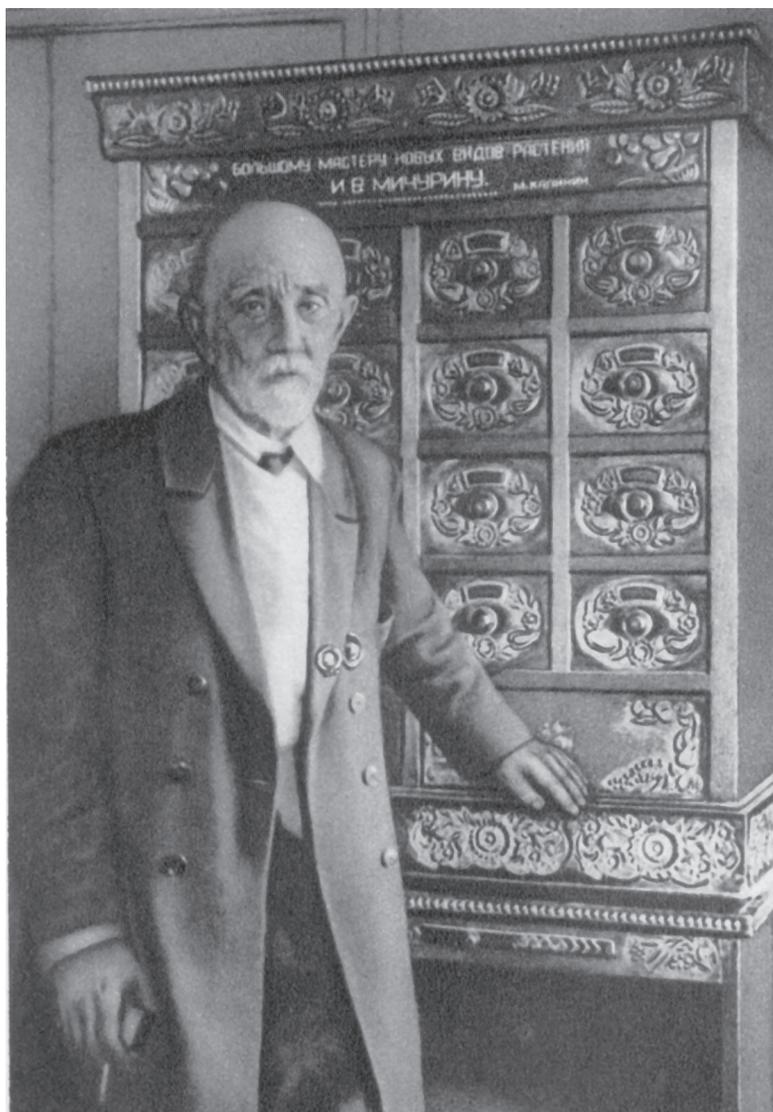
российского съезда по прикладной ботанике (всего Н.И. Вавилов посетил И.В. Мичурина 4 раза). В 1922 г. на Всероссийском совещании по опытному делу при Наркомземе РСФСР Н.И. Вавилов предложил провести научную инвентаризацию генофонда Опытного-помологического питомника Мичурина для специального издания «Флора Мичуринского питомника».

В январе 1921 г. И.В. Мичурин организует дополнительный питомник на землях бывшего Троицкого монастыря, расположенного в пяти километрах от его усадьбы и от основного питомника. На уездной выставке, организованной земотделом г. Козлова, впервые широко демонстрировались достижения Мичурина, и его питомник начинают посещать тысячи людей¹⁹. В этом же году издается первая брошюра И.В. Мичурина (1921) «Выведение из семян новых культурных растений плодовых и кустарников».

18 февраля 1922 г. Тамбовский губисполком получает от Совнаркома телеграмму В.И. Ленина: «Опыты по получению новых культурных растений имеют громадное государственное значение. Срочно пришлите доклад об опытах и работах Мичурина Козловского уезда для доклада председателю Совнарком тов. Ленину. Исполнение телеграммы подтвердите» (Бахарев, 1948. С. 61). Вскоре, летом 1922 г., Мичуринский питомник посетил Председатель ВЦИК М.И. Калинин, который оказывал содействие в улучшении его финансирования и материальной базы, в 1930 г. он вторично был почетным гостем И.В. Мичурина, а в следующий раз, в 1933 г., на память о встрече подарил Мичурину резной деревянный шкаф для хранения семян с надписью: «Большому мастеру новых видов растений И.В. Мичурину. М. Калинин».

В 1923 г. в Москве на 1-й Всесоюзной сельскохозяйственной выставке демонстрировались достижения И.В. Мичурина и его помощника И.С. Горшкова.

¹⁹ В 1921–1935 гг. населению, опытными станциями, сельскохозяйственным учреждениям отпущено 1267 тыс. штук саженцев и прививочного материала для окулировки на местах для 2500 тыс. штук дичков (в том числе в 1928–1935 гг. отпущено около 600 тыс. штук посадочного материала).



И.В. Мичурин у шкафа для хранения семян, подаренного М.И. Калининым, 1933 г. (из: Савельев, 2005).

После открытия выставки в ноябре 1923 г. Постановлением СНК РСФСР Опытный-помологический питомник признан научно-исследовательским учреждением, имеющим общегосударственное значение. Первым его директором был назначен И.В. Мичурин. В 1928 г. питомник был преобразован в Селекционно-опытную станцию плодовых культур. Постановлением СНК СССР от 16 июля 1934 г. станция переименовывается в Центральную генетическую лабораторию им. И.В. Мичурина (ЦГЛ), которая на правах научно-исследовательского института вошла в состав ВАСХНИЛ. В ЦГЛ функционирует селекционно-генетический отдел, который включал секции по генетике, селекции, сортоизучению ведущих плодовых и ягодных культур, а также цитологическую, электробиологическую и химико-физиологическую лаборатории. Результативность их работы – тема отдельного рассмотрения.

Мичуринские методы

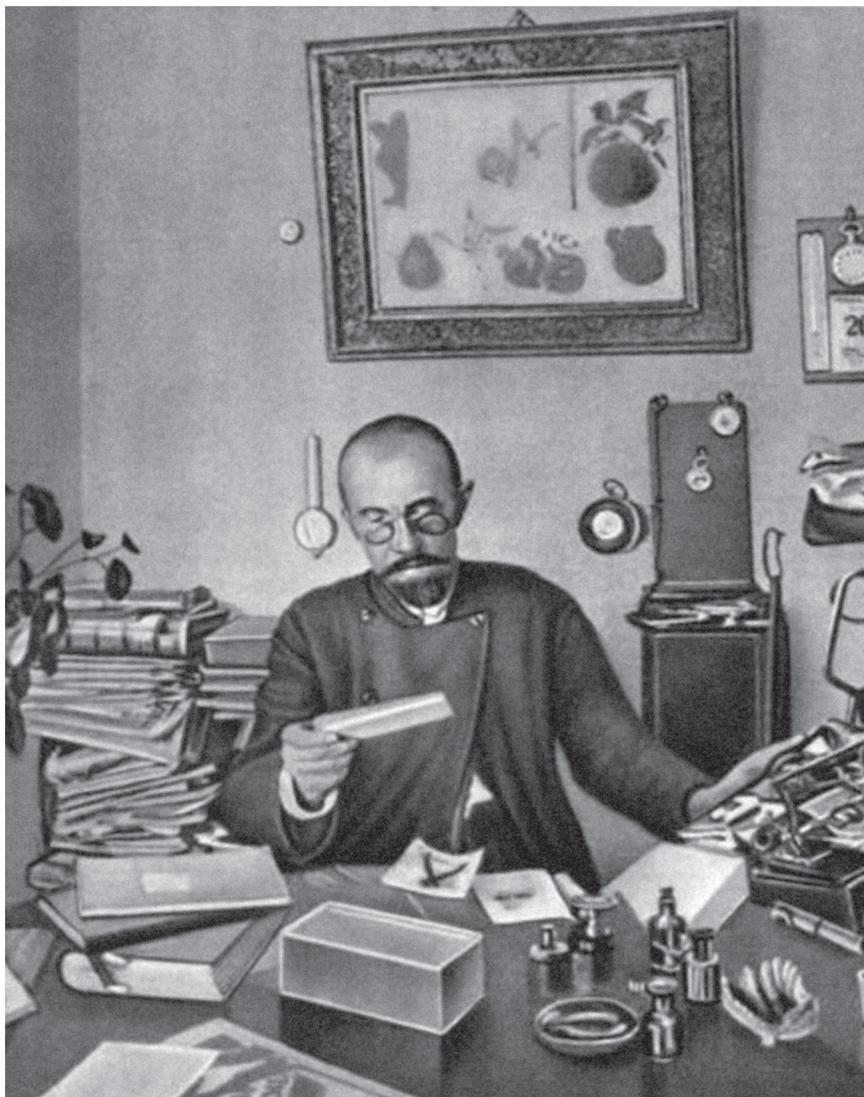
В арсенале методов селекции И.В. Мичурина, как и у Лютера Бербанка, была отдаленная гибридизация, которая почти не применялась в садоводстве со времен Жана ван Монса (см. выше). Н.И. Вавилов считал, что «И.В. Мичурин первый в нашей стране выдвинул вопрос о практическом использовании



Одна из многочисленных делегаций на экскурсии у И.В. Мичурина (из: Савельев, 2005).



Отбор «культурных» семян в молодом возрасте, 1930 г. Слева от И.В. Мичурина П.Н. Яковлев, справа – И.С. Горшков (из: Савельев, 2005).



И.В. Мичурин в рабочем кабинете, 1926 г. (из: Савельев, 2005).

отдаленной гибридизации как радикального метода для сочетания лучших свойств далеких видов и родов и начал свои замечательные работы по улучшению плодовых деревьев путем скрещивания диких видов с культурными, улучшая гибриды повторными скрещиваниями» (Вавилов, 1936. С. 43).

Параллельно с другим отечественным плодоводом М.В. Рытовым (1846–1920) и независимо от него И.В. Мичурин рассматривал отдаленные скрещивания в двух аспектах: систематическом (принадлежность к разным видам и родам) и географическом (происхождение из разных естественно-исторических районов). В 1920-е гг. под руководством С.И. Жегалова отдаленной гибридизацией начал заниматься Г.Д. Карпеченко (Вишнякова, Гончаров, 2009; Гончаров и др., 2013). Отдаленная гибридизация как таковая была хорошо известна и за рубежом, однако и там долгое время она не давала практических результатов, тогда как И.В. Мичурин с ее помощью получил хозяйственно важные формы. И.В. Мичурин использовал методы отдаленной гибридизации на плодовых культурах, а затем его последователи применяли их на других, в том числе и полевых, культурах. К И.В. Мичурину едут не только на экскурсии, но и за «благословлением». Как отмечал академик Н.В. Цицин (1954), решающее значение в выборе направления его научных исследований (создание озимых и многолетних пшениц на основе пшенично-пырейных гибридов)

оказали научные труды и личные встречи с И.В. Мичуриным, которые состоялись в 1924 и 1932 гг.

Для повышения зимостойкости и устойчивости к болезням своих новых сортов И.В. Мичурин включал в гибридизацию дикие виды и производные такой гибридизации: яблоню сливолистную, китайку, грушу уссурийскую, вишню степную, черемуху и др. На основе отдаленной гибридизации им и его последователями были созданы новые сорта яблони, груши, вишни и других культур. Были получены уникальные межродовые гибриды между яблоней и грушей, рябиной и грушей, черемухой и вишней, терном и персиком, миндалем и персиком. Не все из них пошли в производство, но все они являлись и являются донорами ценных признаков. Одним из самых интересных межродовых гибридов селекции И.В. Мичурина является церападус сладкий (гибрид F_1 вишни *Cerasus vulgaris* L. на черемуху Маака *Padus maackii* Kom.). Позже, после интродукции черемухи в Памирском ботаническом саду, церападус возник в «природе» в результате спонтанной гибридизации.

На основе созданных И.В. Мичуриным церападусов и падоцерусов (обратных гибридов между черемухой и вишней) во ВНИИГиСПР (г. Мичуринск) выведены высококачественные сорта вишни Фея и Харитоновская с устойчивостью к такой опасной болезни косточковых культур, как коккомикоз. Успешно ведутся работы с церападусом во ВСТИСиП (г. Москва), где создан сорт вишни Русинка. Кроме того, у церападуса плоды собраны в кисти (рис. 1), и И.В. Мичурин считал, что на основе таких растений возможно выведение урожайных сортов вишни, плоды которых будут собраны в кисть, как у черемухи, а не располагаться попарно, как у вишни. У церападусов, полученных И.В. Мичуриным, в кистях от 3 до 6 плодов с массой 1,0–1,5 г каждый. А.Ф. Колесникова на Орловской опытной станции (ныне ВНИИСПК) получила формы церападусов с приятными на вкус и уже вполне съедобными плодами.

В то же время из гибридов сливы с абрикосом и миндаля с персиком ничего не вышло. Эффективным



Рис. 1. Церападус (из: Мичурин, 1949).

методом при использовании отдаленной гибридизации оказалась интрогрессия отдельных генов или их комплексов, обеспечивающих проявление положительных признаков, например, генов, контролирующих устойчивость к болезням или вредителям или выраженность тех или иных хозяйственно важных признаков.

В результате использования отдаленной, особенно межродовой, гибридизации часто наблюдается несовместимость, снижается жизнеспособность и плодовитость отдаленных гибридов, резко уменьшается завязываемость плодов. Для предотвращения подобных отрицательных явлений И.В. Мичурин разработал различные методические приемы преодоления нескрещиваемости, которые не утратили своего значения и до настоящего времени. Это метод посредника, предварительное вегетативное сближение, использование смеси пыльцы, ростовых веществ, повторного нанесения пыльцы и др.²⁰ Он обратил особое внимание на изучение влияния радиационного, электрического и электромагнитного воздействий на рост, развитие и процессы оплодотворения плодовых

растений. Было установлено, что применение статического электричества и других биофизических факторов воздействия на пыльцу и женскую генеративную сферу повышало эффективность отдаленных скрещиваний. Позже применение колхицина оказалось более простым и эффективным способом получения искусственных видов-амфидиплоидов и от ряда разработанных Мичуриным методов автоматически отказались.

И.В. Мичурин ввел в обыденную практику селекции плодовых культур широкое применение метода ступенчатой гибридизации, ранее предложенного известным отечественным садоводом П.И. Шварцем (1784–1852) для селекции цветочных культур.

Большое влияние на развитие селекционной работы по плодовым и другим сельскохозяйственным культурам оказали разработанные И.В. Мичуриным новые подходы по подбору родительских пар для гибридизации и отбору ценных семян. Широкое применение в практической селекции нашел впервые предложенный И.В. Мичуриным метод гибридизации эколого-географически отдаленных форм, а также метод возвратных скрещиваний. Им была усовершенствована методика отбора «культурных» семян в молодом возрасте на основе корреляций между признаками. И.В. Мичурин рекомендовал проводить отбор семян по признакам «культурности» в несколько этапов, начиная с семядольного состояния. При этом более крупные размеры семядолей, их значительная толщина, короткое и толстое подсемядольное колено являются признаками «культурности» гибридных семян. Кроме того, по цвету семядолей можно определить окраску будущих плодов.

Второй (повторный) отбор И.В. Мичурин рекомендовал проводить в конце вегетационного периода. При этом общими признаками культурности семян для многих плодовых растений, по его мнению, можно считать тучное их сложение, крупные листовые пластинки, толстые и короткие черешки, более толстые концы побегов. Лучшими признаками культурности для яблони являются: толстая, морщинистая и густоопушенная, с тонким частым жилкованием листовая пластинка, неглубокая округлая зазубренность ее краев, толстые черешки листьев и крупные прилистники.

Третий отбор семян по признакам культурности проводится после листопада и включает в себя отбор по форме и опушенности побега, форме и расположению боковых почек. В этом случае к признакам культурности можно отнести граненую форму побега продолжения с сильным опушением в верхней части и крупной округлой верхушечной почкой, крупные боковые почки с широкой верхушкой и сильно выступающими подпочечными подушками с частым крутовинтовым расположением и плотным прижатием к относительно прямому побегу. Признаками культурности груши могут служить крупная листовая пластинка с небольшой зазубренностью краев и мелким жилкованием на нижней стороне, толстые опушенные побеги без конусовидности, редкие разветвления ростовых побегов и часто расположенные в форме розеток листья на побегах, отсутствие острых колючек. У вишни и сливы к признакам культурности можно отнести крупные листья с округлой зазубренностью краев, толстые побеги с округлыми почками крупной величины, резко выраженные подпочечные подушечки, частое групповое расположение почек.

В то же время И.В. Мичурин отмечает, что не всегда отсутствие у семян некоторых признаков культурности мешает ему в будущем стать хорошим сортом. Так, у сорта груши Оливье де Серр с высокими вкусовыми качествами плодов листья очень мелкие, а сорт Памяти Яковлева имеет в кроне массу колючек.

Создал ли И.В. Мичурин теорию селекции плодовых культур, как часто пишут (см., например, Компанеев, 1976)? По крайней мере, очевидно, что он был одним из тех, кто принимал участие в закладке отечественной методологии селекции и обозначил многие успешные практики (методики) в селекции плодовых. Идея «мобилизации растительных ресурсов» для селекции в дальнейшем была успешно подхвачена Н.И. Вавиловым (1962) и его последователями.

²⁰ См. их популярное описание в работе П.Н. Яковлева (1934).

Мичуринские сорта

Для создания новых сортов И.В. Мичурин уже в начальный период своей деятельности широко использовал межсортовые скрещивания, а также гибридизацию форм, различающихся по своему эколого-географическому происхождению, с целью объединения в одном генотипе вкусовых качеств лучших зарубежных сортов и выносливости местных российских зимостойких и морозостойчивых форм. К этому времени он создал свои первые сорта вишни Гриот грушевидный, Плодородная Мичурина, Краса севера и малины – Коммерция. В 1888 г. он обнаружил у сорта яблони Антоновка могилевская белая соматическую мутацию, послужившую исходной формой при создании сорта Антоновка полуторафунтовая.

И.В. Мичурин придавал большое значение введению в культуру новых нетрадиционных не только для России садовых культур, таких как актинидия, лимонник китайский, элеутерококк, боярышник, сладкий каштан, рябина и др. Например, высоковитаминные сорта актинидии Ананасная Мичурина, Крупная мичуринская, Клара Цеткин и др. Им получены положительные результаты по селекции абрикоса, винограда и ряда других экзотичных для средней полосы Европейской части России культур.

Селекционная работа по рябине впервые в России была начата И.В. Мичуриным в 1905 г. Он писал: «Целые тысячелетия рябина как плодородное дерево не использовалась в работе гибридизаторов, и поэтому в ассортименте наших садов рябина как ценное плодородное дерево совершенно не значится» (Мичурин, 1948б. С. 137). В качестве исходных форм для проведения скрещиваний сначала им были использованы рябины обыкновенная (*Sorbus aucuparia* L.) и черноплодная (*S. melanocarpa* (Michx.) Elliot), полученные из Германии. На их основе был создан сладкоплодный сорт рябины Ликерная. С использованием межвидовой гибридизации рябины альпийской (*S. alpina* (Wild.) Scheid.) с рябиной обыкновенной (*S. aucuparia* L.) Мичурин получил сорт Бурка. С целью улучшения вкусовых качеств рябины и увеличения массы ее плода Мичурин вовлек в гибридизацию с ней боярышник,



Рис. 2. Сорта рябины И.В. Мичурина, включенные в «Государственный реестр...» (2013).
а – Алая крупная; б – Рубиновая; в – Титан.

мушмулу, грушу, яблоню, создав сорта Гранатная (*S. aucuparia* L. × *Crataegus sanguinea* Pall.) и Мичуринская десертная (Ликерная × *Mespilus germanica* L.).

Продолжая работу Ивана Владимировича, его многолетняя помощница А.С. Тихонова (1953) из мичуринского гибридного фонда, полученного от скрещивания рябины обыкновенной с грушей, выделила сорта Красавица и Рубиновая. В происхождении сорта Титан принимал участие сорт Бурка и разные сорта груши, яблони, в том числе и краснолистные. От гибридизации рябино-грушевого гибрида с рябиной Моравской был получен наиболее крупноплодный сорт Алая крупная. В настоящее время сорта И.В. Мичурина Алая крупная (рис. 2, а), Рубиновая (рис. 2, б) и Титан (рис. 2, в) включены в «Государственный реестр охраняемых селекционных достижений, допущенных к хозяйственному использованию» (2013).

Мичуринские сорта плодовых и ягодных культур до настоящего времени не утратили своего значения, и спустя многие десятилетия некоторые из них все еще районированы во многих регионах России и стран СНГ. Это сорта яблони Бессемянка мичуринская (рис. 3, а), Бельфлер-китайка (рис. 3, б), Дочь Коричного (рис. 3, в), Пепин шафранный (рис. 3, г); груши – Бере зимняя Мичурина (рис. 3, д); сливы – Ренклод колхозный (рис. 3, е); вишни степной – Полевка (рис. 3, ж); смородины – Память Мичурина (рис. 3, з).

Используя сорта И.В. Мичурина как доноры ценных признаков, к настоящему времени селекционеры получили более 150 новых сортов плодовых и ягодных культур. Ценными в селекционном отношении родительскими формами оказались мичуринские сорта яблони Бельфлер-китайка, Бессе-



Рис. 3. Сорты яблони (а–г), груши (д), сливы (е), вишни (ж) и смородины (з) селекции И.В. Мичурина, включенные в «Государственный реестр...» (2013).

мянка мичуринская, Кандиль-китайка, Пепин шафранный, с участием которых создано более 35 включенных в «Госреестр...» сортов (Седов, 2006). Его сорта также результативно использовались в селекции груши, вишни, черешни, сливы, смородины, крыжовника, винограда и многих других плодовых и ягодных культур.

Промышленное садоводство

И.В. Мичурин всегда указывал на необходимость тесной связи научно-исследовательской работы с практикой. В статье «Наши неотложные задачи» он пишет: «<...> в научно-исследовательской работе всегда таится опасность разрыва теории с практикой. ...Наша насущная задача – оказывать постоянную помощь производству, передавать ему свои достижения, увязывать научно-исследовательскую работу с практикой» (Мичурин, 1948в. С. 278, 279). И.В. Мичурин подчеркивал, что для развития отечественного промышленного садоводства очень важно провести инвентаризацию сортового состава существующих садов с целью замены малопродуктивных старых сортов на новые и закладку промышленных насаждений, а также организовать широкую сеть плодовых питомников для увеличения выпуска посадочного материала.

Для механизированного ухода и сбора урожая наиболее пригодны слаборослые сады. Решение этой задачи И.В. Мичурин видел в создании слаборослых сортов и использовании карликовых подвоев: «Прежде старались выводить могучие, высокорослые плодовые растения. А практика показала, что нужны скороспелые карлики, пригодные для механизации ухода и уборки» (Мичурин, 1948в. С. 219). С 1891 г. он первым в стране²¹ с энтузиазмом взялся за решение проблемы создания карликовых плодовых растений. Селекционным путем ему удалось создать слаборослые сорта вишни, сливы, айвы, рябины, а также карликовый вегетативно размножаемый подвой для яблони Парадизка мичуринская. В качестве слаборослого подвоя груши И.В. Мичурин рекомендовал использовать созданную им Айву северную, а сливы – различные виды терна со сдержанным ростом.

В своих научных статьях в периодической печати И.В. Мичурин давал практические рекомендации по организации территорий защитных полос, закладке садов, размножению плодовых растений и проведению различных агротехнических приемов. В статье «Что

²¹ В Англии первые работы по стандартизации карликовых подвоев (дусена, парадизки и айвы) были начаты в 1875 г. (Касьяненко, 1963).

надо для расцвета плодового?» он обращает внимание на необходимость быстрой закладки маточных насаждений, коллекционных садов, которые послужат базой для размножения и изучения новых сортов, а также маточно-семенных садов для получения семян и последующего выращивания подвоев. На первых порах для производства подвоев можно использовать семена, собранные из дикорастущих плодовых насаждений. Он составляет подробный календарь проведения агротехнических работ в саду в течение года. Важной рекомендацией И.В. Мичурина, особенно для начинающих садоводов, актуальной и в наши дни, является закладка насаждений одно- или двухлетними саженцами, а не взрослыми трех- или четырехлетними, так как последние плохо приживаются при посадке и хуже растут.

Ценные рекомендации дает И.В. Мичурин по выбору места для размещения плодовых и ягодных культур, их сортового состава, по требованиям к рельефу, почве, уровню залегания грунтовых вод, агротехническим приемам, обрезке и уходу за многолетними насаждениями. При выращивании саженцев в питомнике нежелательно проводить обильные подкормки удобрениями и поливы, особенно во второй половине лета, так как это может вызвать затяжной рост растений и они плохо подготовятся к зиме и могут сильно подмерзнуть. Им были разработаны оригинальные способы размножения растений черенками, отводками и укорененными листьями, а также сконструированы и изготовлены специальные приспособления для прививки копулировкой (гайсфус) (рис. 4), тиски для скрепления привоя с подвоем при прививке черенком, специальная ручная машинка для окулировки (рис. 5) и компактный опрыскиватель для обработки различных растений. Он разработал уникальный способ воздушного укоренения черенков, также он окоренял черенки вишни при помощи изобретенного им ящика с ребристым дном и вытяжной трубкой вниз.

Особое внимание Мичурин обращает на подготовку высококвалифицированных техников-садоводов, бригадиров, организацию курсов повышения квалификации, «<...> на которых было бы поменьше «теоретических» рассуждений и побольше практики того, как надо собрать и приготовить зерно к посеву, как привить и обрезать растение, как посадить и ухаживать за ним, как бороться с вредителями, как владеть орудиями борьбы с вредителями и с ядами. Дело не в широких площадях плодовых насаждений, а в большой и устойчивой урожайности садов, в правильном сборе и хранении плодово-ягодного сырья» (Мичурин, 1948в. С. 284). Далее подчеркивается, что при областных и районных земельных управлениях, институтах, зональных станциях и опорных пунктах важно наладить работу консультационных пунктов по вопросам садоводства.

Важным вопросом для развития отечественного промышленного садоводства И.В. Мичурин считал организацию специализированных заводов для расширения производства садовой техники, инвентаря, упаковочных материалов, а также средств борьбы с вредителями и болезнями, удовлетворяющих требованиям используемой агротехники. При пересылке посадочного материала железнодорожным и/или водным транспортом его следует



Рис. 4. Нож для копулировки (из: Савельев, 2005).



Рис. 5. Машинка для окулировки растений (из: Савельев, 2005).

причислить к самому срочному грузу. Эти актуальные вопросы ученый неоднократно ставит перед руководством страны. В то же время он указывает на необходимость более тесного взаимодействия селекционеров с механизаторами и агротехниками в деле создания новых сортов плодовых культур с учетом требования последних.

Кроме того, И.В. Мичурин очень много внимания уделял и садоводам-любителям, вел с ними огромную переписку. Ему ежегодно приходило до 5–10 тыс. писем, а в отдельные годы, как он сам отмечал, корреспонденция измерялась пудами.

Роль научного наследия И.В. Мичурина в развитии отечественной селекции и садоводства

Деятельность И.В. Мичурина была направлена на совершенствование методов селекции, создание новых сортов плодовых растений, а также на всестороннее развитие отечественного садоводства и создание его научных основ. В этой связи он поставил перед собой две задачи: продвинуть границу произрастания плодовых растений далеко на север и восток (рис. 6); пополнить сортимент плодовых и ягодных культур средней полосы России новыми зимостойкими, высокопродуктивными, с высоким качеством плодов сортами.

Л. Бербанк (1955) считал, что в селекции сливы в США основную роль сыграло строительство Тихоокеанской железной дороги, обеспечившей быстрый и экономичный способ транспортировки слив в Восточные штаты для миллионов изголодавшихся без фруктов жителей (С. 121–122). Такая же благоприятная ситуация для развития садоводства появилась в Сибири после строительства Транссибирской магистрали и заселения края Переселенческим управлением МВД (позже Министерства земледелия). С именем И.В. Мичурина связано становление садоводства Урала, Сибири и Дальнего Востока. Он поддерживал

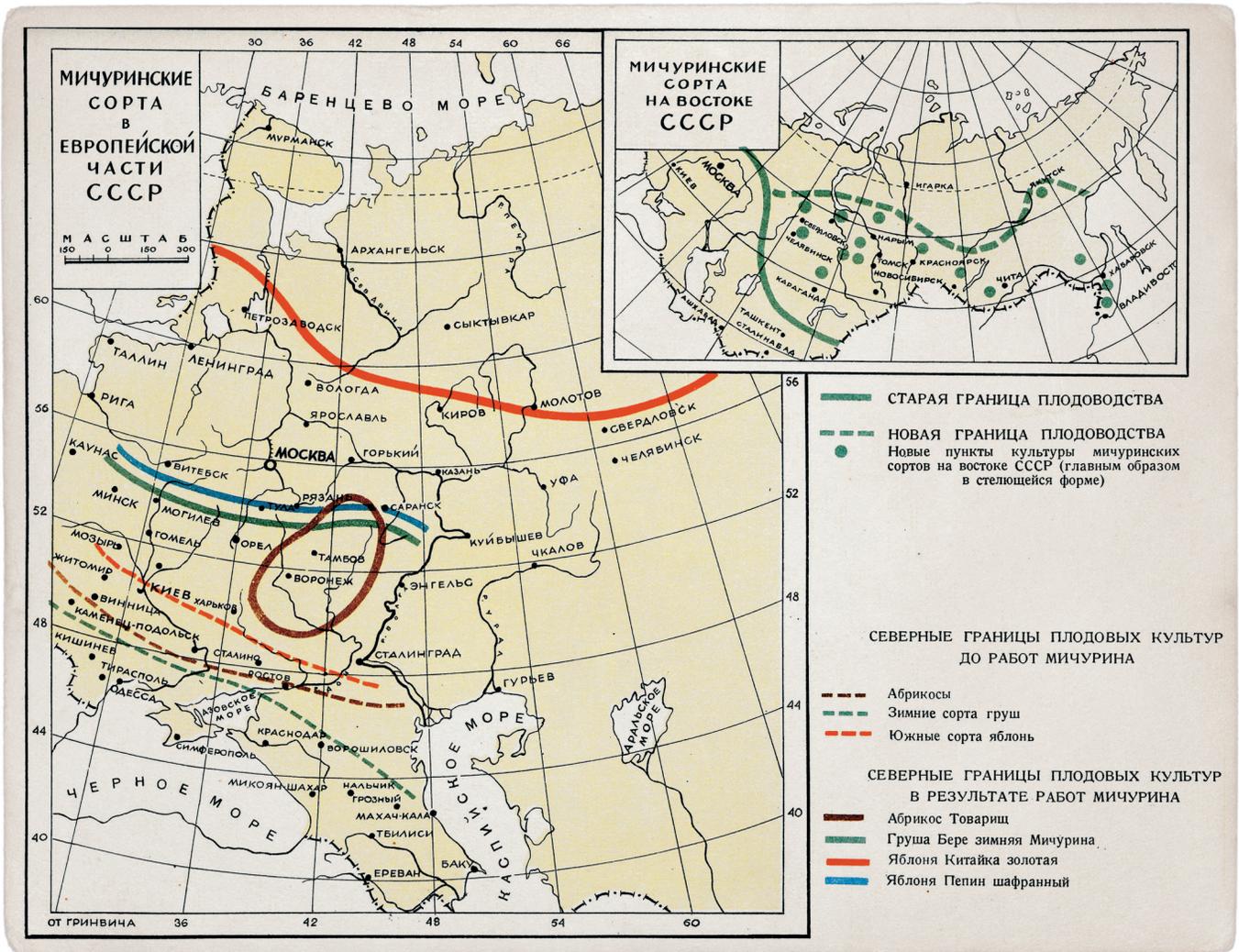


Рис. 6. Продвижение границы произрастания плодовых растений на север и восток страны в результате деятельности И.В. Мичурина (из: Еникеев, 1948).

тесные связи с энтузиастами-садоводами и селекционерами этих суровых регионов, вел с ними переписку и обмен семенным и посадочным материалом. В научной и периодической печати он выступает со статьями: «К сибирским садоводам», «Садоводам Урала и Сибири», «Как выращивать на Урале плодовые деревья», «Недооценка работ Лукашева – преступление», в которых проходит мысль о возможности ведения промышленного садоводства в жестких климатических условиях Урала и Сибири, но исключительно при создании собственных (местных) сортов плодовых культур. По его инициативе в 1930-е гг. на Урале, Сибири и Дальнем Востоке были организованы научные учреждения по садоводству – опытные поля, опорные пункты, плодовые станции. Его последователь М.А. Лисавенко создает плодоводство на Алтае (Калинина, 2007), его коллега Н.Ф. Кашенко (1963) – в Западной Сибири, Вс.М. и В.М. Крутовские – в Восточной Сибири, А.М. Лукашев – на Дальнем Востоке.

Географические закономерности в распределении генов культурных растений рассмотрены Н.И. Вавиловым (1927) в одноименной работе. В ней он писал о преимущественном сосредоточении доминантных генов в главных цен-

трах (очагах) происхождения возделываемых растений. Его идея совпадала со взглядами И.В. Мичурина (1924) о «более сильном доминировании» признаков и свойств у более древних видов по сравнению с более молодыми.

Призыв И.В. Мичурина к поиску и широкому вовлечению в селекцию разнообразного исходного материала, дикорастущих форм растений актуален и в наши дни. Им и его сотрудниками был собран уникальный генофонд плодовых культур из различных регионов мира: Западной Европы, Кавказа, Средней Азии, Сибири, Дальнего Востока, Тибета, Китая, Северной Америки и других регионов. По его инициативе снаряжались многочисленные экспедиции по сбору ценных дикорастущих форм плодовых и ягодных растений. Это направление его деятельности высоко ценил и поддерживал Н.И. Вавилов, отмечавший, что основная заслуга И.В. Мичурина состоит в том, «... что он первый понял, какое значение имеет привлечение для селекции плодовых огромного мирового материала. Он первый оценил все значение диких лесных плодовых Восточной Азии, Кавказа и других горных районов» (Вавилов, 1935а. С. 92). До настоящего времени в Мичуринском питомнике во ВНИИГСПР (г. Мичуринск) сохранилось и поддержи-

вается в живом виде более 300 видов и разновидностей плодовых, ягодных, нетрадиционных и декоративных культур, собранных И.В. Мичуриным. Среди них наиболее интересны лимонник китайский, элеутерококк, разновидности черемухи, бузины, барбариса, калины, боярышника, рябины, ореха, малины, актинидии, жимолости, сирени, акации и некоторые другие растения, которые широко используются в генетико-селекционных исследованиях не только этого института (Савельев, 2005).

Научное наследие, или Вместо заключения

И.В. Мичурин умер 7 июня 1935 г. Все ведущие газеты страны опубликовали траурное сообщение. На следующий день в «Правде» вышла статья Н.И. Вавилова (1935б) «Подвиг», в которой он писал в духе времени: «Его труд проникнут материалистической философией, и многие положения его совершенно оригинальны. Во всех своих трудах Мичурин зовет к самостоятельности, к творческой работе».

Историк науки – не бухгалтер, хотя часто хочется посчитать «за» и «против», «положительное» и «отрицательное». Вероятно, основной итог своей деятельности подвел сам Мичурин (1948в) в статье «Чего я жду от профсоюзов»: «Мне бы и хотелось, чтобы вся эта огромная армия материально-духовной культуры СССР знала, что создание облегчающих, украшающих и улучшающих человеческую жизнь новых растительных форм – дело не одного только “старика Мичурина” и его последователей, что это – родное, кровное дело всех тех, кто работает для блага своей социалистической родины <...> что это – близкое дело всех тех, кто хочет и вправе жить лучше и лучше» (С. 266). Как ни странно для работ почти столетней давности, их результативность не так уж и плоха. С именем И.В. Мичурина связана организация целого ряда научных и учебных учреждений всероссийского значения в г. Козлове (ныне Мичуринск). Осенью 1929 г. был открыт Селекционно-растениеводческий техникум им. И.В. Мичурина. В 1930 г. была организована Центральная плодово-ягодная станция, которая в 1931 г. реорганизована в Центральный научно-исследовательский институт северного плодово-ягодного хозяйства (в настоящее время Всероссийский научно-исследовательский институт садоводства им. И.В. Мичурина). Для подготовки ученых-агрономов высшей квалификации был открыт учебный Институт селекции плодово-ягодных культур (Плодоовощной институт им. И.В. Мичурина), в настоящее время Мичуринский государственный аграрный университет.

Им также был поднят вопрос создания в стране региональной сети научно-исследовательских учреждений по садоводству, и эта проблема настойчиво решалась.

Иван Владимирович Мичурин вывел более 130 сортов яблок, груш, слив, винограда, абрикосов, ежевики, смородины и табака (Яковлев, 1949). Однако сам он очень скромно оценивал результаты своего труда: «Оглядываясь назад на пройденный путь, подытоживая количество достижений, невольно убеждаешься в их незначительности. Слишком коротка жизнь каждого человека для этого дела. Здесь требуется работа целых поколений» (Мичурин, 1948в. С. 156). В обращении к своим последователям

он писал: «Мои последователи должны опережать меня, противоречить мне, даже разрушать мой труд, в то же время продолжать его. Из только такой, последовательно разрушаемой работы и создается прогресс» (Мичурин, 1948в. С. 402).

В то же время, кроме научных и практических достижений И.В. Мичурина, для общества было не менее важно его подвижничество. Н.И. Вавилов (1935а) писал: «В жизни Ивана Владимировича исключительно много поучительного: поучителен сам подвиг, железная воля, упорство, колоссальный труд. И.В. Мичурин является образцом исключительного трудолюбия, подлинным героем труда, своим примером показавшим, как надо жить и работать» (С. 92). «Моральные качества выдающейся личности имеют, возможно, большее значение для данного поколения и всего хода истории, чем чисто интеллектуальные достижения. Последние зависят от величия характера в значительно большей степени, чем это обычно принято считать» (Эйнштейн, 1965. С. 116). На этой положительной ноте нам бы хотелось закончить краткое эссе о И.В. Мичурине, несомненно, неординарном человеке, ученом и гражданине.

Благодарности

Работа поддержана бюджетным проектом № VI.53.1.1.

Считаем своим приятным долгом поблагодарить академика Латвийской АН И.Д. Рашаля (Институт биологии Латвийского университета, г. Рига), профессора Э.И. Колчинского (СПбФ ИИЕиТ РАН, г. Санкт-Петербург), профессора И.К. Захарова (ИЦиГ СО РАН), доктора исторических наук, кандидата биологических наук О.Ю. Елину (ИИЕиТ РАН, г. Москва), доктора биологических наук А.Ю. Новосельскую-Драгович (ИОГен РАН, г. Москва) и С.Э. Смоленскую (ИЦиГ СО РАН) за полезное обсуждение статьи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Александров В.Я. Трудные годы советской биологии. СПб.: Наука, 1993.
- Алиханян С.И. Теоретические основы учения Мичурина о перделах растений. М.: Наука, 1966.
- Баранов П.А., Лебедев Д.В. Забытые страницы из биографии И.В. Мичурина. И.В. Мичурин и Н.И. Вавилов. Ботан. журнал. 1955;40(5):752-757.
- Бахарев А.Н. Замечательная жизнь и работа И.В. Мичурина, 1855–1935. И.В. Мичурин. Итоги шестидесятилетних работ. 4-е изд. М.: Сельхозгиз, 1936. С. XVII-LXIV.
- Бахарев А.Н. И.В. Мичурин: Жизнь и деятельность. Воронеж: Воронежское обл. книгоизд-во, 1938.
- Бахарев А.Н. Иван Владимирович Мичурин: Биографический очерк. И.В. Мичурин Сочинения: в 4 т. 2-е изд., доп. М.: Сельхозгиз, 1948. Т. 1: Принципы и методы работы. С. 1-108.
- Бахарев А.Н. Иван Владимирович Мичурин: 1855–1935. М.: Сельхозгиз, 1949.
- Бахарев А.Н. Иван Владимирович Мичурин: К 100-летию со дня рождения (1855–1955). М.: Сельхозгиз, 1955а.
- Бахарев А.Н. Мичурин – молодежи. М.: Молодая гвардия, 1955б.
- Бахарев А.Н. Основные черты селекционно-генетической теории И.В. Мичурина. М.: Сельхозгиз, 1956.

- Бахарев А.Н. Мичурин в жизни. 3-е изд. М.: Знание, 1980.
- Бербанк Л. Мы останавливаемся, чтобы оглянуться назад. Избр. соч. М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1955;121-128.
- Бердышев А.П. Андрей Тимофеевич Болотов – выдающийся деятель науки и культуры, 1738–1833. М.: Наука, 1988.
- Берлянд С.С. Селекция растений в России (Литературный обзор). Агробиология. 1947;6:145-156.
- Библиография трудов И.В. Мичурина и литературы о нем. [сост. Е.В. Пархоменко и Ф.С. Гинзбург]. М.: Сельхозгиз, 1958.
- Вавилов Н.И. Предисловие. И.В. Мичурин. Итоги его деятельности в области гибридизации по плодоводству. М.: Новая деревня, 1924;3-4.
- Вавилов Н.И. Географические закономерности в распределении генов культурных растений. Природа. 1927;10:763-774.
- Вавилов Н.И. Великий садовод: к юбилею Ивана Владимировича Мичурина. Комсомольская правда. 1934. 18 сент.
- Вавилов Н.И. Памяти Мичурина, 14 октября 1855–7 июня 1935. Природа. 1935а;1:91-93.
- Вавилов Н.И. Подвиг: [памяти И. В. Мичурина]. Правда. 1935б. 8 июня.
- Вавилов Н.И. Пути советской растениеводческой науки (ответ критикам). Соц. реконструкция сельского с.-х. 1936;12:33-46.
- Вавилов Н.И. Новая систематика культурных растений. Н.И. Вавилов. Избр. тр.: в 5 т. Т. 3: Проблемы географии, филогении и селекции пшеницы и ржи. Растительные ресурсы и вопросы систематики культурных растений. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1962;492-503.
- Вавилов Н.И. О состоянии научно-исследовательской работы и о повышении квалификации научных кадров: (неполный текст отчёта ВИР 15 марта 1939 г.). Наука и жизнь. 2002;1:45-51.
- Васильченко И.Т. Иван Владимирович Мичурин, 1855–1935. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1963.
- Вехов Н. Мир цветочных фантазий профессора Арцыбашева. Цветоводство. 2004;4-6.
- Вишнякова М.А., Гончаров Н.П. Георгий Дмитриевич Карпеченко. К 110-летию со дня рождения (03.05.1899-28.07.1941) // Информационный вестник ВОГИС. 2009;13(1):7-25.
- Гончаров Н.П. Государственная организация аграрной науки в России (К 175-летию РАСХН). Историко-биологические исследования. 2012;4(3):10-33.
- Гончаров Н.П., Вишнякова М.А., Котёлкина И.В., Лассан Т.К. Георгий Дмитриевич Карпеченко. 3-е изд. испр. и доп. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2013.
- Горбунов Н.П. Ленин и научно-техническая работа. Великий строитель. Памяти В.И. Ленина. М., 1924;66-69.
- Государственный реестр охраняемых селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. Сорта растений. М.: МСХ РФ, 2013.
- Долгушин Д.А. Мичуринские принципы селекции и семеноводства культурных растений. М.: Правда, 1949.
- Дубинин Н.П. Теоретические основы и методы работ И.В. Мичурина. М.: Просвещение, 1966.
- Дудолкин Ю. Иван Владимирович Мичурин (1855–1935). Сеятели и хранители: очерки об известных агрономах, почвоведех, селекционерах, генетиках, экономистах-аграрниках; отрывки из документов, научных статей, воспоминаний: в 2 кн. Кн. 2. М.: Современник, 1992;161-204 (Серия «Открытия и судьбы»).
- Елина О.Ю. Между научной теорией и сельскохозяйственной практикой. Селекционеры и Лысенко (1948–1955 гг.). За «Железным занавесом»: мифы и реалии советской науки. Под ред. М. Хайнеманна, Э.И. Колчинского. СПб.: К. Булавин, 2002;376-392.
- Еникеев Х.К. И.В. Мичурин, великий преобразователь природы (Альбом). М.: Госкультпросветиздат, 1948.
- Калинина И.П. Жизнь и деятельность академика ВАСХНИЛ Михаила Афанасьевича Лисавенко: К 110-летию со дня рождения. Информационный вестник ВОГИС. 2007;11(3/4):622-630.
- Касьяненко А.И. Плодоводство на карликовых подвоях. Киев: Госсельхозиздат УССР, 1963.
- Кашина В.И., Косякин А.С., Одинцов В.А. История садоводства России. Рязань: Русское слово, 1999.
- Кашенко Н.Ф. Сибирское садоводство. М.: Изд-во с.-х. лит-ры, журналов и плакатов, 1963.
- Колчинский Э.И. Чем закончилась попытка создать «пролетарскую биологию». Вестник РАН. 2000;12:1077-1085.
- Компанеев М. Иван Владимирович Мичурин. Ученые агрономы России: из истории агрономической науки. Кн. 2. М.: Колос, 1976.
- Кюстин А. де. «Россия в 1839 году». СПб.: Крига, 2008.
- Лысенко Т.Д. Агробиология. 4-е изд. доп. М.: Сельхозгиз, 1948.
- Любищев А.А. Значение работ И.В. Мичурина для науки (рукопись). Б.г.: б.м. 147 стр. м.п. (Архив сектора генетики пшениц ИЦиГ СО РАН).
- Мичурин И.В. Выведение из семян новых культурных растений плодовых и кустарников. М.: ГИЗ, 1921.
- Мичурин И.В. Итоги его деятельности в области гибридизации по плодоводству. М.: Новая Деревня, 1924.
- Мичурин И.В. Сочинения: в 4-х т. 2-е изд., доп. М.: Сельхозгиз, 1948а. Т. 1: Принципы и методы работы. Предисл. Т.Д. Лысенко, И.И. Презента.
- Мичурин И.В. Сочинения: в 4 т. 2-е изд., доп. М.: Сельхозгиз, 1948б. Т. 2: Помологические описания.
- Мичурин И.В. Сочинения: в 4 т. 2-е изд., доп. М.: Сельхозгиз. Т. 4: Сборный. 1948в.
- Мичурин И.В. Итоги шестидесятилетних работ. 5-е изд. М.: ОГИЗ-Сельхозгиз, 1949.
- Мичурина М.И. Из воспоминаний об отце: (Период 1885–1896 гг.). И.В. Мичурин в воспоминаниях современников. Тамбов: Тамбовское кн. изд-во, 1963;36.
- Мичурин Иван Владимирович (1855–1935): опись док. материалов личного фонда № 6856: крайние даты док. материалов 1883–1941 гг. М.: [б.и.], 1952.
- Научное наследство. Т. 10. Николай Иванович Вавилов. Из эпистолярного наследия 1929–1940 гг. М.: Наука, 1987.
- Рудкевич Л. Забытая годовщина: [перепеч. из журн. «Грани». 1985. № 137]. Родина. 1993;3:97-99.
- Савельев Н.И. Научное наследие И.В. Мичурина и селекционное улучшение плодовых культур: (к 145-летию со дня рождения ученого). Вестн. Рос. акад. с.-х. наук. 2000;5:14-16.
- Савельев Н.И. Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и селекции плодовых растений им. И.В. Мичурина (История становления от И.В. Мичурина до наших дней). Мичуринск: ВНИИГСПР, 2005.
- Седов Е.Н., Жданов В.В., Седьшева Г.А., Серова З.М. Учение Мичурина широко используется и развивается. Вестник ОрелГАУ. 2006;1:18-23.
- Стебут А.И. Мутационизм и дарвинизм в сортовом деле. Журн. опытн. агрономии. 1909;10(2):142-190.
- Тихонова А.С. Новые сорта рябины. Сб. работ по вопросам плодоводства. М.: Сельхозгиз, 1953;193-194.
- Цинцин Н.В. О формо- и видообразовании. Гибриды отдаленных скрещиваний и полиплоиды. М.: Изд-во АН СССР, 1963;5-24.
- Шитт П.Г. Экономические основы и перспективы развития плодоводства в СССР. М.: Новый агроном, 1928.
- Шумный В.К. За истину в науке. Наука и жизнь. 1987;12:62-65.
- Эйнштейн А. Памяти Марии Кюри. Физика и реальность: сб. ст. М.: Наука, 1965;116.
- Яковлев П.Н. Реконструктор флоры (К 60-летию юбилея работ И.В. Мичурина). Природа. 1934;9:44-55.
- Яковлев П.Н. Инвентаризация растительного материала И.В. Мичурина (составлено по поручению И.В. Мичурина). И.В. Мичурин. Итоги шестидесятилетних работ. 1855–1935. 5-е изд. М.; Л.: ОГИЗ-Сельхозгиз, 1949;517-625.
- Roll-Hansen N. The Lysenko effect: the politics of science. Humanity Books (Amherst, NY, USA), 2005.