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

ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

ФАКТОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ

FACTORS IN EXPERIMENTAL EVOLUTION OF ORGANISMS

Збірник наукових праць

Видається з 2003 р.

ТОМ 16

Присвячено

150-річчю
від часу публікації робіт Грегора Менделя
«Досліди над рослинними гібридами»

Київ — 2015

УДК 575.8+631.52+60](082)
ББК 28.04я43+45.3я43+41.3я43+42-3я43
Ф 18

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

Головний редактор **В. А. Кунах**
Заступник головного редактора **Н. М. Дробик**

І.В. Азізов (Азербайджан)
А. Атанасов (Болгарія)
Я.Б. Блюм
Р.А. Волков
Т.К. Горова
Н.Г. Горовенко
Д.М. Гродзинський
В.А. Драгавцев (Росія)
О.В. Дубровна
Г.В. Єльська
І.С. Карпова
А. В. Кільчевський (Білорусь)
І.А. Козерецька
В.А. Кордюм
М.В. Кучук
Л.Л. Лукаш
С.С. Малюта
В.Г. Михайлов
В.В. Моргун
М.А. Пілінська
В.Г. Радченко
С.Ю. Рубан
А.А. Сибірний
В.А. Сідоров (Україна — США)
О.О. Созінов
Т.К. Терновська
О.М. Тищенко
Г. Федак (Канада)

Відповідальний секретар — **М. З. Мосула**

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

Editorial board

Editor-in-Chief **V. A Kunakh**
Deputy editor **N. M. Drobyk**

I. V. Azizov (Azerbaijan)
A. Atanasov (Bulgaria)
Ya.B. Blum
R.A. Volkov
T.K. Gorova
N.G. Gorovenko
D.M. Grodzynskyy
V. A. Dragavtsev (Russia)
O.V. Dubrovna
A.V. El'ska
I.S. Karpova
A.V. Kilchevsky (Belarus)
I.A. Kozeretska
V.A. Kordium
N.V. Kuchuk
L.L. Lukash
S.S. Maliuta
V.G. Mykhailov
V.V. Morgun
M.A. Pilinska
V.G. Radchenko
S.Yu. Ruban
A.A. Sybirniy
V.A. Sidorov (Ukraine — USA)
O.O. Sozinov
T.K. Ternovska
O.M. Tyshcenko
G. Fedak (Canada)

Responsible secretary — **M.Z. Mosula**

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

Затверджено до друку рішенням вченої ради Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (протокол № 9 від 9 червня 2015 р.)

Свідоцтво про державну реєстрацію друкованого засобу масової інформації
серія КВ № 20936-10736ПР від 29.08.2014

Ф 18 **Фактори експериментальної еволюції організмів:** зб. наук. пр. / Національна академія наук України, Інститут молекулярної біології і генетики, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова; редкол.: В. А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]. — К.: Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова, 2015. — Т. 16. — 286 с. — ISSN 2219-3782

УДК 575.8+631.52+60](082)
ББК 28.04я43+45.3я43+41.3я43+42-3я43

© Українське товариство генетиків
і селекціонерів ім. М. І. Вавилова, 2015

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ
УКРАЇНСЬКЕ ТОВАРИСТВО ГЕНЕТИКІВ І СЕЛЕКЦІОНЕРІВ ім. М. І. ВАВИЛОВА

ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

Том 16
2015

ФАКТОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ
FACTORS IN EXPERIMENTAL EVOLUTION OF ORGANISMS

ЗМІСТ

Від головного редактора
З нагоди проведення X міжнародної наукової конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» 7
Опалко А. І. Постать Грегора Менделя: міфи і реалії. До 150-річчя оприлюднення Грегором Менделем результатів «Дослідів над рослинними гібридами» 13

ЕВОЛЮЦІЯ ГЕНОМІВ У ПРИРОДІ ТА ЕКСПЕРИМЕНТІ

Антонюк М. З., Штефюк Т. В., Терновська Т. К. Мікросателітний аналіз стійких до борошнистої роси інтрогресивних ліній м'якої пшениці різного походження 21
Бурда Р. І. Роль еволюції в інвазіях судинних рослин 26
Воронова Н. В., Сироткина Д. П. Видовой состав и генетическая вариабельность бактериальных симбионтов тлей фауны Беларуси 32
Грачова М. А., Чешко Т. М., Шкорбатов Ю. Г. Деякі онтогенетичні аспекти впливу фізичних факторів на показники життєздатності у *Drosophila melanogaster* 37
Дерябіна О. Г., Шувалова Н. С., Ковальчук М. В., Мінін Ю. В., Дерябін О. М., Кордюм В. А. Вплив трансплантації ксеногенних мезенхімальних стовбурових клітин на протікання атрофічного риніту у мишей 42
Кравець О. А., Горюнова І. І., Ємець А. І., Блюм Я. Б. Диференціація судинної обкладинки та мезофілу у С3 і С4 видів рослин у зв'язку з оптимізацією фотосинтезу 46
Кузнецова О. В., Власенко К. М. Еволюція гормональної регуляції у грибів 50
Кушкіна А. І. Структурні та генетичні особливості літичного бактеріофага Lw1, нового представника псевдо Т-парних фагів 55
Лісовська Т. П. Гомологічна рекомбінація у гетерозиготних за мейотичними мутаціями рослин томату 58
Мамедрзаева Е. Т., Кулиев Г. Н., Керимова З. К., Кулиев А. Г., Шамилов Э. Н., Гасымова Г. Э., Абдуллаева А. С. Кариотип *Microtus sosialis* и родственные связи видов рода *Chionomys* и порода *Terricola*, обитающих в Азербайджане 63
Михеев А. Н. Инварианты универсального эволюционизма 68

CONTENTS

From the Chief Editor's Desk
In relation to the X-th International Scientific Conference «Factors in Experimental Evolution of Organisms» 7
Opalko A. I. Personality of Gregor Mendel: myths and realities. The 150th anniversary of Mendel's disclosure of his results of «Experiments on plant hybrids» 13

GENOME EVOLUTION IN NATURE AND IN EXPERIMENT

Antonyuk M. Z., Shtefyuk T. V., Ternovska T. K. Microsatellite analysis of the resistant to powdery mildew introgressive wheat lines of different origin 21
Burda R. I. Role the evolution of vascular plants in invasion 26
Voronova N. V., Sirotkina D. P. Species composition and genetic variability of bacterial symbionts of aphids from Belarus 32
Gracheva M. A., Cheshko T. M., Shckorbatov Y. G. Some ontogenic aspects of the influence of phisycal factors on viability of *Drosophila melanogaster* 37
Deryabina O. G., Shuvalova N. S., Kovalchuk M. V., Minin Y. V., Deriabin O. M., Kordium V. A. Influence of xenogeneic mesenchymal stem cells transplantation on atrophic rhinitis in mice 42
Kravets E. A., Horiunova I. I., Yemets A. I., Blume Ya. B. Differentiation of leaf vein bundle sheath and mesophyll cells in C3 and C4 species in connection with photosynthesis optimization 46
Kuznetcova O. V., Vlasenko K. M. Evolution hormonal regulation in fungi 50
Kushkina A. I. Structural and genetical features of lityc bacteriophage Lw1, a new member of pseudo T-even phage group 55
Lisovska T. P. Homologous recombination in heterozygous by meiotic mutations tomato plants 58
Memmedrzayeva E. T., Guliyev G. N., Kerimova Z. K., Guliyev A.G., Shamilov E. N., Gasimova G. E., Abdullaev A. S. Karyotype of *Microtus sosialis* and relations of species of the genus *Chionomys* and subgenus *Terricola* inhabiting in Azerbaijan 63
Mikhyeyev A. N. Invariants of universal evolutionism 68

Осмалений М. С., Головков А. М., Нанієва А. В., Верголяс М. Р. Комплексна оцінка токсичності водних зразків за допомогою рослинних і тваринних тест-організмів 74

Скоробагатько Д. А., Страшнюк В. Ю., Мазилов А. А. Компоненты приспособленности в потомстве *Drosophila melanogaster* после острого γ-облучения 78

Iefimenko T. S., Fedak G., Antonyuk M. Z., Ternovska T. K. Introgressive wheat lines *Triticum Aestivum/Amblyopyrum muticum* as to structure of homoeologous group 5 chromosomes 83

ПРИКЛАДНА ГЕНЕТИКА І СЕЛЕКЦІЯ

Білоконь С. В. Генотоксичний вплив деяких пестицидів в тестах на *Drosophila melanogaster* 87

Бурденюк-Тарасевич Л. А., Лозінський М. В. Принципи підбору пар для гібридизації в селекції озимої пшениці *T. aestivum* L. на адаптивність до умов довкілля 92

Вировец В. Г., Лайко И. М., Горшкова Л. М., Кириченко А. И., Мищенко С. В. Однодомность и ненаркотичность *Cannabis sativa* L. как новые составные систематики современной культуры 97

Гуральчук Ж. З., Мордерер Є. Ю. Проблема резистентності рослин до гербіцидів: генетичний та метаболічний аспекти 100

Дубовец Н. И., Сычева Е. А., Бондаревич Е. Б., Соловей Л. А. Биотехнологические подходы к улучшению хозяйственно-ценных признаков тритикале 105

Жук О. І. Ростові процеси у стеблі озимої пшениці за різного забезпечення мінеральним живленням 110

Кацан В. А., Юркевич Л. Н., Потопальський А. І. Ізатізон та наносрібло здатні індукувати зміни ростових процесів та продуктивності вівса сорту Незламний, які зберігаються в наступних поколіннях 114

Кириленко В. В., Гуменюк О. В., Дергачов О. Л., Дубовик Н. С., Близнюк Б. В., Хоменко С. О. Методи підвищення морозо-, зимостійкості пшениці м'якої озимої (*Triticum aestivum* L.) в умовах Лісостепу України 120

Корнєєва М. О., Мацук М. Б., Чемерис Л. М. Вплив гетерогенності тетраплоїдного запилювача на прояв господарсько-цінних ознак ЧС гібридів цукрових буряків 125

Лавриненко Ю. О., Вожегова Р. А., Базалій В. В., Кузьмич В. І. Удосконалення доборів на підвищення продуктивності сої в умовах зрошення 129

Маменко О. М., Ємець З. В., Хруцький С. С. Підвищення стійкості організму корів до негативного впливу плюмбуму кормів раціону 132

Моргун В. В., Січкар С. М., Починок В. М., Голік О. В., Чугункова Т. В. Аналіз структури продуктивності колекційних зразків малопоширених видів пшениці 136

Опалко А. І., Опалко О. А. Проблеми і перспективи селекційно-генетичного вдосконалення яблуні (*Malus* Mill.) 141

Паламарчук А. І. Особливості морозо- і зимостійкості пшениці твердої озимої 147

APPLIED GENETICS AND BREEDING

Belokon S. V. Genotoxic effects of some pesticides in tests of *Drosophila melanogaster* 87

Burdeynyuk-Tarasevych L. A., Lozinski M. V. Pair selection principles for hybridization of *Triticum aestivum* L. winter on adaptability to environmental conditions 92

Vyrovets V. H., Layko I. M., Horshkova L. M., Kyrychenko H. I., Mishchenko S. V. Momeciousness and drug free property of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) as a new components of taxonomy of the modern crop 97

Guralchuk Zh. Z., Morderer Ye. Yu. Problem of plant resistance to herbicides: genetic and metabolic aspects 100

Dubovets N. I., Sycheva Y. A., Bondarevich Y.B, Solovey L. A. Biotechnological approaches to improvement of triticale economically valuable traits 105

Zhuk O. I. The growth processes in winter wheat stem under different mineral nutrition 110

Katsan V.A., Yurkevich L. N., Potopalsky A. I. Izatison and nanosilver are able to induce the changes in growth and productivity of oat plant cultivar nezlamny persisting in the next generations 114

Kyrylenko V. V., Gumenyuk O. V., Dergachov O. L., Dubovyk N. S., Blyznyuk B. V., Khomenko S. O. Methods to improve frost resistance of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) in conditions of Forest-steppe of Ukraine 120

Kornieieva M. O., Matsuk M. B., Chemerys L. M. Effect of heterogeneity of tetraploid pollinator on agronomic signs in triploid CMS hybrids of sugar beet 125

Lavrynenko Y., Vozgegova R., Bazaliy V., Kuzmich M. Effectiveness of selection for increasing of soybean productivity in conditions of irrigation 129

Mamenko A. M., Yemets Z. V., Khrutskiy S. S. Increase in resistance of cows to negative impact of lead in feeds of ration 132

Morgun V. V., Sichkar S. M., Pochinok V. M., Golik O. V., Chugunkova T. V. Analysis of productivity structure of collection samples of rare wheat species 136

Opalko A. I., Opalko O. A. The outlook for the improvement of breeding and genetics problems of apple tree (*Malus* Mill.) 141

Palamarchuk A. I. Especially frost- and winter-resistant on the winter durum wheat 147

Созінов І. О., Козуб Н. О., Бідник Г. Я., Дем'янова Н.О., Карелов А. В., Блюм Я. Б., Созінов О. О. Дослідження реакції рослин пшениці м'якої з транслокацією 1BL/1RS на гамма-опромінення 152
Стельмах А. Ф., Файт В. І. Системи контролю початкового розвитку сучасних селекційних зразків озимих зернових колосових культур у СГІ – НЦНС 156
Степаненко А. І., Степаненко О. В., Моргун Б. В. Поліморфізм генів пшениці, які визначають якісні ознаки, у харчових продуктах 161
Хохлов А. М., Барановский Д. И., Смирнова А. С. Биологические особенности организма животных рода *Sus* 166
Шаптуренко М. Н., Печковская Т. В., Вакула С. И., Хотылева Л. В. Сравнительный анализ аллельного состава микросателлитных локусов *Brassica oleracea* var. *capitata* L. 170
Bi H., Kovalchuk N. V., Dias D., Roessner U., Langridge P., Lopato S., Borisjuk N. V. Natural variation of wheat cuticular waxes in relation to drought tolerance 174
Dabrowska I. V., Tkachenko K. S., Podgorsky V. S., Fomina M. O. Anti-*Staphylococci* activity of yeast isolates affected by pH of experimental medium 179

ГЕНЕТИКА ЛЮДИНИ ТА МЕДИЧНА ГЕНЕТИКА

Боднар І. В., Зубко О. С., Боднар Л. С. Корекція вітамінними хіміопревентерами мутагенних фонів, спричинених дією ароматизаторів продуктів харчування 183
Городецька Є. В., Серга С. В., Лагута Т. І., Левкович Н. М., Анікусько М. Ф., Тимовська Ю. О., Чешук В. Є., Смоланка І. І., Скляр С. Ю., Поленков С. Е., Бойченко О. І., Демидов С. В., Жук О. В., Козерецька І. А. Частоти мутації 5382INSC гена *BRCA1* у жінок, хворих на рак молочної залози, в трьох областях України 188
Горпинченко М. Ю., Атраментова Л. О. Здатність показника I_p розрізняти українські популяції регіонального рівня 192
Дмитрук І. М., Макух Г. В., Тиркус М. Я., Шуварська В. І., Маркевич Н. В., Лялюк О. В. Молекулярно-генетична діагностика мутацій гена *FGFR3* при ахондроплазії та гіпохондроплазії 197
Ковальова В. І., Будрейко О. А., Косовцова Г. В. Визначення ролі спадкових факторів та несприятливих чинників перинатального розвитку у формуванні ожиріння у дітей та підлітків 201
Козак Н. А., Почерняев А. К., Лыткин Д. В., Горшунская М. Ю., Почерняева С. С. Однонуклеотидный полиморфизм гена интерлейкина-6 (*IL-6*) у жителей Харькова, больных сахарным диабетом 2 типа 206
Коляда А. К., Вайсерман А. М., Красненков Д. С., Плетнева Т. В., Карабань И. Н. Изучение молекулярно-генетических маркеров болезни Паркинсона в Украине 210
Кушнірук В. О., Акопян Г. Р., Микитенко Д. О., Гулеюк Н. Л., Зукін В. Д., Лукаш Л. Л. Динаміка ультраструктурних аберацій каріотипу стовбурових клітин людини лінії 4BL, виявлених за допомогою ARRAY CGH 216

Sozinov I. A., Kozub N. A., Bidnyk H. Ya., Demianova N. A., Karelov A. V., Blume Ya. B., Sozinov A. A. Investigation of the response of common wheat plants with the 1BL/1RS translocation to gamma-irradiation 152
Stelmakh A. F., Fayt V. I. Systems of initial development control in modern cereal breeding specimens at PBGI – NCSCI 156
Stepanenko A. I., Stepanenko O. V., Morgun B. V. Polymorphism of wheat genes that determine qualitative properties in food products 161
Hohlov A. M., Baranovskiy D. I., Smirnova A. S. Biological peculiarity of *Sus* genus animal organizm 166
Shapturenko M. N., Pechkovskaya T. V., Vakula S. V., Khotyleva L. V. Comparative diversity simple sequence repeat loci from *Brassica oleracea* var. *capitata* L. 170
Bi H., Kovalchuk N. V., Dias D., Roessner U., Langridge P., Lopato S., Borisjuk N. V. Natural variation of wheat cuticular waxes in relation to drought tolerance 174
Dabrowska I. V., Tkachenko K. S., Podgorsky V. S., Fomina M. O. Anti-*Staphylococci* activity of yeast isolates affected by pH of experimental medium 179

HUMAN GENETICS AND MEDICAL GENETICS

Bodnar I. V., Zubko O. S., Bodnar L. S. Correction of mutagen load caused by action of food flavors using vitamin chemiopreventers 183
Gorodetska I. V., Serga S. V., Levkovich N. M., Lahuta T. I., Anikusko N. F., Tymovska Yu. O., Cheshuk V. Ie., Smolanka I. I., Sklyar S. Yu., Polenkov S. E., Boichenko O. I., Demydov S. V., Zhuk O. W., Kozeretska I. A.
The frequency of *BRCA1* mutation 5382INSC among women with breast cancer from three regions of Ukraine 188
Gorpynchenko M. Yu., Atramentova L. A. Ability of I_p index to distinguish between the ukrainian populations of the regional level 192
Dmytruk I., Makukh H., Turkys M., Markevych N., Shuvarska V., Lialiuk O. Molecular genetic testing of *FGFR3* gene mutation in the differential diagnosis of achondroplasia and hypochondroplasia 197
Kovalyova V. I., Budreyko O. A., Kosovtsova G. V. The role of hereditary and unfavorable factors during perinatal period in the formation of obesity in children and adolescents 201
Kozak N. A., Pochernyayev A. K., Lytkin D. V., Gorshunska M. Yu., Pochernyayeva S. S. Single nucleotide polymorphism of interleukin-6 (*IL-6*) in residents of Kharkiv patients with tupe 2 diabetes mellitus 206
Koliada A. K., Vaiserman A. M., Krasnenkov D. S., Pletneva T. V., Karaban I. N. Study of molecular and genetic markers of Parkinson's disease in ukrainian population 210
Kushniruk V. O., Akopyan H. R., Mykytenko D. O., Huleyuk N. L., Zukin V. D., Lukash L. L.
The dynamic of karyotype ultrastructural aberrrations of new human stem cell line 4BL revealed by ARRAY CGH 216

Лучко Е. Н., Атраментова Л. А. Выраженность агрессивности и эмпатии не связана со степенью метисации жителей украинского города 221
Пальчевська О. Л., Балацький В. В., Мацевич Л. Л., Півень О. О., Лукаш Л. Л. Сигнальна функція β-катеніну при адаптації дорослого міокарда ссавців до фізичних навантажень 225
Підпала О. В., Лукаш Л. Л. Мотиви регуляторних послідовностей у промоторних ділянках гена *MGMT* людини в межах мобільних генетичних елементів 230
Тимошина И. А., Павиченко О. В., Филипцова О. В. Популяционный и генетический анализ пищевых предпочтений среди жителей Украины 236
Тиркус М. Я., Макух Г. В., Бобер Л. Й., Роговик Н. В., Гнатейко О. З. Розповсюдження генетично детермінованої гіполактазії дорослого типу у хворих на муковісцидоз, гомозигот за мутацією p.Phe508del 241
Ткач І. Р., Гулеюк Н. Л., Гельнер Н. В., Безкоровайна Г. М., Вайсе А., Косякова Н., Лір Т., Федишин Т. В. Спектр та частота численних хромосомних аномалій в матеріалі ранніх репродуктивних втрат 246
Третяк Б. І., Макух Г. В., Кіцера Н. І., Костюченко Л. В., Акопян Г. Р. Молекулярно-генетичний аналіз поширених мутацій гена *ATM* у пацієнтів з підозрою на атаксію-телеангіектазію 251
Утевская О. М., Дибирова Х. Д., Чухряева М. И., Агджоян А. Т., Атраментова Л. А., Балановская Е. В., Балановский О. П. Западноевропейские и западноазиатские варианты гаплогруппы R1b в украинских популяциях 255
Федота А. М., Рощенюк Л. В., Адмакина А. В., Солодянкин А. С. Анализ полиморфных вариантов C677T и A1298C гена *MTHFR* у больных псориазом 260
Швачко Л. П., Шумейко І. С., Телегєєв Г. Д. Стан ДНК-метилювання гена глутатіон-S-трансферази P1 (GSTP1) у хворих на рак сечостатевої системи 264
Шубина-Олейник О. А., Синявская М. Г., Левая-Смоляк А. М., Меркулова Е. П., Даниленко Н. Г. Спектр мутаций ядерного локуса DFNB1 у пациентов с несиндромальной СНТ, жителей Беларуси 268
Lylo V. V., Karpova I. S., Kotsarenko K. V., Macewicz L. L., Ruban T. A., Dziuba G. V., Lukash L. L. Isolectins from *Sambucus nigra* flowers and their effect on MGMT and P53 proteins amount in human cells *in vitro* 273

ІСТОРІЯ БІОЛОГІЇ ТА ЕВОЛЮЦІЙНОЇ ТЕОРІЇ

Піскун Р. П., Хлєстова С. С., Гринчак Н. М. Про наукову діяльність у галузі біології та медицини видатних вчених XIX–XX ст.— вихідців з України 277
Чень І. Б., Гуменюк Г. Б. І. І. Мечников: життя і наукова діяльність. До 170-річчя від дня народження 282

Luchko E. N., Atramentova L. A. The expressiveness of aggression and empathy are not related with the degree of cross-breeding ukrainian city citizens 221
Palchevska O. L., Balatskyy V. V., Macewicz L. L., Piven O. O., Lukash L. L. Signaling function of β-catenin during adult myocardium adaptation to physical training 225
Pidpala O. V., Lukash L. L. Motives of the regulatory sequences in promoters of human *MGMT* gene within the transposable elements 230
Timoshyna I. A., Pavichenko O. V., Filiptsova O. V. Population and genetic analysis of food preferences among the inhabitants of Ukraine 236
Tyrkus M., Makukh H., Bober L., Rohovyk N., Hnateyko O. The frequency genetically determined adult-type hypolactasia in cystic fibrosis patients homozygotes for p.Phe508del 241
Tkach I. R., Huleyuk N. L., Helner N. V., Bezkorovaina H. M., Weise A., Kosyakova N., Liehr T., Fedyshyn T. V. Spectrum and frequency of numerical chromosomal abnormalities in material of early reproductive loss 246
Tretyak B., Makukh H., Kitsera N., Kostiuchenko L., Akopyan H. The molecular genetic analysis of common *ATM* gene mutationsamong patients with ataxia-telangiectasiasuspection 251
Utevska O. M., Dibirova Kh.D., Chukhraeva M. I., Agdzhoyan A. T., Atramentova L. A., Balanovska E. V., Balanovsky O. P. West european and west asian variants of the haplogroup R1b in ukrainian population 255
Fedota A. M., Raschelyuk L. B., Admakina A. B., Solodyankin A. S. Analysis of polymorphic variants C677T and A1298C of *MTHFR* gene in patients with psoriasis 260
Shvacko L. P., Shumeiko I. S., Telegeev G. D. DNA-methylation status of glutation-S-transferathe P1 gene (GSTP1) in the urogenital malignancies 264
Shubina-Oleinik O., Siniauskaya M., Levaya-Smaliak A., Merkulava E., Danilenko N. Spectrum of DFNB1 locus mutations among Belarus patients with non-syndromic hearing loss 268
Lylo V. V., Karpova I. S., Kotsarenko K. V., Macewicz L. L., Ruban T. A., Dziuba G. V., Lukash L. L. Isolectins from *Sambucus nigra* flowers and their effect on MGMT AND P53 proteins amount in human cells *in vitro* 273

HISTORY OF BIOLOGY AND EVOLUTIONARY THEORY

Piskun R. P., Chlestova S. S., Grynchak N. M. Scientific activity of outstanding scientists of Ukraine of XIXth–XXth century in the field of biology and medicine 277
Chen I. B., Humeniuk H. B. I. I. Mechnikov: life and scientific work. To the 170th anniversary of his birth 282

З НАГОДИ ПРОВЕДЕННЯ X МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВОЇ КОНФЕРЕНЦІЇ «ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ»

14–18 вересня 2015 року в м. Чернівці на базі Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича відбудеться наукове свято, свято української біологічної науки — ювілейна, X Міжнародна наукова конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів». Свято тому, що наша біологічна наука бурхливо розвивається і здобуває не лише нові знання про живе, а й закладає основи сучасної біотехнології, біомедицини, селекції. Тому, що наша Конференція — це чудова нагода зустрітися разом і познайомитися з досягненнями світової та вітчизняної біологічної науки, почути думку колег щодо своїх власних досліджень. Як кажуть у народі — і на людей подивитись, і себе показати.

Конференція відбудеться у славетному Чернівецькому національному університеті імені Юрія Федьковича — визнаному лідерові серед університетів нашої країни, особливо відомому працями своєї біохімічної, молекулярно-біологічної і біотехнологічної школи. Чудово, що представники цих шкіл є в складі Міжнародного наукового і організаційного комітету конференції, братимуть активну участь у роботі цієї конференції, планують виступити як з пленарними, так і з секційними та стендовими доповідями. Користуюсь нагодою, щоб щиро подякувати керівництву та співробітникам Університету за надану можливість провести конференцію та за допомогу в її організації.

Усі попередні конференції відбувалися теж як велике наукове свято, в якому мали за честь взяти участь провідні представники біологічної, сільськогосподарської, медичної науки. У роботі конференцій брали участь представники різних країн — України, Росії, Білорусі, Азербайджану, Киргизстану, Латвії, Угорщини, Польщі, Ізраїлю, США, Великобританії, Канади тощо. Пленарні і секційні доповіді представляли вчені зі світовим ім'ям. Коротко наукову роботу проведених конференцій проаналізовано у статтях [1–9].

Нагадаю, що у 2002 р. президія Українського товариства генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова (УТГіС) вирішила провести наукову конференцію «Фактори експериментальної еволюції організмів», присвячену ювілеям видатних українських генетиків і селекціонерів, а саме 120-річчю від дня народження **А.О. Сапєгіна**, 100-річчю від дня народження **Д.О. Долгушина** та 100-річчю від дня народження **О.С. Мусійка**. Обираючи назву (головний напрям конференції), виходили з відомого вислову М.І. Вавилова «Селекція — це еволюція, що спрямовується волею людини». Головним завданням конференції був аналіз досягнень та визначення сучасних проблем прикладної біології, зокрема проблем прикладної генетики і селекції, а також біотехнології.

Ця конференція відбулася 30 вересня — 2 жовтня 2003 р. у м. Алушта, Автономна Республіка Крим, Україна. Її головними науковими напрямами було визначено такі напрями: «Генетико-біотехнологічні прийоми розширення генетичної мінливості рослин і тварин», «Спеціальна генетика господарсько-корисних ознак рослин і тварин», «Використання фундаментальних досліджень у практичній селекції», «Сучасні методи біотехнології у створенні нового покоління сортів і гібридів у культурних рослин», «Використання молекулярних маркерів та трансформаційних технологій у селекції й відтворенні рослин і тварин», «Методи мікроклонального відтворення цінних генотипів рослин та їхнє зберігання в культурі *in vitro*». У конференції взяли участь 48 науковців — представників академічної, сільськогосподарської і університетської науки із п'яти країн, а саме України, Росії, Білорусі, Німеччини, Ізраїлю. Було заслухано і обговорено 13 пленарних та 24 доповіді на засіданнях секцій. Надіслані за матеріалами конференції 96 наукових статей опубліковано у збірнику наукових праць «Фактори експериментальної еволюції організмів» (К.: Аграрна наука, 2003, 464 с.).

Аналіз результатів конференції, проведений президією УТГіС, показав наявність великого інтересу до обговорюваних наукових проблем, і, за відгуками учасників конференції, актуальність наукового напряму, визначеного назвою конференції. Тому було прийнято рішення такі конференції проводити регулярно. І, в результаті, конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів» набула статусу міжнародної і почала проводитися практично щорічно (за винятком років, у які відбувалися чергові з'їзди УТГіС, — 2007 р. та 2012 р.). I–VIII конференції відбулися в м. Алушта, IX конференція — в м. Умань на базі Національного дендропарку «Софіївка»

НАН України, а X конференція, як уже згадувалося,— відбудеться у м. Чернівці.

До початку кожної конференції виходив у світ збірник наукових праць «Фактори експериментальної еволюції організмів», у якому публікувалися роботи, подані згідно з науковими напрямами, що планувалися до розгляду на даній конференції. Уже починаючи з першого збірника, він відразу привернув до себе увагу як читачів, так і авторів. У цьому збірнику 216 авторів із України, Росії, Білорусії і Німеччини опублікували 96 статей з шести наукових розділів (табл. 1–3). Тому президія УТГіС прийняла рішення продовжити не лише проведення конференції, а й видання однойменного збірника наукових праць. Увага з боку науковців до цього збірника весь час зростала, і він став щорічним. З 2008 року почало виходити два томи щорічно, об'єм кожного з яких складав понад 28 умовних друкарських аркушів.

Слід підкреслити, що як конференцію, так і однойменний збірник наукових праць «Фактори експериментальної еволюції організмів» запо-

Таблиця 1

Відомча приналежність авторів статей збірника «Фактори експериментальної еволюції організмів»

Рік	Том	Кількість опублікованих статей, шт.				Всього статей*
		академічні установи	вищі навчальні заклади	установи аграрної науки	інші заклади	
2003	б/н	37	9	44	12	96
2004	2	35	15	31	5	77
2006	3	70	34	45	4	143
2008	4	44	28	17	20	99
	5	46	19	41	9	106
2009	6	45	31	24	4	92
	7	62	18	14	20	92
2010	8	47	33	30	5	105
	9	66	24	15	18	106
2011	10	63	44	45	9	128
	11	60	29	21	26	117
2013	12	61	40	19	4	87
	13	54	26	45	10	89
2014	14	45	25	9	3	62
	15	44	22	27	5	63

* Окремі статті представлено кількома авторами з різних установ.

Таблиця 2

Результати кількісного аналізу публікацій у збірнику «Фактори експериментальної еволюції організмів»

Рік	Том	Об'єм ум. д. а.	Кількість статей	Кількість авторів	Кількість статей з країни, шт.*			
					Україна	Росія	Білорусь	інші країни
2003	б/н	27,0	96	216	81	14	3	1
2004	2	24,3	77	191	61	7	4	2
2006	3	39,8	143	447	106	21	8	8
2008	4	28,8	99	309	64	28	7	—
	5	29,6	106	342	77	19	11	3
2009	6	28,2	80	270	57	22	7	3
	7	29,6	92	341	70	24	1	—
2010	8	29,1	105	288	60	37	4	4
	9	30,9	106	402	68	33	6	7
2011	10	38,2	128	421	70	45	11	15
	11	34,6	117	433	85	31	3	3
2013	12	43,2	87	281	59	28	6	4
	13	42,0	89	327	65	23	7	8
2014	14	30,2	62	199	43	19	1	4
	15	32,1	63	232	59	4	—	4

* Окремі статті представлено кількома авторами з різних країн.

Таблиця 3

Розподіл статей збірника за науковими розділами

№ розділу	Рік видання, том, назва розділу	Статті, шт.
	2003, б/н	
1	Генетико-біотехнологічні прийоми розширення генетичної мінливості рослин і тварин	17
2	Спеціальна генетика господарсько-корисних ознак рослин і тварин	23
3	Використання фундаментальних досліджень у практичній селекції	23
4	Сучасні методи біотехнології у створенні нового покоління сортів і гібридів у культурних рослин	12
5	Використання молекулярних маркерів та трансформаційних технологій у селекції й відтворенні рослин і тварин	6
6	Методи мікроклонального відтворення цінних генотипів рослин та їхнє зберігання в культурі *in vitro*	10
	2004, т. 2	
1	Загальні питання еволюції рослин і тварин	8
2	Еволюція рослинних геномів *in vitro*	5
3	ДНК-технології: нове в еволюції генів і геномів	3
4	Молекулярна екологія тварин і рослин	5
5	Популяційно-генетичні наслідки екологічних катастроф на прикладі Чорнобиля	6
6	Генетично-модифіковані організми	5
7	Нове у методах оцінки селекційного генетичного матеріалу і генетика мікроорганізмів	29
8	Оцінки сорто- і породоресурсів	13
	2006, т. 3	
1	Еволюція геномів у природі та експерименті	13
2	Молекулярна структура та організація геномів	19
3	Аналіз та оцінка генетичних ресурсів	35
4	Експериментальний мутагенез	10
5	Механізми взаємодії та експресії генетичних систем	12
6	Технології *in vitro*	20
7	Біотехнології у медицині та сільському господарстві	30
8	Питання викладання генетики, еволюції та біотехнології	2
	2008, т. 4	
1	Загальні питання еволюції	11
2	Еволюція геномів у природі та експерименті	17
3	Молекулярна структура та організація геномів	18
4	Механізми взаємодії та експресії генетичних систем	29
5	Генетика людини та медична генетика	22
6	Питання викладання генетики, еволюції та біотехнології	2
	2008, т. 5	
1	Аналіз та оцінка генетичних ресурсів	53
2	Технології *in vitro*: проблеми та перспективи	20
3	Біотехнології в медицині і сільському господарстві	33
	2009, т. 6	
1	Загальні питання еволюції	7
2	Еволюція геномів у природі та експерименті	15
3	Аналіз та оцінка генетичних ресурсів	33
4	Прикладна генетика і селекція	37
	2009, т. 7	
1	Молекулярна структура та організація геномів	17
2	Механізми взаємодії та експресії генетичних систем	6
3	Технології *in vitro*: проблеми та перспективи	18
4	Біотехнології у сільському господарстві та медицині	17
5	Генетика людини та медична генетика	22
	2010, т. 8	
1	Загальні питання еволюції	6
2	Еволюція геномів у природі та експерименті	11
3	Аналіз та оцінка генетичних ресурсів	43
4	Прикладна генетика і селекція	45

Продовження табл. 3

№ розділу	Рік видання, том, назва розділу	Статті, шт.
2010, т. 9		
1	Молекулярна структура та організація геномів	14
2	Механізми взаємодії та експресії генетичних систем	12
3	Технології *in vitro*: проблеми та перспективи	16
4	Біотехнології у сільському господарстві та медицині	38
5	Генетика людини та медична генетика	23
6	Питання викладання генетики, еволюції та біотехнології	3
2011, т. 10		
1	Структура і функції хромосом	18
2	Проблеми екогенетики	14
3	Аналіз та оцінка генетичних ресурсів	47
4	Прикладна генетика і селекція	48
2011, т. 11		
1	Еволюція геномів у природі та експерименті	22
2	Молекулярна структура та організація геномів	15
3	Біотехнології у сільському господарстві та медицині	54
4	Генетика людини та медична генетика	25
2013, т. 12		
1	Еволюція та біосфера	4
2	Еволюційна екологія та екогенетика	16
3	Еволюція геномів у природі та експерименті	22
4	Клітинні, генні та молекулярні біотехнології	37
5	Історія біології	6
2013, т. 13		
1	Аналіз та оцінка генетичних ресурсів	28
2	Прикладна генетика і селекція	41
3	Генетика людини та медична генетика	20
2014, т. 14		
1	Еволюційна екологія та екогенетика	8
2	Еволюція геномів у природі та експерименті	11
3	Епігенетика і генетика розвитку	6
4	Структура і функції хромосом	5
5	Аналіз та оцінка генетичних ресурсів	11
6	Генетика людини та медична генетика	15
7	Історія біології	5
2014, т. 15		
1	Клітинні, генні та молекулярні біотехнології	34
2	Прикладна генетика і селекція	28

чатковано на самому злеті підвищеної уваги до проблем біології, біомедицини, біотехнологій та еволюції органічного світу. Про досягнення в цих напрямах науки, зокрема, про розшифрування геному людини і найважливіших сільськогосподарських рослин і тварин, успіхи в генній терапії, клонування вищих ссавців, відкриття стовбурових клітин і вирощування для медицини на їх основі тканин та окремих органів людини, створення і застосування у виробництві трансгенних рослин і тварин тощо, практично щодня говорили і говорять не лише солідні і авторитетні засоби масової інформації, але й так звані бульварні видання. Пояснення цьому явищу лежить на поверхні — у суспільному розвитку настала ера біології і біомедицини. Насамперед, це стосується розвитку молекулярної біології та молекулярної генетики і створення на їхній основі по суті нової галузі знань — генетичної інженерії. Уже сьогодні успіхи біологічних наук досягли того рівня, коли можна говорити про їх визначальний вплив на рівень якості життя людини, перш за все на її здоров'я, тривалість повноцінного творчого життя і (прогностично) про можливе безсмертя людини як індивідуума.

Завданням і конференцій, і збірника наукових праць за їх матеріалами є висвітлення теорії, стану і проблем, методів і результатів досліджень у галузі генетики, селекції та сучасної біотехнології, а також історії та впливу цих наук на розвиток те-

орії еволюції та суміжних напрямків біології, медичних і сільськогосподарських наук. Велика увага приділяється також дослідженню генетичних ресурсів і вивченню та збереженню біологічного різноманіття. Важливе місце в роботі конференції займають питання та шляхи практичного використання досягнень генетики, селекції і біотехнології у сільському господарстві, медицині та деяких галузях промисловості, зокрема біотехнологічної. Розглядаються на засіданнях і друкуються у збірнику матеріали експериментальних досліджень, оглядові та практичні статті з теорії еволюції; про клітинні та молекулярні основи сучасної біотехнології, генетичної інженерії та генної терапії; молекулярні основи спадковості і мінливості організмів; проблеми і методи регуляції спадкової мінливості та реалізації генетичної інформації; останні досягнення в галузі як теоретичних основ селекції, так і її практичних досягнень тощо. Значне місце надається висвітленню завдань і проблем впровадження генетико-селекційних, молекулярно-біологічних і біотехнологічних методів у практику селекційної роботи з тваринами, рослинами і мікроорганізмами, використанню генетичних, молекулярно-генетичних, генно-інженерних методів, а також методів клітинної біології і клітинної інженерії у галузі генетики людини і медичної генетики, а особливо — ефективності застосування цих методів (табл. 3).

Важливим завданням також є висвітлення внеску видатних учених, перш за все — вітчизняних та учених, що мають українське коріння, у названі наукові напрями світової науки. Кожну конференцію і кожен збірник присвячено ювілейній даті одного чи кількох учених або ж ювілею видатної події у науці, наприклад ювілейній даті від часу заснування Української академії наук (нині — Національна академія наук України) чи ювілейній даті від часу заснування Київського національного університету імені Тараса Шевченка (табл. 4). Останні, 16-й та 17-й, томи збірника присвячено 150-річчю від часу публікації робіт **Грегора Менделя** «Досліди над рослинними гібридами», що започаткували науку генетику, а також 110-річчю від дня народження уродженця м. Чернівці, знаменитого біохіміка **Ервіна Чаргаффа**, який, по суті, започаткував молекулярні дослідження ДНК, і 75-річчю від

Таблиця 4

Визначні дати і ювілеї вчених, яким присвячено окремі випуски збірника

2003 б/н	120-річчю від дня народження **А. О. Сапєгіна** 100-річчю від дня народження **Д. О. Долгушина** 100-річчю від дня народження **О. С. Мусійка**
2004 т. 2	125-річчю від дня народження **В. Я. Юр'єва** 120-річчю від дня народження **І. І. Шмальгаузена** 105-річчю від дня народження **В. П. Зосимовича**
2006 т. 3	100-річчю від дня народження **С. М. Гершензона** 100-річчю від дня народження **П. К. Шкварнікова**
2008 т. 4, т. 5	90-річчю від часу заснування Української академії наук
2009 т. 6 т. 7	200-річчю від дня народження **Чарльза Роберта Дарвіна** 125-річчю від дня народження **І. І. Шмальгаузена**
2010 т. 8, т. 9	110-річчю від дня народження **Теодосія Григоровича Добжанського**
2011 т. 10 т. 11	120-річчю від дня народження **Л. М. Делоне** 90-річчю від дня народження **Р. Г. Бутенко**
2013 т. 12 т. 13	150-річчю від дня народження **В. І. Вернадського** 95-річчю від часу заснування Української академії наук
2014 т. 14 т. 15	180-річчю від часу заснування Київського національного університету імені Тараса Шевченка 100-річчю від дня народження **Нормана Ернеста Борлоуга**
2015 т. 16 т. 17	150-річчю від часу публікації робіт **Грегора Менделя** «Досліди над рослинними гібридами» 110-річчю від дня народження **Ервіна Чаргаффа** 75-річчю від дня народження **Ю. М. Сиволапа**

дня народження видатного генетика і селекціонера рослин, віце-президента УТГіС, академіка НААН України **Ю. М. Сиволапа**.

Хочу підкреслити, що у 2014 р. збірник наукових праць «Фактори експериментальної еволюції організмів» перереєстровано у Державній реєстраційній службі України, співзасновниками збірника тепер є Українське товариство генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова та Інститут молекулярної біології і генетики НАН України. Друковане періодичне видання «Фактори експериментальної еволюції організмів» включено до Переліку наукових фахових видань України у галузі біологічних наук (наказ Міністерства освіти і науки України від 06.11.2014 № 1279). Вважаю це великим досягненням нашого Товариства — ми чи не єдина громадська організація України, яка має два друкованих періодичних видання (друге — це журнал «Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів»), які видаються на громадських засадах і включені до Переліку наукових фахових видань України.

Оргкомітет і Міжнародний науковий комітет конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», а також редколегія однойменного збірника наукових праць розраховують і на подальше зростання активної участі читачів і авторів у роботі конференції. Сподіваюся, що дослідники систематично братимуть участь у дискусіях, які щороку проводяться за матеріалами публікацій у збірнику на Міжнародній конференції. Це сприятиме поглибленому обговоренню не лише оригінальних теоретичних наукових робіт, а й прикладних питань, які цікавлять широкий загал, а також проблем, що стосуються подальшого розвитку біотехнологій, однією з яких є селекція. (Згадаймо ще раз, що, за визначенням М. І. Вавилова, «селекція — це еволюція, що спрямовується волею людини». Очевидно не меншою мірою це визначення стосується й сучасної біотехнології, зокрема, клітинної і генетичної інженерії.)

X Міжнародна наукова конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів» відбуватиметься у надзвичайно складні для України часи, і тому особливо саме зараз наше завдання, завдання українських учених полягає в тому, щоб бути на рівні сучасної науки та зробити свій достойний внесок у генетику, селекцію, сучасні біотехнології, а також у подальший розвиток теорії еволюції органічного світу і використання здобутків світової науки на благо України, українського народу.

Ми чекаємо від Вас, шановні і дорогі автори, читачі збірника «Фактори експериментальної еволюції організмів», а також учасники однойменної Міжнародної (вже десятої!) конференції рекомендацій, конкретних порад та побажань, які будуть прийняті з увагою та вдячністю. Привітаємо ж один одного з початком X Міжнародної конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» і виходом у світ 16-го та 17-го томів однойменного збірника наукових праць за матеріалами цієї конференції!

Головний редактор збірника, Голова Міжнародного наукового комітету і оргкомітету I–X-ї Міжнародних наукових конференцій «Фактори експериментальної еволюції організмів», Президент Українського товариства генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова, член-кореспондент НАН України, професор ***В. А. Кунах***

ЛІТЕРАТУРА

1. У президії Українського товариства генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова // Вісник Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.— 2004.— 2, № 2.— С. 301–302.
2. Кунах В. А. III Міжнародна конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів» // Там само.— 2006.— 4, № 2.— С. 303–307.
3. Дубровна О. В., Лялько І. І. IV Міжнародна наукова конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів» // Там само.— 2008.— 6, № 2.— С. 369–373.
4. Дубровна О. В., Лялько І. І. V Міжнародна наукова конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів» // Там само.— 2009.— 7, № 2.— С. 333–336.
5. Дубровна О. В., Лялько І. І. VI Міжнародна наукова конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів» // Там само.— 2010.— 8, № 2.— С. 353–357.
6. Дубровна О. В., Лялько І. І., Кунах В. А. VII Міжнародна наукова конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів» // Там само.— 2011.— 9, № 2.— С. 313–319.
7. Дробик Н. М., Кунах В. А. Генетичні основи еволюції, селекції і біотехнології та проблеми біосферології (за матеріалами VIII Міжнародної наукової конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», 23–27 вересня 2013 р., Алушта, Україна) // Там само.— 2011.— 9, № 2.— С. 313–319.
8. Кунах В. А. Від головного редактора. До читачів і авторів збірника — з нагоди 10-річчя виходу в світ першого тому // Фактори експериментальної еволюції організмів.— 2013.— 12.— С. 3–6.
9. Мосула М. З., Дробик Н. М., Кунах В. А. Актуальні проблеми сучасної генетики, селекції, біотехнології та еволюційної теорії (за матеріалами IX Міжнародної наукової конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», 22–26 вересня 2014 р., м. Умань, Черкаська обл., Україна) // Вісник Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.— 2014.— 12, № 2.— С. 290–297.

УДК 575 (092)

ОПАЛКО А. І.
Національний дендрологічний парк «Софіївка» НАН України,
Україна, 20300, м. Умань Черкаської обл., вул. Київська, 12А, e-mail: opalko_a@ukr.net

ПОСТАТЬ ГРЕГОРА МЕНДЕЛЯ: МІФИ І РЕАЛІЇ

До 150-річчя оприлюднення Грегором Менделем результатів «Дослідів над рослинними гібридами»

Грегор Мендель
(20.07.1822–6.01.1884)

Справжні вчені навіть у глибокій старості зберігають певний романтизм, мрійливий і сповнений уяви склад розуму; вони продовжують жити в світі захоплюючого, химерного, незвичайного; вони ніколи не перестають дивуватися грандіозності і непогрішній постійності законів, що керують гармонією Природи всередині і поза людиною.

Ганс Сельє, 1964 [1]

Світова наукова спільнота в черговий раз цього року вшановує славетного вченого-біолога Грегора Менделя, наукова спадщина котрого стала базою для формування нової біологічної науки — генетики [2, 3]. Науки, що вказала шлях розв'язання найбільших таємниць життя: успадкування ознак у потомстві і пояснення механізмів спадковості і мінливості. Однак при цьому її зачинатель, Г. Мендель, належить до вчених, епохальні відкриття котрих не були визнані за життя [4], внаслідок чого відлік історії генетики розпочався лише через 16 років після смерті її фундатора і через 35 років після оприлюднення базових положень менделізму. Засадничі доповіді на тему «Досліди над рослинними гібридами» (Versuche über Pflanzen Hybriden), першу з яких 8 лютого 1865 р. за результатами своїх восьмирічних досліджень зі схрещування гороху зробив прелат Г. Мендель у монастирі святого Фоми моравського міста Брюн (нині Брно, Чехія) перед групою ченців-августинців та запрошених світських членів Товариства природодослідників (Naturforschender Verein), а другу, з узагальненнями і висновками щодо цих дослідів, у тій же аудиторії через місяць (8 березня), залишились недооціненими і не до кінця зрозумілими тодішніми біологами [2], як і опублікована наступного року стаття, за дещо скороченим (до 43 стор.) їхнім змістом, у часописі цього Товариства [5].

Історична довідка про долю відкриття. Товариство природодослідників м. Брно було організоване у 1862 р. [6], а його науковий часопис засновано через рік; отже у 1866 р., було видано лише четвертий випуск, і провінційне видання, природно, ще не здобуло великої популярності у наукових колах. Цим можна якось пояснювати той факт, що беззаперечний нині пріоритет Г. Менделя знайшов своє визнання лише на початку XX сторіччя, коли три знаних біологи — Карл Еріх Корренс, Еріх Чермак і Гуго де Фриз, у трьох європейських країнах на різних об'єктах (відповідно кукурудза, горох, мак) і незалежно один від одного отримали схожі результати і розвинули їх у теорію, що нині відома як «Закони Менделя». Через рік до них приєднався відомий англійський біолог В. Бетсон, що з'ясував природу дискретної спадковості на курях. Саме він відразу став найпослідовнішим менделістом, а ще через п'ять років запропонував саму назву «генетика». З того часу історія менделізму, як і генетики, що розвилася з нього, насичена багатьма прикладами майже фанатичної прихильності і бездоказового й ірраціонального неприйняття [2].

З-поміж вагомих чинників, що побічно загальмували визнання менделізму, найбільше значення мало обговорення, що розгорнулось у біологічній науці з приводу опублікованої на шість років раніше книги Чарльза Дарвіна «Походження видів, або збереження сприятливих рас у боротьбі за життя» [7]. У цій книзі Ч. Дарвін

© ОПАЛКО А. І.

виклав свою знамениту теорію еволюційного походження і розвитку живих організмів, завдяки якій навіки увійшов в історію біологічної науки як геніальний мислитель [8]. На тлі дискусії щодо теорії Ч. Дарвіна не менш революційне повідомлення Г. Менделя здалося незначним для переважної більшості тодішніх науковців.

Щодо попередників Г. Менделя, котрі намагалися розібратись у механізмах успадковування, то в різних джерелах можна натрапити на цитування античних натурфілософських праць Емпедокла (490–430 рр. до н.е.), Демокріта (460–370 рр. до н.е.), Гіпократа (460–377 рр. до н.е.), Арістотеля (384–322 рр. до н.е.), Лукреція Кара (99–55 рр. до н.е.) та ін. До натурфілософських можна віднести й погляди Карла Ліннея (1707–1778 рр.) на успадкування у рослин, однак Т.Е. Найт (1759–1838 рр.) вже на методичному рівні описав явище домінування забарвлення насіння у гібридів гороху, хоча й не з'ясував механізми цього явища [9–13]. З-поміж ближчих до менделівських часів біологів, що не лише спостерігали, а й намагалися аналізувати і дати наукові тлумачення фактам прояву материнських і батьківських ознак у гібридних поколіннях, найбільш відомі праці Й.Г. Кельрейтера (1733–1806 рр.), що з'явились у Росії понад 250 років тому [14]. Досліди Й.Г. Кельрейтера з гвоздикою (*Dianthus*) були загалом схожі на роботи, виконані Г. Менделем з горохом (*Pisum*), однак Й.Г. Кельрейтер виконував міжвидові схрещування *Dianthus chinensis*×*D. carthusianorum* з наступним бекросом на *D. carthusianorum*, а масштаби схрещувань і аналізу потомства були на два порядки менші, ніж у Г. Менделя, що завадило йому помітити будь-які кількісні закономірності. Елементи незалежного розщеплення описав Огюстен Сажре (1763–1851) при схрещуванні дині; за результатами дослідів з тютюном, дурманом, маком, мірабіліс, примулою, петунією, динею і гарбузом про одноманітність гібридів першого покоління повідомляв Шарль Ноден (1815–1894 рр.). Слід зазначити, що завдяки більшій кількості видів рослин, залучених у досліди, Ш. Ноден спостерігав не просто «*домінування*», а «*одноманітність*» гібридів першого покоління і досить пістряве розщеплення, тобто дійшов ширших висновків, ніж Г. Мендель [15]. Відомо, що Ч. Дарвін також отримав близьке до відомого менделівського розщеплення у другому поколінні гібридів *Antirrhinum* (ротики, собачки), та не зумів пояснити.

Однак жоден зі згаданих і з багатьох інших неназваних дослідників, котрі спостерігали успадкування різних ознак у різних гібридів і намагалися використати результати розщеплення (хто для суто наукових цілей, а хто для підвищення ефективності аграрного виробництва), не змогли обґрунтувати їх механізми.

Річ у тім, що тодішні біологи ставились до математики дещо скептично, ігнорували методику експерименту, натомість усі висновки Г. Менделя ґрунтувалися на методах гібридологічного аналізу, на скрупульозних підрахунках результатів успадковування невеликої кількості зручних для спостереження альтернативних ознак і проводились у достатніх для статистичного аналізу масштабах. Не вдаючись до загальновідомих деталей зазначимо, що принципово новим у працях Г. Менделя були твердження про дискретний (переривчастий) характер спадковості та наявність корпускул (одиниць спадковості), які пізніше й отримали назву — гени.

Тому беззаперечний нині пріоритет Г. Менделя знайшов своє визнання лише на початку XX сторіччя, коли найбільш прогресивні біологи почали розуміти значення математики і розпочалася започаткована ним ера інтегрування математики й біології [16].

Міфологізація Г. Менделя і менделізму. Брак інформації та/або намагання приховати чи спотворити правду завжди породжують міфи. Не бракує міфів, що з'являлися і продовжують з'являтися й дотепер, і навколо постаті Г. Менделя. Деякі з них варто розглянути. Так, у більшості джерел з історії генетики наводиться міркування, що тогочасні біологи не прочитали написану *німецькою мовою* статтю Г. Менделя а ті, хто прочитав, не зрозуміли значення його математичних викладок [2, 3, 6].

Такі твердження лише частково можна вважати правильними. У біологічній науці XIX сторіччя ще не було домінування англійської мови, яке спостерігається нині. Тож мабуть математика відлякала більше, аніж німецька.

Не більше, ніж гарний міф, який частково реабілітує затримку у визнанні менделізму, є твердження про те, що стаття Г. Менделя, яку було надруковано у 1866 р. (а не в 1865 р., як дехто пише) впродовж тривалого часу залишалася зовсім невідомою і на неї лише випадково і незалежно один від одного натрапили через 35 років вже згадані три перевідкривачі.

Насправді, робота Г. Менделя цитувалася близько 15 разів, зокрема у зведенні німецького ботаніка В. Фокса про рослинні гібриди у 1881 р., про неї знали всі провідні ботаніки ще за життя Дослідника. Четвертий том Часопису Товариства природодослідників зі статтею Г. Менделя відразу потрапив в 120 бібліотек університетів і товариств природознавців Відня, Праги, Берліна, Лондона, Парижа, Санкт-Петербурга, Філадельфії. Крім того, Г. Мендель розіслав 40 відбитків свого дослідження найбільш відомим ботанікам того часу, котрих вважав спроможними розібратися в його роботі. Більше того, як з'ясувалося при аналізі робочих зошитів К. Корренса, він у 1896 р. також читав статтю Г. Менделя і навіть зробив її реферат, але не зрозумів у той час її глибинного сенсу і банально забув про неї [4, 6, 17]. Читав статтю Г. Менделя, зрозумів і навіть послався на неї у німецькому виданні [18] Г. де Фріз, вилучивши посилання у скороченому для Вісника Паризької академії наук варіанті публікації [19]. Лише після опублікування роботи Г. де Фріза, коли К. Корренс зрозумів, що втрачає пріоритет відкриття, він нагадав і собі, і Г. де Фрізу про статтю Г. Менделя [6]. Нині є чимало інших свідчень, що спростовують міф про незнання тогочасними біологами цієї публікації до 1900 р. [20–22].

Питання — чи читав статтю Г. Менделя сам Ч. Дарвін, цікавить дослідників наукової спадщини обох вчених. Стосовно Г. Менделя можна вважати цілком доведеним його знайомство з працею Ч. Дарвіна про походження видів, котру він читав у німецькому перекладі. Більше того, зберігся його особистий примірник другого видання цієї праці, що побачило світ у 1863 р., з великою кількістю нотаток на берегах сторінок, зроблених його дрібним і акуратним почерком, з подвійним підкреслюванням окремих рядків тексту і позначенням деяких із них знаком оклику [6, 22]. Частина авторів схильні вважати, що Г. Мендель посоромився надіслати примірник своєї праці *самому Ч. Дарвіну* [6], інші переконані, що надсилав [22].

Свідчення, що в архіві Ч. Дарвіна зберігся примірник «Записок Товариства природодослідників м. Брно» зі статтею Г. Менделя і що сторінки цього провінційного часопису виявились не розрізаними, не підтверджуються більш прискіпливими дослідниками. Витоки цього міфу пов'язуються з тим, що у Ч. Дарвіна був екземпляр «Гібридизації у рослин» (Die Pflanzenmischlinge) Вільгельма Фокке [23, 24]. В. Фокке дійсно вказував на роботи Г. Менделя, однак саме ці сторінки в екземплярі Ч. Дарвіна були розрізані, що дає підстави вважати їх прочитаними. Втім В. Фокке просто посилався, не підкреслюючи важливість роботи Г. Менделя, і зовсім необов'язково Ч. Дарвін мав би усвідомити її значення, навіть якби прочитав ці сторінки. Та й німецькою мовою Ч. Дарвін володів не дуже гарно. Хоча, якби він прочитав саму роботу Г. Менделя й усвідомив би її значення, то розвиток світової біології міг би піти зовсім інакше і були б зовсім інші міфи. Тож зіставивши долі цих двох найвидатніших біологів XIX сторіччя, які творили у спільному часі, лишається тільки фантазувати, що було б, якби вони співпрацювали…

Принаймні, мабуть, Ч. Дарвіну вдалося б уникнути найдошкульнішої критики, відомої з 1867 р. як «*Кошмар Дженкіна*» і він зміг би з позицій менделізму без великих зусиль пояснити механізми еволюції, зокрема посилаючись на менделівські постулати про дискретний характер спадковості та одиницю спадковості. Адже головне протиріччя дарвінізму, на яке посилався Ф. Дженкін, полягало в тому, що накопичення достатньої для природного добору кількості дрібних, випадкових змін, що передаються у спадщину потомству, неможливе з причини розбавлення у гібридному потомстві зміненої спадковості одного партнера схрещування незміненою спадковістю іншого. І отже, зробив висновок Ф. Дженкін, вся теорія природного добору хибна [25].

Розв'язання цього протиріччя дочекалося фундатора синтетичної теорії еволюції американського вченого зі світовим ім'ям українського походження Теодозія Добржанського [26].

Багато разів повторювана легенда про фатальну роль Карла Негелі, котрий недооцінивши математичні викладки Г. Менделя спрямував його досліди на невдалий об'єкт — рід *Hieracium* L. (нечуйвітер, *ястребинка, рос.*), рослини якого називали «хрестом ботаніків» за непередбачуваність розщеплення у гібридних поколіннях (що, як з'ясувалось пізніше, було наслідком схильності до апоміксису) і що саме невдалі досліди з *Hieracium* призвели до розчарування Г. Менделя в біології і припинення його подальших експериментів [27], також не зовсім коректна.

К. Негелі був одним з тих учених, котрим Г. Мендель писав листи з викладенням результа-

тів своїх дослідів. Однак при цьому Негелі був чи не єдиним, хто зволив робити деякі відповіді й коментарі. Загалом, хоча він не схвалював «горохові експерименти» Менделя, але у подальших публікаціях виявився вельми обізнаним для свого часу у питаннях спадковості [12], однак при цьому не посилався на роботи Г. Менделя, мабуть через забудькуватість. Можна вважати, що елементи такої обізнаності могли сформуватись на рівні підсвідомості внаслідок листування з Г. Менделем. До того ж К. Негелі був одним з небагатьох тогочасних учених, хто намагався перейти в ботанічній науці від позірних описів до аналізу природних процесів із застосуванням математичних методів [6].

Не до кінця сприйняті К. Негелі висновки Г. Менделя ще за його життя були високо оцінені в магістерській дисертації Івана Федоровича Шмальгаузена опублікованій у 1875 р. в «Трудах Санкт-Петербургского общества естествоиспытателей», котрі однак через російськомовність видання залишились невідомими як для самого Г. Менделя, так і для науковців Європи [6].

Іронічні висловлювання Роберта Фішера щодо нерозуміння самим автором значення своїх праць і їхню, саме математичну, недостовірність [28] цілком спростовано дослідниками архіву Г. Менделя [21]. Факти свідчать, що Г. Мендель цілком адекватно оцінював значення своїх експериментів, що доводять наступні рядки: «Якщо мені й доводилося переживати гіркі години, то я маю визнати з вдячністю, що прекрасних, хороших годин випало значно більше. Мої наукові праці доставили мені багато задоволення, і я переконаний, що не мине багато часу — і весь світ визнає результати цих праць» [6, с. 244].

Менделізм в СРСР і в Україні. У СРСР менделівська генетика бурхливо розвивалася до середини тридцятих років минулого сторіччя і за кадровим потенціалом і новизною теоретичних розробок посідала почесне друге місце в світі після США [21]. Перелік славних імен тогочасних генетиків не можна читати без шанобливого захоплення. Очолюють список вчені зі світовим ім'ям: М. І. Вавилов, М. К. Кольцов, Т. Г. Добржанський, О. С. Серебровський, Ю. О. Філіпченко, Г. Д. Карпеченко, С. С. Четвериков, С. Г. Навашин, Г. А. Левитський, А. О. Сапєгін, В.Л Симиренко. Плідно працювали в СРСР запрошені іноземні вчені: Вільям Бетсон, Сідней Харланд, Кирил Дарлінгтон, Ервін Баур, Ріхард Гольдшмідт, Кельвін Бріджес, Герман Мюллер та ін., а Томас Морган у 1933 р. навіть став чл.-кор. АН СРСР. Щоправда після серпневої (1948 р.) сесії ВАСГНІЛ він відмовився від цього почесного звання на знак протесту на переслідування генетики в СРСР [21, 29–32].

Більшість навчальних і науково-популярних джерел пов'язують ідеологічні гоніння на генетику з сумнозвісною серпневою (1948 р.) сесією ВАСГНІЛ, однак масований наступ на менделізм розпочався ще наприкінці 1920-х рр., невдовзі після переведення Академії наук у відання Ради народних комісарів, хоча періодичні арешти генетиків практикувались і раніше під різними приводами. Арештовували М. К. Кольцова, С. С. Четверикова та їхніх учнів, у 1930-х — Г. А. Левитського, В.Л Симиренка, а в 1940-х заарештували М. І. Вавилова, Г. Д. Карпеченка та ін. [21, 31, 32]. Неповерненцем став Теодозій Добржанський, котрий у 1931 р. прийняв болісне для себе і сім'ї рішення не повертатися у сталінізуючий СРСР [33]. Однак загалом на кінець 1920-х рр. інституційні позиції класичної генетики в радянській системі державного управління наукою здавалися непорушними, а політичний статус М. І. Вавилова і О. С. Серебровського досягнув у керівництва режиму найвищої точки. У роки НЕПу практично всім талановитим біологам, незалежно від їхнього походження та політичних поглядів, надавалась можливість продовжувати дослідження, керувати лабораторіями, кафедрами, інститутами, готувати наукові кадри. Не випадково саме 1920–30-і рр. стали періодом найвищих досягнень вітчизняних учених, зокрема у дослідженнях з еволюційної теорії, генетики, екології тощо. З'явилася талановита молодь: І. Й. Агол, С. М. Гершензон, М. М. Гришко, Л. М. Делоне, М. П. Дубінін, А. Р. Жебрак, С. Г. Левіт, Ю. П. Мірюта І. М. Поляков, Й. А. Рапопорт, М. В. Тимофєєв-Ресовський, та ін. [31, 32, 34, 35] .

З середини 1930-х рр. сформувалися тенденції (пізніше названі соціополітичною еволюцією СРСР), які згодом призвели до феномену «мічурінської генетики і радянського творчого дарвінізму». Розгорнулася контрольована партійним керівництвом наукова дискусія з питань генетики, головною фігурою якої став Т. Д. Лисенко. У наукових колах тодішніх біологів найбільш непримиренну антименделівську позицію

зайняв К. А. Тімірязєв, багаторазово розтиражовані виступи, статті і книги котрого були спрямовані не стільки на приниження авторитету власне Г. Менделя, як проти його послідовників [36]. Однак незважаючи на арешти можливих опонентів вирішальна сесія ВАСГНІЛ, що відбулася в грудні 1936 р., пройшла не за сценарієм Т. Д. Лисенка. Опір генетиків на цій сесії не було зламано, тож наступна хвиля заходів, спрямованих на придушення генетичної науки, завершилася широкою публічною дискусією, проведеною восени 1939 р. під егідою редакції журналу «Под знаменем марксизма». Керівництво партії і уряду перейшло від наукової дискусії до ідеологічної, різко обмеживши можливості опонентів Т. Д. Лисенка. Повоєнна серпнева сесія ВАСГНІЛ, що розпочала свою роботу 31 липня 1948 р., поставила останню крапку у розгромі генетики в СРСР, і в Україні зокрема [31].

Вчення Г. Менделя було поставлене під сумнів і заплямоване як чуже комуністичній ідеології мракобісся. Самого Г. Менделя зневажливо називали попом, а для його прихильників, як і для самої генетики, за свідченням Л. М. Делоне, було заготовлено ярлик: *продажна дівка імперіалізму*. Феномен міфу про вчення Г. Менделя і той факт, що цей міф у нашій державі розквітнув саме у повоєнні роки, можна пояснити ротацією наукових кадрів, що внаслідок вимивання наукової інтелігенції через еміграцію, політичні переслідування та природного старіння досягла свого піку наприкінці сорокових. Для амбітних, але не вельми обдарованих інтелектом і не переобтяжених науковими знаннями молодих людей з дипломами, що прийшли натомість, які оцінювали все малозрозуміле як дурне й вороже, така обструкція була формою самозахисту на кшталт страусиного хування голови у пісок.

Нормальна наука в чудеса не вірить і чудес не обіцяє. А так хочеться повірити… При читанні стенограми сесії ВАСГНІЛ 1948 р. створюється враження, що у багатьох практичних працівників сільського господарства академічна генетика викликала психологічне відторгнення як щось малозрозуміле і не дуже необхідне для задоволення щоденних потреб. Висловлювання Т. Д. Лисенка про виховання рослин і тварин і про вплив цього виховання на спадковість були для них ближчими [37].

Після жовтневого Пленуму ЦК КПРС 1964 р. класична генетика була формально відновлена в правах, що, втім, почало давати відчутні наслідки лише через 30–40 років, коли прийшли в науку генетики нового покоління. І виникли нові міфи, за якими Г. Мендель вже не видавався дуже набожним, а описувався майже атеїстом, що постригся в монахи у пошуках порятунку від безгрошів'я. Натомість факти свідчать про досить міцні переконання патера Менделя, завдяки чому у 1868 р. його було обрано настоятелем монастиря; що він був досить поважною персоною в Маравській провінції і прославився десятирічною безкомпромісною боротьбою проти прийнятого рейхстагом і затвердженого імператором закону про релігійний фонд, згідно якого було введено непосильне оподаткування монастиря.

Факти з біографії Г. Менделя. Традиційну для біографічних есе хронологію життєпису Г. Менделя викладемо лише одним абзацом, відсилаючи зацікавлених у більш докладній інформації до добротних літературних джерел [3, 6, 12, 17, 20–22]. Отже, фактологічні дані: **народження** — 20 липня (часто в літературі наводиться 22 липня, однак — це дата його хрещення) 1822 р. у Хейнцендорфі (Сілезія, Австрійська імперія) у селянській родині змішаного німецько-слов'янського походження Антона Менделя і Розіни Швіртліх (дехто намагається віднайти єврейський слід у його родоводі); **освіта** — незакінчена вища (за нинішнім протоколом), що включала однокласну сільську школу, чотирикласну школу в Липнику, гімназію міста Троппау, філософські класи при університеті в Ольмюці, після постригу в ченці і прийняття нового імені Грегор продовжив освіту у богословському училищі при монастирі святого Фоми, пізніше були ще чотири семестри у Віденському університеті; **сімейний стан** — неодружений і бездітний, у відповідності з монастирським статутом; **професійно-творча діяльність** — частково вже висвітлена, можна додати, що рівнобіжно з монастирськими обов'язками Г. Мендель виконував обов'язки вчителя гімназії в Цнаймі, де викладав математику й грецьку мову, пізніше — помічника вчителя у реальному училищі, де викладав фізику й природознавство, а також завідував природничо-історичними колекціями училища, а зосередившись на церковній службі у 1868 р. він був обраний на пост настоятеля монастиря, на якому віддано служив до 6 січня 1884 р., коли зупинилося серце мислителя. Ховали отця Грегора всім Брюном [6, 17]. Можна лише додати, що незакін-

чена вища освіта Г. Менделя поряд з виключно богословськими дисциплінами включала вивчення грецької, халдейської, сірійської й арабської мов, лекції з сільського господарства професора Ф. Дибеля, комплекс філософських наук, а також математику й фізику. Не кожен з нинішніх фахівців, що хизуються кількома дипломами, годен позмагатися з брюнським ченцем за освіченістю.

Перспективи менделізму. Нині, на тлі безперечного всепланетного тріумфу класичної генетики, що стала основою багатьох фундаментальних і прикладних дисциплін, зауважимо, що лисенківщина ще не повністю втратила свої позиції у світовій біології, і склалася абсолютно парадоксальна ситуація, коли на батьківщині М. І. Вавилова зачитуються епатажними пасквілями, що паплюжать і Г. Менделя, і А. Вейсмана, і Т. Моргана, а також і М. І. Вавилова, й Й. А. Рапопорта, і багатьох їхніх послідовників, вихваляючи і Й. В. Сталіна, і Т. Д. Лисенка, вже навіть не прикриваючись, як колись, авторитетом І. В. Мічуріна [38].

Натомість в Україні практично не спостерігається жодних рецидивів лисенківщини, в наукових колах усталилось розуміння, що без розвитку генетики були б неможливі радикальні зміні, які відбулися в 40–70-х роках минулого сторіччя і увійшли в світову історію як «зелена революція» Нормана Борлоуга. Так само неможливою була б нова біотехнологічна хвиля «зеленої революції», внаслідок чого вже розроблено технології, використання яких дасть змогу надійно прогодувати майбутнє 10-мільярдне населення планети [39].

На завершення оповіді доречно навести імена наших сучасників, що нині успішно розвивають вчення Г. Менделя в Україні, однак пам'ятаючи стару мудрість, що велич можна побачити лише на відстані, назву лише кілька прізвищ з великої когорти найбільш послідовних (на вельми суб'єктивну думку автора) генетиків, розташувавши їх в алфавітному порядку — Ю. В. Вагін, Ю. Ю. Глєба, В. А. Кунах, С. С. Малюта, В. В. Моргун, О. О. Созінов, А. Ф. Стельмах. Мабуть є інші достойники, котрі залишились за межами цього списку, тож маємо дочекатися, коли історія винесе свій справедливий присуд.

Висновки

Генетика як вчення про спадковість і мінливість, закономірності яких були предметом інтенсивних досліджень кількох поколінь вчених-натуралістів, утвердилась як могутня реалія на рубежі XIX і XX століть. Закони, відкриті Грегором Менделем, зламали багато усталених уявлень і догм «старого доброго світу», де панували феноменологічні взаємозв'язки. Геній Г. Менделя дав змогу спростити сутність таємничого явища успадковування до простої комбінаторики генів і математичних формул, що посприяло надзвичайному прискоренню науково-технічного прогресу в біології, а завдяки приладним досягненням у галузях селекції і медицини, забезпечило основи соціального розвитку людства. Динамічний характер генетичних досліджень зберігається і в наш час, оскільки багато невирішених проблем, пов'язаних з потребами людини, лежать саме у галузях генетики, молекулярної біології, нанобіотехнологій. На менделізмі ґрунтувалась «зелена революція», під знаком менделізму набирає потужності її нова біотехнологічна хвиля, а велич постаті Грегора Менделя набуває все більшої значущості й привабливості як справжнього вченого — взірця для наслідування як для нинішнього, так і для прийдешніх поколінь науковців. Його приклад набуває особливого значення для науковців XXI сторіччя, що працюють і працюватимуть в умовах потужних міждисциплінарних синергетичних досліджень, а значить, нових ідей, теорій, образів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Selye H. From dream to discovery: On being a scientist (History, philosophy and sociology of science).— N.Y.: McGraw-Hill Book Company, 1964.— 407 p.
2. Кунах В. А., Опалко А. І. Менделізм як теоретична база пояснення явища гетерозису (до 150-річчя оприлюднення Грегором Менделем результатів «дослідів над рослинними гібридами») // Генетика і селекція: досягнення та проблеми: Тез. доп. міжнарод. наук. конф., присв. 110-річчю від дня народ. … Ю. П. Мірюти (м. Умань, 18–20 березня 2015 р.) / [Редкол.: О. О. Непочатенко (відп. ред.) та ін.].— Умань: УНУС, 2015.— С. 6–7.
3. Opitz J. M., Bianchi D. W. Mendel: Morphologist and mathematician founder of genetics — to begin a celebration of the 2015 sesquicentennial of Mendel's presentation in 1865 of his Versuche über Pflanzenhybriden // Molecular genetics and genomic medicine.— 2015.— 3, № 1.— P. 1–7.
4. Самин Д. К. 100 великих учёных.— М.: Вече, 2000.— 590 с.

5. Mendel G. Versuche über Pflanzen-Hybriden // Verhandlungen des Naturforschenden Vereins zu Brünn.— 1866.— Bd. 4.— S. 3–47.
6. Володин Б.Г. Мендель. (*Vita aeterna*) .— М.: Молодая гвардия, 1968.— 256 с.
7. Darwin Ch. On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life.— London: J. Murray, 1859.— 502 p.
8. Косенко І.С., Опалко А.І. Еволюція рослинного світу в природному і культигенному середовищі // Вісник УТГіС.— 2010.— 8, № 1.— С. 189–194.
9. Семушкин А.В. Эмпедокл.— М.: Мысль, 1994.— 251 с.
10. Романець О.В. Передісторія розвитку генетики: світовий контекст // Наука і наукознавство.— 2010.— № 4.— С. 48–60.
11. Гиппократ. Избранные труды [Ред. В.П. Карпов] .— М.: Биомедгиз, 1936.— 736 с.
12. Гайсинович А.Е. Зарождение и развитие генетики.— М.: Наука, 1988.— 423 с.
13. Ангелов Г. Люди, изменившие мир.— М.: ЛитРес, 2015.— URL: https://books.google.com.ua/books?id=fAxrBgAAQBAJ.
14. Кёльрейтер Й.Г. Учение о поле и гибридизации растений / Классики естествознания [Общ. ред. Н.И. Вавилова] .— М.; Л.: Сельхозгиз, 1940.— 251 с.
15. Лункевич В.В. От Гераклита до Дарвина. Очерки по истории биологии: [В 3 т. М.; Л.: Биомедгиз, 1936; Изд-во АН СССР, 1940–1943] .— 1940.— 2 (XVII–XVIII века) .— 414 с.
16. Савченко С.П., Опалко А.І. Дисперсійний аналіз: можливості й обмеження в аналізі результативності добору // Еволюція рослинного світу в природному і культигенному середовищі: Зб. тез доп. Міжнарод. наук. конф. «Еволюція рослинного світу в природному і культигенному середовищі», присвяченої 200-річчю зо дня народження Чарльза Дарвіна (20–23 жовтня 2009 р.) .— Умань: НДП «Софіївка» НАН України, 2009.— С. 116–117.
17. Кутя С.А., Прохорова Н.С. Грегор Иоганн Мендель — основоположник генетики (к 190-летию со дня рождения) // Український медичний альманах.— 2012.— 15, № 6.— С. 103–104.
18. De Vries H. Das Spaltungsgestetz der Bastarde // Berichte der Deutsche Botanischen Gesellschaft.— 1900.— Bd. 18.— S. 83–90.
19. De Vries H. Sur la loi de disjonction des hybrides // Comptes rendus Academie des Sciences (Paris) .— 1900.— 130.— P. 845–847.
20. Monaghan F.V., Corcos A.F. Reexamination of the late of Mendel's paper // J. Heredity.— 1987.— 78.— P. 116–118.
21. Жимулёв И.Ф. Общая и молекулярная генетика: Учебное пособие.— Новосибирск: Изд. Новосиб. универ., 2002.— Гл. 1. Предмет и история генетики.— С. 1–30.
22. Donnelly S. Did Darwin read Mendel? // QJM.— 2009.— 102.— P. 587–589.
23. Dawkins R. The greatest show on Earth: The evidence for evolution.— N.Y.: Simon and Schuster, 2009.— 470 p.
24. Focke W.O. Die Pflanzen-Mischlinge: ein Beitrag zur Biologie der Gewächse.— Berlin: Gebr. Borntraeger, 1881.— 569 p.
25. Jenkin H.C.F. The origin of species // North British review.— 1867.— 46.— P. 277–318.
26. Dobzhansky Th. Genetics and the origin of species.— N.Y.: Columbia University Press, 1937.— 380 p.
27. Попов И.Ю. Появление концепции направленной эволюции // Эволюционная биология: история и теория.— СПб: СПбФИИЕТ РАН, 2003.— Вып. 2.— С. 155–172.
28. Fisher R.A. Has Mendel's work been rediscovered? // Annals of Science (London) .— 1936.— 1.— P. 115–137.
29. Brozcaronek J. Extension of political domination beyond Soviet genetics // Science.— 1950.— 111, № 2885.— P. 389–391.
30. Gershenson S.M. The grim heritage of Lysenkoism: four personal accounts. IV. Difficult years in Soviet genetics // The Quarterly review of biology.— 1990.— 65, № 4.— P. 447–456.
31. Глазко В.И, Чешко В.Ф. Август — 48. Феномен «пролетарской науки» (научное киллерство, к истории советской генетики, к феномену распада СССР): Монография.— М.: НЕФТиГАЗ.— 2013.— 385 с.
32. Кунах В.А. Розвиток генетики в Національній академії наук України. До 90-річчя від часу заснування Української Академії Наук / В.А. Кунах.— К.: Академперіодика, 2009.— 102 с.
33. Конашев М.Б. Страсти по Феодосию, или как и почему Ф.Г. Добржанский стал «невозвращенцем» // Вестник ВОГиС.— 2013.— № 1.— С. 202–209.
34. Моргун В.В., Чучмий И.П. Учитель и друг // Иосиф Абрамович Рапопорт — ученый, воин, гражданин. Очерки. Воспоминания. Материалы.— М.: Наука, 2001.— С. 259.
35. Парій Ф.М. Ю.П. Мірюта — видатний генетик вавилівської плеяди вчених (до 110-річчя з дня народження) // Генетика і селекція: досягнення та проблеми: Тез. доп. міжнародної наукової конференції / Присв. 110-річчю

від дня народ. … Ю. П. Мірюти (м. Умань, 18–20 березня 2015 р.) / [Редкол.: О. О. Непочатенко (відп. ред.) та ін.].— Умань: УНУС, 2015.— С. 3–5.
36. Тімірязєв К. А. Дарвінізм і селекція: вибрані статті / [Ред.: В. Л. Комаров] .— Київ; Харків: Держсільгоспвидав, 1938.— 156 с.
37. Багоцкий С. В. Пятьдесят лет без Лысенко // Химия и жизнь — XXI век.— 2014.— № 9 — С. 48–50.
38. Мухин Ю. И. Продажная девка Генетика.— М.: Изд. Быстров, 2006.— 416 с.
39. Opalko A. I., Opalko O. A. Anthropoadaptability of plants as a basis component of a new wave of the «Green revolution» // Biological systems, biodiversity, and stability of plant communities [Eds. Larissa I. Weisfeld, Anatoly I. Opalko, Nina A. Bome et al.].— Toronto NJ: Apple Academic Press, 2015.— Part 1: The optimization of interaction anthropogenic changes with natural environmental variability for sustainable land use.— P. 3–17.

OPALKO A.I.
National dendrological park «Sofiyivka» of NAS of Ukraine,
Ukraine, 20300, Uman, Kiyivska str., 12A, e-mail: opalko_a@ukr.net

PERSONALITY OF GREGOR MENDEL: MYTHS AND REALITIES. THE 150TH ANNIVERSARY OF MENDEL'S DISCLOSURE OF HIS RESULTS OF «EXPERIMENTS ON PLANT HYBRIDS»

Aims. In order to know the personality of Gregor Mendel as one of the most outstanding figures of the XIXth century, whose efforts have laid the foundations of a new science of life — genetics, we had to find out the sources of his formation and development. ***Methods.*** We've used the biographic method of studying an individual way, life experience and the scientific publications so that to make our investigation. ***Results.*** The meaning of some objective and subjective factors which braked Mendelizm recognition, so as the removal of biological sciences from mathematics and imperfection of experiment methodology and excitement discussion developed in the biological science, concerning the book by Charles Darwin «On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life» which had been published six years earlier; was find out owing to the retrospective analysis of Mendelism history as the basis of classical genetics. The efforts of an ancient authors so as the attempts of philosophers of the Age of the Enlightenment which tried to discuss the facilities before Gregor Mendel were observed. The reasons of Gregor Mendel and Mendelism mythologizing were discussed while the odious myths were rebutted. The individual aspects of Lysenkoism bad influence onto the biologiacal science in the USSR and Ukraine were revealed. ***Conclusions.*** An outstanding figure of Gregor Mendel have been obtained the greatest significance and attraction; he was really great scientist — example for imitation for the present and coming generation of scientists. His example became the more meaningful for the scientists of XIXth century who have been developing the genetics in the conditions of powerful synergistic researches so as the new ideas, theories and images.
Keywords: Charles Darwin, Green revolution, history of genetics, life sciences, Lysenkoism, Mendelism, synergistic research.

УДК 575.2+575.222.73

АНТОНЮК М. З., ШТЕФЮК Т. В., ТЕРНОВСЬКА Т. К.
Національний університет «Києво-Могилянська Академія» МОН України,
Україна, 04070, м. Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: m_antonyuk@yahoo.com

МІКРОСАТЕЛІТНИЙ АНАЛІЗ СТІЙКИХ ДО БОРОШНИСТОЇ РОСИ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ РІЗНОГО ПОХОДЖЕННЯ

На сьогодні у м'якої пшениці локалізовано 53 гени вертикальної стійкості до борошнистої роси (*Pm*), серед яких близько 30 привнесені до геному м'якої пшениці від її дикорослих родичів [1], зокрема від представника роду егілопс — від *Aegilops speltoides Pm12* (6BS-6SS.6SL), *Pm32* (1BL-1SS), *Pm53* (5BL), геном якого є близький до B субгеному пшениці [2]. Гени *Pm*, які надають рослинам повну резистентність до збудника, є компонентами системи ген-на-ген, і їхня ефективність швидко втрачається через постійний процес коеволюції пари збудник-резидентний організм. Тому поповнення генного пулу пшениці за рахунок інтрогресії генів стійкості від дикорослих родичів є завданням, яке не втрачає своєї актуальності. Інтрогресивні лінії м'якої пшениці, створені методами геномної та хромосомної інженерії та стійкі до борошнистої роси, мають бути вивченими щодо структури свого геному в термінах обсягу чужинного хроматину, який включає до себе ген стійкості: стійкі лінії можуть бути хромосомно-заміщеними або транслокованими. Організація подальшої роботи з ними цілком залежить від їхньої геномної структури щодо наявного обсягу чужинного хроматину, а також визначення його гомеологічної належності. Дане дослідження проведено з метою знайти лінії з таким сполученням алелів мікросателітних локусів, які б відповідали хромосомі певної гомеологічної групи чужинного геному.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал: сорт Аврора, створені на основі його тетракомпоненту AABB геномно-заміщені амфідиплоїди Аврозис (AABBS^{sh}S^{sh} — геном S^{sh}від *Aegilops sharonensis*), Авродес (AABBSS — S геном від *Ae. speltoides*), Авролата (AABBUU — U геном від *Ae. umbellulata*) [3]; набір цитологічно стабільних інтрогресивних ліній м'якої пшениці, стійких до борошнистої роси, які є похідними від геномно-заміщених амфідиплоїдів (3 лінії-похідні Аврозису, 13 ліній-похідних Авролати та 24 лінії-похідні Авродесу). Виділення ДНК досліджуваних рослин проводили за модифікованою ЦТАБ-методикою. Мікросателітний аналіз здійснили з праймерали, відібраними до SSR-локусів хромосом D субгеному пшениці (табл.). Розділення продуктів ампліфікації та візуалізацію результатів проводили у 6 % ПААГ за денатуруючих умов та у 2 % агарозному гелі.

Результати та обговорення

Серед поліморфізмів за мікросателітними локусами, які були виявлені при дослідженні стійких інтрогресивних ліній м'якої пшениці, спостерігалися: спектри, частково ідентичні до одного із компонентів ініціального схрещування (Авродес × Аврора, Аврозис × Аврора, Авролата × Аврора, далі згадуються як батьки), спектри із відсутнім одним або декількома компонентами, властивими батькам; окремі спектри із новими компонентами, відмінними від обох батьківських спектрів; повна відсутність компонента у спектрі (нуль-алель) за наявністю таких компонентів в спектрах ДНК батьків.

Першу хромосому субгеному D було вивчено лише за 3-ма SSR-локусами, локалізованими на короткому плечі. Два з трьох локусів вказані оріґінаторами як специфічні не лише до хромосоми 1D, а й інших хромосом гомеологічної групи 1 (*Xgwm33*-1A, 1B, 1D, *Xgwm106*-1B, 1D). Оскільки кожен з геномно-заміщених амфідиплоїдів мав на спектрі ДНК, отриманому з праймерами вказаних локусів, специфічні компоненти, ампліфікація відбувається з ДНК хромосом 1-ї групи трьох видів егілопсу також. Локус *Xcfd92*-1D виявився неінформативним через відсутність у спектрах амфідиплоїдів специфічних компонентів: компонент, який у наявності у спектрі амфідиплоїда, співпадає за рухливістю з одним із двох компонентів спектра, які продукує ДНК Аврори. Відсутність у спектрі лінії іншого компонента, притаманного ДНК Аврори, не можна розглядати як прямий

© АНТОНЮК М. З., ШТЕФЮК Т. В., ТЕРНОВСЬКА Т. К.

Таблиця

Хромосомне розташування мікросателітних локусів, задіяних у дослідженні

Хромосома	1D	2D	3D	4D	5D	6D	7D
Коротке плече*	*Xgwm33* *Xcfd92* *Xgwm106*	*Xcfd56* *Xcfd43*	*Xcfd152* *Xcfd55* *Xcfd141* *Xcfd64* *Xcfd34* *Xcfd201* *Xcfd223*	*Xwmc285* *Xwmc89* *Xcfd106*	*Xcfd18* *Xgwm190* *Xcfd189* *Xbarc143*	*Xbarc173* *Xcfd42* *Xcfd132* *Xbarc196*	*Xwmc506* *Xcfd41* *Xbarc154* *Xgwm44* *Xbarc111*
Довге плече		*Xcfd17* *Xcfd161*	*Xcfd9* *Xcfd211* *Xwmc552* *Xgdm72*	*Xwmc399* *Xcfd84*	*Xcfd8* *Xwmc434* *Xcfd86* *Xwmc443*	*Xcfd287* *Xcfd95* *Xcfd60* *Xbarc96*	*Xbarc172* *Xbarc53* *Xcfd69*

* Для короткого плеча локуси наведені у порядку від теломери до центромери, для довгого плеча — від центромери до теломери.

доказ наявності чужинного хроматину у геномі лінії. Така відсутність може тільки непрямим чином підтримувати висновок, отриманий за рахунок більш переконливих доказів. Такий локус ми вважаємо за напівінформативний. Найхарактернішою рисою спектрів, отриманих з праймерами локусів, специфічних до хромосом 1-ї гомеологічної групи, є поява у спектрах помітної кількості компонентів, які можуть продукуватися лише «іншими» алелями, тобто такими, які не були притаманні ні Аврорі, ні геномно-заміщеному амфідиплоїду. Ми не маємо жодної можливості обговорювати механізми утворення таких локусів. Лише зауважимо, що короткі плечі хромосом 1-ї групи містять гліадинові гени, високий рівень мінливості яких доведено у геномі інтрогресивних ліній [4], і ця мінливість знаходить пояснення у характерних особливостях будови цих генів [5, 6]. Серед морфологічних маркерів хромосом 1-ї групи егілопсів є дуже виразний: рослини, листя яких вкриті восковою осугою, мають зелений (без воскової осуги) колос. Вид рослин дуже характерний, такі рослини завжди відбирались для подальшої роботи при створенні інтрогресивних ліній. Можливо, це непрямим чином вплинуло на підвищення концентрації серед стійких ліній таких, що їхній геном зазнав перебудов за участю хромосоми егілопсау 1-ї гомеологічної групи. Серед вивчених нами стійких до борошнистої роси ліній зелений колос мали: одна лінія — похідна Аврозису, 5 ліній — похідних Авролати, а одна лінія — похідна Авродесу була повністю позбавлена воскової осуги. Раніше нами було показано при гібридологічному аналізі геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротика, що у контролі ознаки «відсутність воскової осуги» беруть участь гени 1-ї та 2-ї хромосом егілопса [7]. Можливо, що стійкі лінії з зеленим колосом містять у геномі хромосому 1-ї групи егілопса, проте не нативну, а перебудовану. Оскільки перебудованою хромосомою 1-ї групи характеризуються не більшість стійких ліній, а лише деякі, можна вважати, що ця хромосома не долучається до контролю стійкості ліній до борошнистої роси.

Серед чотирьох мікросателітних локусів, специфічних до хромосоми 2D, обмежену специфічність мав лише локус *Xcfd56*-2B, 2D і саме цей локус, а також локус *Xcfd161*-2D були неінформативними для всіх амфідиплоїдів: з праймерами до першого локусу амфідиплоїди взагалі не давали компонентів, другого — давали спектр, що співпадає зі спектром Аврори. За локусом *Xcfd56*-2B, 2D лінії демонстрували або спектр Аврори, або обмежену кількість інших алелів. З праймерами локусу *Xcfd161*-2D ДНК ліній майже завжди мали інший алель. З праймерами локусів *Xcfd43*-2DS, *Xcfd17*-2DL ДНК амфідиплоїдів дає специфічну картину ампліфікації з двома та трьома компонентами, в той час як ДНК Аврори продукує лише один компонент. Чужинними ампліконами за локусом *Xcfd17*-2DL характеризуються три лінії — похідні Аврозису. Колосся цих ліній не має морфологічного маркера, що характеризує лінії з заміщенням хромосоми 2D (жорстка луска без вдавленості у своїй основі). Скоріш за все, геноми ліній мають тільки транслокацію, що включає локус *Xcfd17*-2DL. За локусом *Xcfd43*-2DS в спектрах цих ліній всі алелі інші. Три лінії — похідні Авролати характеризуються чужинним алелем за кожним із згаданих локусів, *Xcfd17* та *Xcfd43*. Ті самі лінії мають жорстку луску без вдавленості. Схоже, що вказані лінії мають чужинне заміщення 2U/2D. Так само характеризуються дві лінії — похідні Авродесу, хоча для останньої ми не маємо

характеристики луски. Переважна кількість ліній за цими двома локусами мають інші алелі, не такі, що властиві Аврорі або амфідиплоїду. Знову потрібно підкреслити, що наявність морфологічного маркера, що легко ідентифікується (жорстка луска без вдавленості), підвищує концентрацію лінії з відповідним гомеологічним хроматином серед розмаїття інтрогресивних ліній у порівнянні з лініями, для яких нами не було вчасно знайдено ефективного морфологічного маркера. У цілому немає підстав вважати, що стійкість до борошнистої роси пов'язана з хроматином хромосом егілопсу 2-ї гомеологічної групи.

Всі мікросателітні локуси хромосоми 3D, за даними оригінаторів, специфічні лише для цієї хромосоми і практично всі не мають маркерного потенціалу для хромосом егілопсів. Спектри ДНК амфідиплоїдів або співпадають зі спектром ДНК Аврори (*Xcfd223* для всіх трьох, *Xcfd55* для Аврозису, Авролати, *Xcfd64* та *Xcfd201* для Аврозису, Авродесу), що робить їх повністю неінформативними, або амфідиплоїди характеризуються 0-алелями (*Xcfd152–3D, Xcfd9, Xgdm72* для трьох амфідиплоїдів, *Xcfd141, Xwmc552* для Аврозису, Авродесу, *Xcfd34* для Аврозису, Авролати, *Xcfd55* для Авродесу). Цінність таких спектрів також обмежена, адже повноцінним доказом наявності чужинного хроматину у геномі має слугувати наявність відповідного, специфічного компонента у спектрі. Таких компонентів для хромосом 3-ї групи лише три: *Xcfd211* для Авролати, *Xcfd211* для Авролати та Авродесу. Всі три лінії — похідні Аврозису, схоже, мають хромосому 3D, можливо з деякими змінами у порівнянні з 3D Аврори, але без жодного доказу присутності чужинного хроматину. Серед похідних Авролати є лінії, що мають у спектрах ДНК по одному (п'ять ліній) чи два (три лінії) маркери U хромосоми. Проте таким маркером переважно є відсутність компонентів у спектрі, а такий доказ наявності чужинного хроматину є лише непрямим. Можна припустити, що хромосома 3D згаданих ліній має транслокацію чужинного гомолога, але потрібні додаткові докази. Серед ліній — похідних Авродеса, маркерні компоненти його спектра з'являються частіше. Можливо, що п'ять ліній серед 24-х є чужинним заміщенням 3S/3D, тому що жодного компонента спектра, притаманного спектру Аврори, ДНК цих ліній не утворює. Наявність неінформативних компонентів картину не прояснює. Деякі лінії, схоже, мають рекомбінантну хромосому, в якій прицентромерний регіон складається з хроматину Аврори, а дистальні частини хромосоми представлені хроматином егілопса. Серед 24 ліній лише три не мають у спектрі ДНК маркерів (прямих чи непрямих) егілопсу, але і спектру Аврори вони не відповідають: мають або інші алелі, або неінформативні компоненти спектра, наявність яких можна розглядати на користь наявності хроматину як Аврори, так і егілопсу. За результатами мікросателітного аналізу схоже, що ген стійкості до борошнистої роси містить хроматин хромосоми 3S Авродесу.

Серед п'яти мікросателітних локусів, вивчених для ідентифікації хроматину 4-ї гомеологічної групи, один був специфічний до всіх трьох хромосом та виявився неінформативним для всіх амфідиплоїдів, оскільки мав електрофоретичний продукт такий самий, як і з ДНК Аврори (*Xwmc89*). Для ДНК Аврозису неінформативними виявилися ще три локуси, *Xcfd106*, *Xwmc399*, *Xcfd84* через збіг спектрів Аврозису та Аврори. Локус *Xwmc285* мав обмежену інформативність, оскільки ампліфікація з ДНК Аврозису не відбувалася. Отже, лінії — похідні Аврозису охарактеризувати щодо наявності чужинних включень хроматину $4S^{sh}$ хромосоми не вдалось. Те саме стосується ліній — похідних Авролати, тільки інший локус не дає ампліфікації з ДНК Авролати, це *Xcfd106.* ДНК двох ліній Авролати не ампліфікується з праймерами цього локусу, що непрямо вказує не можливу інтрогресію хроматину 4U в цих лініях. Для одної з цих ліній це підтверджується фенотипом електрофоретичного спектра β-амілази. Для ліній — похідних Авродесу неінформативними виявилися всі досліджені локуси. Деякі лінії містять «нові» компоненти спектра стосовно батьківських. Хоча таких компонентів було зареєстровано помітно менше, ніж для локусів, специфічних до хромосом 1-ї та 3-ї гомеологічних груп, вони реєструються в одних і тих самих лініях для різних досліджених мікросателітних локусів. Це може вказувати на перебудову хромосоми 4D ліній у порівнянні з такою сорту Аврора. Немає підстав вважати, що наявність чужинного хроматину 4-ї гомеологічної групи властива всім лініям певного походження, стійким до борошнистої роси.

З семи мікросателітних локусів, специфічних до хромосоми 5D, два, *Xcfd8* та *Xwmc434*, були неінформативними для Аврозису, оскільки спектри його ДНК збігалися зі спектрами ДНК Аврори. За локусами *Xgwm190* та *Xcfd86* ДНК Аврозису компонентів не давала, а праймери локусів *Xcfd18*, *Xcfd189*, *Xbarc143, Xwmc443* давали специфічний

компонент з ДНК Аврозису та є інформативними. Інші компоненти, у порівнянні з батьківськими, продукували праймери локусів *Xcfd189*, *Xwmc443* (інформативні) та *Xwmc434* (неінформативний). Специфічний для Аврозису спектр мала лише лінія res113 за локусом *Xwmc443*, дистальним на довгому плечі хромосоми. Можна припустити наявність чужинної транслокацій на плечі 5DL. Інші алелі в локусах *Xcfd189* та *Xwmc434* можуть розглядатися на користь припущення про наявність внутрішньохромосомних перебудов у хромосомі 5D Аврори. Для Авролати неінформативним був локус *Xcfd18*, а за локусами *Xgwm190*, *Xbarc143*, *Xcfd8* ДНК Авролати компонентів не утворює. За інформативними локусами спектри ДНК ліній не мали компонентів, властивих Авролаті, за виключенням однієї, яка за локусом *Xcfd189* відповідала Авролаті і, як Авролата, мала 0-алель за локусом *Xbarc143*. Можливо, лінія має транслокацію 5DS/5US. Локус *Xcfd18* характеризується високою частотою утворення нових алелів. ДНК 10 ліній з 13 демонструє три нові алелі. Нуль-алель також є новим, якщо жоден з батьків не характеризувався таким алелем. Отже, алелі деяких ліній за локусами *Xcfd86* та *Xwmc443* також є новими і у цілому хромосом 5D у інтрогресивних лініях — похідних Авролати показує ознаки неідентичності хромосомі 5D Аврори. Для ДНК Авродесу неінформативними є локуси *Xwmc434* та *Xcfd86.* Специфічні для Авродесу компоненти спектра утворюються з праймерами локусів *Xcfd18* та *Xcfd189.* Чотири локуси, *Xgwm190, Xbarc143, Xcfd8, Xwmc443*, характеризуються 0-алелями з ДНК Авродесу. За дистальним локусом короткого плеча чужинним алелем характеризуються шість ліній, що дає підстави припустити транслокацію. Для двох ліній з шести це підтверджується 0-алелем за наступним маркером. Зміна на чужинні алелі знайдена у ДНК однієї з ліній за локусами *Xcfd189* та *Xbarc143*, розташованими поруч на короткому плечі ближче до центромери. Частою появою нового алеля в лініях — похідних Авродесу характеризується локус *Xbarc143.* 0-алель характеризує не лише ті локуси, за якими він властивий Авродесу, але з'являється у якості нового алеля для неінформативних локусів. У цьому випадку ми його розглядаємо як новий, поява якого дає підстави припустити наявність якихось змін у хромосомі 5D Аврори. Нові алелі спостерігали за 6-ма локусами з восьми вивчених. Зміни хромосоми 5D, ідентифіковані мікросателітним аналізом, не носять систематичного характеру серед всіх ліній певного походження, тому немає підстав вважати, що наявність чужинного хроматину 5-ї гомеологічної групи спричинює стійкість ліній до борошнистої роси.

Більшість локусів, специфічних до хромосоми 6D, виявились напівінформативними через 0-алель, властивий геномно-заіщеному амфідиплоїду. Це локуси *Xcfd60* для трьох амфідиплоїдів, *Xbarc173, Xcfd132, Xbarc196, Xcfd95* для Аврозису та Авролати, *Xcfd42* для Авролати та Авродесу та *Xbarc96* для Авролати. Спектри Аврори та амфідиплоїдів співпадали для локусів *Xcfd42* (Аврозис), *Xbarc173, Xcfd132, Xbarc196, Xbarc96* (Авродес), *Xcfd287*-0-алель у всіх випадках. Специфічність до чужинного хроматину виявлено лише для двох локусів: *Xcfd95* для Авродеса та *Xbarc96* для Аврозису. Жодну з ліній — похідних Авролати не можна характеризувати як таку, що містить чужинний хроматин від амфідиплоїда, судячи за даними мікросателітного аналізу. Одна з ліній Аврозису характеризується специфічним для Аврозису алелем за локусом *Xbarc96.* Алелі за іншими локусами або нові, або властиві ДНК Аврори. Половина з вивчених ліній — похідних Ародесу характеризуються за інформативним локусом *Xcfd95* алелем, властивим Авродесу. Цей локус розташований на довгому плечі 6D близько до центромери. 5 локусів цієї хромосоми для Авродесу неінформативі, тобто не можна стверджувати, що хромосома 6D ліній аналогічна нативній хромосомі Аврори і не містить хроматину хромосоми 6S. 12 ліній із 24 перевірених стійких до борошнистої роси, мають специфічний для Авродесу алель прицентромерного SSR-локусу. Можна припустити, що хромосома 6S містить ген (гени), що забезпечують стійкість до борошнистої роси та запровадити дослідження з перевірки цього припущення. Інші алелі були знайдені для всіх локусів, крім найближчих до центромери. Можливо, досліджена хромосома є рекомбінантною, проте рекомбінація здійснювалась не на хромосомі 6D, а на хромосомі 6S.

Локуси хромосоми 7D, дають специфічні продукти ампліфікації з Аврозисом (*Xgwm44, Xcfd69*), Авролатою (*Xbarc154, Xbarc172*), Авродесом (*Xbarc154, Xgwm44, Xbarc172*). Неінформативних локусів відносно мало, це *Xwmc506* та *Xgwm44* для Авролати, *Xwmc506* та *Xcfd41* для Авродеса. Всі інші сполучення локус-амфідиплоїд — це відсутність продукта ампліфікації, тобто 0-алель. Три лінії — похідні Аврозису демонструють повну подібність Аврорі за мікросателітними локусами хромосоми 7D за єдиним винятком, коли з ДНК двох ліній з праймерами локусу

Xbarc172 утворюється інший компонент спектра. Серед ліній — похідних Аврорати за жодним локусом в лініях не було виявлено подібності до Аврорати. В лініях переважали алелі, властиві Авроpі, траплялись інші алелі, в тому числі 0-алелі. Серед ліній — похідних Авродесу алелі, специфічні для цього амфідиплоїда є для кожного з трьох інформативних локусів. Одна з ліній має або заміщення 7D/7S або значно перебудовану хромосому. За кількома локусами відрізняються від 7D хромосоми чотирьох ліній, за одним-двома локусами — п'яти ліній. Отже, 10 ліній з 24 стійких до борошнистої роси виявилися носіями не інтактної хромосоми 7D. Слід перевіряти припущення, що ця хромосома несе ген стійкості до борошнистої роси, отриманий від *Ae. speltoides*.

Висновки

Потенціал мікросателітного аналізу для дослідження структури генома інтрогресивної лінії обмежений алополіплоїдною структурою м'якої пшениці, яка може перетворювати хромосомну специфічність деяких SSR-локусів на специфічність до гомеологічної групи в цілому (transferability — перенесення специфічності на іншу хромосому тієї самої гомеологічної групи). Саме перенесення специфічності робить можливим використання праймерів локусів, розроблених для хромосом геному D пшениці, для ампліфікації ДНК егілопсів. Інформативним є такий локус, який дає специфічні компоненти ампліфікації з ДНК Аврори та ДНК геномно-заміщених амфідиплоїдів. Локус, праймери якого формують однакові спектри ампліфікації для вказаних ДНК, є напівінформативним і має діагностичну цінність лише у сполученні з результатами аналізу ДНК лінії за інформативними локусами. Стійкість ліній до борошнистої роси пов'язана за хроматином *Ae. speltoides* 3-ї, 6-ї, та 7-ї гомологічних груп. Для ліній — похідних Аврозису та Аврорати, критичних для цільової ознаки хромосом не встановлено.

ЛІТЕРАТУРА

1. McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat.— 2013–2014 Supplement.
2. Peterson S., Lyerly J.H., Worthington M.L., Parks W.R., Cowger C., Marshall D.S., Brown-Guedira G., Murphy J.P. Mapping of powdery mildew resistance gene *Pm53* introgressed from *Aegilops speltoides* into soft red winter wheat // Theor. Appl. Genet.— 2015. DOI 10.1007/s00122-014-2430-8.
3. Жиров Е.Г., Терновская Т.К. Геномная инженерия у пшеницы // Вестник с.-х. науки.— 1984.— № 10.— С. 58–66.
4. Михайлик С.Ю., Антонюк М.З., Терновська Т.К. Можливі молекулярні механізми мінливості гліадинових генів в інтрогресивних лініях пшениці // Фактори експериментальної еволюції організмів.— К.: Логос, 2014.— 14.— С. 62–66.
5. Anderson O.D., Huo N., Gu Y.Q. The gene space in wheat: the complete γ-gliadin gene family from the wheat cultivar Chinese Spring // Funct Integr Genomics.— 2013.— 13.— P. 261–273.
6. Gu Y.Q., Crossman C., Kong X., Luo M., You F.M., Coleman-Derr D., Dubcovsky J., Anderson O.D. Genomic organization of the complex alpha-gliadin gene loci in wheat // Theor Appl Genet.— 2004.— 109.— P. 648–657.
7. Shpylchyn V.V., Antonyuk M.Z., Ternovska T.K. Genetic analysis of artificial *Triticinae* amphidiploid Aurotica based on the glaucousness trait // Cytology and Genetics.— 2014.— 48, N 5.— P. 308–317.

ANTONYUK M.Z., SHTEFYUK T.V., TERNOVSKA T.K.

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

MICROSATELLITE ANALYSIS OF THE RESISTANT TO POWDERY MILDEW INTROGRESSIVE WHEAT LINES OF DIFFERENT ORIGIN

Aims. Among resistant to powdery mildew wheat introgressive lines with introgressions from *Ae. speltoides, Ae. sharonensis, Ae. umbellulata*, identify lines with microsatellite loci allele combinations corresponding to chromosome of specific homeological group of alien genome. ***Methods.*** DNA extraction using CTAB method, PCR with primers to SSR loci, electrophoresis in PAAG, silver staining. ***Results.*** Forty introgressive lines have been screened with primers to 3, 4, 11, 5, 8, 8, 8 SSR-loci specific to wheat chromosomes 1D, 2D, 3D, 4D, 5D, 6D, 7D, respectively. Among identified polymorphisms we observed: spectra completely identical to one of the components of the initial cross, partly identical spectra, spectra with new components which were not present in any of the parental forms, and null-alleles in spectra which were not characteristic for parental spectra. ***Conclusions.*** Resistance to powdery mildew in lines derived from Aurodes is caused by the presence of 3S, 6S and 7S chromosomes or their translocations on D chromosomes in their genomes.

Keywords: introgressive wheat lines, powdery mildew resistance, *Pm*, microsatellite analysis, alien translocations, *Aegilops* species.

УДК 581.6:502.7:632.51

БУРДА Р. І.
Інститут еволюційної екології НАН України,
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Лебедєва, 37, e-mail: rayburda@mail.ru

РОЛЬ ЕВОЛЮЦІЇ В ІНВАЗІЯХ СУДИННИХ РОСЛИН

Носіями генетичних ресурсів є від 270 до 320 тис. описаних видів судинних рослин, що нині зростають на Землі. Усі вони мають сформовані протягом історичного розвитку рослинного покриву первинні ареали, зумовлені розподілом сонячної радіації, тепла, вологи, ґрунтових різновидів і решти ресурсів. Інтенсифікація діяльності людини призвела до глобалізації і спричинила природно-антропогенне явище — масові біологічні міграції, зокрема фітоінвазії. Деякі з багатьох умисно або неумисно занесених видів рослин вийшли з-під контролю людини та поширились спонтанно, окремі з них отримали статус «інвазійний вид» (*invasive species*). Це поняття визначено в Конвенції ООН «Про біорізноманіття, 1992» так: вид, що натуралізувався і наніс чи наносить шкоду аборигенним видам, їх угрупованням чи екосистемам в цілому. Ю. Ю. Дгебуадзе [1] вже підкреслював тенденцію авторів сучасних російських наукових публікацій — усі види-вселенці називати інвазійними. Те саме спостерігається у вітчизняній літературі. Втім, усі разом категорії видів, присутність у спонтанній флорі яких є наслідком природно-антропогенних міграцій, тобто вони потрапили в результаті діяльності людини поза межі свого первинного ареалу в зонах, в яких раніше не зростали, належать до адвентивних видів (*adventive species*). Їх найпоширеніші синоніми: екзоти (*exotic species*), або ненативні (*non-native species*), неаборигенні (*non-indigenous species*) види. Останні два поняття подекуди вживаються навіть ширше і є скоріше аналогами поняття «антропофіт». Ним позначають не лише ті види рослин, що спонтанно оселилися, але і культивовані, цілеспрямовано ввезені, тобто інтродуковані.

Спонтанне розповсюдження видів рослин супроводжується подоланням фундаментальних біогеографічних бар'єрів і складається з декількох послідовних етапів, що характеризують будь-яку біологічну міграцію, а саме: занесення, створення колоній, натуралізація — подолання репродуктивного бар'єру, утворення адвентивних популяцій, формування еконіші, набуття фітоценотичного статусу у вже існуючих місцевих угрупованнях чи створення власних моно- і поліценозів, формування вторинного ареалу та функціональних зв'язків у місцевих екосистемах. Утворивши вторинний ареал, адвентивний вид набуває статусу чужорідного (*alien species*). Решта адвентивних видів, які ще не досягли такого статусу, складають нестабільний елемент флори, що об'єднує так звані неофіти.

В останні роки уточнено уявлення про вплив, нанесений інвазійним видом на довкілля, як зміну властивостей екосистеми через присутність чужорідного виду. Йдеться про вплив на природну біоту або екосистемні процеси, похідні від саме цього довкілля. Вплив, який змінює середовище таким чином, що призводить до збіднення місцевого біорізноманіття або шкодить функціонуванню екосистем, оцінюється як згубний. Диференційовані також механізми впливу — категорії, в яких класифікується вплив чужорідних видів. У Глобальній базі даних інвазійних видів (IUCN GISD) [2] розрізняються 13 категорій впливу, а саме: конкуренція, хижацтво, гібридизація, передача захворювань серед аборигенних видів, паразитизм, отруєння (токсичність), біологічне забруднення, випас (поїдання), витоптування, небезпека пожеж, взаємодія з рештою чужорідних видів та інші впливи.

Це повідомлення ставить за мету виявити можливі еволюційні зміни, які сприяють інвазіям судинних рослин.

Матеріали і методи

Критичний аналіз наукових публікацій щодо еволюційних змін судинних рослин при вторгненнях чужорідних видів в умовах вторинних ареалів. Йдеться про фіксовані еволюційні зміни як адвентивних, так й аборигенних видів.

Результати та обговорення

У спонтанній флорі України участь адвентивних видів сягає 18%. Загальна чисельність її адвентивної фракції перевищує 900 видів, а нестабільний елемент в ній складає за різними оцінками 30–40%. Решта 60–70% адвентивної фракції стали чужорідними видами, і лише пев-

© БУРДА Р. І.

на частка серед них набули статусу інвазійних. Чужорідні види судинних рослин розповсюджені у всіх типах антропогенно трансформованих екосистем — від флор природно-заповідного фонду до флор техногенних екотопів, що не мають природних аналогів [3]. Флори територій, що підлягають особливій охороні, не уникли фітоінвазій у різних країнах світу. Проте частка чужорідних видів у флорах природно-заповідного фонду в Україні у середньому на 5–7% вища за флори, що охороняються у прилеглих країнах [4, 5]. Передумовами такої ситуації є не стільки природні особливості території, скільки історія розвитку заповідної справи в Україні, невеликі площі охоронюваних територій, високий ступінь деградації прилеглих угідь і довкілля [6]. На рівнинній частині України чужорідні види рослин освоїли усі типи оселищ у наземних і водних екосистемах, втім, перевагу вони надають трав'янистим біотопам. Луки та степи (тип Е) є найчисельнішими екосистемами-реципієнтами чужорідних видів [7].

Перелік адвентивних видів рослин України з інвазійною спроможністю містить 100–120 видів, натомість чисельність видів з високою інвазійною спроможністю не перевищує 85 [8]. Нагадаймо, кожен серед них змінює довкілля таким чином, що викликає збіднення місцевого біорізноманіття та шкодить функціонуванню екосистем, тобто несе згубний вплив. Зазвичай це виражається не лише у перетвореннях видового складу, а й у порушенні структури угруповань — зміні едифікаторів і домінантів у них, трансформації рослинного покриву, порушенню функціональних (харчових, топічних, форичних тощо) зв'язків екосистеми. Як наслідок, не виключається викривлення передачі енергії, інформаційних потоків, як і спотворення генетичної інформації.

Згадані впливи вважаються загальновизнаними, хоча є низка публікацій, які заперечують їх екологічну загрозу. Хоча швидкість біологічних інвазій та її прискореність в останні роки, з'ясування їх наслідків, а також знань про пом'якшення їх негативного впливу швидко зростає, необхідність науки про біологічні вторгнення є суперечливою [9]. Підставою для скепсису є ряд висловлюваних положень. Наприклад, екологічні системи рідко видаються такими, що мають доведену повну видову насиченість, а вторгнення нових видів не несе негативних змін. Як вважається, конкуренція за ресурси в екосистемі, на відміну від хижацтва, рідко викликає глобальне вимирання. Більш того, формування угруповань відбувається шляхом «екологічного сортування» або «вирівнювання»; адаптивна генетична зміна може відбутися раптово; підходи, основані на кліматичних перетвореннях, можуть бути недостатніми для прогнозування розповсюдження і кінцевого розподілу для багатьох видів тощо. Взагалі питання про те, як занесена рослина реагує на нове середовище в межах вторинного ареалу, не зовсім зрозуміле. Історично склалося так, що основним механізмом, що дозволяє виду-вселенцю колонізувати великі простори, часом з різними екологічними умовами є фенотипічна пластичність. Втім, у низці нових публікацій показано, що сучасна еволюція є більш суттєвим чинником у вторгненні, ніж раніше допускалося [10]. Джон Марон зі співавторами [10] для визначення ролі сучасної еволюції, фенотипічної пластичності і ефекту засновника у впливі на фенотипічну мінливість серед занесених рослин *Hypericum perforatum* L. порівнювали розмір, насіннєву продуктивність і площу листка на зразках, зібраних у природних європейських з Іспанії та Швеції та занесених північноамериканських популяціях з Вашингтону та Каліфорнії. Паралельно визначалися генетичні зв'язки серед цих рослин за змінами за AFLP маркерами. Автори відмічають істотну генетичну варіабельність серед занесених популяцій та наводять докази багаторазових занесень *H. perforatum* до Північної Америки за генетичними відмінностями.

Переконливим доказом багаторазових занесень досить інвазійного *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. із Європи до Північної Америки є недавнє виявлення нового гаплотипу цього виду [11]. До того вважалося, що вторгнення *Ph. australis* до угруповань в Північній Америці обмежується одним cp-DNA гаплотипом — гаплотипом M. Новий гаплотип L1, природно поширений у Північній Європі, Великій Британії та Румунії, знайдений у Квебеку (Канада). Отже, вторгнення виду до Північної Америки триває і більше уваги на думку авторів слід приділяти виявленню генетичних відмінностей і зв'язків, які визначають активність популяцій інтродукованих *Phragmites*.

Одним із вагомих механізмів генетичних змін при фітоінвазіях є гібридизація. Утворення гібридогенних форм внаслідок схрещувань чужорідних видів рослин з аборигенними розгля-

дається одним серед модусів мікроеволюції при розширенні вторинного ареалу [12]. Хоча при гібридизації не з'являється власне «нового» генетичного матеріалу, створювані нові комбінації відіграють важливу роль у флорогенезі. Високий відсоток гібридів у природних угрупованнях характерний для багатьох таксонів судинних рослин. Провідний аристолог М. М. Цвєльов [13], який велике значення в еволюції злаків (*Poaceae*) відводить процесам гібридизації, допускає, що не менше 2/3 сучасних видів родини мають гібридне походження, як і багато які роди (*Calamagrostis, Stipa* тощо). Однією з переваг гібридів перед батьківськими формами він вважає екологічну «деспеціалізацію», вони не адаптовані до певного середовища, отже більш лабільні, податливі та здатні до подальшої еволюції. Знижена зі зрозумілих причин фертильність у деяких гібридогенних видів у злаків часто компенсується переходом до вегетативного відновлення. Прикладом є *Ph. australis*.

М. М. Цвєльов [14] висловив припущення, що перехід до апоміксису як і до вівіпарії є способом стабілізації гібридів. Апоміктичні та вівіпарні адвентивні види виявляються преадаптованими до нового незвичного середовища, в якому запилення утруднено через погодні умови чи відсутність запилювачів. Вчений звертає увагу на те, що гібриди нерідко бувають стерильними при першому цвітінні, втім при повторних цвітіннях у наступні роки повністю або частково відновлюють фертильність, що є неможливим у монокарпіків.

У рослинному покриві України віднести будь-який чужорідний вид рослин до таких, що викликають серйозні наслідки, принаймні, пов'язані з наявністю локального вимирання місцевих видів, і виникаючими незворотними змінами в складі угруповань, складно. Втім, є окремі випадки, описані в нашій флорі, про вплив цього механізму, що призводить до «генетичного поглинання» аборигенного виду чужорідним. Наприклад, О. К. Скворцов [15] на підставі морфолого-географічного аналізу роду *Salix* прийшов до висновку, що аборигенний вид *S. alba* L. фактично повністю поглинений чужорідним *S. fragilis* L. Як результат, у лісах Європи важко знайти генетично чистий *S. alba*, оскільки диференціюється тільки вид-вселенець або ж їхні гібриди. Набагато пізніше О. К. Скворцов [16] не настільки категоричний і наводить для Європи обидва види як на берегах річок, в заплавах, так і в культурі. Однак учений зазначає в примітці до діагностичного ключа: «Дуже часто трапляються гібриди між *S. alba* і *S. fragilis*, яким притаманне проміжне поєднання ознак». Г. Ю. Конечна [17] наводить для нашої території обидва види без будь-яких приміток, втім згадує гібрид *S. alba* × *S. fragilis* серед «найбільш звичайних». Від себе можемо додати, що ідентифікація цих двох видів *Salix* за зовнішніми морфологічними ознаками в наших умовах досить проблематична.

Гібридизаційні процеси характерні для багатьох деревних рослин, інтродукованих в Україну. Усім добре відомі гібриди у роді *Populus* L. Вважається, що в озелененні міст у Європі тополі частіше гібридогенні, особливо це стосується гібридів між євро-азійськими та північноамериканськими видами з секції чорних тополь (*Aigeiros* Duby) та секції бальзамічних тополь (*Tacamahaca* Spach). Окремі з них описані як гібридогенні види (нотовиди), що мають законні латинські назви (*Populus* × *canadensis* Moench = *P. deltoides* s.l. × *P. nigra* L., *P.* × *berolinensis* K. Koch = *P. laurifolia* Ledeb. × *P. nigra* L., *P.* × *moskoviensis* Schroeder = *P. suaveolens* Fisch. × *P. laurifolia* Ledeb.). На цій підставі Ю. А. Насімович та М. В. Костина [18] виходячи з ситуації в насадженнях міста Москви, звертають увагу на існування в науковому і практичному обігу двох протилежних «міфів». Один з них — про широке використання в озелененні чистих видів тополь, включно з *P. balsamifera* L., а інший — про наявність там же багатьох нотовидів. Як би воно не було, поглинання генетичного ресурсу аборигенного виду *P. nigra* має місце у декількох варіантах спонтанних схрещувань.

Особливої уваги в рослинному покриві України і Європи в цілому потребують, наприклад, види роду *Juglans* L. (*Juglandaceae*). Провідні дендрологи наголошують на характерному для видів роду формовому різноманітті і схильності до гібридизації [19, 20]. Не дивлячись на те, що представники родини серед аборигенної флори відсутні, загроза від таких схрещувань неабияка. Наразі родовий комплекс *Juglans* L. в Україні представлений сімома видами з трьох секцій [17]. Первинні ареали *J. regia* L. — Балкани, Іран, Афганістан, Середня Азія, Китай, *J. ailantifolia* Carr. (*J. sieboldiana* Maxim.) і *J. subcordiformis* Dode — Японія, *J. mandshurica* Maxim. — Далекий Схід, Північний Китай, Корея, *J. cinerea* L.

і *J. nigra* L., *J. microcarpa* Berl. (*J. rupestris* Endelm. ex Torr.) — Північна Америка. Найбільш стійкі, життєздатні, витривалі і схильні до здичавіння гібриди видів з віддаленими первинними ареалами. Відомі гібриди: *J. subcordiformis* × *J. regia* (*J. notha batesii* Rehd.), *J. subcordiformis* × *J. cinerea* (*J. lancastriesis* Rehd.), *J. ailantifolia* × *J. regia* (*J. notha* Rehd.), *J. ailantifolia* × *J. cinerea* (*J. bixbyi* Rehd.*)* тощо.

Передумовою здичавіння та утворення різноманітних за будовою вегетативних та генеративних органів популяцій видів *Juglans* є високий рівень мінливості, що проявляється у формовій різноманітності; звичність внутрішньородової гібридизації (наявність гібридів з високою життєвістю, деякі з яких наводяться у статусі гібридних видів); тривалий період окультурення (від XVI — початку XIX сторіччя до 80–90 років); низка біологічних властивостей (швидкий ріст, висока репродуктивна здатність, зумовлена щорічним урожаєм плодів та інтенсивним насіннєвим відновленням, наявність скороплідних форм з періодом вступу в плодоношення на 3–4 роках життя) тощо. Іншим аспектом передумов успішної інтродукції видів цього роду в Україні є те, що екологічні умови їх первинних ареалів є близькими аналогами місця інтродукції. Види *Juglans* є лісовими видами, проте чистих насаджень в первинному ареалі не утворюють. Надають перевагу зрідженим лісовим ценозам, вибагливі до родючості ґрунтів, проте здатні зростати на різних ґрунтах за достатнього їх зволоження. Часто трапляються вздовж річок та на заплавах з алювіальними ґрунтами. Саме в аналогічних умовах Київських міських деревних насаджень спостерігається здичавіння деяких видів роду *Juglans*.

Розповсюдження спонтанних популяцій видів родового комплексу *Juglans* L. у міських деревних насадженнях м. Києва встановлено на основі власних обстежень цих екосистем у 2001–2014 рр. та літературних відомостей [20]. Спонтанні популяції в першому поколінні утворили *J. mandshurica* — у парку «Феофанія», *J. cinerea* — у Сирецькому парку тощо. Як уже наголошувалось [21], С. С. Станков ще у 1924–1925 рр. не вважав *J. regia* здичавілим навіть на Південному березі Криму. За нашими спостереженнями *J. regia* останнім часом активно дичавіє на широті Києва. Наприклад, спонтанні популяції *J. regia* вивчалися нами у різних частинах національного природного парку «Голосіївський» (біля Китаєвої пустині, поблизу парку М. Т. Рильського тощо).

Класичний приклад небезпеки генетичного поглинання аборигенних видів з вузьким географічним та екологічним ареалами становлять три вузькоендемічних види перлистих волошок ряду Eumargaritaceae Klokov (*Asteraceae*): *Centaurea proto-margaritacea* Klokov, *C. margaritacea* Ten. та *C. margarita-alba* Klokov [22]. Усі вони поширені в пониззі Південного Бугу і є давніми, реліктовими видами, особливо *C. proto-margaritacea,* який на думку монографа роду у «Флорі УРСР» Д. М. Доброчаєвої дав початок двом іншим видам. Ці три види занесені до Червоної книги України, *C. margarita-alba* Klokov та *C. margaritacea* Ten., крім того, ще й до Європейського Червоного списку, а останній — також до Світового Червоного списку. Давно відомі гібриди ендемічного західнопонтійського виду *C. margarita-alba* з близьким середземноморським видом роду — *C. diffusa* Lam. Такі гібриди були описані Й. К. Пачоським як окремий вид *C. hypanica* Pacz. [22]. Україні належать унікальні генетичні ресурси цих ендеміків, що наразі перебувають під загрозою.

Як приклад гібридного виду, що виник завдяки природно-антропогенній міграції, згадаймо *Bidens connata* Muehl. ex Willd. (*Asteraceae*). Його було ідентифіковано у Північній Америці за морфологічними ознаками ще у 1981 р. Гібридну комбінацію утворили євразійський *B. cernua* L. та північноамериканський *B. frondosa* L. До речі, особини його у Європі спочатку були описані як окремий вид *B. decipiens* Warnst. [12]. Морфологічні дослідження євро-азійських *B. cernua* L. і *B. tripartita,* що зростали поряд з північноамериканським *B. frondosa* та гібридогенним американського походження *B. connata* на заболоченій місцині вздовж річки Таса в Середній Росії (Володимирська обл.), виявили досить значну варіабельність сім'янок. На основі порівняння ознак сім'янок чотирьох згаданих видів автори публікації висловили гіпотезу, поки що не протестовану методами молекулярно-генетичного аналізу, про повторне виникнення гібридогенного *B. connata,* але тепер уже в Європі.

Цікава картина заселення водно-болотних угідь у північно-східній частині Північної Америки видами родового комплексу *Typha* (*Typhaceae*): аборигенним *T. latifolia* L., занесеним з Європи *T. angustifolia* L. та їхнім гібридом

T. × *glauca* Gordon виявлена за матеріалом, зібраним у 61 оселищі. Біля Великих озер та озера Святого Лаврентія види *Typha* за останнє століття дуже поширилися, тут переважають гібриди як в порушених так і в непорушених оселищах, але ареал збільшується і за рахунок батьківських видів. У Новій Шотландії і Мен найпоширенішим є аборигенний *T. latifolia* в усіх типах оселищ, гібриди ж трапляються зрідка [23].

Природно-антропогенні міграції судинних рослин, фенотипічні та еволюційні перетворення, які при цьому відбуваються призводять до гомогенізації рослинного покриву. Як відомо, біотичну гомогенізацію розглядають як поступову заміну природної біоти внаслідок локальних поширень чужорідних видів. Це явище вважається одним з найвиразніших форм біотичного зубожіння у всьому світі з екологічними та еволюційними наслідками [24]. Це глобальний процес, який знижує відмінності між флорами й фаунами регіонів. Ступінь біотичної гомогенізації (найчастіше — генетичної, таксономічної або функціональної) визначається за збільшенням просторової подібності конкретної біотичної змінної з плином часу, і, як правило, оцінюється шляхом порівняння середньої попарної подібності/відмінності, розрахованої у двох дискретних часових термінах. Однак отримані початкові дані про біотичну гомогенізацію у водних і наземних екосистемах ще не становлять основу для передбачення наслідків цього явища, зокрема, для визначення якості довкілля та екологічних послуг. Процес біотичної гомогенізації протікає за великих просторових і часових масштабів, щоб збагнути ризики генетичних факторів щодо таксономічної і функціональної гомогенізації на різних рівнях біологічної організації необхідно більш широко мислити. Олден зі співавторами [24], усвідомлюючи загрози біотичної гомогенізації, наголошує на необхідності розробки та вжиття заходів, які б гарантували збереження лабільності і стійкості екосистем на Землі перед цим «антропогенним блендером».

Екологи розглядають інвазії як природну модель для вирішення фундаментальних і прикладних досліджень у галузі екології, еволюційної біології та біогеографії. Яскравим прикладом є праця Д. Ф. Сакса зі співавторами [25], у якій на основі останніх досліджень інвазій висловлено шість ідей щодо використання екзотичних видів як «модельних організмів» і сформульовано емерджентну гіпотезу, що узагальнює інтелектуальне розуміння інвазій видів і стійкість до них угруповань. Нарешті, ними підкреслено, що вивчення вторгнень може допомогти розумінню прикладних завдань, таких, як зникнення, функціонування екосистем і реакцію видів на зміну клімату.

Висновки

Наведений короткий зріз еволюційних змін, які сприяють інвазіям судинних рослин. Наголошено на адаптаційній фенотипічній диференціації та генетичному поліморфізмі місцевих популяцій чужорідних видів у вторинних ареалах. Відображено роль спонтанних гібридизаційних процесів у випадках успішних міграцій судинних рослин. Підкреслено загрозу прийдешньої біотичної гомогенізації щодо різних рівнів організації біоти.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дгебуадзе Ю. Ю. 10 лет исследований инвазий чужеродных видов в Голарктике [Електронний ресурс] // Российский журнал биологических инвазий.— 2011.— Предисловие к № 1–3.— С. 1–6.— Режим доступу: http://www.sevin.ru/invasjour.
2. The Global Invasive Species Database (GISD) [Електронний ресурс] — Режим доступу: http://www.google.ru/?gws_rd=ssl#newwindow=1&q=Global+database+of+Invasive+species.
3. Бурда Р. И. Антропогенная трансформация флоры.— Киев: Наук. думка, 1991.— 168 с.
4. Бурда Р. И., Голивец М. А., Петрович О. З. Чужеродные виды во флоре природно-заповедного фонда равнинной части Украины // Российский журн. биол. инвазий — 2014.— № 4.— С. 10–19.
5. Burda R. I., Golivets M. A., Petrovych O. Z. Alien Species in the Flora of the Nature Reserve Fund of the Flatland Part of Ukraine // Russian Journal of Biological Invasions.— 2015–6, № 1.— P. 6–20. DOI: 10.1134/S2075111715010038.
6. Петрович О. З., Бурда Р. І., Пашкевич Н. А., Голівець М. О. Передумови формування адвентивної фракції лісостепових локальних флор природно-заповідного фонду України // Чорноморськ. бот. ж.— 2014.— 10, № 3.— С. 388–401. DOI: 10.14255/2308–9628/14.103/11.

7. Pashkevych N., Burda R., Golivets M., Petrovych O. Assessment of the distribution of alien plant species across the habitats of the Ukrainian Forest Steppe. (The 11-th International Conference «Synanthropization of Flora and Vegetation», 11–13 September 2014. Poznań & Obrzycko, Poland) // Biodiversity: Research and Conservation. Supplement 1.— 2014.— P. 75.
8. Протопопова В. В., Мосякін С. Л., Шевера М. В. Вплив адвентивних видів рослин на фітобіоту України // Оцінка і напрямки зменшення загроз біорізноманіття України.— К.: Хімджест, 2003.— С. 129–155; 366–372.
9. Simberloff D., Martin J. L., Genovesi P., Maris V., Wardle D. A., Aronson J., Courchamp F., Galil B., García-Berthou E., Pascal M., Pyšek P., Sousa R., Tabacchi E., Vilà M. Impacts of biological invasions: what's what and the way forward // Trends Ecol. Evol.— 2013–28, № 1.— P. 58–66. Doi: 10.1016/j.tree.2012.07.013.
10. Maron J. L., Vila M., Bommarco R., Elmendorf S., Beardsley P. Rapid evolution of an invasive plant // Ecological Monographs.— 2004.— 74, № 2.— P. 261–280.
11. Meyerson L. A., Cronin J. T. Evidence for multiple introductions of *Phragmites australis* to North America: detection of a new non-native haplotype // Biolog. invas.— 2013.— 15, № 12.— P. 2605–2608.
12. Виноградова Ю. К., Галкина М. Л. О возможности гибридогенного происхождения *Bidens connata* // 50 лет без К. И. Мейера: XIII Московское совещание по филогении растений: Материалы международной конференции (2–6 февраля 2015 г., Москва) / Ред. Тимонин А. К.— М.: МАКС Пресс.— 2015.— С. 64–69.
13. Цвелев Н. Н. О значении гибридизационных процессов в эволюции злаков (*Poaceae*) // История флоры и растительности Евразии.— Л.: Наука, 1972.— С. 5–16.
14. Цвелев Н. Н. Система злаков (*Poaceae*) и их эволюция: (Комаровские чтения, Т. 37) .— Л.: Наука, 1987.— 75 с.
15. Скворцов А. К. Ивы СССР. Систематический и географический обзор.— М.: Наука, 1968.— 262 с.
16. Скворцов А. К. Сем. 70. *Salicaceae* Mirbel — Ивовые // Фл. евр. части.— 1981.— 5.— С. 10–36.
17. Конечная Г. Ю. Сем. 46. *Juglandaceae* A. Rich. ex Kunth — Ореховые. Сем. 87. *Salicaceae* Juss.— Ивовые. Род Salix L. // Консп. фл. Вост. Европ.— 2012.— 1.— С. 96–102; 441–447.
18. Насимович Ю. А., Костина М. В. Гибридизация тополей как фактор их эволюции // 50 лет без К. И. Мейера: XIII Московское совещание по филогении растений: Материалы международной конференции (2–6 февраля 2015 г., Москва) / Ред. Тимонин А. К.— М.: МАКС Пресс, 2015.— С. 211–214.
19. Соколов С. Я. Сем. 7. *Juglandaceae* Lindl.— Ореховые // Деревья и кустарники СССР.— 2.— М.: Наука.— 1951.— С. 221–255.
20. Лыпа А. Л. Дендрологические богатства Украинской ССР и их использование // Озеленение населенных мест.— Киев: Изд-во Акад. архитектуры УССР.— 1952.— С. 333–345.
21. Бурда Р. И. Интродукция растений: окультуривание и натурализация // Промыш. ботан. Сб. науч. тр.— 2013.— 13.— С. 3–15.
22. Доброчаєва Д. М. Рід 928. Волошка — *Centaurea* L. // Флора УРСР.— 1965.— 12.— С. 37–165.
23. Freeland J., Ciotir C., Kirk H. Regional differences in the abundance of native, introduced, and hybrid *Typha* ssp. in northeastern North America influence wetland invasions // Biolog. invas.— 2013.— 15, № 12.— P. 2651–2665.
24. Olden J. D., LeRoy Poff N., Douglas M. R., Douglas M. E. and Fausch K. D. Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization // Tr. in Ecol. and Evol.— 2004.— 19, № 1.— P. 18–24.
25. Sax D. F., Stachowicz J. J., Brown J. H., Bruno J. F., Dawson M. N., Gaines S. D., Grosberg R. K., Hastings A., Holt R. D., Mayfield M. M., O'Connor M.I. and Rice W. R. Ecological and evolutionary insights from species invasions // Tr. in Ecol. and Evol.— 2007.— 22, № 9.— P. 465–471.

BURDA R.I.

Institute for Evolutionary Ecology of Nat. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 03143, Kyiv, Acad. Lebedeva, 37, e-mail: rayburda@mail.ru

ROLE THE EVOLUTION OF VASCULAR PLANTS IN INVASION

Aims. Identify possible evolutionary changes that promote invasion of vascular plants. ***Methods.*** This is a critical analysis of scientific publications on evolutionary changes of vascular plants in the invasion of alien species in terms of secondary area. This is a fixed evolutionary change as alien species, and so native species. ***Conclusions.*** The following a brief review of evolutionary changes that promote invasion of vascular plants. The adaptive phenotypic differentiation and genetic polymorphism of local populations of native species in secondary area are accentuated. Displaying role of spontaneous hybridization processes in cases of successful migration of vascular plants. Highlight threat coming biotic homogenization on different levels of biota.

Keywords: alien species, biotic homogenization, evolution, invasion, hybridization, vascular plants.

УДК 575.89

ВОРОНОВА Н. В., СИРОТКИНА Д. П.
Белорусский государственный университет,
Беларусь, 220030, г. Минск, пр. Независимости, 4, e-mail: nvoronova@bsu.by

ВИДОВОЙ СОСТАВ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СИМБИОНТОВ ТЛЕЙ ФАУНЫ БЕЛАРУСИ

Большинство видов насекомых имеют облигатных и вторичных бактериальных симбионтов, роль которых в жизнедеятельности хозяев невозможно переоценить. У тлей некоторые виды симбиотических бактерий способны повышать термоустойчивость, снижать влияние патогенных организмов и паразитоидов, а также изменять трофические предпочтения хозяев. Другие виды ассоциированы с уменьшением общей массы тела и количества потомства у тлей или оказывают отрицательное влияние на облигатного симбионта — бактерий рода *Buchnera*. В связи с этим симбиотические микроорганизмы представляют существенный интерес для биотехнологии, как возможный инструмент регуляции численности тлей. Наиболее перспективными в этом отношении представляются симбионты рода *Rickettsia* da Rocha-Lima, 1916.

Бактерии рода риккетсия представляют собой обширную группу микроорганизмов, включающую как симбиотические, так и патогенные виды. Видовое разнообразие патогенных микроорганизмов хорошо изучено, поскольку они вызывают ряд тяжелых заболеваний человека. Симбиотические риккетсии, как считается, способны оказывать различное воздействие на жизнедеятельность своих хозяев: влияют на массу тела тлей, количество жизнеспособного потомства и, возможно, ассоциированы с устойчивостью к инсектицидам [2].

Прочность ассоциации тлей со своими симбионтами, факты существования горизонтального переноса генов между бактериями и тлями, позволяют рассматривать тлей как истинных холобионтов, а геном всех сосуществующих организмов — как хологеном. Несмотря на столь важное значение в жизни хозяев, видовое разнообразие симбиотических риккетсий крайне плохо изучено. Целью нашей работы было изучение видового состава вторичных симбионтов тлей, а также оценка генетической однородности симбиотических бактерий рода *Rickettsia*.

Материалы и методы

В работе был использован следующий энтомологический материал (табл. 1, 2):

ДНК выделяли с использованием DNA Purification Kit (Thermo Scientific) из пула особей, адаптировав протокол производителя для работы с тлями. ПЦР провели с использованием родоспецифичных диагностических праймеров, предложенных T. Tsuchida и соавторами [2].

Состав реакционной смеси составил в 15 мкл: Quick-Load Taq 2X Master Mix (Праймтех) — 7,5 мкл, вода — 2,5 мкл, 0,15 мкМ каждого праймера, 2 мкг ДНК. ПЦР проводили в режиме: 95 ºС — 10 минут, 40 циклов при 95 ºС — 30 секунд, 55 ºС — 30 секунд и 72 ºС — 1 минута, финальная элонгация — 72 ºС — 5 минут. Электрофоретическое разделение продуктов провели

Таблица 1

Виды тлей, использованные в исследовании

Вид тлей (шифр ваучера)	Вид тлей (шифр ваучера)
Acyrthosiphon caragana Cholodkovsky (14–297)	*Brachycaudus prunicola* Kaltenbach, 1843 (101–32)
Anuraphis catonii Hille Ris Lambers, 1935 (30–10)	*Cholodkovskya viridana* Chol., 1896 (14–376–1)
Aphis craccivora Koch, 1854 (14–371)	*Drepanosiphum platanoides* Schrank (14–300)
Aphis fabae Scopoli, 1763 (25–10)	*Dysaphis spp* (26–10)
Aphis fabae cirsiiacanthoidis Scopoli, 1763 (15–10)	*Dysaphis apiifolia petroselini* Börn., 1950 (100–89)
Aphis fabae fabae Scopoli, 1763 (43–10)	*Dysaphis lappae lappae* Koch, 1854 (101–05)
Aphis idaei v.d.Goot, 1912 (21–10–2)	*Dysaphis lauberti* Börner, 1940 (20–10)
Aphis pomi DeGeer, 1773 (31–10)	*Dysaphis ossiannilssoni* Stroyan, 1961 (100–78)
Aphis vaccinii, Börner, 1940 (36–10)	*Impatientinum asiaticum* Nevsky, 1929 (51 (1) –11)
Brachicaudus helichrysi Kaltenbach, 1843 (33–10)	*Impatientinum asiaticum* Nevsky, 1929 (51 (2) –11)

© ВОРОНОВА Н. В., СИРОТКИНА Д. П.

Таблица 2

Праймеры, использованные в исследовании

Род симбиотических бактерий	Название праймера	Последовательность праймера 5'–3'	Размер продукта, kb	Ген-мишень
Buchnera	Buch16S1F Buch16S1R	GAGCTTGCTCTCTTTGTCGGCAA CTTCTGCGGGTAACGTCACGAA	0,42	*16SrRNA*
Rickettsia	Apis-Ric16SF1 Apis-Ric16SR1	TGGCTGTCGTCAGCTCGT TTTAGGCTAATGGGTTTTGGTCAT	0,2	*16SrRNA*
	16SA1 16SB1	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG TACGGYTACCTTGTTACGACTT	0,095	*gltA*
Spiroplasma	16SA1 TKSSspR	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG TAGCCGTGGCTTTCTGGTAA	0,51	*16SrRNA*
Regiella	U99F 16SB4	ATCGGGGAGTAGCTTGCTAC CTAGAGATCGTCGCCTAGGTA	0,2	*16SrRNA*
Hamiltonella	PABSF 16SB4	AGCACAGTTTACTGAGTTCA CTAGAGATCGTCGCCTAGGTA	0,2	*16SrRNA*
Serratia	16SA1 PASScmp	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG GCAATGTCTTATTAACACAT	0,48	*16SrRNA*

в 1,5% агарозном геле с использованием маркера молекулярного веса GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). ПЦР с праймерами к облигатному симбионту тлей рода *Buchnera* использовали в качестве положительного контроля.

Для изучения филогенетического родства бактерий дополнительно использовали 200 нуклеотидных последовательностей генов 16S rRNA и gltA бактерий рода *Rickettsia*, симбионтов животных принадлежащих к различным таксонам: 2 типам, 4 классам, 12 отрядам и более чем к 30 родам; а также свободноживущих бактерий родов *Clostridium* и *Lactococcus*. Нуклеотидные последовательности были получены из GenBankNCBI.

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей провели с использованием алгоритма Muscle, построение филогенетических деревьев осуществили с использованием бутстрэпп анализа для 1000 псевдореплик. Расчет парных генетических дистанций провели в программе MEGA 6 [3]. Для статистической обработки данных использовали программу STATISTICA 8, непараметрический метод множественного сравнения средних.

Результаты и обсуждение

В результате проделанной работы было показано, что данная выборка тлей содержала все виды симбиотических бактерий, указанных в табл. 2 (рис. 1). Несмотря на то, что в литературе приводятся данные о том, что бактерии родов *Rickettsia* и *Spiroplasma* встречаются сравнительно редко, однако в нашем исследовании все виды симбиотических бактерий имели высокий процент встречаемости. *Spiroplasma* выявлялась в 90% исследованных образцов. Этот симбионт отсутствовал только в *B. helichrysi.* Симбионты рода *Serratia* также были обнаружены у 90% тлей, за исключением *A. idaei*. Как известно, *Hamiltonella* защищает тлей от паразитических ос и также ассоциирована с адаптацией тлей к повышенным температурам. Встречаемость *Hamiltonella* имела самый низкий процент — 60%. *Hamiltonella* не была обнаружена у таких видов как *M. cholodkovsky, B. helichrysi, A. vaccinii* и *A. pomi.*

Поскольку бактерии рода *Rickettsia,* как было сказано выше, представляют особый интерес, что связано с их возможной ассоциацией с устойчивостью хозяев к инсектицидам, для

Рис. 1. Электрофореграммы результатов диагностического ПЦР-анализа с тотальной ДНК, выделенной из тлей.
Слева: А: *A. catonii,* 1 — *Buchnera*, 2 — *Rickettsi*a, 3 — *Regiella*, 4 — *Hamiltonella*, 5 — *Spiroplasma*, 6 — *Serratia*.
Б: *A. pomi,* 7 — *Buchnera*, 8 — *Rickettsia*, 9 — *Regiella*, 10 — *Hamiltonella*, 11 — *Spiroplasma*, 12 — *Serratia*.
Справа: Электрофореграмма результатов диагностического ПЦР бактерии *Rickettsia* 1, 2, 3 — *B. lychnidis*; 4, 5, 6 — *D. sorbi*

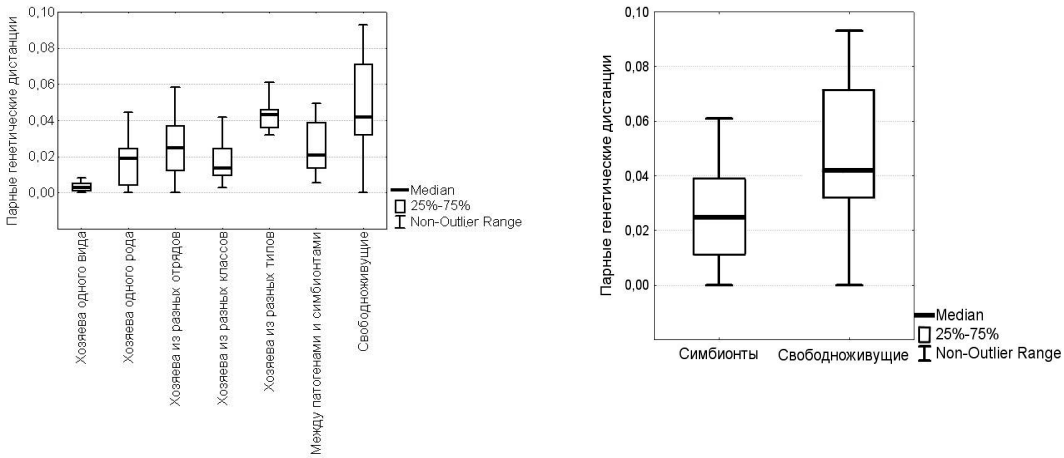


Рис. 2. Сравнительный анализ парных генетических дистанций, рассчитанных по нуклеотидным последовательностям гена 16S rRNA симбиотических и патогенных бактерий рода *Rickettsia*, а также свободноживущих бактерий

уточнения данных по встречаемости риккетсий у тлей мы провели дополнительный диагностический ПЦР одновременно по двум генам риккетсий с положительным контролем — *B. aphidicola* (рис. 2). В результате мы действительно показали, что *Rickettsia* выявляется почти в 100% образцов.

Вторым вопросом, на который мы хотели ответить в рамках исследования, это — являются ли симбиотические риккетсии в филогенетическом отношении достаточно близкими, чтобы их функции, установленные для хозяев одного таксона насекомых, можно было экстраполировать на другие таксоны? В частности, это касалось возможности усиливать устойчивость хозяев к инсектицидам, как это было показано для белокрылок, таксона — родственного тлям. Для анализа генетических различий между отдельными симбиотическими риккетсиями для каждого гена в отдельности были рассчитаны парные генетические дистанции между последовательностями как симбиотических, так и свободноживущих и патогенных бактерий (рис. 2).

Значения генетических дистанций по последовательности 16SrRNA у риккетсий варьировали: у симбионтов от 0 до 0,099, у риккетсий, вызывающих тиф,— от 0 до 0,110. У свободноживущих бактерий варьирование внутриродовых значений генетических дистанций было выше — от 0 до 0,849.

Ожидалось, что у симбиотических бактерий уровень генетической вариабельности будет отличаться от свободноживущих или патогенных видов, в связи с высокоспецифическими условиями их обитания. Тем не менее, оказалось, что уровень генетической вариабельности симбиотических и патогенных риккетсий соизмеримы. Различия в варьировании генетических дистанций были статистически значимыми между почти всеми группами. В то же время межвидовые генетические дистанции между симбиотическими риккетсиями и свободноживущими видами заметно отличались, причем уровень этих различий также имел высокую статистическую значимость.

Филогенетическое дерево симбиотических риккетсий (67 последовательностей), построенное по гену 16S rRNA, имело 4 кластера с высокими значениями индекса достоверности топологии ветвей (рис. 3).

При этом группирование ветвей происходило не по таксономической принадлежности хозяев. А именно, верхняя часть дендрограммы объединила нуклеотидные последовательности бактерий, чьи хозяева принадлежат не только к различным таксонам членистоногих (Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera, Lepidoptera, Neuroptera и др.), но и паукообразных (Trombidiformes, Parasitiformes), а также кольчатых червей. На композитном филогенетическом дереве и дендрограмме по гену gltA симбионты из филогенетически близких хозяев также не объединялись, несмотря на высокую статистическую поддержку топологии ветвей. Дендрограмма, построенная на основе последовательностей гена gltA (88 последовательностей), так же содержала 4 кластера, однако объединение ветвей происходило иначе, чем на предыдущем филогенетическом дереве.

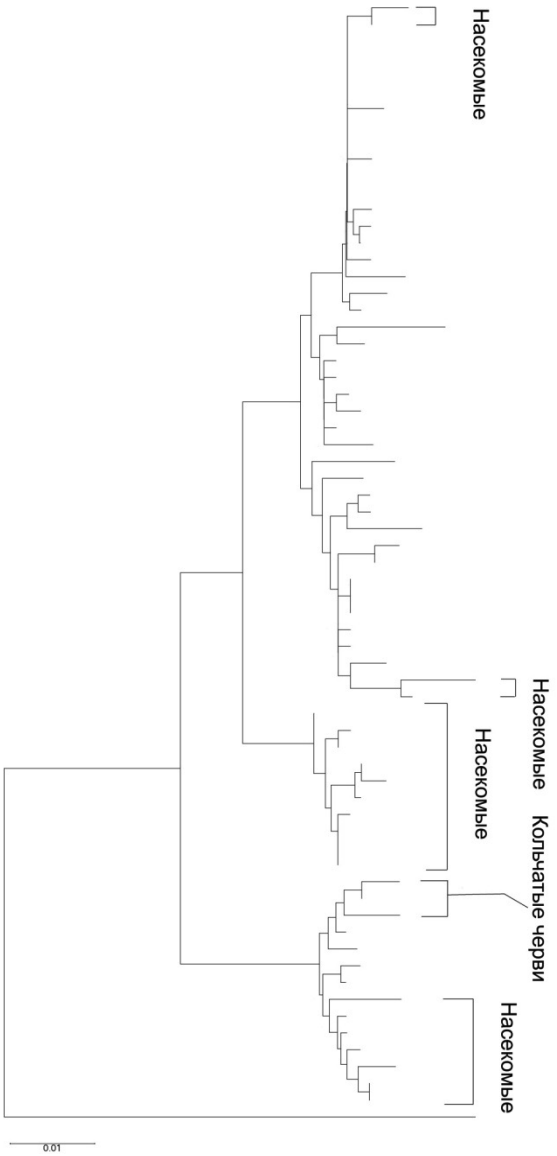


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основе последовательностей гена 16S rRNA симбиотических бактерий рода *Rickettsia*

Принимая во внимание плохую изученность видового разнообразия симбиотических риккетсий, логично предположить, что исходная выборка включала последовательности разных видов (минимум 4) или иных таксономических единиц.

Поскольку и выявленные значения парных генетических дистанций также показали, что различия между отдельными симбионтами одного рода могут быть выше, чем между свободноживущими бактериями разных видов, для дополнительного подтверждения предположения о возможном существовании нескольких самостоятельных видов симбиотических риккетсий мы провели биоинформационный филогенетический анализ последовательностей гена 16S rRNA риккетсий, выделенных из хозяина одного вида — белокрылки *Bemisia tabacci* (рис. 4). Анализ полученного филогенетического дерева показал, что из хозяев одного биологического вида могут быть выделены риккетсии, генетические различия между которыми соответствуют межвидовому уровню.

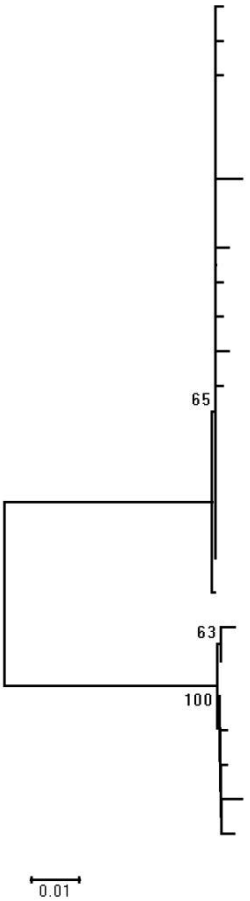


Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное на основе гена 16S rRNA симбиотических риккетсий *Bemisia tabacci*

Выводы

Изученные тли фауны Беларуси обладают широким спектром симбиотических микроорганизмов. Среди вторичных симбионтов тлей фауны Беларуси почти со 100% частотой встречаются бактерии родов *Rickettsia* и *Spiroplasma*, несмотря на то, что в литературе они указывались как редкие.

Кластеризация симбиотических риккетсий на филогенетических деревьях происходила не в соответствии с таксономической принадлежностью хозяев.

Межвидовые генетические дистанции патогенных видов с установленной видовой принадлежностью оказались ниже, чем симбиотических риккетсий.

С высокой долей вероятности можно заключить, что симбиотические бактерии рода риккетсия принадлежат минимум к 4 различным видам микроорганизмов, и генетически сходные риккетсии могут быть выделены из отдалённых таксонов хозяев. В дальнейшем необходимо уточнить видовую принадлежность и характеристики отдельных представителей симбиотических риккетсий.

Исследование функций симбиотических бактерий в каждом таксоне хозяев необходимо проводить отдельно и независимо от данных, полученных ранее для других групп животных.

Авторы выражают искреннюю благодарность заведующему кафедрой микробиологии, доктору биологических наук, профессору В. А. Прокулевичу за помощь в проведении исследования, заведующему кафедрой зоологии, доктору биологических наук, профессору С. В. Буге и кандидату биологических наук А. В. Стекольщикову за любезно предоставленный энтомологический материал.

ЛИТЕРАТУРА

1. Caspi-Fluger A. Inbar M., Mozes-Daube N., Mouton L., Hunter M. S., Zchori-Fein E. Rickettsia 'In' and 'Out': Two Different Localization Patterns of a Bacterial Symbiont in the Same Insect Species // PLoS ONE.— 2011.— 6, № 3.— P. 1–6.
2. Kontsedalov S., Zchori-Fein E., Chiel E., Gottlieb Y., Inbar M., Ghanim M. The presence of Rickettsia is associated with increased susceptibility of Bemisia tabaci (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides // Pest Management Science.— 2008.— 64.— P. 789–792.
3. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 // Molecular Evolutionary Genetics Analysis [Electronic resource] .— 2013.— Mode of access: http://www.megasoftware.net.— date of access: 12.10.2014.

VORONOVA N.V., SIROTKINA D.P.

Belarusian State University,
Belarus, 220030, Minsk, Nezavisimost ave, 4, e-mail: nvoronova@bsu.by

SPECIES COMPOSITION AND GENETIC VARIABILITY OF BACTERIAL SYMBIONTS OF APHIDS FROM BELARUS

Aims. Symbiotic bacteria are of interest to biotechnology as potential tool for pest management. The aim of the study was to research the occurrence and diversity of secondary symbionts of specific genera in different species of aphids from Belarus. ***Methods.*** Biodiversity of bacterial symbionts was studied by PCR with genus-specified primers. Genetic diversity was revealed with methods of bioinformatics. ***Results.*** The research showed that aphids of Belarusian fauna possess a wide range of symbiotic microorganisms. Among secondary symbionts of Belarusian aphids *Rickettsia* and *Spiroplasma* have almost 100 % frequency of occurrence despite the fact in literature they are considered as rare. Degree of the phylogenetic homogeneity of 16S rRNA and gltA genes in symbiotic rickettsia has been studied. It is shown that both the mean and the maximum interspecific genetic distances of 16S rRNA gene in pathogenic rickettsia have been significantly lower than in symbiotic ones. Phylogenetic analysis of symbiotic rickettsia, based on 16S rRNA and gltA genes, has shown the existence of 4 separate clusters with high bootstrap value. ***Conclusions.*** The obtained data show possible existence of at least four different species of symbiotic bacteria in *Rickettsia* genus.

Keywords: aphids, symbiotic bacteria, *Rickettsia*, PCR markers.

УДК 575.21:57.042

ГРАЧОВА М. А., ЧЕШКО Т. М., ШКОРБАТОВ Ю. Г.
Науково-дослідний інститут біології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, Україна, 61022, м. Харків, пл. Свободи, 4, e-mail: rarog70@mail.ru

ДЕЯКІ ОНТОГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ ВПЛИВУ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА ПОКАЗНИКИ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Актуальність досліджень біологічних ефектів різних режимів електромагнітного опромінення зумовлена їх широким розповсюдженням у повсякденному житті людини та використанням у медичній практиці [1]. Поряд із цим відомо, що цей чинник може бути також шкідливим для людини. Так, згідно з даними Міжнародної агенції по вивченню раку, дуже низькочастотні магнітні поля, можливо, є канцерогенними для людини (група 2В). Статичні електричні і магнітні поля і вкрай низькочастотні електричні поля не класифікуються як канцерогенні для людини (група 3) [2]. У наших попередніх дослідженнях було продемонстровано, що електромагнітні опромінення різних режимів можуть викликати значні зміни у життєздатності дрозофіли [3, 4], показано ефекти цих факторів щодо структурної організації ядер клітин букального епітелію людини [5, 6]. Проте питання безпечного застосування електромагнітного випромінювання у повсякденному житті та терапевтичній практиці вимагає подальшого дослідження його біологічних ефектів. Суттєве значення при цьому має виявлення різних онтогенетичних аспектів дії цього чинника.

Метою даної роботи було вивчення наслідків короткочасної дії випромінювання надзвичайно високої частоти (НЗВЧ), магнітного поля (МП) та їх комбінацій (НЗВЧ+МП та МП+НЗВЧ на передембріональних (тобто при формуванні гамет) та ранніх ембріональних стадіях розвитку та показники життєздатності (швидкість розвитку, кількість дорослих нащадків та частоту порушень розвитку у *Drosophila melanogaster*).

Матеріали і методи

Дослідження проводили на лінії *Canton-S* (дикий тип) *D. melanogaster*, яку підтримували в культурі шляхом тісного інбридингу протягом більш ніж 80 поколінь. Мух вирощували на стандартному цукрово-дріжджовому середовищі при температурі 23±0,5 °С.

Для отримання опромінення НЗВЧ із заданими характеристиками (частота 36,64 ГГц, щільність міцності на рівні об'єкту 120±0,05 мкВт/см^2) використовували генератор, який був створений на кафедрі теоретичної радіофізики ХНУ ім. В. Н. Каразіна. Відстань до об'єкта, що опромінюється,— 15 см, експозиція — 30 секунд. Експозиція у МП 25 мТл — 5 хв. Відповідно до поставленої в роботі мети задавали п'ять варіантів досліду: контроль, НЗВЧ, МП, НЗВЧ+МП та МП+НЗВЧ.

Задля вивчення наслідків дії фізичних факторів на передембріональні стадії розвитку опроміненню піддавали мух, які були зібрані у перші 3 години після їх вильоту з лялечок. У цей час, як відомо, імаго дрозофіли ще не здатні до продуктивного парування і переважна кількість гамет у їх статевих шляхах є недозрілою [7] .

Задля вивчення наслідків дії фізичних факторів на ранніх стадіях ембріогенезу отримували 1-годинні синхронізовані кладки яєць від триденних імаго. В кожній з цих кладок аналізували швидкість розвитку, шляхом підрахування імаго, що вилуплюються з лялечок кожні три години. Плодючість імаго оцінювали за кількістю дорослих нащадків.

Ставили тільки індивідуальні схрещування. З метою аналізу дії фізичних факторів на динаміку змін показників життєздатності нащадків батьків, що старіють, від кожної пари батьківських особин було отримано шість послідовних кладок. Кожна з цих кладок відповідала певному віку батьків і була отримана шляхом пересадки мух кожні дві доби на свіже поживне середовище.

Оцінку життєздатності нащадків на преімагінальних стадіях розвитку проводили за допомогою двох показників: частоти нерозвинених яєць і кількості особин, що загинули на стадії лялечки. Оцінку першого з них проводили за стандартним методом обліку домінантних летальних мутацій (ДЛМ) в ембріогенезі [8]. При цьому схрещування ставили безпосередньо після піддавання опроміненню відповідно до варіанту досліду. Мух утримували на тимчасовому поживному середовищі, яке поновлювали кожну добу. Таким чином отримували кладки, що відповідали

© ГРАЧОВА М. А., ЧЕШКО Т. М., ШКОРБАТОВ Ю. Г.

певному віку батьків. Облік нерозвинених яєць проводили через 48 год. інкубації (24±0,5 °С) за наступними критеріями: білі яйця — ранні леталі (перші 6–9 годин ембріонального розвитку); жовті та коричневі — пізні леталі [8, 9]. Визначали у відсотках співвідношення яєць, що не розвилися, до загальної кількості яєць. Загибель особин на ляльковій стадії оцінювали за відсотком загиблих лялечок від загальної кількості лялечок. Отримані дані оброблені загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням критерію Ст'юдента.

Результати та обговорення

Проведене дослідження дозволило встановити ефект прискорення темпів онтогенезу дрозофіли при дії фізичних факторів (НЗВЧ, МП, НЗВЧ+МП та МП+НЗВЧ) у період раннього ембріогенезу (рис. 1). Найбільш значне скорочення розвитку порівняно з контролем спостерігали у варіантах НЗВЧ+МП та МП+НЗВЧ на 9,4 ($p<0,001$) та 7,7 ($p<0,001$) год., відповідно. У варіантах НЗВЧ та МП ці відмінності складають відповідно 4,8 ($p<0,001$); 6,8 ($p<0,001$) год. При цьому тривалість розвитку самців була коротшою ніж самиць: у варіантах НЗВЧ+МП та МП+НЗВЧ — на 4,7 ($p<0,001$) та 3,0 ($p<0,01$); у НЗВЧ та контролі на 2,1 ($p<0,05$) та 2,8 ($p<0,01$) год., відповідно. При дії МП швидкість розвитку самиць і самців була майже однакова.

Проте поряд зі встановленими ефектами дії фізичних факторів на швидкість розвитку статистично значущих відмінностей між варіантами досліду за плодючістю імаго, яких піддавали дії цих факторів в ранньому ембріогенезі, не виявлено. Характер вікових змін цього показника був майже однаковий у контролі і при дії фізичних факторів, що вивчаються.

Аналіз кількості загиблих лялечок в різних варіантах експерименту виявив негативний характер впливу НЗВЧ в ранньому ембріогенезі батьків на життєздатність їх нащадків (рис. 2). Загальна кількість порушень на ляльковій стадії за усіма кладками у варіанті НЗВЧ перевищувала контрольні значення на 1,33 % ($p<0,05$). Найбільшу чутливість до дії фізичних факторів у ембріогенезі батьків виявлено у нащадків 6-дібних батьків: у варіантах НЗВЧ та МП+НЗВЧ збільшення лялькової смертності (на 4,14 % ($p<0,001$) та 3,14 % ($p<0,01$), відповідно), але поряд з цим зменшення показника на 3,22 % ($p<0,01$) під впливом МП.

З метою вивчення наслідків дії фізичних факторів на статеві клітини, що знаходяться на різних стадіях свого формування, у другій частині експериментів дії фізичних факторів піддава-

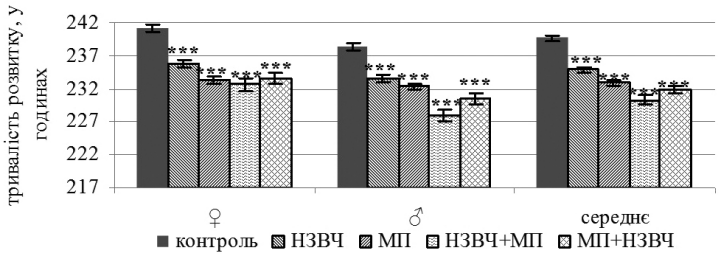


Рис. 1. Вплив фізичних факторів у ранньому ембріогенезі на швидкість розвитку в лінії *Canton-S Drosophila melanogaster*. Тут і далі: * — рівень статистичної значущості порівняно з контролем $p<0,05$; ** — $p<0,01$; *** — $p<0,001$

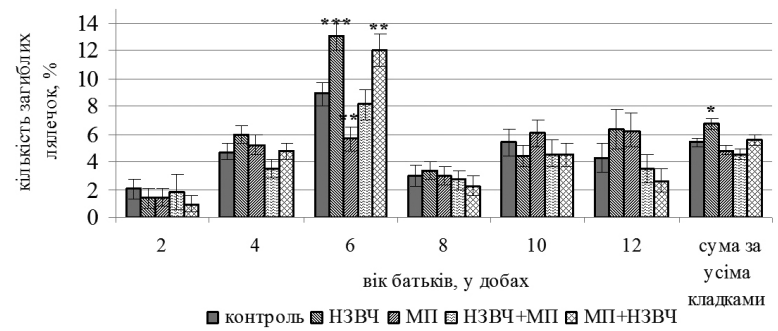


Рис. 2. Вплив фізичних факторів у ранньому ембріогенезі батьків на кількість порушень розвитку нащадків на ляльковій стадії в лінії *Canton-S D. melanogaster*

ли мух, які були зібрані у перші 3 години після їх вильоту з лялечок, перед паруванням [7]. При цьому виходили з припущення, що за характером змін показників життєздатності у послідовних кладках, які були отримані від цих мух, можна виявити найбільш чуттєві до електромагнітного опромінення стадії гаметогенезу.

У ході цього дослідження встановлено, що у варіанті МП плодючість 4-дібних імаго перевищує контрольні значення на 39,1% ($p<0,01$), а 12-дібних — на 91,9% ($p>0,05$) (рис. 3). Плодючість 2-дібних батьків у варіантах НЗВЧ+МП і МП+НЗВЧ більш ніж у три рази перевищує контроль ($p<0,05$), тоді як у 10-дібних батьків спостерігали протилежний ефект — зниження показника на 50 і 55% ($p<0,05$), відповідно. Протилежність ефектів цих режимів опромінення на плодючість в різних кладках є можливою причиною відсутності відмінностей за даним показником між варіантами НЗВЧ+МП, МП+НЗВЧ та контролем за сумарними даними в усіх послідовних кладках. Достовірних відмінностей за плодючістю від контролю у варіанті НЗВЧ не виявлено.

Фізичні фактори, що були застосовані у роботі при впливі на імаго, тобто МП та НЗВЧ та МП у різних комбінаціях, викликали порушення розвитку у нащадків. Встановлено, що з режимів електромагнітного опромінення, що вивчаються в даній роботі, найбільш шкідливий вплив на ембріональний розвиток дрозофіли спричиняє комбінована дія НЗВЧ+МП та МП+НЗВЧ (рис. 4). В кладках, в яких вік батьків складав 5, 6, 7, 10 та 11 діб (тобто у більшості отриманих кладок), кількість нерозвинених яєць в цих варіантах на статистично значущому рівні перевищує контрольні значення. Негативний ефект на ембріональний розвиток нащадків батьків, що старіють, здійснює також МП. Так, хоча в кладці, що була отримана від 4-дібних батьків, кількість ДЛМ у варіанті МП була на 3% ($p<0,05$) менше ніж у контролі, в кладках старіших батьків (за винятком 9-дібних) значення цього показника у варіанті МП на статистично значущому рівні перевищують контрольні. Об'єднання даних за усіма послідовними кладками показало наступне. Режим опромінення МП+НЗВЧ батьків здійснює найбільш суттєвий негативний вплив на ембріогенез нащадків — кількість ДЛМ в цьому варіанті на 6,58% ($p<0,001$) більше ніж у контролі. Варіанти МП та НЗВЧ+МП за кількістю цих порушень перевищують контрольні значення, відповідно на 2,43 і 2,42% ($p<0,01$). У цілому, НЗВЧ менш впливає на ДЛМ, ніж МП, ста-

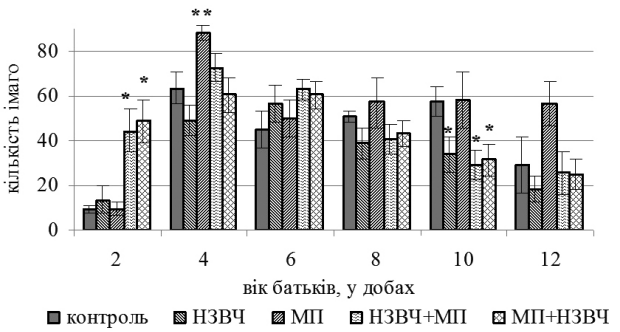


Рис. 3. Вікові зміни плодючості імаго, яких піддавали дії фізичних факторів в лінії *Canton-S D. melanogaster*

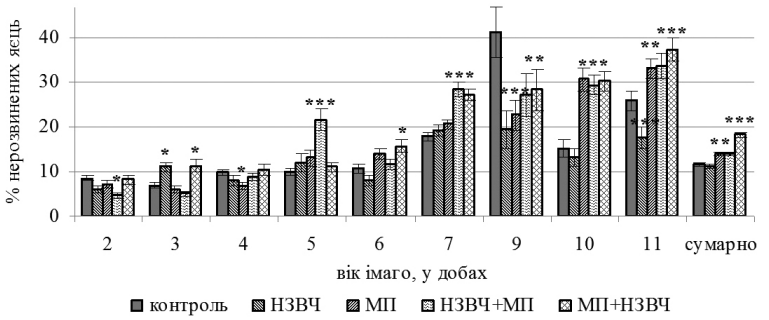


Рис. 4. Вплив обробки фізичними факторами імаго дроздофіли на вікові зміни частоти нерозвинених яєць у їх потомстві в лінії *Canton-S D. melanogaster*

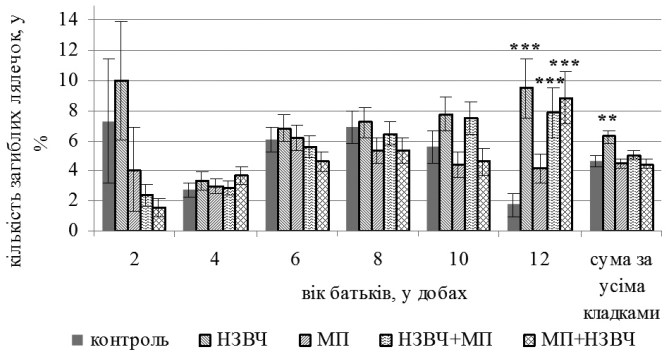


Рис. 5. Вплив обробки імаго фізичними факторами на частоту порушень розвитку їх нащадків на лялькових стадіях в лінії *Canton-S D. melanogaster*

тистично значущого впливу НЗВЧ на загальну кількість ДЛМ у нащадків у всіх кладках, окрім нащадків батьків і віці 3 доби, 9 та 11 діб, не виявлено.

У той же час аналіз кількості порушень на лялькових стадіях розвитку дрозофіли залежно від дії фізичних факторів, у нащадків батьків, що старіють, виявив негативний вплив НЗВЧ-опромінення на життєздатність (рис. 5). Достовірного впливу самого МП та у комбінаціях з НЗВЧ не виявлено. Об'єднання даних за усіма послідовними кладками показало, що у цьому варіанті кількість загиблих лялечок на 1,61% ($p<0,01$) вище, ніж у контрольному. Особливо чутливим до НЗВЧ опромінення є ляльковий розвиток нащадків батьків 10–12-дібного віку (рис. 5).

Отже, отримані у даній роботі дані про прискорення розвитку дрозофіли під впливом МП та НЗВЧ добре погоджуються з результатами роботи [11], у якій показано прискорення розвитку дрозофіли під впливом опромінення НЗВЧ з частотою 10 ГГЦ, та роботи [12], де показано ефект зниження плодючості дрозофіли під впливом опромінення НЗВЧ з частотою 10 ГГЦ.

Висновки

Таким чином, у даній роботі вивчено деякі онтогенетичні аспекти дії електромагнітного опромінення на показники життєздатності у дрозофіли. Встановлено стимулюючий ефект НЗВЧ, МП, НЗВЧ+МП, МП+НЗВЧ на швидкість розвитку при дії на ранніх стадіях ембріогенезу. Показано, що НЗВЧ — опромінення призводить до підвищення частоти летальних порушень на лялькових стадіях розвитку як у потомстві імаго, яких піддавали дії цього фактора у ранньому ембріогенезі, так і у потомстві імаго, яких піддавали дії опромінення перед паруванням. При вивченні характеру дії електромагнітного опромінення батьків перед паруванням на показники життєздатності нащадків виявлено, що МП має певний позитивний ефект на кількість дорослих нащадків. Частота порушень у ембріогенезі нащадків у варіантах МП, НЗВЧ+МП та МП+НЗВЧ суттєво зростає при старінні батьків, найбільш значущий негативний ефект на ембріогенез нащадків здійснює опромінення батьків перед паруванням спочатку МП потім НЗВЧ (варіант МП+НЗВЧ).

ЛІТЕРАТУРА

1. Bassett A. C. L. Beneficial effects of electromagnetic fields // J. Cell.Biochem.— 1993.— 51, № 4.— P. 387–393.
2. Non-ionizing radiation, part 1: static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields // IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.— 2002.— 80.— P. 338.
3. Shckorbatov Y. G., Evseeva M. V., Shakhbazov V. G., Popov A. I., Cheshko T. M., Grabina V. A., Fisun A. I., Belous O. I. Transvection effect and viability of Drosophila under the influence of the microwave radiation // MSMW'04 Symposium Proceedings.— Kharkiv, 2004.— P. 879–880.
4. Shckorbatov Y. G., Pasiuga V. N., Shakina L. A., Grabina V. A., Kolchigin N. N., Ivanchenko D. D., Kazansky O. V., Bykov V. N. *Drosophila melanogaster* viability and mutability under the influence of low energy microwave monochromatic and ultra wideband impulse field // 6-th International Conference on Antenna Theory and Techniques (ICATT'07) .— Sevastopol, 2007.— P. 289–291.
5. Shckorbatov Y. G., Trofimov S. V., Shakhbazov V. G., Grabina V. A., Gorobets N. N. The influence of microwaves with different state of polarization upon the state of chromatin and viability of Drosophila // The Second International Workshop «Ultrawideband and ultrashort impulse signals» (UWBUSIS'04) .— Sevastopol, 2004.— P. 246–247.

6. Shckorbatov Y. G., Zhuravleva L. A., Navrotskaya V. V., Miroshnichenko E. V., Montvid P. Y., Shakhbazov V. G., Sutushev T. A. Chromatin structure and the state of human organism // Cell Biol. Internat.— 2005.— 29.— P. 77–81.
7. Проблемы генетики в исследованиях на дрозофиле / Под ред. В. В. Хвостовой, Л. И. Корочкина, М. Д. Голубовского.— Новосибирск: Наука, 1977.— 277 с.
8. Тихомирова М. М. Генетический анализ: Учебное пособие.— Л.: Изд-во ЛГУ, 1990.— 280 с.
9. Soller M., Bownes M., Kubli E. Control of oocyte maturation in sexually mature Drosophila females // Devel. Biol.— 1999.— 208.— P. 337–351.
10. Markow T. A. «Cost» of virginity in wild *Drosophila melanogaster* females // Ecology and Evolution.— 2011.— 1.— P. 596–600.
11. Atli E., Ünlű H. The effects of microwave frequency electromagnetic fields on the development of *Drosophila melanogaster* // International journal of radiation biology.— 2006.— 82.— P. 435–441.
12. Atli E., Ünlű H. The effects of microwave frequency electromagnetic fields on the fecundity of *Drosophila melanogaster* // Turkish Journal of Biology.— 2007.— 31.— P. 1–5.

GRACHEVA M. A., CHESHKO T. M., SHCKORBATOV Y. G.

Kharkov National University,
Ukraine, 61022, Kharkov, Svoboda sq., 4, e-mail: rarog70@mail.ru

SOME ONTOGENIC ASPECTS OF THE INFLUENCE OF PHISYCAL FACTORS ON VIABILITY OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Aim. The aim of this work was to study the effects of electromagnetic factors at preembryonic and embryonic stages on viability of aging parents' progeny in *Drosophila*. The influence of microwave irradiation (MW, f = 36,64 GHz, surface power density at the level of the object — 120 ± 0,05 mW/cm^2; 15 cm from antenna edge; exposure time — 30 s), magnetic field (MF; 25mT; exposure time 5 min) and their combinations (MW+MF and MF+MW) on rate of development; fecundity, embryonic and pupal lethality in *Drosophila melanogaster* stock *Canton-S* was investigated. ***Methods.*** The methods of recording of quantitative traits (rate of development; fecundity, embryonic and pupal lethality) and variation statistics were used. ***Results.*** The exposure to physical factors at embryonic stages the increase of *Drosophila* rate development was shown. MW also induced increasing pupal lethality being applied at embryonic stages. The MW+MF and MF+MW exposure of young flies raised embryonic lethality in progeny of the oldest parents. Exposure of imagoes to MW only resulted in increasing of pupal lethality of progeny. ***Conclusions.*** Electromagnetic factors that have been studied in this work significantly modify the viability of *Drosophila*. These effects depend on both developmental stage at which the irradiation was applied and on parental age.

Keywords: electromagnetic irradiation, developmental stage, viability, *Drosophila*.

УДК 57.088+616.7:616-018.1”712.4”

ДЕРЯБІНА О.Г.[1, 3], ШУВАЛОВА Н.С.[1], КОВАЛЬЧУК М.В.[1, 2], МІНІН Ю.В.[3], ДЕРЯБІН О.М.[4], КОРДЮМ В.А.[1, 2]

[1] *ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН»,*
Україна, 04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67, e-mail: oderyabina@gmail.com
[2] *Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,*
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, email: kovmv@ukr.net
[3] *ДУ «Інститут отоларингології імені проф. О.С. Коломійченка НАМН»,*
Україна, 03057, м. Київ, вул. Зоологічна, 3
[4] *Державний науково-контрольний Інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів,*
Україна, 03151, м. Київ, вул. Донецька, 30, e-mail: don.lmb@gmail.com

ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ КСЕНОГЕННИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА ПРОТІКАННЯ АТРОФІЧНОГО РИНІТУ У МИШЕЙ

Дослідження та розробка технологій отримання та мультиплікації поза організмом МСК пуповини зі збереженням їх нативних характеристик, їх культивування у визначених умовах з додаванням специфічних факторів дозволяє отримувати необхідну кількість клітин для трансплантації без багаторазових перещеплень [1]. Це відкриває нові можливості лікування різних атрофічних станів, у тому числі і захворювань верхніх дихальних шляхів.

В останні двадцять років у світі все більшого розвитку набуває клітинна терапія з використанням різних типів клітин, що дозволило боротися із захворюваннями, які не піддаються лікуванню класичними методами. Особливе місце серед клітин, які застосовують в клітинній терапії, займають мезенхімальні мультипотентні стромальні клітини або мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), що пояснюється їх властивостями. Це їх здатність до диференціації в кілька типів клітин, відсутність на їх поверхні білків II класу гістосумісності, що забезпечує низьку імуногенність, здатність до міграції в місце запалення. Механізм дії МСК повністю не ясний, хоча в останні роки дослідники схильні більшу увагу приділяти паракринним ефектам, що причиняють ці клітини. МСК секретують значну кількість ростових факторів та цитокінів, які забезпечують регенерацію уражених тканин та залучення власних стовбурових клітин організму. На сьогодні відомо декілька джерел, МСК з яких використовують в клінічних дослідженнях, у тому числі, клітини з Вартонового студня пуповини, що мають значні переваги перед МСК з інших джерел, оскільки за декількома показниками наближуються до ембріональних клітин. Авторами розроблена технологія виділення і характеристики таких МСК, які забезпечують збереження їх нативних властивостей для використання на модельних тваринах і в клінічній практиці.

Незважаючи на появу та застосування нових фармакологічних засобів та використання різноманітних фізичних методів терапії, лікування хронічних атрофічних захворювань слизової оболонки верхніх дихальних шляхів залишається актуальною проблемою [2, 3]. Системний вплив на трофіку слизової оболонки верхніх дихальних шляхів, який використовують сьогодні, за клінічними результатами є малоефективним та потребує подальших досліджень. Останнім часом все більше уваги при виборі відновлювальних заходів при атрофічних змінах тканин організму людини приділяється використанню досягнень сучасної регенеративної медицини. Одним із напрямків розвитку наукових досліджень на сьогоднішній день є інтенсивний пошук нових біостимулюючих та відновлюючих методів на основі використання клітинних технологій [4–6], в тому числі, з використанням стовбурових та мультипотентних клітин.

Метою даної роботи було вивчення ефективності використання ксеногенних МСК людини при лікуванні атрофічного риніту інфекційного генезу у мишей, а також визначення введених клітин в різних органах реципієнтів.

Матеріали і методи

Отримання моделі атрофічного риніту у мишей. Модель атрофічного риніту на мишах отримували за методикою, описаною Jordan [7] та модифікованою співробітниками ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка»

© ДЕРЯБІНА О.Г., ШУВАЛОВА Н.С., КОВАЛЬЧУК М.В., МІНІН Ю.В., ДЕРЯБІН О.М., КОРДЮМ В.А.

НАМН України [8]. Суть методики полягає в інфікуванні мишей віком 1–2 тижні інтраназальною інокуляцією трьома патогенними штамами *Pasteurella multocida*. Доза зараження складала 10^7колонієутворюючих одиниць (КУО) в 10 мкл фізіологічного розчину. Попередньо, за 24 та 6 годин до зараження, піддослідним тваринам інтраназально вводили 10 мкл 1% розчину оцтової кислоти. Тварини протягом 1 місяця перебували під щоденним клінічним спостереженням, фіксувалися їх рухливість, характер дихання, харчування, вага, зовнішні зміни.

Отримання та характеристика МСК з Вартонового желе пуповини людини для введення модельним тваринам. Мезенхімальні стромальні мультипотентні клітини з Вартонового студня отримували за методикою, розробленою авторами на основі створеного протоколу [1]. В роботі використовували клітини другого пасажу в культурі [9], перевірені за морфологією та охарактеризовані за поверхневими маркерами, класичними для МСК — CD73, CD90, CD105 (позитивні) та CD34 (негативний) [10].

Лікування мишей з атрофічним ринітом введенням МСК Вартонового студня. Після відтворення атрофічного процесу (через місяць після початку експерименту) усім мишам незалежно від їх стану два рази на день протягом трьох днів парентерально вводили антибіотик енрофлоксацин у дозі 20 мг на 0,12 $см^3$ розчину. Після цього тваринам дослідної групи у хвостову вену ін'єкційно вводили попередньо підготовлені та охарактеризовані МСК з пуповини людини в кількості 10^6 клітин в об'ємі 100 мкл ФБР та протягом 1 місяця спостерігали за їх клінічним станом в порівнянні з нелікованим контролем та інтактними тваринами.

Виявлення ДНК людини в організмі мишей при введенні їм МСК Вартонового студня пуповини людини. Для виявлення ДНК людини використовували полімеразну ланцюгову реакцію з праймерами до альфа-сателітної ДНК: F 5′-GGG ATA ATT TCA GCT GAC TAA ACA G-3′ та R 5′-TTC CGT TTA GTT AGG TGC AGT TAT C-3′. Реакційна суміш для ПЛР містила 10× буфер, 2,0 мМ хлорид магнія, 0,20 мМ нуклеотидтрифосфати, 0,25 мкМ праймери і Taq-полімеразу «Fermentas» (Литва). Реакцію проводили в ампліфікаторі «Терцик». Використовували наступні режими: 95° — 3 хв, 30 циклів: 94° — 1 хв, 60° — 1 хв, 72° — 30 сек, потім 5 хв при 72°. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 1,2% агарозному гелі в трис-ацетатній буферній системі. Тотальну ДНК із патматеріалів, взятих у мишей через 1 та 5 діб після введення МСК, отримували шляхом висолювання з 6 М NaCl після інкубації з проназою при 37 °С протягом ночі [11] Матеріалами, в яких проводили аналіз на виявлення ДНК людини, були легені, селезінка, слизова носової порожнини.

Результати та обговорення

Характеристика клітин, які були використані для введення піддослідним тваринам. У дослідах по введенню модельним тваринам МСК Вартонового студня використовували клітини другого пасажу поза організмом, які характеризувалися типовою веретеноподібною морфологією та експресували поверхневі маркери CD73, CD90, CD105 та не експресували CD34 (дані не представлені). Це відповідає характеристикам, притаманним МСК, що свідчить про адекватність використаних нами підходів для отримання клітин з Вартонового студня пуповини для введення модельним тваринам.

Створення на мишах моделі атрофічного риніту та їх лікування за допомогою МСК Вартонового желе. Нами була відтворена на мишах експериментальна модель атрофії слизової оболонки носа інфекційного генезу. У піддослідних тварин спостерігалася млявість, уповільнення рухів, поганий апетит, накопичення виділень в носі, утворення корок, сухість слизової оболонки. Відмічено зменшення середньої маси тіла (12,3±0,6 г в порівнянні з 16,7±0,7 г у контролі). Тобто клінічні спостереження свідчать про загальнотоксичну дію *Pasteurella multocida* на мишей та про розвиток патологічного процесу у слизовій оболонці верхніх дихальних шляхів, симптоми якого через місяць можуть свідчити про розвиток атрофії.

Через 30 днів після зараження *Pasteurella multocida* та обробки інфікованих тварин антибіотиком, мишам у хвостову вену ін'єкційно вводили МСК з Вартонового студня пуповини людини. Отримані результати порівняння клінічного стану мишей, що отримали лікування клітинами, з мишами, які були інфіковані *Pasteurella multocida*, але котрим не вводили МСК, представлені в табл. 1.

Наведені результати клінічного спостереження після введення клітин однозначно свід-

Таблиця 1

Стан мишей з моделлю атрофічного риніту після введення МСК та без нього

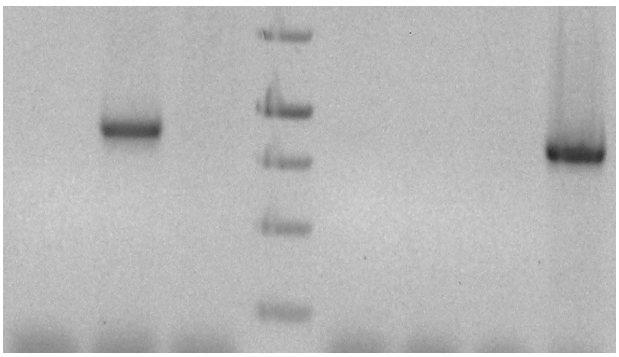
Час після введення МСК	Стан тварин	
	після введення клітин	без введення клітин
1 тиждень	Тварини виглядали активними, рухливими, зі звичайним апетитом та адекватним носовим диханням. Водночас, у 33,0 % мишей спостерігалася незначна кількість прозорого слизу біля присінку носа	Миші мали наявні ознаки слабкості та утрудненого носового дихання внаслідок накопичення густого гнійного слизу на рівні верхніх дихальних шляхів
1 місяць	Середня вага мишей складала (14,5±0,6) г. Тварини зберігали звичайну активність, добре їли, їх дихальні шляхи були вільними. Слизова оболонка глотки виглядала рожевою та вологою	Тварини виглядали більш млявими, малорухливими, погано харчувалися. Середня вага мишей складала (12,6±0,5) г. Біля присінку носа — накопичення густого слизу та кірок. Слизова оболонка — блідо-рожева, погано зволожена

Таблиця 2

Детекція клітин людини за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з праймерами до альфа-сателітної ДНК людини

	1 доба n = 4	5 діб n = 4
Селезінка	0	0
Легені	4	0
Епітелій носової оболонки	0	0

Примітка. n — кількість тварин, проаналізованих на наявність альфа-сателітної ДНК людини в кожний проміжок часу після введення клітин.



1 2 3 4 5 6 7 8

Рис. 1. Результати ПЛР на наявність альфа-сателітної ДНК людини в тканинах мишей з атрофічним ринітом після введення їм МСК матриксу пуповини людини через добу (1–3) та 5 діб (5–7): 1 — селезінка; 2 — легені; 3 — епітелій носової порожнини; 4 — маркер молекулярної ваги 1 kb DNA Ladder (Fermentas); 5 — селезінка; 6 — легені; 7 — епітелій носової порожнини; 8 — ДНК МСК людини (позитивний контроль)

чать про позитивний вплив внутрішньовенного введення МСК з Вартонового студня пуповини людини на загальний стан піддослідних тварин та стан їх слизової оболонки на рівні верхніх дихальних шляхів.

Детекція ксеногенних МСК людини у мишей з індукованим атрофічним ринітом. Виявлення ДНК людини проводили в селезінці, легенях та епітелії слизової оболонки мишей з використанням полімеразної ланцюгової реакції з праймерами до альфа-сателітної ДНК людини. Аналіз проводили через 1 та 5 діб після трансплантації клітин, в кожний проміжок часу тестували по 4 тварини. Отримані результати представлені в табл. 2 та на рис. 1.

У результаті проведених досліджень показано, що через 1 добу ДНК людини детектується в легенях піддослідних тварин, що узгоджується з даними інших авторів [12]. На п'яту добу ні в одному з досліджених органів ДНК людини виявлена не була.

Висновки

1. Шляхом інтраназальної інокуляції мишей *Pasteurella multocida* отримана модель атрофічного риніту.

2. Клінічними спостереженнями підтверджений позитивний вплив внутрішньовенного введення МСК з Вартонового студня пуповини людини на загальний стан піддослідних тварин.

3. За допомогою ПЛР в матеріалах від усіх проаналізованих тварин показана наявність ДНК донорських клітин в легенях через 1 добу після ін'єкції.

ЛІТЕРАТУРА

1. Маслова О. О., Шувалова Н. С., Сухорада О. М., Дерябіна О. Г., Кордюм В. А. Спосіб отримання мезенхімальних стовбурових клітин з матриксу пуповини людини. Пат. 74171, Україна, МПК C12N 5/00. № u201201939; заявл. 21.02.2012; опубл. 25.10.2012, Бюл. № 13. http://base.ukrpatent.org.
2. Settipane R. A., Lieberman P. Update on non-allergic rhinitis // Ann Allergy Asthma Immunol.— 2001.— 86.— P. 494–507.
3. Middleton E. Jr. Chronic rhinitis in adults // J Allergy Clin Immunol.— 1988.— № 81.— P. 971.
4. Scheller E. L., Krebsbach P. H., Kohn D. H. Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation // J Oral Rehabil.— 2009.— 36, N 5.— P. 368–389.
5. Gillespie L. N., Shepherd R. K. Clinical application of neurotrophic factors: the potential for primary auditory neuron protection // Eur J Neurosci. Author manuscript; available in PMC 2007 March 25.
6. Lau A. N., Goodwin V., Kim C. F., Weiss D. J. Stem Cells and Regenerative Medicine in Lung Biology and Diseases // Mol Ther.— 2012.— 20, N 6.— P. 1116–1130.
7. Jordan R. W., Roe J. M. An experimental mouse model of progressive athrophic rhinitis of swine // Veterinary microbiology.— 2004.— 105.— P. 201–207.
8. Мінін Ю. В., Карась А. Ф., Кучеренко Т. І., Карась Г. А., Тарасов О. А. Експериментальна модель атрофічного риніту інфекційного генезу // Ринологія.— 2012.— № 4.— С. 40–45.
9. Deryabina O., Maslova O., Sukhorada O., Kyryk V., Kordium V. Diversity of umbilical cord MSC and their variability during passaging *ex vivo* // Abstracts of the World Conference on Regenerative Medicine, 2–4 November.— Leipzig, Germany, 2011.
10. Maslova O., Deryabina O., Kordium V. The evaluation of the morphological and phisiological characteristics of the umbilical cord matrix mesenchymal stem cells as criteria of the suitability for the clinical usage // IV International Life Sciences Students' Conference Book of Abstracts.— 2010.— P. 57.
11. Biase F. H., Maurнcio Machaim Franco, Luiz Ricardo Goulart, Robson Carlos Antunes Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues // Genet. Mol. Biol.— 2002.— 25, № 4.— P. 313–315.
12. Lee R. H. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells rembolized in lung are active top sectere the anti-inflammatory protein TSG-6 // Cell Stem Cell.— 2009.— 5.— P. 54–63.

DERYABINA O. G.[1, 3], SHUVALOVA N. S.[1], KOVALCHUK M. V.[1, 2], MININ Y. V.[3], DERIABIN O. M.[4], KORDIUM V. A.[1, 2]

[1] *State Institute «Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS», Ukraine, 04114, Kiev, Vyshgorodska str., 67, e-mail: oderyabina@gmail.com*

[2] *Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03143, Kiev, Zabolotnogo str., 150, e-mail: kovmv@ukr.net*

[3] *State Institute «Institute of otolaryngology after prof. Kolomiychenko O. S. NAMS», Ukraine, 03057, Kiev, Zoologichna str., 3*

[4] *State Institute of Biotechnologiesand Strains of Microorganisms, Ukraine, 03151, Kiev, Donetskaya str., 30, email: don.lmb@gmail.com*

INFLUENCE OF XENOGENEIC MESENCHYMAL STEM CELLS TRANSPLANTATION ON ATROPHIC RHINITIS IN MICE

Aims. Studying of xenogeneic MSC efficacy in treatment of atrophic rhinitis in mice and detection of human DNA in recipient different organs. ***Methods.*** Molecular biology and cell biology methods, animal model obtaining. ***Results.*** Intravenous injection of human MSC into model mice showed positive effect on clinical state of experimental animals. Human DNA can be detected by PCR during one day in lungs of mice received treatment. ***Conclusions.*** Model of atrophic rhinitis was obtained by intranasal inoculation of mice with Pasteurella multocida. Clinical studies confirmed positive effect of human MSC on general state of experimental animals. Donor human DNA was detected in lungs of mice during 1 day.

Keywords: atrophic rhinitis, MSC, PCR.

УДК 581.1+581.4

КРАВЕЦЬ О. А., ГОРЮНОВА І. І., ЄМЕЦЬ А. І., БЛЮМ Я. Б.
ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail:kravetshelen@gmail.com

ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ СУДИННОЇ ОБКЛАДИНКИ ТА МЕЗОФІЛУ У С3 І С4 ВИДІВ РОСЛИН У ЗВ'ЯЗКУ З ОПТИМІЗАЦІЄЮ ФОТОСИНТЕЗУ

Еволюція С4-шляху фотосинтезу супроводжувалась модифікацією програми розвитку листка [1–3]. Важливою умовою ефективного функціонування С4 систем є формування анатомії Кранца, яка підтримує просторове роз'єднання метаболічних шляхів і забезпечує механізм концентрування диоксиду вуглецю для циклу Кальвіна [4, 5]. При цьому, ФЕП-карбоксилаза зосереджується в клітинах мезофілу, де відбувається первинне карбоксилювання, а Рубіско та декарбоксилази С4-кислот концентруються в клітинах обкладинки (Кранц-клітинах), де проходить декарбоксилювання та рефіксація CO_2для С3-шляху [2, 6]. У пошуках підвищення продуктивності фотосинтезу (і показників RUE, NUE та WUE) основних харчових С3 культур, розробки ефективних методів трансформації С3 рослин у С4, а також скринінгу мутантів, необхідно визначити зміни в анатомії листка, які зумовлюють оптимізацію фотосинтезу і становлення С4 типу, саме утворення двокамерної С4 системи, або анатомії Кранца. Для цього нами було проведене порівняльне дослідження структурної організації обкладинки судинної системи та хлоренхіми листків у С3 і С4 однодольних та дводольних видів рослин із зазначенням особливостей їхньої диференціації.

Матеріали і методи

Об'єкти дослідження: С3-однодольні рослини — ячмінь і традесканція, С4-однодольні — кукурудза та сорго, С3-дводольна — горох та С4-дводольна — амарант. Листки фіксували у суміші параформальдегіду і глутаральдегіду або досліджували свіжий нефіксований матеріал. Одну частину зрізів аналізували без фарбування, іншу фарбували, застосовуючи оцетокармін та реактив Люголя для світлової, аніліновий блакитний (АВ, 0,025 %) і DAPI (2,5 мкг/мл) — для люмінесцентної мікроскопії. Зрізи виготовляли вручну під стереомікроскопом. Окрім виготовлення зрізів, частину матеріалу аналізували, використовуючи ферментативну мацерацію для видалення судин з тканин листка. Спостерігали за рухом хлоропластів в клітинах обкладинки та хлоренхіми в листках амаранту за умов зміненого режиму освітлення. Тимчасові препарати вивчали в прохідному та ультрафіолетовому світлі за допомогою мікроскопу Axiostar (Carl Zeiss, Німеччина) .

Результати та обговорення

Анатомія листка С3-однодольних. У ячменю провідні судини в листку займають 1/6–1/7 від площі мезофілу. Хлоренхіма губчаста, не диференційована на стовпчасту, з добре розвинутою мережею міжклітинників та повітряних камер. Судини оточені подвійною обкладинкою (рис. 1, А). Внутрішня, або местомна, складається з плоских живих клітин з потовщеною кутинізованою оболонкою. Внутрішні стінки клітин мають більш потужні потовщення, ніж зовнішні. В цитоплазмі клітин міститься незначна кількість хлоропластів. Местомна обкладинка багатьох судин має, так зване «подовження» (П) з кутинізованих клітин, яке досягає поверхні листків (рис. 1, А). Вважають, що це «подовження» істотно збільшує площу контакту між мезофілом і судинами [7]. Зовнішня обкладинка складається з великих паренхімних клітин з нещільною цитоплазмою і потовщеними стінками (рис. 1, А). Основний вміст клітин займає велика центральна вакуоль, периферію — тяжі цитоплазми з пластидами та іншими органелами. Клітини зовнішньої обкладинки сполучаються як з клітинами «подовження», так і міжклітинниками і продиховими камерами. Вважають, що внутрішня і зовнішня обкладинки мають різне походження: местомна — прокамбіальне (аналог ендодерми), а зовнішня є похідною паренхіми [7] .

У традесканції анатомія листка в цілому схожа з ячменною. З особливостей потрібно відзначити добре розвинуту повітряну паренхіму у вигляді суцільної тканини або окремих клітин (рис. 1, Б). Клітини обкладинки містять незначну кількість пластид. Отже, серед однодольних С3 рослин саме у злаків спостерігається удосконалення судинної системи та мезофілу для оптимізації фотосинтезу — зростання розмірів та зба-

© КРАВЕЦЬ О. А., ГОРЮНОВА І. І., ЄМЕЦЬ А. І., БЛЮМ Я. Б.

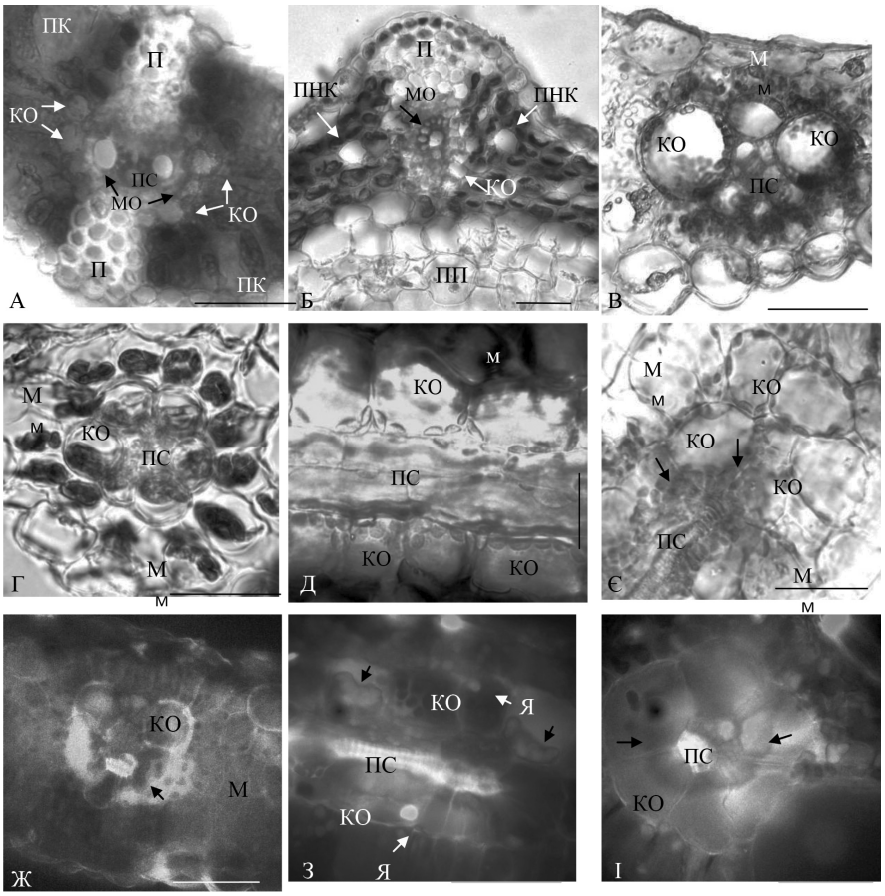


Рис. 1. Анатомія обкладинки термінальних судин у С3 і С4 рослин: А — подвійна (местомна і паренхімна) обкладинка судин у ячменю, Б — подвійна обкладинка судин у традесканції, В — різновеликі клітини простої обкладинки у проростків кукурудзи, Г — Кранц анатомія у сорго, Д — судини і клітини обкладинки у гороха, Є–І — обкладинка судин у амаранта (ПС – провідні судини, КО — клітини обкладинки, МО — местомна обкладинка, П — «подовження» обкладинок, ПК — повітряні камери, ПП — повітряна паренхіма, ПНК — повітряноносні клітини, М — мезофіл, стрілками зазначено местомну та паренхімну обкладинки (А, Б), агрегацію пластид (Є–І), ядро (З), (А–Є — нефарбований матеріал, Ж – І – АБ (аніліновий блакитний) + DAPI. Реперна мітка = 20 мкм

гачення на пластиди клітин обкладинки та збільшення площі їх взаємодії з мезофілом.

Анатомія листка С4-однодольних. У кукурудзи та сорго судини в листках займають велику площу, приблизно таку ж, як і хлоренхіма (1:1). Судини щільно оточені великими (витягнутими вздовж судин і сферичними на зрізі) клітинами з потовщеною оболонкою, які утворюють просту обкладинку (рис. 1, В, Г). Местомна обкладинка навколо судин та «подовження» обкладинок у цих рослин відсутні. Хлоропласти клітин обкладинки розташовані у периферичному домені та агрегуються здебільшого збоку клітин мезофілу. Ззовні клітини внутрішньої обкладинки оточуються радіально розташованими клітинами мезофілу, які створюють зовнішнє коло. Пластиди в клітинах мезофілу займають полярне положення відносно до клітин обкладинки. Таким чином створюються два радіальних кола клітин з полярно розташованими пластидами, або анатомія Кранца (рис. 1, В, Г). Виразність такої структури, розташування та розміри хлоропластів, їх диморфізм варіюють залежно від виду рослини та етапу онтогенезу. Центральним структурним і функціональним елементом у тканинах листка С4 рослин стає судинна обкладинка, клітини якої зростають в об'ємі, збагачуються на хлоропласти і беруть на себе головне навантаження у фотосинтезі — вторинне карбоксилювання.

Анатомія листка С3-дводольних. Листок гороху має слабо диференційований мезофіл, але добре розвинуті міжклітинники. Судини займають 1/7–1/8 від загальної площини мезофілу. Термінальні судини оточені одинарною обкладинкою з вакуолізованих сферичних клітин з потовщеною оболонкою (рис. 1, Д). Клітини

обкладинки у периферичному компартменті містять хлоропласти та сполучаються з повітряними камерами. Клітини мезофілу значно багатші на хлоропласти, ніж обкладинки. Після ферментативної мацерації судини повністю відокремлюються від тканин мезофілу та обкладинки; при подовженні мацерації судини розпадаються на флоемні і ксилемні елементи.

Анатомія листка С4-дводольних. Судинний візерунок листків амаранту щільніший, ніж у гороху. Судини оточуються великими сферичними вакуолізованими клітинами з потовщеною оболонкою, до складу якої входить калоза та/або лігніни (рис. 1, Є–І). У периферичному компартменті клітин обкладинки, а саме з боку судин, скупчується велика кількість хлоропластів, а з протилежного боку звичайно розташовується ядро (рис. 1, З). Ззовні клітини обкладинки оточуються радіальними клітинами хлоренхіми та сполучаються з продиховими камерами. Клітини мезофілу містять менші за розміром та кількістю хлоропласти. Після ферментативної мацерації судини відокремлюються від тканин мезофілу, зберігаючи структуру Кранц анатомії; при подовженні ензимної обробки зв'язок між судинами і клітинами обкладинки не порушується. Отже, у С4 рослин разом з функціональним навантаженням та збагаченням на органели клітин обкладинки посилюється фізичний зв'язок між судинами та обкладинкою.

Аналіз руху хлоропластів в листках амаранту за умов зміненого режиму освітлення вказує на відносну сталість структурно-динамічних ознак клітин обкладинки, порівняно з хлоренхімою. Чисельні хлоропласти цих клітин займають периферичну цитоплазму, зосереджуючись переважно з боку судин, а ядра локалізуються у протилежному компартменті (рис. 1, Є–І). Зміна освітлення суттєво не впливає на агрегацію хлоропластів в клітинах обкладинки. В той же час, хлоропласти клітин хлоренхіми легко змінюють свою локалізацію: агрегація хлоропластів модифікувалась освітленням та близькістю повітряних камер. Вважають, що важливу роль у світлозалежній агрегації хлоропластів відіграють актинові мікрофіламенти, причому цей процес може здійснюватися через регуляцію балансу пулів G- і F-актину поблизу поверхні органел [8–10]. Динамічність у локалізації органел клітин хлоренхіми, яка пов'язана з функцією первинного карбоксилювання, може також відображати «сенсорно-буферні» властивості цієї тканини, що пом'якшує дію подразників на клітини обкладинки. Однак роль організаційного центру та індуктора Кранц анатомії виконують, як вважають, термінальні судини [11–13]. Причому, С4-індукуючи сигнали сприймаються тільки клітинами, які знаходяться в радіусі дії судин [15]. Разом із судинами, центральним структурно-функціональним елементом листка як асимілюючого органа стає обкладинка, клітини якої зростають в об'ємі, збагачуються на хлоропласти і беруть на себе функцію вторинного карбоксилювання. Цікавим є те, що становлення С4 шляху і анатомії Кранца відбувається в онтогенезі не одразу, а протягом певного часу. Так, у проростків кукурудзи чітка спеціалізація протеому клітин обкладинки і мезофілу починає формуватися тільки на автотрофній стадії розвитку, а на анатомічній структурі вона відображається значно пізніше [16].

Висновки

Анатомічні особливості С3 і С4 рослин є відображенням різних шляхів диференціації тканин (судин і мезофілу) листків. У С3 однодольних, особливо злаків, функціонування фотосинтетичного апарату супроводжується спеціалізацією та ускладненням організації обкладинки судин — формуванням додаткової местомної обкладинки та кутинізацією її стінок, «подовженням» обкладинок до поверхні листка, а також розвитком повітряної паренхіми. При становленні С4 метаболізму відбулося спрощення будови обкладинки судин (редукція местомної обкладинки та її «подовження») і диференціація мезофілу на Рубіско-вмісні клітини обкладинки та збагачену ФЕПКО-хлоропластами губчасту хлоренхіму. Отже, С3- і С4-рослини використовують різні засоби концентрування CO_2 (і асимілятів) клітинами обкладинки. Структурні пристосування С4 рослин є досконалішими: з одного боку, зростає ефективний простір судин і обкладинки, збільшуються площа та міцність їхньої взаємодії, з іншого, зменшується об'єм тканини мезофілу, яка постачає їм CO_2. Судини разом з обкладинкою стають індукторами та організаторами Кранц анатомії, а клітини мезофілу — джерелом CO_2, і «буферною зоною» відносно обкладинки. Таким чином, оптимізація фотосинтезу із становленням С4 метаболізму тісно пов'язана з формуванням анатомії Кранца і, перш за все, спеціалізацією обкладинки термінальних судин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гамалей Ю. В., Вознесенская Е. В. Структурные и биохимические типы С4-растений // Физиология растений.— 1986.— 3, № 4.— С. 802–819.
2. Hatch M. D. C 4 photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure // Biochim Biophys Acta.— 1987.— 895.— P. 81–106.
3. Langdale1 J.A. C4 Cycles: Past, Present, and Future Re arch on C4 Photosynthesis // The Plant Cell.— 2011.— 23.— P. 3879–3892.
4. Edwards G. E., Franceschi V. R., Voznesenskaya E. V. Single-cell C (4) photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm // Annu. Rev. Plant Biol.— 2004.— 55.— P. 173–196.
5. Edwards G. E., Voznesenskaya E. V. C4 photosynthesis: Kranz forms and single-cell C4 in terrestrial plants. In: Raghavendra AS, Sage RF, eds. Photosynthesis and related CO_2 concentrating mechanisms. Advances in Photosynthesis Research. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2011.— P. 29–60.
6. Эдвардс Д. Фотосинтез С 3- и С 4-растений: механизмы и регуляция.— М.: Мир, 1986.— 590 с.
7. Эсау К. Анатомия растений.— М.: Мир, 1980.— 1, 2.— 558 с.
8. Parthasarathy M. V. F-actin Architecture in Coleoptile Epidermal Cells // Eur. J. Cell Biol.— 1985.— 39.— P. 1–12.
9. Chuong S. D.X., Franceschi V. R., Edwards G. E. The Cytoskeleton Maintains Organelle Partitioning Required for Single-Cell C4 Photosynthesis in Chenopodiaceae Species // The Plant Cell.— 2006.— 18.— P. 2207–2223.
10. Yamada M., Kawasaki M., Sugiyama T., Miyake H., Taniguchi M. Differential Positioning of C 4 Mesophyll and Bundle Sheath Chloroplasts: Aggregative Movement of C 4 Mesophyll Chloroplasts in Response to Environmental Stresses // Plant Cell Physiol.— 2009–50 (10).— P. 1736–1749.
11. Monson R. K., Schuster W. S., Ku M. S.B. Photosynthesis in Flaveria brownii A. M. Powell: A C4-like C3-C4 intermediate. Plant Physiol.— 1987.— 85.— P. 1063–1067.
12. Cheng S.-H., Moore B. D., Wu J., Edwards G. E., Ku M. S.B. Photosynthetic plasticity in *Flaveria brownii*. Growth irradiance and the expression of C4 photosynthesis // Plant Physiol.— 1989.— 89.— P. 1129–1135.
13. McKown A.D., Dengler N. G. Key innovations in the evolution of Kranz anatomy and C4 vein pattern in Flaveria (Asteraceae) // Am. J. Bot.— 2007.— 94.— P. 382–399.
14. McKown A.D., Dengler N. G. Shifts in leaf vein density through accelerated vein formation in C4 Flaveria (Asteraceae) // Ann.Bot. (Lond.) .— 2009.— 104.— P. 1085–1098.
15. Langdale J. A., Nelson T. Spatial regulation of photosynthetic development in C4 plants // Trends Genet.— 1991.— 7.— P. 191–196.
16. Majeran W., Friso G., Ponnala L., Connolly B., Huang M., Reidel E., Zhang C., Asakura Y., Bhuiyan N. H., Sun Q., Turgeon R., van Wijk K. J. Structural and metabolic transitions of C4 quantitative proteomics in maize // Plant Cell.— 2010.— 22.— P. 3509–3542.

KRAVETS E.A., HORIUNOVA I.I., YEMETS A.I., BLUME Ya.B.

Institute of Food Biotechnology and Genomics, Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2a, e-mail: kravetshelen@gmail.com

DIFFERENTIATION OF LEAF VEIN BUNDLE SHEATH AND MESOPHYLL CELLS IN C3 AND C4 SPECIES IN CONNECTION WITH PHOTOSYNTHESIS OPTIMIZATION

Aims. The comparative anatomical study of the bundle sheath and mesophyll in C3 and C4 species to determine the changes in leaf anatomy that cause the formation of two-chamber C4 system named Kranz anatomy. ***Methods.*** Light and fluorescent microscopy. ***Results.*** Anatomical features of C3 and C4 plants is a reflection of the various ways of differentiation of leaf tissues (bundle sheath and mesophyll cells). In monocots C3 plants the functioning of the photosynthetic apparatus is accompanied by specialization and complexity of the bundle sheath, namely the formation of additional mestomic bundle sheath, cutynization of the cell walls, "lengthening" of bundle sheath cells to the leaf surface and the development of air parenchyma. The simplification of the bundle sheath structure (reduction of mestomic cover and its «lengthening») and differentiation of mesophyll to the Rubisco-containing bundle sheath and FEPK-enriched mesophyll chloroplasts occur by formation of C4 metabolism. ***Conclusions.*** C3 and C4 plants use different ways of CO_2concentration and assimilates of the bundle sheath cells. Structural adjustment of C4 plants are more advanced: grow of effective space of vien and bundle sheath while area of mesophill cells are reduced. The mesophill cells are characterized by expressive dynamic properties than the bundle sheath. Veins become the inductors of Kranz anatomy while hlorenhima cells serve as a source of CO_2 and the «buffer zone».

Keywords: leaf veins, bundle sheath, mesophyll cells, Kranz anatomy, C3 and C4 species.

УДК 582:635.8+581.143

КУЗНЕЦОВА О.В., ВЛАСЕНКО К.М.
ДВНЗ «Український хіміко-технологічний університет»,
Україна, 49005, м. Дніпропетровськ, пр. Гагаріна, 8, e-mail: Olga_59k@mail.ru

ЕВОЛЮЦІЯ ГОРМОНАЛЬНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ У ГРИБІВ

У процесі еволюції живих систем виникнення гормонів, як вважають, пов'язано з диференціацією живої матерії, з відокремленням тканин і органів, діяльність яких повинна бути тонко координована. Припускають, що вже давні одноклітинні організми використовували певні біологічно активні речовини для реалізації процесу міжклітинних взаємодій [1]. Деякі речовини такого роду, які володіли регуляторними функціями, могли діяти як на окремі клітини найпростіших, так і вже пізніше на клітини багатоклітинних організмів. Згодом вони стали виконувати функції гормонів [2]. Єдність походження гормонів у різних організмів підтверджується виявленням відомих гормонів тварин у клітинах найпростіших, грибів, нижчих та вищих рослин, де вони виконують функції регуляторів клітинного поділу, руху війок і вакуоль тощо [3]. Подібність гормональної системи мікроорганізмів, грибів, нижчих і вищих рослин дає підстави для ствердження, що фітогормони виникли ще у прокаріот, а далі в процесі еволюції вони збереглися у всіх організмів, а у вищих рослин і тварин набули регуляторної ролі. У літературі досить поширена думка про те, що формування гормонального апарату різних груп організмів є результатом тривалої еволюції, пов'язаної з перетворенням окремих біологічно активних метаболітів у регуляторні гормональні речовини [4].

За даними палеонтологічних досліджень, гриби мають поліфілетичне походження від різних джгутикових і безджгутикових одноклітинних організмів [5]. Від останніх виникли, як вважають, зигоміцети, з яких виходять вищі гриби, від різноджгутикових водоростей — ооміцети. Достовірно перші гіфоподібні структури, які володіли апікальним ростом, були виявлені у пізньому докембрії: в неопротерозойських відкладеннях віком біля 600 млн років [6]. Починаючи з юрського періоду (230 млн років) викопні гриби становляться дуже схожими на сучасні форми [7]. Грибні організми, близькі сучасним, з'явилися вже дуже давно: спори, схожі на спори сапролегнієвих мають вік 185 млн років. Перший агариковий (шапковий) гриб був знайдений у 1994 році у туринських відкладеннях середнього крейдового періоду (90–94 млн років назад). Існують дані, що процеси формоутворення й видоутворення у грибів носять переважно аллотопний характер та піддаються впливу екологічних ізолюючих механізмів. Припускають, що при виході рослин на сушу суттєве значення мали організми гетеротрофного блоку, в тому числі сапротрофні і симбіотрофні гриби [8, 9]. Дані палеомікології свідчать про дуже давнє походження грибних організмів, які в процесі еволюції не придбали досконалих пристосувань до зовнішнього середовища — виникнення справжніх органів і тканин. Це корелюється з еволюцією гормональної регуляції різних царств живого, яка йшла сумісно з еволюцією самих організмів.

Як вважають, хімічний вплив — давня форма взаємодії між клітинами багатоклітинних організмів, який здійснюється за допомогою продуктів обміну речовин, що виділяються в організмі. Це найбільш еволюційно старий спосіб регуляції в організмі. Інформація між клітинами може передаватися у формі потенціалу дії або шляхом зміни концентрацій хімічних речовин (іони, метаболіти) або особливих молекул — гормонів чи нейромедіаторів [10]. Г. Левінсон (1974) [11] припускає, що біосинтез поліізопреноїдних молекул, що є основою терпеноїдних та стероїдних гормонів, був можливий вже близько двох з половиною мільярдів років назад, так що ці речовини могли перейняти на себе функції феромонів і гормонів на досить ранніх рівнях еволюції. Такі функції гормонів ми як раз і спостерігаємо у грибів, як одних із самих найдавніших організмів: гормональна регуляція у грибів не має чіткої визначеності. Терпени і (або) стероїди виконують, наприклад, в організмах грибів функції феромонів, в організмах вищих рослин — роль гормонів, в організмах членистоногих вони можуть виконувати обидві вищеназвані функції.

Вчені підкреслюють, що біосинтез сполук, які здійснюють передачу інформації хімічним шляхом, а також регулюють ріст і відтворення живих організмів, дуже економічний: у багатьох видів, що знаходяться на різних рівнях філоге-

© КУЗНЕЦОВА О.В., ВЛАСЕНКО К.М.

незу, повторюються всі або велика частина однотипних ферментативних реакцій. Тому гуморальна регуляція притаманна всім групам живих істот. У процесі еволюції тваринного світу механізми гуморальної регуляції поступово доповнювались більш складними і більш досконалими механізмами нервової регуляції функцій [10].

В Україні еволюційний напрямок у вивченні фітогормонів започаткував всесвітньо відомий вчений-фітогормонолог М.Г. Холодний, який розвивав концепцію походження гормональних речовин у рослинному організмі, підкреслюючи визначальну роль природного добору в процесі виникнення і становлення системи гормональної регуляції рослин. Він вважав, що вторинні метаболіти, які виявляли стимулюючий вплив на хід фізіологічних процесів, були вихідним матеріалом відбору швидкодіючих біологічно активних сполук з регуляторною функцією [12]. Деякі дослідники для пояснення ролі терпеноїдних сполук як речовин хімічної взаємодії в одноклітинних і багатоклітинних організмах використовують гіпотезу Холдейна, згідно з якою прямими попередниками гормонів є феромони [11].

У тварин гормональні функції є доволі визначеними та обмеженими, тоді як у рослин система фітогормонального сигналу є не дуже чіткою і часто зв'язана з фізіологічним станом або положенням цільової тканини і клітин. Тобто часто певна реакція може бути викликана декількома з фітогормонів або даний фітогормон може викликати декілька гормональних відповідей [1, 3]. В еволюційному відношенні це пояснюють тим, що фітогормони класифікуються як продукти вторинного метаболізму [12], а вторинний метаболізм характерний для клітин з низькою або неспеціалізованою активністю [1].

Цікаво відзначити, що деякі фітогормони мають структури, подібні до гормонів тварин. Наприклад, ауксини рослин подібні до триптаміну та серотоніну тварин, гібереліни — до кортикостероїдів, цитокініни — до циклічної АМФ тварин [4]. Аналізуючи подібність хімічної структури фітогормонів і гормонів тварин, можна зробити припущення щодо подібності і механізму дії цих речовин у таксономічно різних груп організмів. Фітогормони, як і гормони тварин, проявляють регуляторні функції у дуже низьких концентраціях (10^{-5}–10^{-13} моль/л) і не беруть участь безпосередньо у тих біохімічних перетвореннях, які ними викликаються. Однак дія гормонів на рослини (мг/кг) стає помітною при дозах, на порядки менших у порівнянні з тваринами і їх гормонами, тому вміст фітогормонів у рослин нікчемний [13].

Рослини здатні продукувати ряд гормонів тварин — жіночі та чоловічі гормони ссавців — естрогени і андрогени. Вважають, що функцією цих гормонів у рослинах є запобігання поїданню рослин ссавцями. За іншою гіпотезою, статеві гормони ссавців у рослин можуть утворюватися випадково, як продукти метаболізму, що приводять до синтезу важливіших стеролів рослин, роль яких пов'язана з процесами розвитку, цвітіння та проявом статі у рослин [14]. Так, у насінні та пилку фінікової пальми виявлено естрон, насінні яблуні — естріол, пилку сосни — тестостерон. У тварин гормональна система ретельно збалансована, тому екзогенне надходження статевих гормонів може серйозно впливати на розмноження, в тому числі людини.

У рослинах у деяких випадках містяться не самі гормони тварин, а близькі сполуки, які у рослинному організмі імітують дію гормонів тварин. Так, із коренів рослини родини бобових *Pueraria mirifica* виділено міrестрол, структура якого близька до жіночого гормону естрону. Ця сполука при пероральному вживанні викликає аборт у вагітних жінок. Достовірні докази гормональної взаємодії між рослинами та тваринами отримано при дослідженні відкритих в рослинах ювенільних гормонів та тваринних гормонів линяння (фітоекдизони). У метаморфозі комах гормони необхідні для регуляції онтогенезу, який охоплює кілька стадій за участю цих гормонів — від личинки до дорослої особини (імаго). У рослинах ювенільні гормони синтезуються як засіб самозахисту від комах, оскільки вони здатні затримувати розвиток комах, а іноді — спричиняти їх загибель [15].

Вперше цей факт був встановлений чеським вченим Карелом Слама, який культивував на фільтрувальному папері клопа безкрилого (*Pyrrhocoris apterus* L.) і виявив, що метаморфоз комахи порушений — личинки клопа не можуть завершити перетворення у дорослу особину на стадії лялечки. З'ясувалось, що у хвойному дереві, із якого був виготовлений фільтрувальний папір — бальзамічній піхті (*Abies balsamea*) міститься структурний аналог ювенільного гормону — ювабіон, який вибірково діє саме на цю комаху. Ювенільні гормони були також виділені

із рослин *Cedrus deodara, Vetiveria zizanioides, Ocimum basilicum, Ageratum conyzoides* [16].

Можливість здійснювати контроль за ростом комах за допомогою подібних речовин використовують при тестуванні синтетичних інсектицидів. У рослинах виявлено близько 50 речовин, що проявляють активність гормонів линяння і порушують нормальний метаморфоз комах. Наявність в рослинах фітоекдизонів — це, можливо, захисний механізм, який був вироблений рослинами на певному етапі еволюції до появи або на початку розвитку покритонасінних. У теперішній час фітоекдизони виявлені у квіткових та голонасінних рослинах, папоротях, грибах, мохах. Припускають, що комахи, які з'явилися у порівнянні з рослинами на більш пізніх етапах еволюції, почали використовувати їх як гормональний фактор розвитку, а підвищений синтез фітоекдизонів у давніх папоротей і голонасінних первісно представляв захисний механізм від поїдання комахами-фітофагами [16].

Зараз відомо, що гриби, на відміну від рослин та тварин, не синтезують специфічних (власних) гормонів, хоча є, безперечно, унікальними продуцентами фізіологічно активних речовин широкого спектра дії [17]. Вони продукують фітогормони, і є відомості більше ніж про 100 видів грибів з різних таксономічних груп, здатних продукувати гормони рослин всіх основних груп. Існуючи дані свідчать про те, що більшість відомих грибів-продуцентів фітогормонів є фітопатогенами [16]. Рослинні гормони, які синтезують гриби цієї екологічної групи, беруть участь у процесах фітопатогенезу і регуляції взаємовідносин паразита і рослини-хазяїна. Гриб-паразит за допомогою фітогормонів змінює гормональний статус рослини-хазяїна, чим забезпечує для свого росту та розвитку більш сприятливі умови [4].

Роль фітогормонів, які синтезуються сапротрофними і мікоризними грибами, не зовсім з'ясована. Вважають, що мікоризні гриби, тісно пов'язані в життєвому циклі з рослинами, мають підвищену здатність утворювати ці речовини [4, 16]. При мікоризному симбіозі взаємовідносини між грибом і рослиною мають двобічний гормональний характер: рослини виділяють велику кількість речовин, які впливають на ріст і морфогенез мікоризних грибів (вуглеводи, цитокініни, М-фактор, ІОК, жасмонова кислота), і в той же час гриби виділяють метаболіти з рістрегулюючою активністю (гібереліни, ІОК, етилен, вітаміни, ферменти та ін.). Також відмічено, що мікоризні гриби і рослини здатні взаємно регулювати проникність мембран і мінеральний обмін [18]. Щодо сапротрофних грибів, то існує думка, що гормони росту, які виділяються грибами, стимулюють швидкий ріст рослини у довжину. Стеблини витягуються і під тяжкістю власної ваги рослини вилягають, в результаті чого рослина стає більш уразливою і доступною для сапротрофних грибів. Така дія притаманна, наприклад, відомому грибу *Gibberella fujikuroi*, який здатний синтезувати у значної кількості різні види гіберелінів [19].

Більшість грибів-продуцентів фітогормонів є представниками класу *Hyphomycetes*, але знайдені вони і у представників класу *Basidiomycetes,* порядків: *Aphyllophorales, Boletales, Agaricales, Sclerodermales, Hymenogastrales, Uredinales, Ustilaginales* [4, 20].

З'ясовано, що гриби синтезують дуже різноманітні органічні сполуки, серед яких значне місце займають такі фізіологічно активні речовини як ферменти, антибіотики, токсини, фітогормони, вітаміни. Цікаво, що гриби здатні синтезувати ці речовини в кількостях, що в 100–1000 разів перевищують їх вміст у вищих рослинах [17, 21]. Однак встановлено, що фітогормони у міцелії і базидіомах вищих грибів знаходяться у вільній і зв'язаній формах. Вчені припускають, що кон'югація фітогормонів у грибів є пристосувальним механізмом для нейтралізації їх вільних форм, які не потрібні для росту в окремі стадії розвитку грибів. Наприклад, відмічено надзвичайно низький рівень ендогенних фітогормонів у вегетативному міцелії *Pleurotus ostreatus* [4]. Можливо, дійсно, вони там не потрібні. Це можна встановити експериментально через дію екзогенних факторів (фітогормонів) на ріст вегетативного міцелію і визначити їх роль на різних стадіях онтогенезу грибів.

Інтерес до вивчення біосинтезу і ролі фітогормонів у вищих базидіальних грибів пов'язаний, по-перше, не лише з великим загально науковим інтересом до питань гормональної регуляції життя різних живих організмів але й має значення для подальшого розвитку грибних біотехнологій у сучасному грибівництві і збільшення продуктивності їстівних грибів, а, по-друге — у галузях, пов'язаних з отриманням лікарських препаратів із вищих грибів.

Якщо прийняти гіпотезу про спільне еволюційне походження гормонів у різних груп ор-

ганізмів, то можна припустити, що фізіологічна дія різних гормонів буде проявлятися однаково. Можливо спільні гормони навіть різних Царств живого (рослин, тварин та грибів) проявляють однаковий вплив на ріст та розвиток організмів.

У рослин більшість фізіологічних процесів, в першу чергу ріст, формоутворення і розвиток, регулюються гормонами. Функції фітогормонів не обмежуються тільки регуляцією росту, вони здатні контролювати і управляти практично повністю метаболізмом рослин в онтогенезі. Гормони беруть участь у процесах формування статі, старінні, переходу до стадії спокою, транспорті речовин, передаванні сигналів про зміну параметрів зовнішнього середовища, адаптації рослин до стресових дій, регуляції процесів синтезу органічних сполук та їх розпаду [3].

У процесі наших досліджень щодо росту та розвитку грибів роду *Pleurotus* було визначено, що фітогормони здатні впливати на практично всі фізіологічні процеси у грибів. Так, показано, що гормони групи ауксинів прискорюють утворення примордіїв та збільшують урожайність грибів [22]. Гормони групи гіберелінів збільшують швидкість радіального росту міцелію, викликають розтягнення клітин, прискорюють утворення примордіїв та збільшують їх кількість [23]. Гормони групи цитокінінів скорочують лаг-фазу росту міцелію, збільшують швидкість радіального росту, але не впливають на стадію утворення примордіїв та їх кількість [24]. Комплексні стимулятори росту, такі як фумар і біогумат, чинять більш широку дію на ріст та розвиток грибів роду *Pleurotus*: скорочують лаг-фазу росту міцелію, збільшують швидкість росту, викликають інтенсивний поділ клітин, прискорюють утворення примордіїв та позитивно впливають на стадію плодоношення [25]. Крім того, в умовах глибинного культивування гіберелін та біогумат сприяють збільшенню біомаси та інтенсифікують синтетичні процеси у міцелії [26].

Висновки

Аналізуючи вплив фітогормонів на фізіологічні процеси у рослин і порівнюючи з впливом гормонів у тваринному і грибному організмах, можна відмітити їх подібність. Є багато спільного у тих функціях, що виконують гормони у грибному і рослинному організмі. І це, ймовірно, пов'язано, в першу чергу, зі спільним еволюційним походженням гормональної регуляції у різних груп організмів. Роль фітогормонів у грибних організмах чітко не визначена, хоча аналізуючи дані дослідників, можна припустити, що ці біологічно активні речовини беруть участь у певних фізіологічних процесах у грибах. Практична спрямованість ролі фітогормонів у грибах полягає в тому, що регулятори росту рослин можуть бути застосовані у грибних біотехнологіях для підвищення ефективності біосинтетичних процесів та урожайності їстівних грибів, що штучно культивуються.

ЛІТЕРАТУРА

1. Neumann K-H., Imani J., Kumar A. Plant Cell and Tissue Culture — A Tool in Biotechnology. Ch. 11. Phytohormones and Growth Regulators.— Springer Berlin Heidelberg, 2009.— P. 227–233.
2. Полевой В. В. Фитогормоны.— Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1982.— 248 с.
3. Медведев С. С. Физиология растений.— СПб.: Изд. С.— Пет. ун-та, 2004.— 336 с.
4. Ситник К. М., Мусатенко Л. І., Васюк В. А., Веденічева Н. П., Генералова В. М., Мартин Г. Г. Гормональний комплекс рослин і грибів.— Київ, 2003.— 186 с.
5. Stubblefield S. P., Taylor D. L. Recent advantages in palaeomycology // New Phytologist.— 1988.— 108.— P. 3–25.
6. Катарыгин И. В., Снигиревская Н. С. Палеонтологические свидетельства о происхождении основных таксономических групп грибов // Микология и фитопатология.— 2004.— 38, № 5.— С. 15–31.
7. Redecker D., Kodner R., Graham L. E. Palaeoglomus grayi from the Ordovician // Mycotaxon.— 2002.— 84, № oct–dec.— P. 33–37.
8. Змитрович И. В., Спирин В. А. Экологические аспекты видообразования у высших грибов // Вестник экологии, лесовед. и ландшафтовед.— 2006.— № 6.— С. 44–68.
9. Дьяков Ю. Т. Введение в генетику грибов.— М.: Изд. центр «Академия», 2005.— 304 с.
10. Бакл Дж. Гормоны животных. Пер. с англ.— М.: Мир, 1986.— 88 с.
11. Левинсон Г. Терпеноидные феромоны и гормоны: их эволюция и биосинтез // Успехи химии.— 1974.— 43, № 1.— С. 181–195.
12. Холодный Н. Г. Фитогормоны: (Очерки по физиологии гормональных явлений в растительном организме) .— К.: Изд-во АН УССР, 1939.— 265 с.
13. Романов Г. А. Рецепторы фитогормонов (Обзор) // Физиол. раст.— 2002.— 49, № 4.— С. 615–625.

14. Иванов В. Д. Феромоны насекомых // Соровский образоват. журнал.— 1998.— № 6.— С. 29–34.
15. Ісаєнко В. М., Войціцький В. М., Бабенюк Ю. Д. Екологічна біохімія.— К.: Книжкове вид-во НАУ, 2005.— 440 с.
16. Саловарова В. П., Приставка А. А., Берсенева О. А. Введение в биохимическую екологию.— Иркутск: Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2007.— 159 с.
17. Билай В. И. Основы общей микологии.— К.: Вища школа, 1989.— 392 с.
18. Godola G. Regulation of micorhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi // Experimenta.— 1991.— 47, № 4.— P. 331–340.
19. Bruckner B., Blechschmidt R. Die microbiologische synthese von gibberellinen // J. Basic. Microbiol.— 1986.— 26, № 8.— P. 483–499.
20. Radic N., Injac R., Strukelj B. Sulphur Tuft Culinary — Medicinal Mushroom, *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murril: Bioactive Compounds and Pharmaceutical Effects (Review) // Int. J. of Med. Mushrooms.— 2009.— 11, № 2.— P. 103–116.
21. Song C. H. Growth stimulation and lipid synthesis in *Lentinus edodes* // Mycologia.— 1989.— 81.— P. 514–522.
22. Кузнецова О. В. Вплив стимуляторів росту на розвиток вегетативного міцелію *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kumm. // Біотехнологія.— 2011.— 4, № 3.— С. 82–89.
23. Kuznetcova O. V., Zakolesnyk N. V. The influence of phitohormone — gibberellin on the ontogenesis of edible and medicinal oyser mushroom (*Pleurotus ostreatus* (JACQ.: FR) KUMM.) // Proceedings of the III International young scientists conference «Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution», 15–18 May, 2007.— Odesa, 2007.— P. 90.
24. Кузнецова О. В., Василенко О. Ю. Использование стимуляторов роста в процессе культивирования высших базидиомицетов // Тезисы докладов III съезда микологов России «Современная микология в России», 10–12 октября 2012 г.— М.: Национальная академия микологии, 2012.— 3.— С. 361–362.
25. Кузнецова О. В., Малиновская Н. В., Герасименко В. О. Влияние комплексного стимулятора роста нового поколения на морфогенез *Pleurotus ostreatus* // Вісник укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.— 2011.— 9, № 2.— С. 227–231.
26. Кузнецова О. В. Влияние стимуляторов роста на синтез биологически активных веществ высшими базидиомицетами // Успехи медицинской микологии.— 2013.— 11.— С. 349–352.

KUZNETCOVA O.V., VLASENKO K.M.

Ukraining State chemical-technology University,
Ukraine, 49005, Dnipropetrovsk, Gagarina str., 8, e-mail: Olga_59k@mail.ru

EVOLUTION HORMONAL REGULATION IN FUNGI

Aims. Analyze literature data on the evolution of hormonal regulation in different groups of organisms: plants, animals, fungi. Identify possibilities for the use phytohormones for regulate the growth and development of higher fungi. ***Results***. Fungal organisms have very ancient origin, so the evolution is not acquired perfect adaptations to the environment — the origin of true organs, tissues. Mushrooms do not synthesize specific (own) hormones. They produce phytohormones in quantities 100–1000 times higher than their content in higher plants. However, hormonal regulation in fungi has no clear definition. According to common evolutionary origin of hormones in different groups of organisms: plants, animals, fungi,— suggests that the physiological action of various hormones will manifest the same. In the course of our studies on the growth and development of fungi of the genus *Pleurotus* it was determined that plant hormones can influence almost all physiological processes in fungi, plants like: radial growth rate, tension and division of cells, biomass accumulation, biosynthetic processes, productivity and more. ***Conclusions***. There are many similarities in those functions that perform the hormones in the plant and fungi organisms. This is probably due, primarily, with a common evolutionary origin of hormonal regulation in different groups of organisms. The practical orientation of the role of phytohormones in mushrooms is that plant growth regulators can be used in fungal biotechnology to improve the efficiency of biosynthetic processes and yield of edible fungi artificially cultivated.

Keywords: evolution, fungi, hormonal regulation, phytohormones, genus *Pleurotus*.

УДК 578.811+578.56

КУШКІНА А. І.
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
Україна, Д03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 154, e-mail: a.kushkina@gmail.com

СТРУКТУРНІ ТА ГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ЛІТИЧНОГО БАКТЕРІОФАГА LW1, НОВОГО ПРЕДСТАВНИКА ПСЕВДО Т-ПАРНИХ ФАГІВ

На сьогоднішній день офіційна таксономія Т4-подібних бактеріофагів не відображає існуючу спорідненість між вірусними видами, що належать до цієї групи. Як і всі віруси взагалі, об'єднані за морфологічними ознаками, ці фаги часто виявляються філогенетично неспорідненими з їх прототипом, фагом Т4. Тому для удосконалення вже існуючої класифікації потрібні ізоляція та сиквенування нових членів вже існуючих підгруп Т4-подібних вірусів бактерій. Одною з основних специфічних властивостей підгрупи RB43-споріднених псевдо Т-парних фагів є специфічна будова їх геному [1]. Ця підгрупа не є чисельною і об'єднує фаги ентеробактерій RB16 [1] та RB43 [2], фаги KP15 та KP27 *Klebsiella pneumoniae* [3, інвентарний номер GenBank NC_014036 та HQ918180, відповідно], та фаг vB_CsaM_GAP161 *Cronobacter sakazakii* [4]. Всі ці бактеріофаги містять у своєму геномі від 1 до 6 передбачених генів HNH-ендонуклеаз, продукти яких містять специфічні домени AP2-родини, що широко притаманні рослинам [5]. Наявність рослино-специфічних ендонуклеаз в геномі фагів даної групи розглядалась як одина з можливих додаткових відмінностей [2]. Бактеріофаг Lw1 має RB43-подібну геномну організацію, однак не містить передбачених генів рослино-специфічних AP2-ендонуклеаз.

Матеріали і методи

У роботі використовували LB-середовище для бактерій. Розмноження фагів здійснювали на *Escherichia coli* B^E та BL21 (DE3).

Очистку, концентрування та розділення фаголізату проводили в кілька етапів із застосуванням іонообмінної хроматографії на DEAE-целюлозі та градієнтного центрифугування.

Для одержання електронних мікрографій зразки контрастували ураніл ацетатом (2%).

Екстракцію ДНК здійснювали з використанням суміші ДСН (20%) та фенолу. Рестрикційний аналіз та аналіз віріонних білків проводили в агарозному та ДСН-ПАА гелях, відповідно, за стандартними протоколами. Сиквенування віріонної ДНК було здійснено з використанням технології 454-піросиквенсу. Геномний контіг був зібраний з використанням програмного забезпечення Newbler v2.5.3.

Анотація вірусного генома була здійснена з використанням стандартних біоінформатичних онлайн інструментів: Glimmer (www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/glimmer_3.cgi) та GeneMarkS (www.exon.gatech.edu/genemarks.cgi) для ідентифікації ВРЗ; tRNA-scan (www.lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE) для передбачення генів tRNA; BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) для пошуку гомологів та ідентифікації генів; CoreGenes v3.0 (www.binf.gmu.edu:8080/ CoreGenes3.0/index.html) для порівняння групо-специфічних гомологів; DNAplotter (www.sanger.ac.uk/resources/software/dnaplotter) для створення зображення фагової хромосоми; гомологи бактеріальних токсинів шукали в колекції генів DBETH (www.hpppi.iicb.res.in/btox/). Ідентифікаційний номер анотованого геному в базі GenBank — KC801932.

Результати та обговорення

Lw1 був ізольований як контамінуючий фаг з лізованих клітин *E. coli* BL21 (DE3). У дослідженнях використовували кілька чистих ліній фага Lw1 одержаних 5-разовим клонуванням з окремої бляшки та наступним розмноженням на штамі *E. coli* B^E. Електронно-мікроскопічний аналіз зразків показав, що Lw1 належить до родини Myoviridae, морфотипу A2 (рис. 1) [6].

Середній розмір фагової головки Lw1 складає 107×80 нм, довжина хвостового відростка 117 нм. Характерною відмінністю фага Lw1 є здатність до спонтанного утворення надвеликої кількості аберантних часток з нетипово подовженими капсидами (рис. 1) зі значно вищою частотою, ніж це властиво Т4.

Аналіз білкового складу капсиду показав наявність значної кількості структурних білків, ідентичних або дуже близьких за розмірами до прототипа підгрупи — фага RB43, та абсолютну відмінність білкового складу Lw1 від капсиду фага Т4 (рис. 2).

© КУШКІНА А. І.

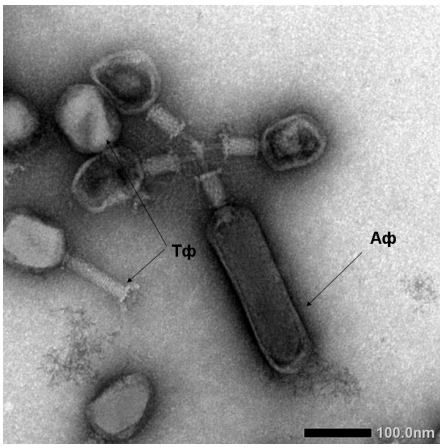


Рис. 1. Електронна мікроскопія бактеріофага Lw1. «Тф» — типова фагова частка, «Аф» — аберантна фагова частка з надподовженим капсидом

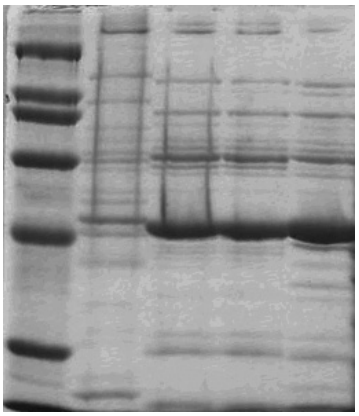


Рис. 2. ДСН-ПААГ фагових структурних білків. М — маркер, Т4-віріонні білки бактеріофага Т4, k1 та k2 — віріонні білки двох окремих чистих ліній фага Lw1, RB43-віріонні білки бактеріофага RB43

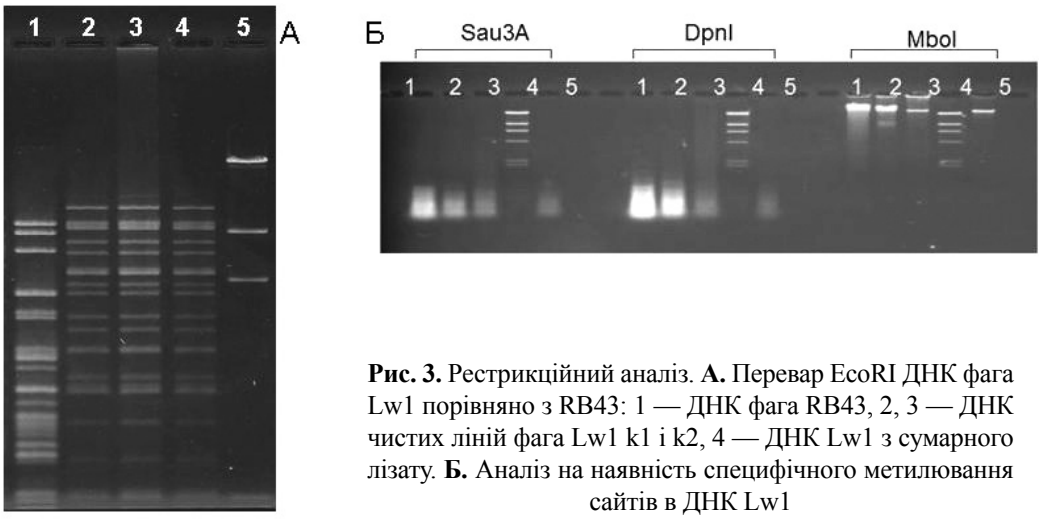


Рис. 3. Рестрикційний аналіз. **А.** Перевар EcoRI ДНК фага Lw1 порівняно з RB43: 1 — ДНК фага RB43, 2, 3 — ДНК чистих ліній фага Lw1 k1 і k2, 4 — ДНК Lw1 з сумарного лізату. **Б.** Аналіз на наявність специфічного метилювання сайтів в ДНК Lw1

Рестрикційний аналіз фагової ДНК показав наявність індивідуального патерна для фага Lw1, дозволив ідентифікувати всі ізольовані чисті лінії як варіанти фага Lw1 та показав різницю в розташуванні сайтів для вибраних ендонуклеаз рестрикції порівняно з фагом RB43 (рис. 3, А).

Використання набору ендонуклеаз рестрикції із специфічною чутливістю до метилювання сайтів ДНК показало наявність множинного повного та часткового метилювання сайтів Dam та Dcm (рис. 3, Б).

Геномний контіг фага Lw1 був зібраний програмою Newbler v2.5.3, що показало наявність кільцевої генетичної карти (рис. 4). Незвично, анотація геному Lw1 починається з гена rIIB через наявність перекриття в один нуклеотид між генами rIIB та rIIA. Останній є традиційною точкою старту для всіх Т4-подібних фагів при створенні генетичних карт або анотацій. Однак в разі, якщо стартовою точкою був би вибраний ген rIIA існуюче перекриття заважило нам представити геном у вигляді лінійної молекули, що є систематичною ознакою цих вірусів.

Капсид фага Lw1 містить лінійну двониткову ДНК довжиною 176,227 п.н. з кільцевою пермутацією. GC-склад дорівнює 43,5% та геном містить 274 передбачених гена, з яких: 273 білок-кодуючі ВРЗ та 1 ген Met-tRNA. Сто п'ятдесят ВРЗ (55%) не мають відомих функцій. Щільність знаходження генів в геномі складає 1,56 ген/т.п.н та кодуючи щільність геному складає 95,5%. Середній розмір одного гена становить 618 нуклеотидів; середній розмір передбаченого вірусного білка — 205 амінокислотних залишків. Найбільш спорідненими до Lw1 фагами є — RB43, GAP161, RB16, KP27 та KP15. Вони розділяють з Lw1 91,2% (249/273),

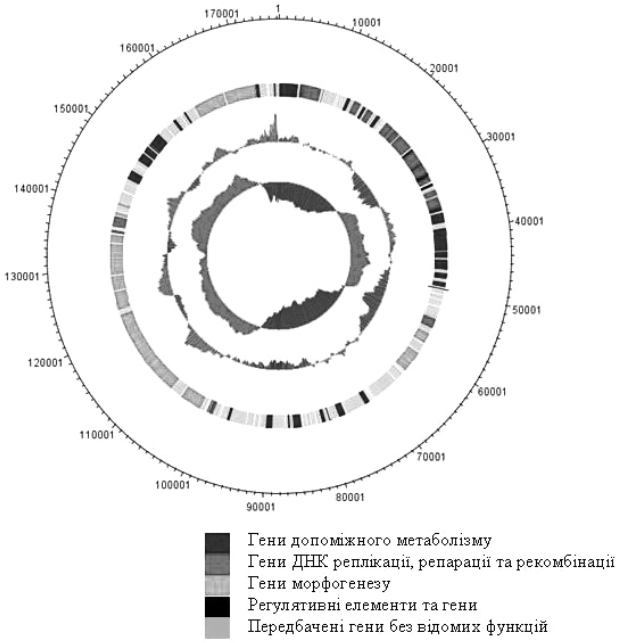


Рис. 4. Генетична карта бактеріофага Lw1

90,5% (247/273), 89,7% (245/273), 86,1% (235/273) та 83,2% (227/273) гомологів відповідно. Таким чином, фаг Lw1 належить до підгрупи RB43-подібних псевдо Т-парних бактеріофагів [7]. Зрештою, хоча геном Lw1 містить один ген Т4-специфічної ендонуклеази родини MobE, в ньому відсутні нуклеази, що містять AP2-домени. Така відносна нечисленність мобільних генетичних елементів свідчить або про їх нещодавню втрату, або про наявність обмеженої кількості сайтів для фіксації життєздатної інсерції в цей геном, порівняно з іншими RB43-подібними фагами.

Висновки

Таким чином, фаг Lw1 належить до підгрупи RB43-подібних псевдо Т-парних бактеріофагів [7]. Зрештою, хоча геном Lw1 містить один ген Т4-специфічної ендонуклеази родини MobE, в ньому відсутні нуклеази, що містять AP2-домени. Така відносна нечисленність мобільних генетичних елементів свідчить або про їх нещодавню втрату, або про наявність обмеженої кількості сайтів для фіксації життєздатної інсерції в цей геном, порівняно з іншими RB43-подібними фагами.

Автор висловлює подяку А.М. Остапчуку за допомогу у виконанні ДСН-ПААГ, та Ф.І. Товкачу за планування експериментів та дискусію.

ЛІТЕРАТУРА

1. Petrov V. M., Nolan J. M., Bertrand C., Levy D., Desplats C., Krisch H. M., Karam J. D. Plasticity of the gene functions for DNA replication in the T4-like phages // J. Mol. Biol.— 2006.— 361.— P. 46–68.
2. Nolan J. M., Petrov V., Bertrand C., Krisch H. M., Karam J. D. Genetic diversity among five T4-like bacteriophages // Virol. J.— 2006. Doi:10.1186/1743–422X-3-30.
3. Кksik-Szeloch A., Drulis-Kawa Z., Weber-D№ browska B., Kassner J., Majkowska-Skrobek G., Augustyniak D., Lusiak-Szelachowska M., Zaczek M., Gyrski A., Kropinski A. M. Characterizing the biology of novel lytic bacteriophages infecting multidrug resistant Klebsiella pneumoniae // Virol. J.— 2013. Doi: 10.1186/1743-422X-10-100.
4. Abbasifar R., Kropinski A. M., Sabour P. M., Ackermann H. W., Lingohr E. J., Griffiths M. W. Complete genome sequence of Cronobacter sakazakii bacteriophage vB_CsaM_GAP161 // J. Virol.— 2012. Doi: 10.1128/JVI.02546-12.
5. Magnani E., Sjцlander K., Hake S. From endonucleases to transcription factors: evolution of the AP2 DNA binding domain in plants // Plant Cell.— 2004.— 16.— P. 2265–2277.
6. Ackermann H. W., Krisch H. M. A catalogue of T4-type bacteriophages. // Arch. Virol.— 1997.— 142.— P. 2329–2345.
7. Monod C., Repoila F., Kutateladze M., Tutart F., Krisch H. M. The genome of the pseudo T-even bacteriophages, a diverse group that resembles T4 // J. Mol. Biol.— 1997.— 267.— P. 237–249.

KUSHKINA A.I.

Zabolotny Institute of microbiology and virology of the N.A.S. of Ukraine,
Ukraine, D03680, Kyiv, Acad. Zabolotnogo str., 154, e-mail: a.kushkina@gmail.com

STRUCTURAL AND GENETICAL FEATURES OF LITYC BACTERIOPHAGE LW1, A NEW MEMBER OF PSEUDO T-EVEN PHAGE GROUP

Aims. Bacteriophages are diverse group of bacterial parasites which have complex, but insufficient systematics. RB43-related bacteriophages have a specific genome type that clearly distinguishes them from other T4-like viruses. The main aim was to identify new Myoviridae phage Lw1 isolated as an *E. coli* BL21 (DE3) contaminant. ***Methods.*** Microbiological, biophysical, molecular biology and bioinformatic methods were used to reach the aims. ***Results.*** Here we present main characteristics and complete genome sequence of a new lytic phage Lw1 which shares RB43-like genome organization, but it does not contain putative AP2-domain endonuclease genes. ***Conclusions.*** By genomic organization phage Lw1 belongs to subgroup of RB43-like pseudo T-even phages. Although the Lw1 genome does contain one T4-like phage endonuclease of the MobE family, there is a lack of AP2-domain-containing endonucleases, and the relative paucity of mobile elements indicates either recent loss events or the presence of limited sites for viable insertion in the genome compared to some other RB43-like phages.

Keywords: T4-like phages, identification, morphology, structural proteins, DNA pattern, genome organization, phage-specific nucleases, gene drift.

УДК 635.64:631.528

ЛІСОВСЬКА Т. П.
Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки,
Україна, 43025, м. Луцьк, пр. Волі, 13, e-mail: tlisovska@ukr.net

ГОМОЛОГІЧНА РЕКОМБІНАЦІЯ У ГЕТЕРОЗИГОТНИХ ЗА МЕЙОТИЧНИМИ МУТАЦІЯМИ РОСЛИН ТОМАТУ

Генетична рекомбінація є потужним джерелом мінливості живих організмів. Вона забезпечує їхнє пристосування до змінних умов середовища, еволюцію і керовану людиною селекцію [1]. Найбільше значення у цьому відношенні має гомологічна рекомбінація генів — кросинговер, який відбувається у профазі I мейозу. Гомологічна рекомбінація ініціюється дволанцюговими розрізами ДНК, які здійснюються ендонуклеазою — топоізомеразою II, продуктом гена Spo11, яка є похідною топоізомерази VI архебактерій [2]. Після зближення гомологічних хромосом, яке стабілізується синаптонемним комплексом, і розв'язання обмінним або безобмінним шляхом структури Холідея, в першому випадку хроматиди взаємно обмінюються ділянками. Крім індукції комбінаційної мінливості, кросинговер призводить до утримання гомологів у бівалентах в місцях хіазм (обмінів) до анафази I, чим забезпечує регулярну сегрегацію гомологічних хромосом у першому поділі мейозу [3]. Для того, щоб в анафазі першого поділу мейозу гомологічні хромосоми могли вірно розійтися до полюсів, необхідно, щоб між ними відбувся, щонайменше, один кросоверний обмін (облігатний або обов'язковий), який би утримував гомологи разом до анафази I [4].

В останні десятиріччя спостерігається значний прогрес у розумінні процесів перебігу мейозу, кросинговеру, репарації і конверсії генів [2–5]. Хоча остаточної відповіді на питання, які саме гени і у якій послідовності відповідають за процеси нормального перебігу мейозу і важливих генетичних подій, які відбуваються під час мейозу — кросинговеру, конверсії генів і репарації ДНК, ще немає, однак встановлений тісний зв'язок між цими процесами. Значний успіх у розумінні генетичного контролю мейозу і кросинговеру, зокрема, був одержаний під час досліджень еукаріотичних мутантних організмів, які порушують нормальний перебіг мейозу, так званих мейотичних мутантів [6].

Вияв мутацій, що впливають на частоту і розподіл кросоверних обмінів у культурних рослин (кукурудза, жито, томати, рис, просо, у яких створені колекції мейотичних мутантів), має, крім теоретичного, важливе практичне значення. Знання генетичного контролю рекомбінації надасть людині можливість керувати формоутворюючим процесом [1].

Через переважно високу стерильність мейотичних мутацій у гомозиготному стані важливого значення набуває вияв рекомбінаційних ефектів мейотичних мутацій у гетерозиготному стані, що дозволило би безпосередньо використовувати їх у селекційному процесі.

У роботі наведені результати оцінки впливу мейотичних мутацій томату у гетерозиготному стані на частоту кросинговеру в маркованих зонах геному, а також на відмінності мікро- і мегаспорогенезу за частотою гомологічної рекомбінації.

Матеріали і методи

Частоту рекомбінації вивчали у чотирьох мейотичних мутантів томату. Мутант as_1 був відібраний у польових посівах томату сорту San Marzano [7], два — dsm_1 і sti — виникли спонтанно у польових посівах томату сорту Глорія [8, 9], мутант dsm_2 був відібраний у потомстві рослин-регенерантів сорту Вікторина.

Дослідження впливу мей-генів на частоту рекомбінації проводили з використанням ліній, які містили маркерні гени у 2-й (wv, aw, d), 4-й (e, ful), 6-й (m-2, c) і 11-й (hl, a) хромосомі. Застосовані маркерні гени мають чіткий фенотиповий вияв і легко ідентифікуються на стадії сіянців. Мутації зміненої форми листкової пластинки: *e* (4-а хромосома, 66 сМ) — листки з майже цілокраїми малочисельними сегментами, центральна жилка листа викривлена; *c* (6-а хромосома, 104 сМ) — перший справжній листок звичайно цільний, а наступні менш розчленовані; мутація *hl* (11-а хромосома, 48 сМ) — відсутність волосків на всіх частинах рослин; *d* (2-а хромосома, 70 сМ) — карликові рослини; мутації, які зумовлюють відсутність антоціану в усіх частинах рослини: *a* (11-а хромосома, 68 сМ) і *aw* (2-а хромосома, 59 сМ); хлорофільні мутації *m-2* (6-а

© ЛІСОВСЬКА Т. П.

хромосома, 77 сМ) — дуже дрібні хлоротичні плями на листках; *ful* (4-а хромосома, 24 сМ) — листя жовте у точці росту, більш старе листя світло-зелене; *wv* (2-а хромосома, 41 сМ) — сім'ядолі і справжнє листя завжди хлоротичні у ранньому віці і зберігають білу плямистість пізніше [10]. Запропоновані мутації характеризуються рецесивним моногенним успадкуванням. Розсаду маркерних ліній, мейотичних мутантів і вихідних сортів томату вирощували в теплиці, на стадії 5–6-ти справжніх листків висаджували у відкритий ґрунт на агробіостанції СНУ ім. Лесі Українки. Схрещування проводили за стандартною методикою на 2–3-й кисті. Через високу чоловічу стерильність мейотичних мутантів їх використовували в якості материнської форми. У наступному році одержували потомство F_2 та від тесткросів з багатомаркерними лініями. Висіювали насіння популяцій, які розщеплюються за маркерними генами, в теплиці за схемою 2×5 см, сіянці ідентифікували за фенотиповим виявом на стадії 3–4 справжніх листків.

Для гетерозигот оцінювали величину rf на підставі даних розщеплення за маркерними генами в популяціях F_2 і тесткросів, у яких рослини, гетерозиготні за мей-генами, були материнською формою. На основі оцінок величини rf у жіночому мейозі і сумарної у F_2 розраховували величину rf у чоловічому мейозі за методом максимальної правдоподібності [11].

Результати та обговорення

За цитологічним виявом три досліджені мутації — as_1, dsm_1, dsm_2 є синаптичними із різним ступенем редукції частоти хіазм на мейоцит [7, 8]. Наші дані свідчать, що найбільшу редукцію за частотою хіазм виявляє мутант dsm_2, середню — dsm_1 і найменшу — as_1.

Мутація sti характеризується очевидно нормальним початком мейозу, але вже на стадіях диплотени — діакінезу спостерігаються порушення конденсації хромосом, їх неспецифічні асоціації. В анафазі I виявляються чисельні переплетіння хроматину, фрагменти, злипання хромосом. Мейоз II у переважної більшості мейоцитів у мікроспорогенезі відсутній [9].

Часто в якості оцінки гомологічної рекомбінації використовують оцінку частоти хіазм або кількості рекомбінаційних вузликів на хромосому або мейоцит. Така оцінка, цілком коректна для організмів з нормальних мейозом, не виправдовує себе у мейотичних мутантів, значна кількість яких виявляє передчасне розпадання бівалентів у диплотені-діакінезі профази першого поділу мейозу. Таким чином організми із нормальним або навіть переважаючим норму рівнем кросинговеру у пахітені профази I мейозу будуть виявляти низьку частоту хіазм у диплотені-діакінезі. З іншого боку, реєстрація рекомбінаційних вузликів у пахітені може не відповідати кількості кросоверних обмінів у мейотичних мутантів з порушенням механізму розв'язання структури Холідея обмінним шляхом. Саме тому ми звернули увагу на оцінку частоти кросинговеру за результатами генетичного аналізу рекомбінантних класів рослин як завершального продукту рекомбінаційних подій.

Результати оцінки впливу мейотичних мутацій томату в гетерозиготному стані на гомологічну рекомбінацію в окремих зонах геному, одержані на підставі розщеплення маркерних генів в популяції F_2, не виявили істотної відмінності за частотою кросинговеру від вихідних сортів (табл. 1). Лише гетерозигота за мутацією as_1 виявила істотне зниження частоти рекомбінації у одній із чотирьох досліджених зон геному (табл. 1) .

Таблиця 1

Частота кросинговеру (rf) в маркованих зонах геному (за даними F_2) у гетерозиготних за мейотичними мутаціями рослин томату

Генотип	rf, % в зонах				
	e-ful	hl-a	aw-d	wv-aw	m2-c
San Marzano	35,06±1,83	18,38±1,41	12,13±1,26	17,41±1,51	—
As_1/as_1	34,59±1,38	21,68±2,29	10,50±1,20	12,04±1,29*	—
Глорія	—	18,93±4,87	13,06±1,53	18,33±1,83	26,11±1,75
Sti/sti	—	18,18±1,50	15,35±1,38	—	26,28±1,83
Dsm_1/dsm_1	—	15,56±1,02	10,55±1,28	14,23±1,49	—
Вікторина	33,25±1,67	14,69±1,08	—	—	—
Dsm_2/dsm_2	36,73±1,81	16,60±1,19	—	—	—

Примітка: * — відмінності від контролю істотні при $P \leq 0,05$.

Таблиця 2

Частота кросинговеру в маркованих зонах геному в мікро- і мегаспорогенезі

Генотип	Кількість рослин		Зони геному			
			aw-d		m2-c	
	F_2	ВС	$rf_♂$	$rf_♀$	$rf_♂$	$rf_♀$
Глорія	441	377	18,58±2,93	12,73±1,16	29,76±4,04	26,79±1,55
Dsm_1/dsm_1	259	257	19,54±3,62	11,67±1,41	26,74±5,09	26,85±1,95
Sti/sti	273	268	9,56±3,82	17,54±1,63*	18,45±4,80	25,75±1,88

Примітка: * — відмінності від контролю істотні при $P \leq 0,05$.

У наступному експерименті одночасно з F_2 були одержані популяції від аналізуючого схрещування, в якому рослини Dsm_1/dsm_1, Sti/sti і Глорія були материнською формою. Аналіз розщеплення за маркерними ознаками у ВС дозволив оцінити частоту рекомбінації в мегаспорогенезі ($rf_♀$), а величина rf в мікроспорогенезі була розрахована за програмою на підставі сумісного обліку даних F_2 і ВС [11].

Величина rf у гетерозигот Dsm_1/dsm_1 в чоловічому і жіночому мейозі не відрізняється від контролю — вихідного сорту Глорія (табл. 2). Мутація sti в гетерозиготному стані значно зменшує rf у мікроспорогенезі в обох вивчених зонах та істотно перевищує частоту рекомбінації в зоні aw-d у мегаспорогенезі (17,54±1,63 % у Sti/sti в порівнянні з 12,73±1,10 % у Глорії).

При цьому міняється співвідношення рівнів рекомбінації в мега- і мікроспорогенезі. Для контролю Глорія і генотипу Dsm_1/dsm_1 спостерігалася тенденція перевищення частоти рекомбінації в чоловічому мейозі над жіночим ($rf_♂ > rf_♀$), а для Sti/sti характерна зворотна тенденція ($rf_♂ < rf_♀$) (рис.). Отже, мутація sti різноспрямовано модифікує частоту рекомбінації в чоловічому та жіночому мейозі гетерозигот, що приводить до відсутності ефекту в F_2. За цитологічним виявом досліджені мутації раніше були віднесені нами до повністю рецесивних. Проте одержані дані дозволяють зробити висновок про неповну рецесивність мутацій as_1 і sti за впливом на рекомбінаційні події.

Величина rf, розрахована на підставі даних F_2, складається з величин rf в жіночому і чоловічому мейозі. З літературних даних відомо існування статевих відмінностей за частотою рекомбінації як у тварин, так і у рослин [12]. Раніше було показано зміну співвідношень рівнів рекомбінації в жіночому і чоловічому мейозі арабідопсиса за експериментальних впливів [13]. Отже, якщо зовнішні або внутрішні чинники різноспрямовано змінюють величину rf в мега- і мікроспорогенезі, величина rf в F_2 може залишатися на постійному рівні.

Мейотичні мутанти за цитологічним виявом є, як правило, рецесивними. Ймовірно, виходячи з того, що у гетерозигот за мей-генами спостерігається нормальний перебіг мейозу, їх майже не вивчали стосовно впливу на рекомбінацію, а у ряді робіт використовували гетерозиготи в якості контролю для порівняння із гомозиготними за мей-генами сибсами. Проте в нечисленних дослідженнях частоти кросинговеру у гетерозигот за мей-генами спостерігали окремі випадки неповного домінування — для генів as і el кукурудзи [14], генів as_b і as_4 томату [7] і наддомінування для гена c (3) G *Drosophila melanogaster* [15]. Хінтон пояснює ефект наддомінування гена c (3) G тим, що слабкі порушення у гетерозиготі є рекомбіногенними, а в гомозиготі більш виражені порушення запобігають рекомбінації.

Сильні рекомбінаційно-дефектні мутанти *D. melanogaster* проявляють слабкий домінантний ефект на рекомбінацію. Карпентер і Сандлер відзначили, що вивчені ними мутанти дрозофіли mei-9a, mei- 9b і mei-218 є рецесивними відносно пригнічення кросинговеру і виявляють домінантний ефект на розподіл обмінів і коінциденцію [16]. Серед мутацій дрозофіли, які впливають на конденсацію гетерохроматину, виявлені мутації,

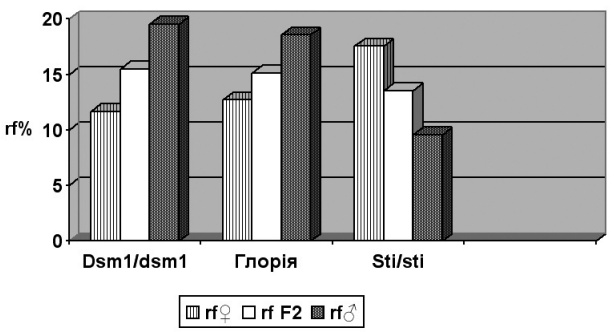


Рис. Вплив мейотичних мутацій у гетерозиготному стані на частоту рекомбінації у зоні aw-d у чоловічому і жіночому мейозі

які, перебуваючи в гетерозиготному стані, збільшують частоту кросинговеру в 3–4 рази і зменшують позитивну інтерференцію [17].

Висновки

За цитологічним виявом чотири досліджені мейотичні мутації раніше були віднесені нами до повністю рецесивних. Проте одержані дані дозволяють зробити висновок про неповну рецесивність мутацій as_1 і sti за впливом на рекомбінаційні події.

Досліджені мутації у гетерозиготному стані не впливали істотно на частоту кросинговеру у маркованих зонах геному за даними F_2, крім гетерозиготи As_1/as_1, яка виявила зниження rf у зоні wv-aw. Оцінка частоти кросинговеру окремо у жіночому і чоловічому мейозі показала, що у контролі — вихідному сорті Глорія і гетерозиготі Dsm_1/dsm_1 частота кросинговеру вище у чоловічому мейозі (мікроспорогенезі), у гетерозиготи Sti/sti частота rf була істотно вище у жіночому мейозі. Отже, мей-мутації у гетерозиготному стані (на прикладі sti) можуть різноспрямовано впливати на рекомбінацію в чоловічому і жіночому мейозі, змінюючи при цьому співвідношення рівнів $rf_♂$ і $rf_♀$ у порівнянні з нормою. Використання гетерозигот mei/+, змінюючих, подібно sti/+, рівень і/або розподіл кросоверних обмінів, може представляти інтерес в цілях розширення спектру генетичної мінливості в потомстві.

ЛІТЕРАТУРА

1. Жученко А. А., Король А. Б. Рекомбинация в эволюции и селекции.— М.: Наука, 1985.— 400 с.
2. Keeney S, Giroux CN, Kleckner N. Meiosis-specifc DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family // Cell.— 1997.— 88.— P. 375–384.
3. Pawlowski W. P., Cande W. Z. Coordinating the events of the meiotic prophase // Trends in Cell Biology.— 2005.— 15, № 12.— P. 674–681.
4. Korol A. B. Recombination // Encyclopedia of Biodiversity. Academic Press.— 2001.— 5.— P. 53–71.
5. Kleckner N. Meiosis: How could it work? // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1996.— 93.— P. 8167–8174.
6. Schwarzacher T. Meiosis, recombination and chromosomes: a review of gene isolation and fuorescent in situ hybridization data in plants // Journal of Experimental Botany.— 2003.— 54, № 380.— P. 11–23.
7. Moens P. B. Genetic and cytological effects of three desynaptic genes in the tomato // Canad. J. Genet. and Cytol.— 1969.— II, № 4.— P. 857–859.
8. Лісовська Т. П., Войтюк В. П., Кузьмішина І. І. Цитологічний і генетичний аналіз мейотичної мутації томата dsm1 // Науковий вісник ВНУ ім. Лесі Українки.— 2010.— № 12.— С. 105–111.
9. Лісовська Т. П., Кузьмішина І. І., Коцун Л. О., Войтюк В. П., Андреєва В. В. Мейотична мутація томату що порушує конденсацію хроматину // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр.— К.: Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова, 2014.— 14.— С. 125–129.
10. Жученко А. А. Генетика томатов.— Кишинев: Штиинца, 1973.— 663 с.
11. Король А. Б., Прейгель И. А., Прейгель С. И. Изменчивость кроссинговера у высших организмов: методы анализа и популяционно генетические модели.— Кишинев.: Штиинца, 1990.— 404 с.
12. Burt A., Bell G. Harvey P. H. Sex differences in recombination // J. Evol. Biol.— 1991.— 4.— P. 259–277.
13. Vizir I. Yu., Korol A. B. Sex difference in recombination frequency in Arabidopsis // Heredity.— 1990.— 65.— P. 694–717.
14. Nel P. M. Effect of the asinaptic factor on recombination in maize // Genetics.— 1975.— 79, № 3.— P. 435–450.
15. Hinton C. W. Enhancement of recombination associated with the c (3) G of Drosophila melanogaster // Genetics.— 1966.— 53, № 1.— P. 157–164.
16. Carpenter A. T. C., Sandler L. On recombination-defective meiotic mutants in Drosophila melanogaster // Genetics.— 1974.— 76, № 3.— P. 453–475.
17. Westphal Th., Reuter G. Recombinogenic effects of suppressors of position-effect variegation in Drosophila // Genetics.— 2002.— 160 (2) .— P. 609–621.

LISOVSKA T.P.

Lesia Ukrainka Estern European National University,
Ukraine, 43025, Lutsk, Voli prosp., 13, e-mail: tlisovska@ukr.net

HOMOLOGOUS RECOMBINATION IN HETEROZYGOUS BY MEIOTIC MUTATIONS TOMATO PLANTS

Aims. Significant progress in understanding the genetic control of meiosis and crossing-over, in particular, was obtained through research eukaryotic mutant organisms that violate the normal course of meiosis, called meiotic mutants. The

article presents the results of estimating the frequency of crossing-over in four heterozygotes for meiotic mutations tomato. ***Methods.*** The influence of mei-genes on recombination frequency was performed using lines that contain marker genes in the 2nd (wv, aw, d), 4th (e, ful), 6th (m-2, c) and 11 (hl, a) chromosomes. Sex difference in rf was determined on the basis of splitting of marker signs in populations F_2 and testcrosses of F_1 as maternal form with multiple-marker tester. Expected value of rf the maximum likelihood method. ***Results.*** Mutations in the heterozygous state did not affect significantly the frequency of crossing-over in marked areas of the genome according to F2, except heterozygotes As1/as1, which revealed rf reduction in area wv-aw. Assessment crossover frequency separately in female and male meiosis showed that in control — the initial variety Gloria and heterozygote Dsm1/dsm1 crossover frequency is higher in male meiosis (microsporogenesis) in heterozygotes Sti/sti rf frequency was significantly higher in female meiosis. ***Conclusions.*** The meiotic mutation as1 and sti is recessive completely by cytological manifestation, but not completely recessive to influence the homologous recombination.

Keywords: meiotic mutants, heterozygotes, crossing over, sex difference, tomato.

УДК 599.323.4

МАМЕДРЗАЕВА Е. Т.[1], КУЛИЕВ Г. Н.[1], КЕРИМОВА З. К.[1], КУЛИЕВ А. Г.[1], ШАМИЛОВ Э. Н.[2], ГАСЫМОВА Г. Э.[2], АБДУЛЛАЕВА А. С.[2]

[1] *Институт Зоологии НАН Азербайджана,*
Азербайджанская Республика, AZ1073, г. Баку, ул. А. Аббасова, 1128 квартал, 504 проезд,
e-mail: qiyas_q@mail.ru

[2] *Институт Радиационных Проблем НАН Азербайджана,*
Азербайджанская Республика, AZ1143, г. Баку, ул. Б. Вахабзаде, 9, e-mail: elshanshamil@gmail.com

КАРИОТИП *MICROTUS SOSIALIS* И РОДСТВЕННЫЕ СВЯЗИ ВИДОВ РОДА *CHIONOMYS* И ПОДРОДА *TERRICOLA*, ОБИТАЮЩИХ В АЗЕРБАЙДЖАНЕ

Многие виды полевок причиняют значительный вред сельскому хозяйству, поэтому представители полевок широко исследуются во многих отношениях. Ряд вопросов, касающихся систематики, родственных отношений и особенностей эволюции кариотипа полевок, остаются спорными. Систематика полевок в Азербайджане была изучена Шидловским [1]. Эволюция этих видов расширилась после появлений кариологических исследований. Для решения этих вопросов большую роль имеет применение методов дифференциальной окраски. Несмотря на то, что кариотипы этих видов были исследованы многими авторами [2–9], но родственные связи и эволюция кариотипов полевок изучены недостаточно.

Настоящая работа посвящена изучению родственных связей и эволюции кариотипа видов общественной, снежной и кустарниковой полевок.

Материалы и методы

Кариотип общественной полевки пойман в окрестностях села Ашаги Караманлы, Нефтечалинского района 19 животных (9 самок и 10 самцов), Снеговая полёвка Роберта — *Chionomys roberti*, 5 особей (2♀; 3♂), пойманы в окрестностях Или-су, Кахского района; Европейская снеговая полёвка — *Chionomys nivalis*, 21 (10♀; 11♂), пойманы в окрестностях курорта Исти-Су, Кельбаджарского района; Гудаурская снеговая полёвка — *Chionomys qud*, 18 (7♀; 11♂), пойманы в окрестностях села Согюб, Кубинского района; Дагестанская кустарниковая полёвка — *Microtus dagestanicus*, 22 (9♀; 13♂), пойманы в окрестностях села Кузун, Кусарского района; 23. Кавказская кустарниковая полёвка — *Microtus majori*, 23 (12♀; 11♂), пойманы вблизи города Кедабек, Кедабекского района; Полёвка Шелковникова — *Microtus schelkovnikovi*, 5 (2♀; 3♂), пойманы в Ленкоранской природной области на 17 км от Ленкорани по Лерикской дороге.

Исследование хромосом проводили на препаратах клеток костного мозга, приготовленных по модифицированной методике Форда и Хамертона [10]. Для получения дифференциально окрашенных хромосом применялся G-метод окраски, предложенный С. И. Раджабли [11]. Для выявления структурного гетерохроматина была использована методика Самнера [12].

Результаты и обсуждение

Chionomys qud Satunin, 1909-Гудаурская снеговая полевка. В кариотипе число хромосом 2n = 54; Основное число хромосом NF = 58. Х-хромосома-метацентрик, У-хромосома-акроцентрик [4].

Chionomys nivalis Martins, 1842-Европейская снеговая полевка. В кариотипе число хромосом 2n = 54; Основное число хромосом NF = 56. Х-хромосома-метацентрик, У-хромосома-акроцентрик [4].

Chionomys roberti Thomas, 1906-Малоазийская снеговая полевка или полевка Роберта. В кариотипе число хромосом 2n = 54; Основное число хромосом NF = 58. Х-хромосома — метацентрик, У-хромосома-акроцентрик [4].

Microtus (Terricola) Schelkovnikovi Satunin, 1907-Полевка Шелковникова имеет диплоидное число хромосом 2n = 54, основное число плеч NF = 62. Х-хромосома-акроцентрик, У-хромосома -акроцентрик [5].

Microtus (Terricola) majori, Thomas 1906-Кавказская кустарниковая полевка имеет диплоидное число хромосом 2n = 54, основное число плеч NF = 60. Первая и вторая пары являются субметацентриками. Х–хромосома-метацентрик. Х-хромосома-акроцентрик [5].

Microtus (Terricola) daghestanicus Schidlovsky, 1919-Дагестанская полевка Диплоидное

© МАМЕДРЗАЕВА Е. Т., КУЛИЕВ Г. Н., КЕРИМОВА З. К., КУЛИЕВ А. Г., ШАМИЛОВ Э. Н., ГАСЫМОВА Г. Э., АБДУЛЛАЕВА А. С.

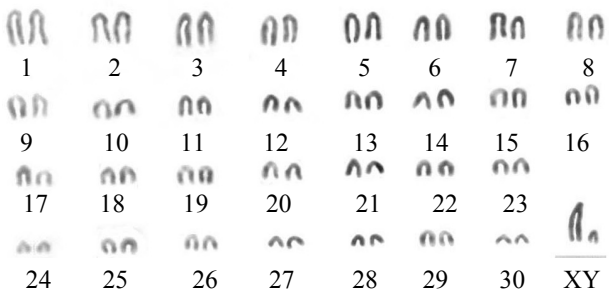


Рис. 1. Хромосом общественной полевки (*Microtus sosialis*). Обычная окраска

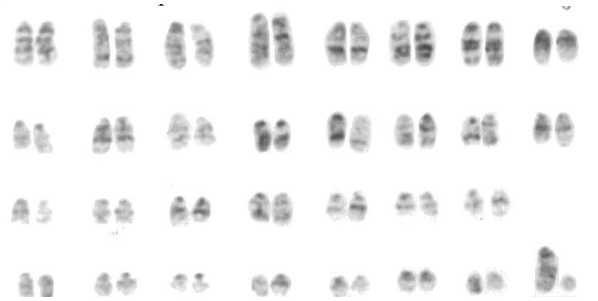


Рис. 2. Хромосом общественной полевки (*Microtus sosialis*). G-окраска

число хромосом 2n = 54, основное число плеч NF = 58. Х-хромосома представлена метацентриком, а Y-хромосома — мелкий акроцентрик [4, 5].

***Microtus (Sumeriomys) sosialis* Pallas, 1773-Общественная полевка**. Кариотипических различий между животными из разных популяций не обнаружено. Все исследованные полевки имели 2n = 62 и NF = 62. В кариотипе общественных полевок нет двуплечих хромосом: все аутосомы и половые хромосомы представлены акроцентриками, которые могут быть ранжированы в постепенно убывающие в размерах ряды (рис. 1).

Точная идентификация половых хромосом и распределение аутосом в пары оказались возможными только при использовании G-окраски (рис. 2). Для Х-хромосом характерно наличие двух близко расположенных полос в средней части хромосомы, одно полоса в околоцентромерном районе и еще одна — в теломерном. У-хромосома выглядит как диффузный слабоокрашенный элемент.

Структурный гетерохроматин обнаруживается в основном в центромерной части хромосом.

Межвидовые сравнения дифференцально окрашенных хромосом показали, что кариотипическая дифференциация у *Mikrotini* может быть связана с различного рода тандемными слияниями хромосом. Эти слияния приводят к появлению в кариотипах сложно-составных структур, истинные различия между которыми далеко не всегда выявляется при обычных сравнительно-кариологических анализах. Кариотипические различия, обусловленные именно такими перестройками, демонстрируют виды подрода *Terricola*.

Исследованные виды обнаруживают резкие различия в значениях 2n. Наиболее высокое число хромосом имеют *M. (S.) socialis,* у которых 2n = 62, и все хромосомы набора, включая половые, представлены акроцентриками. Три вида рода *Chionomys* и три вида подрода *Terricola* рода *Microtus* имеют 2n = 54, но различаются по числу двуплечих элементов.

Сравнение G-рисунка хромосом *Microtus socialis* и одной из видов кустарниковых полевок (*Microtus dagestanicus*) показало, что 21 аутосомная пара *Microtus socialis* имеет полностью идентичный рисунок дифференциальной окраски с хромосомами *M. dagestanicus* (рис. 1) Три пары *M. socialis* (1, 2 и 3) имеют сходный рисунок G-полос с соответствующими хромосомами *M. dagestanicus*, но последовательность распределения полос по отношению к центромере у хромосом *M. socialis* имеет интервированный характер. Для шести аутосомных пар *M. socialis* и двух пар *M. dagestanicus* гомология не установлена (рис. 1). Отличаются и Х-хромосомы сравниваемых форм.

Отличие 1, 2 и 3 пар *M. socialis* от соответствующих пар *M. dagestanicus* может рассматриваться как результат произошедшего в эволюции кариотипов этих видов слияния теломерными районами двух одинаковых акроцентриков, но последующей инактивацией разных видов центромер у разных участников слияния: 7-я и 12-я пары *M. dagestanicus*, 5-я и 6-я пары *M. socialis*, также предположительно являются продуктом слияния двух хромосом (на основании сравнительного анализа *M. dagestanicus*). Таким образом, в кариотипе *M. socialis* можно предполагать наличие, по крайней мере пяти пар, образованных в результате тандемных слияний более мелких хромосом. Это указывает на эволюцию кариотипа *M. socialis* от кариотипа еще более высокохромосомной формы. Шесть хромосом *M. socialis,* которым не найдено соответствующих хромосом в кариотипе *M. dagestanicus*, могли войти как составные элементы в 1-ю и 2-ю пары последних,

сложно-составная структура которых выявлена на основании межвидовых сравнений кустарниковых полевок.

Также сравнены виды родов *Chionomys* (*Ch. roberti, Ch. nivalis, Ch. gud*) относящиеся к группе 54-хромосомных полевок, также подрода *Terricola* рода *Microtus* (*M. majori, M. dagestanicus, M. schelkovnikovi*). Между всеми этими видами отмечается внешнее сходство кариотипов. Например, аутосомные наборы *Ch. gud* и *M. dagestanicus* морфологически не отличимы. Сравнение рисунка G-окраски хромосом показало, что эти формы действительно кариотипически очень сходны. Вместе с тем между видами рода *Chionomys* и подрода *Terricola* рода *Microtus* выявлены и различия, которые не могли быть обнаружены без использования дифференциальной окраски. 2-я, 4–18-я 20-я, 21-я и 26-я пары видов рода *Chionomys*, по рисунку G-окраски, гомологичны соответствующим парам в кариотипе *M. dagestanicus*. Четко отличаются 3-я пара двух сравниваемых родов: совпадают теломерные участки хромосом, остальные участки совпадают частично. Первые пары видов рода *Chionomys* и подрода *Terricola* рода *Microtus* сходны на протяжении двух третей длины от телемерного конца. Проксимальный околоцентромерный район различается по рисунку G-полос. При сравнении кариотипов двух видов *M. majori* и *M. dagestanicus* было установлено, что первые пары аутосом у этих видов образованы в результате теломерно-центромерного слияния двух акроцентриков. Различия в морфологии хромосом этих видов объясняются функциональной активностью центромер разных акроцентриков, вступивших в слияние. Сходство в рисунке G-полос хромосом первой пары *Chionomys* и подрода *Terricola* рода *Microtus* прослеживается на уровне большего из акроцентриков, участвовавших в образовании первой пары видов подрода *Terricola*. Можно предполагать, что хромосомы первой пары *Chionomys* образованы также в результате слияния двух акроцентриков, причем один из них тот же который принимал участие в образовании первой пары у *Microtus majori*. Следует вспомнить, что анологичным образом объясняются различия в рисунке G-полос между видами *M. majori* и *M. dagestanicus* с одной стороны *M. schelkovnikovi*, с другой. Следовательно, у всех сравниваемых видов в образовании первой пары аутосом участвовала одна и та же

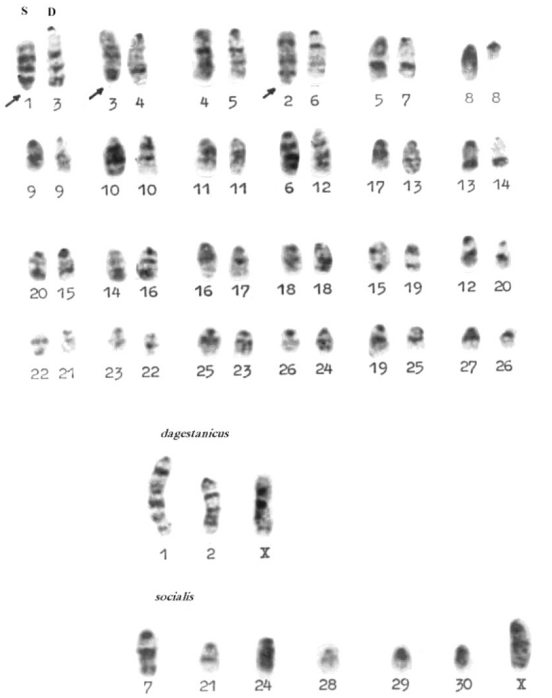


Рис. 3. Сравнение рисунка G-окраски хромосом *M. (S) socialis* и *M. dagestanicus*. В каждой паре левый элемент представляет хромосому из кариотипа *M. (S) socialis* (s) правый — из кариотипа *M. dagestanicus* (d). Цифрами обозначены номера пар в соответствии с ранжировкой хромосом внутри кариотипа вида. Внизу расположены хромосомы, несходные по рисунку G-окраски. Стрелками указаны центромеры у некоторых хромосом *M. (S) socialis*

акроцентрическая хромосома, слияние который с разными более мелкими акроцентриками дали три разных хромосомы. У 19-й пары *Chionomys* рисунок G-полос имеет инвертированный по сравнению с рисункой этой же пары *M. majori* и *M. dagestanicus* характер. Не исключено, что эта хромосома возникла в результате теломерно-теломерного слияния двух более мелких акроцентриков, но у разных форм функциональную активность сохранили разные участники слияния. Виды *Chionomys* отличаются от кустарниковых полевок и по рисунку G-окраски X-хромосомы. Различия в распределении по длине X-хромосомы могут быть объяснены крупной перицентрической инвесией.

Полученные нами результаты были сопоставлены с результатами опубликованными другими авторами [6] и *Microtus afghanus*. Эти авторы изучали кариотип 52-хромосомных *Microtus subterranius* из северо-восточный части Турции и сравнивали его с кариотипом *M. majori*. Резуль-

таты, полученные нами при изучении кариотип *M. majori*, полностью совпадают с результатами исследования вышеупомянутых авторов. Различия связаны только с порядком сложения хромосом. Нами также подтверждено, что уменьшение числа хромосом у *M. subterranius* обусловлено Робертсоновской транслокацией. Кариотипы изученных нами видов *Chionomys* и видов подрода *Terricola* рода *Microtus* сравнены с кариотипами полевки *Microtus afghanus,* изученной N. Martinkova et.al., (2004). Кариотипы этих видов по G-полосам очень сходны.

Выводы

Таким образом, изученные виды *Microtus socialis* в кариотипе имеют больше хромосом (2n = 62). Основное число хромосом у этого вида (NF = 62). Все хромосомы имеют акроцентрическую форму. Виды рода *Chionomys* (*Ch. roberti, Ch. nivalis, Ch. gud*), подрода *Terricola* рода *Microtus* (*M. majori, M. dagestanicus, M. schelkovnikovi*) относятся к группе 54-хромосомных полевок. *Ch. roberti* и *Ch. gud* имеют одинаковую структуру, только 26-я пара у них имеет метацентрическую структуру. В кариотипе *Ch. nivalis* все хромосомы имеют акроцентрическую форму. У кустарниковых полевок в кариотипе *M. dagestanicus* только 26 пара, у *M. majori* 1-я, 2-я пара, у *M. schelkovnikovi* 2-я, 4-я, 7-я и 8-я пара имеют метацентрическую форму. В видообразовании играли роль тандемные транслокации, такие как теломерно-центромерный и теломерно-теломерный слияния акроцентрической хромосомы. Хотя виды *Chionomys* и подрода *Terricola* рода *Microtus* имеют одинаковые диплоидные числа и внешне сходную структуру кариотипа, хромосомные наборы этих двух групп полевок эволюцинировали от общей предковой формы с более высоким числом хромосом. Такие животные, возможно, имели в кариотипе больше акроцентрических хромосом, сходных с кариотипом современной общественной полевки — *Microtus socialis*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шидловский М. В. Определитель грызунов Закавказья.— Тбилиси, 1976.—255 с.
2. Орлов В. Н., Булатова Н. Ш. Сравнительная цитогенетика и кариосистематика млекопитающих.— М.: Наука, 1983.— 405 с.
3. Саблина О. В., Раджабли С. И., Мейер М. Н., Маликов В. Г., Кулиев Г. Н. О систематическом положении рода *Chionomys* (*Rodentia*) по кариологическим данным // Зоологический журнал.— М., 1988.— С. 472–476.
4. Gias N. Kuliev, John W. Bickham. Karyotypes of four species of rodents (Muridae: Arvicolinae) from the Azerbaijan Republic // General Notes, Texas J. Sci.— USA, 2003.— 55 (3).— P. 271–277.
5. Gias N. Kuliev, John.W. Bickham Karyological Relationships and Biodiversiti of the Pine Voles of Azerbaican: Differentiation of Species from the Greater and Lesser Caucasus Mountains Texas Tech University.Natural Science Research Laboratori. Oggasional papers // Museum of Texas Tech University.— 2010.— № 291.— P. 1–14.
6. Mc Macolan, Maria Grazia Filippucci, Jan Zima Genetik variation and zoogeography of pine voles of the *Microtus subterranius* / majori group in Europe and Asia Minor // J. Zool. Land.— 2001.— 255.— P. 31–42.
7. Natália Martínková, Petra Nová, Olga V. Sablina, Alexander S. Graphodatsky and Jan Zima. Karyotypic relationships of the Tatra vole (*Microtus tatricus*) // Folia Zool.— 2004.— 53 (3).— P. 279–284.
8. Nadachowski A. The taxonomic status of Schelkovnikovs pine vole Microtus Schelkovnikovi (Rodentia, Mammalia) // Acta Zoologica Cracoviensia.— 2007.— 50 A.— P. 67–72.
9. Shamilov E. N., Abdullayev A. S., Quliyev G. N., Memmedrzayeva E. T., Shamilli V. E., Azizov I. V. Intraspecific spontaneous chromosomal mutations in some Rodents distributed in Azerbaijan, their induction by ionizing radiation and correction // «Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів».— 2014.— 12, № 1.— С. 90–97.
10. Ford C. E., Hamerton J. L. A colchicines hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes // Stain Technol.— 1956.— 31.— P. 247–251.
11. Раджабли С. И., Крюкова Е. П. Сравнительный анализ дифференциальной окраски хромосом двух видов хомячков: даурского и китайского // Цитология.— 1973, 15.— С. 1527–1531.
12. Sumner A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin // Exp. Cell. Res.— 1972.— 75.— P. 304–306.

MEMMEDRZAYEVA E. T.[1], GULIYEV G. N.[1], KERIMOVA Z. K.[1], GULIYEV A. G.[1], SHAMILOV E. N.[2], GASIMOVA G. E.[2], ABDULLAEV A. S.[2]

[1] *Institute of Zoology of National Academy of Sciences of Azerbaijan,*
Azerbaijan, AZ1073, Baku, A. Abbasov str., quarter 1128, passage 504, e-mail: qiyas_q@mail.ru

[2] *Institute of Radiation Problems of National Academy of Sciences of Azerbaijan,*
Azerbaijan, AZ1143, Baku, B. Vahabzade str., 9, e-mail: elshanshamil@gmail.com

KARYOTYPE OF *MICROTUS SOSIALIS* AND RELATIONS OF SPECIES OF THE GENUS *CHIONOMYS* AND SUBGENUS *TERRICOLA* INHABITING IN AZERBAIJAN

Aim. There were studied relational connections of social voles *(Microtus socialis)* species of genus *Chionomys* (*Ch. roberti, Ch. nivalis, Ch. gud*) and species of subgenus *Terricola*, genus *Microtus* (*M. majori, M. dagestanicus, M. schelkovnikovi*). ***Methods.*** There were identified common chromosomes of *Microtus socialis* and species of the genus *Chionomys* and subgenus *Terricola*. ***Results.*** It was established that in speciation played a role tandem translocations such as telomeric-centromeric and telomeric-telomeric fusion of acrocentric chromosomes. ***Conclusions.*** The studied species of the genera *Chionomys* and species of the subgenus *Terricola,* genus *Microtus* have the same diploid number and externally similar structure of the karyotype, chromosome sets of these two groups of voles have evolved from common ancestral form of a higher number of chromosomes. Such animals may have had in the karyotype more acrocentric chromosomes similar to karyotype of modern social voles — *Microtus socialis*.

Keywords: Social voles, chromosomes, karyotype, acrocentrics.

УДК 575.85

МИХЕЕВ А. Н.
Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
Украина, 03680, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 148, e-mail: mikhalex7@yahoo.com

ИНВАРИАНТЫ УНИВЕРСАЛЬНОГО ЭВОЛЮЦИОНИЗМА

Логика предыдущих статей автора, опубликованных более чем за десятилетний период в сборниках «Факторы экспериментальной эволюции», привела к необходимости рассмотреть проблемы более высокого уровня абстрагирования, т.е. метаэволюционные проблемы и, прежде всего, проблему выявления последовательности причин, породивших все многообразие окружающего нас мира. Например, если «причиной космоса» считается спонтанная флуктуация физического вакуума [1], то как представить всю иерархию причин, породивших видимый мир? Именно это составляет предмет междисциплинарной теории универсального эволюционизма (ТУЭ) — учения об общих принципах эволюции наблюдаемой Вселенной как о едином процессе, являющемся путем к вершине эволюции — человеческому разуму (этап когнитивной эволюции) и, возможно, к сверхразуму — ступень Z_0 по А. Д. Панову [2]. ТУЭ является результатом эмпирического обобщения наблюдаемых фактов сходства эволюционных процессов на разных уровнях интеграции материальных и идеальных объектов, синтезом множества эволюционных знаний о частных проявлениях эволюционизма на основе предположения о существовании единых механизмов эволюции — инвариантов эволюции для мега-, мезо- и микромиров [3]. Хотя ТУЭ претендует на статус общенаучной теории, подобно кибернетике, синергетике или общей теории систем (ОТС), но по своим формальным признакам она еще далека от полноценной теории и станет таковой, лишь достигнув своей конечной цели — создания теории эволюционного системогенеза. Пока же ТУЭ характеризуется неизбежной эклектичностью содержания по причине незавершенности поиска инвариантов эволюционных изменений, которые могли бы служить элементами будущей ТУЭ, что (незавершенность) отражается на содержании данной статьи.

Рассмотрение того, чем может обогатить ТУЭ теория биологической эволюции (ТБЭ) и, наоборот, использование эвристичных возможностей ТУЭ, т.е. выяснение применимости глобальных обобщений ТУЭ для решения проблем ТБЭ, составляет основную задачу статьи, название которой можно было бы переформулировать следующим образом: «Почему возможна самоорганизация (фактически, синоним понятия «глобальный эволюционизм»)?». Нас, разумеется, будут интересовать, прежде всего, возможности ТБЭ, для которой ТУЭ предполагается использовать в качестве исследовательской программы.

Биологическая эволюция — частный случай эволюции материи вообще, под которой обычно понимается процесс ее спонтанной самоорганизации от простых форм к более сложным, прогрессивным формам. В рамках ТУЭ идея спонтанного усложнения материальных объектов принимается как аксиома. При этом считается, что продукты самоорганизации предыдущего уровня являются исходными элементами для организации («самосборки») последующего уровня. Таким образом, возникает наблюдаемая в настоящее время иерархичность окружающего нас (и иерархичность нас самих) мира.

Существующих частных эволюционных теорий (космологических, геологических, эволюционных и др.) самих по себе недостаточно для решения проблем ТУЭ. Недостаточно для этого и общенаучных теорий. В частности, синергетика, претендующая на эту роль, не способна объяснить эволюцию сложных систем, для которых характерно наличие принципиально новых качеств, отсутствующих в явном виде у слагающих ее элементов. Так, по мнению А. В. Болдачева [4] синергетики недостаточно также для описания сложного развития, связей и взаимодействия элементов систем, процессов, функционирования, причин и направленности их эволюционного развития. Например, такое синергетическое по своей природе явление, как ячейки Бернара (возникновение упорядоченности в виде конвективных трехмерных ячеек) хорошо описывается теорией синергетики, но лишь на уровне явления, а механизм образования макроструктур с новыми качествами остается нераскрытым.

Собственно создание ТУЭ предполагает поиск таких свойств эволюционирующих систем, которые характерны для всех систем независи-

© МИХЕЕВ А. Н.

мо от уровня их структурно-функциональной организации (УСФО), т.е. эволюционных инвариантов (ЭИ) — единых механизмов эволюции и величин (качественных и количественных) ее характеризующих. Имеется множество ЭИ, факт существования которых указывает на универсальность эволюции [3]. К числу ЭИ, в первую очередь, следует отнести универсальные типы структурно-функциональной изменчивости, что, собственно говоря, и составляет феноменологию универсального эволюционизма. Так, упоминание эволюционирующих систем неминуемо приводит нас к мысли о возможности рассмотрения ТБЭ в качестве прототипа общей теории развивающихся систем (фактически, ТУЭ) и, наоборот, использование достижений общей теории систем (ОТС как начального варианта ТУЭ) для решения проблем биологической эволюции. В связи с этим, велик соблазн использовать ОТС для решения проблем ТУЭ, например, использовать положения одной из самых разработанных ОТС [5] о типах преобразования систем или положения И.Г. Моисеевой о векторах изменений [6]. В частности, И.Г. Моисеева предлагает рассматривать изменения типа «плюс-минус», «прогресс-регресс», «усложнение-упрощение», учитывать заданный уровень исследований (молекулярный, клеточный, тканевой, органный, индивидуальный, популяционный и т.д.), на каждом из которых возможны такие изменения, а также учитывать изменения на разных временных этапах существования объекта (филогенетический, онтогенетический, возрастные периоды). Возможны также и другие аспекты рассмотрения — материальный и нематериальный (идеальный), относящийся к объектам, обладающим сознанием,— генетический и негенетический (эпигенетический), учет количества и качества взаимодействий, наличие одно- и двусторонних взаимодействий, тип оказываемого эффекта — положительный, отрицательный и нейтральный. Все перечисленное составляет огромное множество типов изменчивости, требующих оценки в качестве «кандидатов» на универсальные инварианты эволюции.

Следует выделять два типа инвариантов — константные (например, консервативность эволюции и др.) и экстремальные (например, «усиление-ослабление», «усложнение-упрощение» и др.). Два важнейших инварианта эволюции — эволюционный консерватизм (каждый УСФО базируется на предыдущем, включая его в качестве подсистемы) и явление диспропорционирования энтропии (сопряжение двух процессов — возникновение низкоэнтропийного продукта сопровождается выделением большого количества высокоэнтропийных продуктов в окружающую среду) [7]. Фактически, последний принцип указывает на локализацию порядка (организованности в ограниченном пространстве) за счет глобализации (распространения в окружающей среде прогрессивно организующегося объекта) хаоса. Эволюционирующим системам приходится все более и более возрастающей хаотизацией мира «платить» за переход космической энергии в энергию психическую [8].

Сутью эволюционного консерватизма является то, что прогрессивное развитие феноменологически проявляется в его преемственности (наследуемости, номогенетичности, ортогенетичности), т.е. во внутренней причинной связи между следующими друг за другом состояниями изменяющейся системы [9]. Поскольку состояние системы определяется совокупностью ее текущих качественных и количественных характеристик, то преемственность выражается в виде зависимости последующих состояний системы от предыдущих, опосредуемых текущим состоянием, т.е. в относительно устойчивом сохранении последствий (влияний, детерминаций) предыдущих состояний при замене их новыми состояниями. Благодаря преемственности ряд состояний системы связывается (объединяется) в единый процесс развития, в котором система, постоянно изменяясь, тем не менее, сохраняет свою индивидуальность. Количественные и качественные характеристики системы при этом хоть и меняются, но система остается «узнаваемой» на всем пути своего развития. Правда, «узнаваемость» представляет собой идеальный случай для изучения эволюции. Чаще же всего, мы постоянно сталкиваемся с проблемой недостающих звеньев в эволюции (и в эволюции костной материи также), решение которой и позволяет нам «узнавать» систему, воссоздавая все этапы ее эволюции. Очевидно, что преемственность (наследуемость), как феномен, обеспечивается определенным механизмом преемственности, обуславливающим непрерывность процесса развития систем.

Вероятно, эволюция вообще не смогла бы осуществляться, если бы состояла из одних

«инвариантов» и не появлялись специфические (уникальные) особенности на каждом новом уровне прогрессивно развивающихся объектов. Прогресс «ломает» универсализм. Возможно, идею глобального универсализма следовало бы дополнить идеей глобального «уникализма». Другими словами, эволюционный консерватизм должен сопровождаться эмерджентностью (неаддитивностью).

Но почему же системы движутся? Почему они изменяются, причем изменяются с повышением уровня своей организации? Почему изменяется тип симметрии? С понятием развития тесно связаны понятия причины и следствия. В процессе развития постоянно наблюдается временное отставание следствий от вызывающих их причин. Влияние прошлого (причины) на будущее (следствие) не заканчивается мгновенно. Иначе говоря, влияние прошлого на будущее продолжается какое-то время, т.е. наблюдается инерционность развития, которую можно рассматривать в качестве обобщенного представления о наследственности (наследуемости). Любое развитие системы инерционно, т.е. система, пребывая в текущем состоянии, обладает способностью наследовать причины. Таким образом, в инерционности проявляется фундаментальная способность объектов любой природы к взаимодействию с окружающими их объектами и проявляется эта способность, прежде всего, в способности реагировать на какие-либо воздействие. Наш мир устроен причинно и в основе причинности, вернее, условием ее проявления является способность систем к инерционному движению, которое в скрытом или явном виде содержит предысторию системы. Инерционное движение, имеющее определенные характеристики, представляет собой актуализированную идею (план, квазиплан, потенцию) развития системы, которая присутствует в ней до начала движения в скрытом, потенциальном виде. Система всегда движется по инерции (или просто движется) так, как она может, с одной стороны, двигаться, а, с другой стороны, так как ее может двигать влияющая на нее система-фактор. Характеристики движения системы могут быть таковы, что она сама и все последующие новообразованные с ее участием системы будут обладать способностью продолжать взаимодействие с новыми системами. Влияние первичного акта взаимодействия двух систем может распространиться на системы более высокого уровня интеграции, что будет свидетельствовать о своеобразном наследовании характеристик систем-прародительниц на других уровнях интеграции, но, конечно же, в измененном виде. Поведение первично взаимодействующих систем как бы «инструктирует» поведение последующих новообразованных систем.

Еще один эволюционный инвариант предлагает выделить А. Д. Панов [3], а именно свойство аддитивности — возникновение в процессе эволюции новых уровней не сопровождается исчезновением старых, которые в модифицированном виде участвуют в последующих эволюционных преобразованиях. С нашей точки зрения аддитивность в качестве эволюционного варианта является структурным аналогом принципа эволюционного консерватизма. К эволюционным инвариантам относят также и показатели ускорения разного рода эволюционных процессов [3].

Предпринимаются попытки использовать терминологию ТБЭ для описания эволюционных процессов, имеющих универсальный характер. Так, В. В. Казютинский [1] предлагает дополнить дарвиновскую триаду (изменчивость, наследственность, отбор) апориями А. А. Любищева: «…1) эволюция (трансформизм) и постоянство (генезис — стазис); 2) эволюция (преформация) и эпигенез; 3) эволюция и революция; 4) эволюция и эманация…» [10], рассматривая их как инварианты универсального эволюционизма. Особую методологическую ценность, с нашей точки зрения, представляет первая из перечисленных апорий, а именно «эволюция (трансформизм) и постоянство». Чаще всего, понятие эволюции ассоциируется, как правило, именно с трансформизмом, т.е. с какой-то динамикой, непрерывными, постепенными или скачкообразными преобразованиями. С учетом последнего (т.е. скачкообразности), принцип универсального эволюционизма должен быть дополнен принципом универсального революционизма. Что же касается «постоянства», то в действительности, механизмы, за счет которых повышается исходный уровень изменчивости (генетической в виде мутагенеза при работе системы ошибочной репарации или эпигенетической в виде эпимутагенеза за счет функционирования систем перепрограммирования паттернов генетической активности), одновременно (и главным образом!) являются механизмами, обеспечивающими стабильность функционирования или существования вообще.

Для развития ТУЭ важно подчеркнуть, что материальные (да и идеальные) объекты не стремятся эволюционировать. Им важно существовать, т.е. быть стабильными. Но так уж устроен наш Мир, что стабильность возможна только динамическая и не просто динамическая, а прогрессивно динамическая. Свободна ли эволюция? Эволюция как познанная необходимость прогрессивно изменяться с целью сохранения?

Обобщить дарвиновскую триаду с целью создания метаязыка ТУЭ предлагает и Н. Н. Моисеев [11]. Изменчивость, являясь объективной характеристикой нашего мира, указывает на источник эволюционного материала, который, в свою очередь подвергается отбору в соответствии с законами сохранения. Механизмы наследственности указывают не только на способность материальных объектов сохранять свои свойства и характеристики, но и на «способность будущего зависеть от прошлого», т.е. на преформистский компонент из вышеупомянутой любищевской апории «эволюция (преформация) и эпигенез». На роль преформистского (телеономического) инварианта, фактически, указывает и В. В. Налимов [12], говоря о том, что эволюция представляет собой последовательность дискретных состояний-распаковок исходного «семантического поля», и С. П. Курдюмов [13], утверждая, что в нелинейных средах возникают лишь такие структуры, которые предсуществовали в них в форме структур-аттракторов.

В конечном счете, еще плохо разработанную теорию биологической адаптации («сохранения») можно «положить в основу» будущей общей теории адаптации как главного компонента ТУЭ. Н. Н. Моисеев [11] считает, что использование дарвиновской триады позволяет увидеть общую логику развития материального мира. Мы считаем, что настал момент обобщения понятия «наследственность» на все структурные уровни Универсума — косной материи, живого вещества и человеческого разума. Фактически, такое обобщение уже в неявном виде произошло при возникновении меметики, но она обращает внимание преимущественно на наследование в социо-культурных процессах (эволюция «психической энергии»), но, по сути дела, должна охватывать генетику, эпигенетику и гипогенетику (изучение наследование в косных системах). В связи с последним целесообразно рассмотреть роль меметики в качестве варианта ТУЭ [14]. Еще Ричард Докинз [15] предложил дополнить дарвиновскую концепцию эволюции концепцией репликатора культурной эволюции — мема. Для рассматриваемой нами темы важны рассуждения Р. Докинза о том, что «… дарвиновское «выживание наиболее приспособленных» — это на самом деле частный случай более общего закона выживания стабильного. Мир населен стабильными объектами. Стабильный объект — это совокупность атомов, которая достаточно стабильна или обыкновенна, чтобы заслуживать собственного имени». По мнению Р. Докинза естественный отбор тоже эволюционировал, представляя собой уже на самых ранних этапах сохранение стабильных форм и отбрасывание нестабильных. При этом обеспечение стабильности возможно двумя способами: путем длительного сохранения или путем самокопирования. С этой точки зрения ген — лишь частный случай копирования (репликации). Если речь идет о репликации единиц культурной информации, то такое копирование называется копированием мемов. Таким образом, мем есть единица культурной информации, способная к хранению, модификации («мутированию»), репликации и распространению в социальных группах. Все это составляет предмет меметики, необходимость в расширении предмета которой давно назрела, поскольку накоплен огромный массив эволюционных знаний в самых разных научных дисциплинах, требующих обобщения разнообразных проявлениях наследования в рамках единой теории, на роль которой как раз и претендует меметика. Во всяком случае, если учесть увеличение сенситивности и возрастание роли информационных факторов в процессе эволюции мира, меметика должна занять свое достойное место. Можно ли применить меметику к описанию эволюции двух ее «рукавов» — до образования тяжелых элементов и после? [3]. Вероятно, да. А если это так, то «отбор на стабильность» по Докинзу, является единственно «универсальным» инвариантом, характеризующим состояние всех эволюционирующих систем независимо от уровня их структурной организации. Кроме этого, если распространить воззрения В. В. Козютинского [1] и Н. Н. Моисеева [11] на идеальные объекты, то они (воззрения) существенно дополнят (или даже составят основу!) миметическую (и следовательно, ТУЭ) теорию.

Н. И. Горбунов [16] считает, что необходимо ввести представление об эталонной эволюциони-

рующей системе. Примером последней является эволюция жизни на Земле, изученные тонкие механизмы которой «…ждут экстраполяции на другие уровни организации Вселенной», в частности, такой экстраполяции (биологизации) «ждет» физика элементарных частиц, результатом чего может быть нахождение механизма их эволюции. Очевидно, что критериями такой «эталонизации» биологической эволюции должны быть как раз инварианты эволюционизма.

Возвращаясь к идее самоорганизации, как, вероятно, самому фундаментальному инварианту эволюционирующих систем, следует сказать, что абсолютной самоорганизованности в природе не существует. Недетерминированных процессов быть не может. Все имеет свою причину. Вопрос только в том, в какой мере процессы вообще и эволюционные в частности самостоятельны, т.е. каково соотношение внешних и внутренних факторов-причин. Самоорганизация — процесс упорядочивающего («организующего») взаимодействия элементов системы одного уровня за счёт ее внутренних факторов, без внешнего специфического воздействия. Внешние условия могут быть как стимулирующими, так и подавляющими воздействиями. В результате самоорганизации появляется структура следующего качественного (структурно-функционального) уровня. Фактически, в процессе самоорганизации происходит переход от стохастической системы к детерминированной. При этом происходят реализации морфообразующего потенциала стохастической системы.

А. В. Болдачёв [4] к эволюционирующим (саморазвивающимися) относит только две системы: авангардную систему и весь Мир, эволюционный потенциал которых как раз и реализуется в текущих («здесь и сейчас») преобразованиях данных систем. По А. В. Болдачёву нынешний авангард эволюции — социальная система. Вероятно, имеется ввиду антропная социальная система. Однако исходя из собственного определения эволюции как процесса, «…при котором возникающие определенности являются новыми, уникальными не только для конкретной системы, но и для всего Мира в целом», и определения саморазвития, как процесса автономного (самостоятельного, не направляемого внешними воздействиями) образования некоторой функционирующей системы из независимых, рассредоточенных элементов или как процесса «…появления (формирования, образования) у некоторой автономной системы новых признаков, свойств, функций и так далее, под воздействием только внутренних причин», А. В. Болдачев саморазвивающейся системой в итоге считает только Мир. Но даже и Миру он, в конце концов, отказывает в «праве» на саморазвитие. В этом терминологическом сумбуре все же есть рациональное зерно. Во-первых, в процессе квазисаморазвития происходит возникновение новых качеств и, во-вторых, при этом реализуются предзаданные (существующие потенциально) сценарии. Вероятно, к эволюции авангардных систем следует отнести глобальный закон (инвариант) самоорганизации: максимальный уровень организации материи во Вселенной растет со временем в процессе консервативной эволюции, проходящей через последовательность качественно различных форм структурной организации материи [2].

Таким образом, в качестве выводов хотелось бы повторить положения, которые могут стать своеобразными «точками роста» ТУЭ. Вероятно, синергетика, общая теория систем и меметика в качестве метанаучных дисциплин могут составить основу теории универсального эволюционизма. Существует огромное множество типов изменчивости материальных и идеальных объектов, требующих оценки в качестве «кандидатов» на универсальные инварианты эволюции. В результате самоорганизации появляются структуры следующего качественного уровня. Фактически, в процессе самоорганизации происходит переход от стохастической системы к детерминированной. При этом происходят реализации морфообразующего потенциала стохастической системы. В процессе эволюции осуществляется постоянная локализация порядка (организованности в ограниченном пространстве) за счет глобализации (распространения в окружающей среде прогрессивно организующегося объекта) хаоса. Эволюция вообще не смогла бы осуществляться, если бы состояла из одних «инвариантов» и не появлялись специфические (уникальные) особенности на каждом новом уровне организации прогрессивно развивающихся объектов. Механизмы, за счет которых повышается исходный уровень изменчивости, одновременно являются механизмами, обеспечивающими стабильность функционирования или существования вообще. И, наоборот. В связи с этим, представляется возможным идею

глобального универсализма дополнить идеей глобального уникализма. Существует необходимость обобщения понятия «наследственность» на все структурные уровни Универсума, что возможно при помощи меметической теории, которая должна включать генетику, эпигенетику и гипогенетику (изучение наследования в косных системах).

ЛИТЕРАТУРА

1. Казютинский В. В. Эпистемологические проблемы универсального эволюционизма — в кн. Универсальный эволюционизм и глобальные проблемы.— М.: ИФ РАН, 2007.— С. 4–32.
2. Панов А. Глобальный закон самоорганизации [Електронний ресурс].— 2015.— Режим доступа: http://astroera.net/content/view/105/43.
3. Панов А. Д. Инварианты универсальной эволюции и эволюция в Мультиверсе.— в кн. Универсальный эволюционизм и глобальные проблемы.— М.: ИФ РАН, 2007.— С. 73–96.
4. Болдачёв А. В. Терминология и мифы эволюционизма.— СПб.: Питер.— 2004.
5. Урманцев Ю. А. Симметрия природы и природа симметрии (Философские и естественно-научные аспекты).— М.: Мысль, 1974.— 229 с.
6. Моисеева И. Г. Теоретические аспекты изучения форм изменчивости в биологии // Сб. научн. тр. «Съезд генетиков и селекционеров, посвященный 200-летию со дня рождения Чарльза Дарвина. V съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров». Часть I. 21–28 июня 2009.— М., 2009 — С. 88.
7. Галимов Э. М. Феномен жизни: между равновесием и нелинейностью. Происхождение и принципы эволюции.— М.: Едиториал УРСС, 2006.— 256 с.
8. Чижевский А. Л. Космический пульс жизни.— М.: Мысль, 1995.— 768 с.
9. Раутиан А. С. Палеонтология как источник сведений о закономерностях и факторах эволюции.— В кн.: Современная палеонтология: В 2-х томах.— М.: Недра, 1988.— 2.— С. 76–78.
10. Любищев А. А. Проблема формы, систематики и эволюции организмов.— М.: Наука, 1982.— 279 с.
11. Моисеев Н. Н. Современный рационализм.— М.: МГВП КОКС, 1995.— 376 с.
12. Налимов В. В. В поисках иных смыслов.— М.: Прогресс, 1993.— 278 с.
13. Князева Е. Н., Курдюмов С. П. Основания синергетики.— СПб.: Алетейя, 2002.— 414 с.
14. Поляков Е. М. Меметика: наука или парадигма? // Вестник ВГУ. Серия: Философия.— 2010.— № 2.— С. 160–165.
15. Докинз Р. Эгоистичный ген.— М.: Мир, 1993.— 318 с.
16. Горбунов Н. И. Универсальность дарвиновской триады (наследственность, изменчивость, отбор) для реализации эволюционных механизмов саморазвития эволюционирующих систем [Электронный ресурс].— 2014.— Режим доступа: http://SciTecLibrary.ru.

MIKHYEYEV A.N.

Institute of cell biology and genetic engineering of NAN of Ukraine,
Ukraine, 03143, Kiev, Zabolotnogo str., 148, e-mail: mikhalex7@yahoo.com

INVARIANTS OF UNIVERSAL EVOLUTIONISM

The article considers the state of the theory of global evolutionism (TGE) in terms of its invariants. Creation TGE supposes the searching of such properties of the evolving systems which are characteristic for all systems regardless of level of their structural-functional organization, i. e. evolutional invariants — general mechanisms of evolution and parameters (high-quality and quantitative) of its characterizing. It becomes firmly established that TGE able to enrich theory of biological evolution (TBE). And, vice versa, the use of heuristic possibilities of TBE is possible for the decision of problems TGE. It is assumed that synergetics, general system theory of the systems and memetics as metascientific disciplines can form basis TGE.

Keywords: theory of global evolutionism, theory of biological evolution.

УДК 612.014.461:574:576

ОСМАЛЕНИЙ М. С., ГОЛОВКОВ А. М., НАНІЄВА А. В., ВЕРГОЛЯС М. Р.
Інститут колоїдної хімії та хімії води ім. А.В. Думанського НАН України,
Україна, 03680, м. Київ-142, бульв. Вернадського, 42, e-mail: vergolyas@meta.ua

КОМПЛЕКСНА ОЦІНКА ТОКСИЧНОСТІ ВОДНИХ ЗРАЗКІВ ЗА ДОПОМОГОЮ РОСЛИННИХ І ТВАРИННИХ ТЕСТ-ОРГАНІЗМІВ

Оцінка якості природних вод біологічними методами в останні десятиліття набула особливої актуальності. Використання хіміко-аналітичних методів не дає інформації про можливу дію комплексу забруднювачів на живі організми. Біотестування передбачає цілеспрямоване використання стандартних тест-організмів і методів для визначення токсичності водних зразків [1].

Біотестування не скасовує систему аналітичних й апаратних методів контролю природного середовища, а лише доповнює її якісно новими біологічними показниками. Отримані з його допомогою результати, варто доповнювати даними аналітичної хімії, а при оцінці ризику досліджуваних проб і речовин для здоров'я людини — результатами стандартних санітарно-гігієнічних методик. Використання біологічних тест-систем дозволяє визначити зміни в екосистемах на дуже ранній стадії, коли вони ще не проявляються у вигляді морфологічних і структурних змін й їх не можна виявити іншими методами. Це дає можливість передбачати порушення екосистеми й вчасно вжити заходів. Крім того, стан біоіндикаторів можна використати як додаткову інформацію при оцінці здоров'я населення [1, 2].

Для характеристики структурних і кількісних змін найважливіших компонентів клітинного ядра, що є носіями генетичної інформації, найбільш часто використовують наступні цитогенетичні методи: визначення частоти хромосомних аберацій, сестринських хроматидних обмінів, мікроядер, ушкоджень ДНК (адукти, розриви нитки ДНК, COMET-тест); а також змін флуоресценції при гібридизації *in situ* (FISH-метод) і кількісних параметрів ядерець та ядерцеутворюючих організаторів хромосом [3, 4].

Вищезазначені методи задовольняють сучасні вимоги щодо досліджень токсичності водних розчинів: вони визначають їхні біологічні властивості на (суб-) клітинному рівні, реєструють зміни в генетичного апарату, об'єктивно характеризують віддалені наслідки їхнього впливу. Як оптимальний набір при проведенні експериментів для визначення структурних і функціональних змін генома клітини внаслідок токсичного впливу запропоновані мікроядерний тест і ядерцевий біомаркер [3, 5, 6].

Мікроядерний тест є одним з найбільш поширених методів виявлення речовин з генотоксичними властивостями. Цей тест переважає за інформативністю та оперативністю тест на хромосомні аберації, та має ряд інших переваг — меншу кількість артефактів, можливість кращого обліку, крім того, він є менш трудомістким та більш продуктивним [6–8].

Відомі роботи, у яких оцінка дії модифікуючих антропогенних факторів на генетичний апарат клітин виконувалася за допомогою аналізу ядерцевих характеристик, однак вони мали моніторинговий характер і не пропонували схеми проведення експерименту, необхідного при біотестуванні. Запропонований нами метод передбачає аналіз морфологічних характеристик ядерець в умовах експерименту й дає можливість оцінити вплив досліджуваних факторів на клітини рослин і тварин [8].

У зв'язку з вищесказаним є актуальною розробка оптимального для конкретних умов та одночасно технічно простого та універсального комплексу біотестів і біомаркерів для виявлення токсичних факторів і речовин, для визначення забруднення оточуючого середовища, зокрема, оцінки якості природних і питних вод, як на рівні організму, так і на рівні клітини, її геному.

Матеріали і методи

При дослідженні впливу токсичних речовин використовували тест-організми: гідру *Hydra attenuata* L., цибулю *Alium cepa* та карась, *Carasius auratus gibelio* L. А в експериментах з дослідження генотоксичності за мікроядерним аналізом — цибулю *Alium cepa* та риб, карась, *Carasius auratus gibelio*. Цитологічні препарати готували із клітин апікальної меристеми корінців рослин, клітин ектодерми гідри й клітин крові, зябер і хвостового плавця риб.

Цитологічні препарати з клітин кореневої меристеми цибулі та салату готували за стандарт-

© ОСМАЛЕНИЙ М. С., ГОЛОВКОВ А. М., НАНІЄВА А. В., ВЕРГОЛЯС М. Р.

ною методикою [9, 10]: корінці забарвлювали ацеторсеїном при температурі 22–25 °С протягом 15 хвилин, після чого їх промивали в 45 %-му розчині оцтової кислоти, що запобігає потраплянню часточок барвника на препарат. Відділяючи зону росту корінців, готували давлені препарати. При мікроядерному аналізі для кожного препарату підраховували по три тисячі клітин, визначали мітотичний індекс, кількість клітин з мікроядрами, подвійними ядрами та з іншими патологіями мітозу, якщо такі зустрічались.

Для мікроядерного тесту на клітинах риб, використовували клітини крові, зябер та хвостового плавця. Кров відбирали з хвостової вени, робили мазки, фіксували 96 % етиловим спиртом 30 хв., висушували та фарбували 5 хв. розчином азуреозину за Романовським [2, 11]. Тканину зябер (зяберні дуги) фіксували в оцтово-гліцериновій суміші, що одночасно є мацеруючим розчином. Фіксація і мацерація матеріалу повинні відбуватись не менш як добу, потім тканина в даній суміші може зберігатись протягом місяця при 4 °С. Готували цитологічні препарати, потім їх сушили і фарбували так само, як і в попередньому випадку. Для приготування препаратів з хвостового плавця використовували регенеровану тканину плавця, тобто ту, що утворилась підчас перебування риб в досліджуваному розчині (вона відрізнялась більш світлим кольором). Шматочки тканини, зафіксовані в оцтово-гліцериновій суміші, переносили на предметне скло і препарувальною голкою гомогенізували тканину, отримуючи суспензію клітин, з якої потім робили мазок. Далі препарати сушили і фарбували протягом 5 хв. розчином азур-еозину за Романовським.

Аналіз препаратів крові, зябер та клітин хвостового плавця проводили так само, як і рослинних препаратів: під світловим мікроскопом підраховували кількість клітин з мікроядрами та іншими патологіями мітозу для три тисяч клітин в кожному випадку.

Результати та обговорення

Запропоновані для дослідження речовини відомі своїми токсичними властивостями і є токсикантами, що часто згадуються як забруднювачі навколишнього середовища.

Результати гострого токсичного впливу даних розчинів на організменному рівні, отримані в рамках міжнародної програми «WaterTox», наведені в табл. 1 [12]. Проаналізовані розчини не мали чіткого розходження за рівнем токсичності, що виявлялась методами біотестування, тобто всі в різній мірі проявляли токсичні властивості. Так, найбільш токсичними в порядку збільшення були розчини: р, р’-ДДТ, 4-нітрохінолін-N-оксиду, міді, ртуті і пентахлорофенолу; а найменш токсичними: миш’яку, ліндану, метолахлору й аніліну.

Найбільші серед органічних сполук рівні токсичності відзначені в пентахлорофенолу, що характеризується бактерицидною й фунгіцидною активністю [13]. Він мав порівняно високі значення негативних ефектів як для двох рослинних, так і двох тваринних тест-об’єктів табл. 1. Найбільшою токсичністю серед неорганічних речовин відрізнялися розчини солей ртуті й міді, але тільки для тваринних тест-об’єктів.

Цитогенетичний моніторинг антропогенного забруднення навколишнього середовища займає важливе місце в системі екологічного мо-

Таблиця 1

Порівняльний аналіз негативних ефектів*, зафіксованих у тваринних та рослинних тест-об’єктів у результаті впливу токсичних сполук [14]

Досліджувані речовини	*Allium cepa*	*Lactuca sativa*	*Daphnia magna*	*Hydra attenuata*
Сульфат міді	18,5	14,6	982,5	750,0
Сульфат цинку	2,1	2,4	141,7	0
Метолахлор	2,4	3,1	5,0	5,0
Хлорид ртуті	11,5	24,0	1000,0	3200,0
Нонілфенол	2,0	0,1	100,0	80,0
Пентахлорфенол	97,0	43,8	178,8	125,0
Альдрин	3,8	4,8	395,6	0
Миш’як	6,8	4,9	12,5	1,1
р, р’-ДДТ	197,1	18,0	1000,0	0
Ліндан	3,2	2,5	10,0	5,0

Примітка: * — ефект розраховано на одиницю концентрації речовини.

ніторингу. Пріоритетність таких досліджень на клітинному й хромосомному рівнях визначається найбільшою уразливістю цих структур організму при впливі мутагенів.

У зв'язку з цим було визначено мітотичну активність і частоту утворення мікроядер і подвійних ядер у проліферативних клітинах корінців *A. cepa* й *L. sativa*, а також проаналізовано характеристики клітин зазначених рослинних тест-об'єктів й ектодермальних клітин *H. attenuata*, підданих впливу досліджуваних розчинів в умовах токсикологічного експерименту.

Для порівняння ефектів різних речовин при дослідженні токсичності на тваринах та рослинах нами були обрані речовини хлорид ртуті, сульфат міді, пентахлорфенол та при дослідженні впливу цих речовин на цитогенетичні показники тест-об'єктів наведено в табл. 2 та 3.

Реакція рослин і тварин на негативний вплив досліджуваних сполук значно відрізнялася, що свідчить про їхню різну чутливість, і робить необхідним спільне використання в комплексних біотестах як рослин, так і тварин. Показано, що тваринні організми відрізнялися більшою чутливістю, у порівнянні з рослинними, але для рослинних біотестів спостерігалася більш чітка відтворюваність результатів.

Результати ефектів досліджуваних речовин щодо токсичності, генотоксичності та цитотоксичності наведені в табл. 2. Ртуть, проявила сильний ефект токсичності на тваринах і середній на рослинах та впливала на мітотичний індекс. Стосовно міді було зафіксовано високий ступінь токсичності та суттєву зміну мітотичного індексу й на цьому фоні сильний генотоксичний ефект.

Серед органічних сполук також відмічено ефекти щодо токсичності, цитотоксичності та генотоксичності табл. 3. Сульфат міді та пентахлорфенол, проявив сильну токсичну дію, проявив генотоксичний та цитотоксичний вплив за мітотичним індексом.

Висновки

Визначено токсичність водних зразків, прослідковано динаміку первинних змін ядерцевих показників клітин тест-організмів при впливі токсичних речовин.

Таблиця 2

Порівняння ефектів щодо токсичності, генотоксичності й цитотоксичності речовин неорганічної природи

Досліджувані речовини	Токсичність		Мітотичний індекс		Генотоксичність			
	тваринні біотести	рослинні біотести	цибуля	салат	мЯ-цибуля	мЯ-салат	2Я-цибуля	2Я-салат
Хлорид ртуті	++++	++	++++	++	+	+	+	+
Сульфат міді	++++	++	++++	++++	++	++	++	+++
Пентахлор-фенол	++	+	++	+	+	+	+++	+

Примітки: +: ефект практично відсутній; ++, +++, ++++: слабкий, середній та сильний ефекти відповідно.

Таблиця 3

Порівняння ефектів щодо токсичності, генотоксичності й цитотоксичності речовин органічної природи

Досліджувані речовини	Токсичність		Мітотичний індекс		Генотоксичність			
	тваринні біотести	рослинні біотести	цибуля	салат	мЯ-цибуля	мЯ-салат	2Я-цибуля	2Я-салат
Пентахлор-фенол	+++	+++	++	+	++	++	+	+
Хлорид ртуті	++	++	++	++	+++	++	++	++
Сульфат міді	++++	+++	+	+	+++	+	+++	+

Примітки: +: ефект практично відсутній; ++, +++, ++++: слабкий, середній та сильний ефекти відповідно.

Розроблено схему дослідження цитотоксичності водних проб за допомогою ядерцевого біомаркеру на клітинах рослин і тварин. Результати аналізу вказують на реакції ядерець на дію токсичних речовин.

На основі експериментальних даних обґрунтовано доцільність комплексного використання мікроядерного тесту та ядерцевого біомаркеру для оцінки цитотоксичності та генотоксичності водних зразків поряд зі стандартними методами визначення гострої і хронічної токсичності.

Цей метод дозволив виявити вплив вмісту токсикантів у воді на ядра клітин. Підчас дослідження спостерігалися генотоксичні дії органічних і неорганічних домішок водного середовища на тест-організмі, доведено, що тканина організмів різних органів є чутливим та дозволяє проводити оцінку токсичності, цитотоксичності та генотоксичності водних проб.

ЛІТЕРАТУРА

1. Arkhipchuk V. V., Goncharuk V. V., Chernykh V. P., Maloshtan L. N., Vergolyas M. R., Moseychuk T. V. «Use of plant and animal bioassays and biomarkers for complex estimation a general toxicity, genotoxicity and cytotoxicity of drugs» // Современные проблемы ИИО «Медицина Украины».— К., 2005.— С. 17–25.
2. Гончарук В. В., Верголяс М. Р., Веялкина Н. Н. Оценка генотоксического влияния тяжелых металлов на клетки рыб // Збірник наукових праць Вінницького державного аграрного університету.— Вінниця, 2008.— 1, вип. 34.— С. 171–176.
3. Ильинских Н. Н., Новицкий В. В., Варгунова Н. И., Ильинских И. Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность.— Томск: Изд-во Томского ун-та, 1991.— 272 с.
4. Гончарук В. В., Верголяс М. Р. Спосіб визначення цитотоксичності водного середовища. Патент України № 20001532 від 06.02.2008 р. Бюл. № 6.
5. Hanson N. Utility of biomarkers in fish for environmental monitoring // Integrated Environmental Assessment and Management.— 2009.— 5, № 1.— P. 182–186.
6. Верголяс М. Р., Кучеренко Т. В., Архипчук В. В. Сравнительный анализ частоты проявления клеток с микроядрами и двойными ядрами у карася *Carassius auratus* в природных и лабораторных условиях // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології.— К, Логос, 2007.— 1 — С. 203–206.
7. Hernadez-Verdun D. Regulators of nucleolar functions // Progress in cycle research.— 2003.— 5.— P. 301–308.
8. Гончарук В. В., Гаранько Н. Н., Архипчук В. В. Некоторые характеристики цитотоксичности и генотоксичности водных растворов полигексаметиленгуанидина // Доповіді НАН України.— 2002.— № 3.— С. 167–170.
9. Marcano L. Effect of cadmium on the nucleoli of meristematic cells of onion *Allium cepa* L: an ultrastructural study // Environmental research.— 2002.— 8, № 1.— P. 30–35.
10. Arkhipchuk V. V., Malinovskaya M. V., Garanko N. N. Cytogenetic consequences of a toxic impact on cells of *Allium cepa*, *Lactuca sativa* and *Hydra attenuata* // 9th International Symposium on Toxicity Assessment, Pretoria, South Africa, 26 September — 1 October 1999.: book of abstracts.— Pretoria, South Africa, 1999.— P. 2–3.
11. Верголяс М. Р., Безруков В. Ф., Манило Л. Г. Цитологічна характеристика периферичної крові дев'яти видів риб // Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки.— Запоріжжя, 2007.— № 1.— С. 10–15.
12. Arkhipchuk V. V., Romanenko V. D., Malinovskaya M. V. Toxicity Assessment of Water Samples with a Set of Animal and Plant Bioassays: Experience of the Ukrainian Participation in the WaterTox Program // Environmental Toxicology and Water Quality.— 2000.— 15, N 4.— P. 277–286.
13. Куценко П. Н. Основы токсикологии.— Санкт-Петербург, 2002.— С. 24.
14. Popp W., Wachtler F. Changes in nucleolar structure, number and size in cellular activation and inactivation. Observations in human phytohaemagglutinin-treated lymphocytes // Cell Tissue Res.— 1983.— N 234.— P. 377–388.

OSMALENYY M.S., HOLOVKOV A.M., NANIIEVA A.V., VERGOLIAS M.R.

A. V. Dumanski Institute of Colloid Chemistry and Chemistry Water of the National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Vernadsky blvd., 42, e-mail: vergolyas@meta.ua

COMPREHENSIVE EVALUATION OF TOXICITY OF WATER SAMPLES USING PLANT AND ANIMAL TEST ORGANISMS

Aims. Developing effective methods for assessing the quality of natural waters by biological methods. ***Methods.*** In the study of the influence of toxic substances have used test organisms of plant and animal origin. Determined mitotic activity and frequency of micronuclei formation and double nuclei in cells proliferate roots and *A. cepa, L. sativa,* and analyzed ectodermal cells *H. attenuata*, exposed to the test solution conditions toxicological experiment. ***Results.*** The reaction of plants and animals on the negative impact of the compounds differed significantly, indicating that their different sensitivities and necessitates sharing in complex biotests both plants and animals. It is shown that the animal organism differed greater sensitivity compared with plant, but plant bioassays observed more accurate reproducibility. ***Conclusions.*** The content and cytotoxicity of water samples using nucleolar biomarker in the cells of plants and animals. The method allows to identify the impact of toxicants in water content in the nuclei of cells. During the study, there was genotoxic action of organic and inorganic impurities aquatic environment of the test organism proved that the fabric of different organisms are sensitive and allows for assessment of toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of water samples.

Keywords: aquatic environment, test organism toxicity.

УДК 539.122.047:631.523.4+575.224

СКОРОБАГАТЬКО Д. А.[1, 2], СТРАШНЮК В. Ю.[1], МАЗИЛОВ А. А.[2]

[1] *Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Украина, 61022, г. Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: d_skorobagatko@bk.ru*

[2] *ННЦ «Харьковский физико-технический институт», Украина, 61108, г. Харьков, ул. Академическая, 1*

КОМПОНЕНТЫ ПРИСПОСОБЛЕННОСТИ В ПОТОМСТВЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ПОСЛЕ ОСТРОГО γ-ОБЛУЧЕНИЯ

Естественный радиационный фон является постоянно присутствующим фактором в природных экосистемах. Кроме того, живые организмы подвергаются действию различных источников радиации антропогенного происхождения. Современная эволюционная теория рассматривает любой экологический фактор как фактор эволюции, влияющий на генетическую структуру популяций. Естественный отбор приравнивается к дифференциальному размножению различных генотипов, что, в свою очередь, представляет собой результат многочисленных компонентов приспособленности [1].

К исследованию влияния ионизирующего излучения на различные компоненты приспособленности у дрозофилы существует давний интерес [2–7]. Много внимания уделяется изучению генетических последствий облучения [3, 5, 7–11]. Современные исследования касаются также возможных эпигенетических аспектов действия радиации [12–13].

Данные о последствях радиации, полученные разными авторами, бывают противоречивы, что связано с комплексом условий, в которых проводились исследования. Зачастую в экспериментах используют источники излучения с определенной энергией γ-квантов. Использование тормозного спектра, представляющего собой набор γ-квантов разных энергий, более приближено к естественным условиям.

Цель данной работы — изучить влияние острого облучения тормозными γ-квантами на компоненты приспособленности у *Drosophila melanogaster* Meig. Были поставлены следующие задачи: изучить влияние γ-излучения на яйцепродукцию самок, определить количество потомков имаго, уровень доминантных летальных мутаций (ДЛМ), количество неразвившихся куколок поколениях F_1 и F_2 после облучения, изучить продолжительность жизни имаго в потомстве облученных самок.

Материалы и методы

В работе использовали линию дикого типа *Oregon-R Drosophila melanogaster* Meig. из коллекции кафедры генетики и цитологии Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина. Мух выращивали на стандартной сахаро-дрожжевой питательной среде при температуре 24,0±1,0 °С. Культуры дрозофилы развивались в стаканчиках объемом 60 мл. Объем питательной среды в каждом стаканчике составлял 10 мл.

В работе использовали дозы облучения 8 Гр, 16 Гр и 25 Гр. Виргинных самок имаго дрозофилы в возрасте 3-х суток подвергали облучению на линейном ускорителе электронов ЛУЭ-10. Облучение проводили тормозными γ-квантами, образующимися при взаимодействии электронного пучка с толстой алюминиевой мишенью. Энергия электронов составляла 9,4 МэВ, сила тока — 810 мкА, толщина алюминиевого конвертора — 38 мм. Мощность дозы в точке облучения была рассчитана с помощью детекторов Harwell Red 4034 (Harwell, Великобритания), определяющих поглощенную дозу, и составляла 0,4 Гр/с. Тормозной спектр с учетом геометрии эксперимента рассчитывался с помощью программного пакета GEANT 4. Тормозной спектр представлял собой кривую Бете-Гайтлера, где 97% энергий γ-квантов приходилось на энергии до 3 МэВ, в том числе 70% на энергии до 500 кэВ. Облученных самок спаривали с необлученными самцами.

Плодовитость определяли по среднему количество яиц, отложенных одной самкой за 8 ч. Для этого в каждом варианте опыта по десять оплодотворенных самок на 3-й день после облучения отсаживали на агарозную среду в чашки Петри, по 3 повторности, после чего проводили учет отложенных яиц.

Количество потомков имаго тесно коррелирует с общей приспособленностью особей [14]. Определяли средний выход имаго в потомстве одной пары родительских особей.

© СКОРОБАГАТЬКО Д. А., СТРАШНЮК В. Ю., МАЗИЛОВ А. А.

Продолжительность жизни имаго оценивали в потомстве F_1 после облучения. В пробирки помещали по 30 особей, отдельно виргинных самок и самцов. Учет выживших мух проводили каждые 3 дня при пересадке на свежую питательную среду. Проведено по 3 повторности в каждом варианте опыта.

Частоту ДЛМ определяли по показателю эмбриональной смертности согласно стандартной методике [15]. Определяли частоту ранних (РЛМ) и поздних (ПЛМ) леталей, а также суммарную частоту ДЛМ (РЛМ+ПЛМ).

Об уровне постэмбриональной смертности судили по доле неразвившихся куколок от общего их числа в потомстве каждой пары мух.

Проведен статистический анализ данных. Проверку на нормальность распределений определяли стандартными методами. Для параметрических признаков (яйцепродукция, количество потомков имаго) использовали дисперсионный анализ. Качественные признаки (уровень ДЛМ, смертность на стадии куколки) анализировали с помощью определения долей, их стандартной ошибки, достоверность различий определяли методом χ^2. Для непараметрического признака продолжительности жизни вычисляли среднее арифметическое, ошибку среднего, медианную и максимальную продолжительность жизни, время 90%-ой гибели мух. Для анализа продолжительности жизни использовали критерий χ^2 и критерий Краскелла-Уоллеса с дальнейшим множественным сравнением по непараметрическому варианту критерия Ньюмена-Кейлса [17]. В работе принят уровень значимости не ниже $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Количество потомков имаго зависит от плодовитости родительских особей и выживания потомков на предимагинальных стадиях развития и является одним из интегральных показателей приспособленности [14]. Данные о среднем выходе имаго после действия γ-радиации представлены на рис. 1. Статистически значимых изменений признака не выявлено ни в первом, ни во втором поколении после облучения.

Плодовитость оценивали по количеству отложенных самками яиц. Данные о влиянии γ-излучения на данный показатель у облученных родителей (Р) и их потомков (F_1) представлены на рис. 2. У облученных самок родительского поколения действия радиации на исследуемый признак не выявлено. В поколении F_1 достоверный эффект имел место после облучения в дозе 25 Гр, яйцепродукция самок снизилась на 51,4% относительно контроля ($p<0,05$).

Полученные нами результаты соотносятся с результатами одной из ранних работ [2], в которой было показано, что дозы радиации до 15 Гр не влияют на величину кладки у дрозофилы, а дозы выше 20 Гр заметно ее снижают.

Одним из компонентов общей приспособленности является уровень эмбриональной смертности (показатель ДЛМ). Данные о частоте ДЛМ, включая ранние (РЛМ) и поздние (ПЛМ) летали, приведены на рис. 3.

В первом поколении наблюдали увеличение уровня ранних и поздних леталей после облучения в дозах 16 Гр и 25 Гр, общий уровень ДЛМ при этом повысился на 63,3% и 101,7% соответственно ($p<0,001$). При дозе облучения 8 Гр

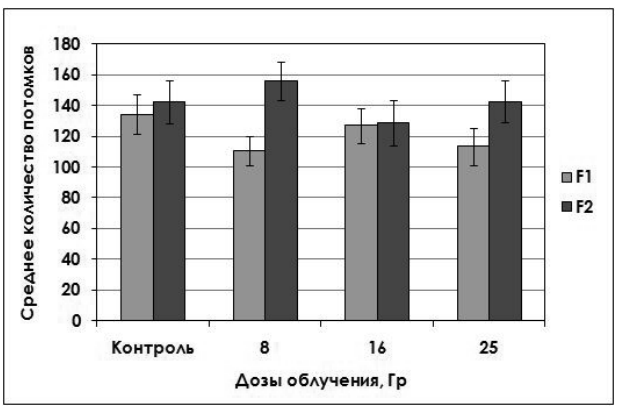


Рис. 1. Количество потомков имаго у *D. melanogaster* после γ-облучения

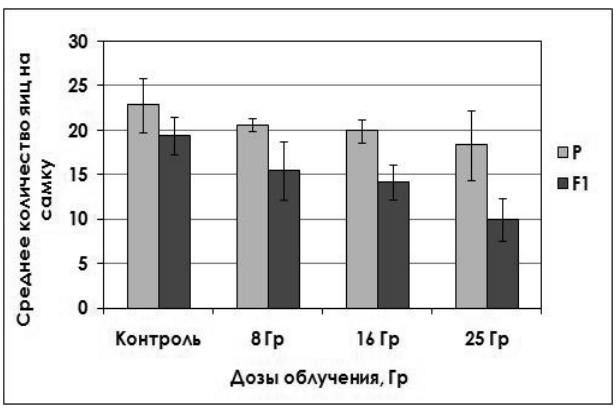


Рис. 2. Яйцепродукция самок *D. melanogaster* после γ-облучения

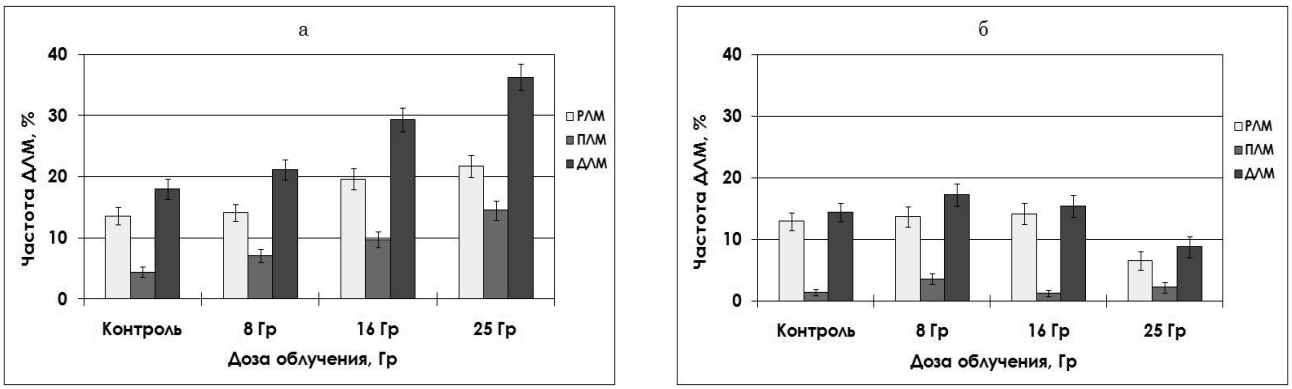


Рис. 3. Частота доминантных летальных мутаций у *D. melanogaster* после γ-облучения: а — в поколении F_1; б — в поколении F_2

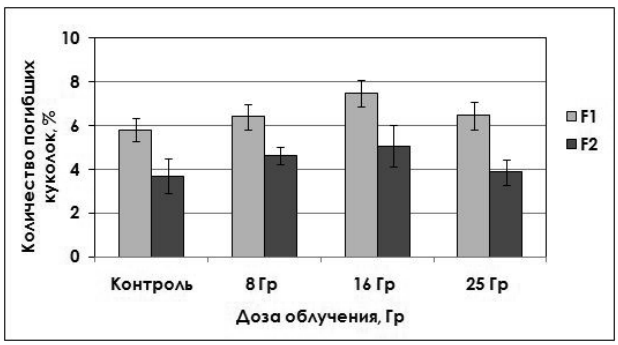


Рис. 4. Смертность на стадии куколки у *D. melanogaster* после γ-облучения

имело место увеличение частоты ПЛМ на 59,8% ($p<0,05$), при этом суммарный уровень ДЛМ не отличался от контрольных значений. Во втором поколении эффекты облучения не сохранялись, а при дозе 25 Гр частота РЛМ и суммарной ДЛМ были снижены по сравнению с контролем на 49,1% и 38,9% соответственно ($p<0,05$), что, по-видимому, является результатом отбора более жизнеспособных генотипов в первом поколении после облучения.

Следует отметить, что эмбриональная смертность в незрелых ооцитах зачастую является следствием поражения ионизирующей радиацией цитоплазматических мишеней, нарушения развития, выявляемые тестом ДЛМ, могут иметь как генетические, так и физиологические причины [3].

По количеству неразвившихся куколок (показатель постэмбриональной смертности, рис. 4) по результатам дисперсионного анализа ни в первом, ни во втором поколениях после облучения значимого влияния γ-излучения не обнаружено.

Данные о влиянии γ-излучения на продолжительность жизни имаго дрозофилы представлены на рис. 5 и в таблице. Тест Краскелла-Уоллеса показал статистически значимое влияние данных доз радиации на продолжительность жизни, у самцов $p<0,01$, у самок $p<0,05$.

Тест Ньюмена-Кейлса показал влияние доз 25 Гр и 8 Гр на самцов ($p<0,01$) и доз 25 Гр и 16 Гр на самок ($p<0,05$). У самцов отмечено снижение как средней, так и медианной продолжительности жизни после дозы облучения 8 Гр на 21,8% и 16,6% соответственно. Также наблюдали сокращение времени 90%-й гибели у самцов данной группы ($p<0,1$). Повышение средней продолжительности жизни на 29,7%, медианной — на 45,7%, а также времени 90%-й гибели на 14,3% отмечено у самцов при дозе облучения 25 Гр. У самок под влиянием дозы 16 Гр было показано снижение средней продолжительности жизни на 6%. После облучения в дозе 25 Гр у самок наблюдали увеличение времени 90%-й гибели на 32,1% и увеличение медианной продолжительности жизни на 16,4% ($p<0,1$).

Результаты исследования свидетельствуют о том, что с увеличением дозы γ-излучения в диапазоне 8–25 Гр в потомстве облученных мух происходит снижение плодовитости, увеличение продолжительности жизни имаго, частота ДЛМ возрастает в поколении F_1 и возвращается к контрольным значениям или (при 25 Гр) снижается в потомстве F_2. Полученные данные согласуются с результатами исследований плодовитости и продолжительности жизни мух, полученных из природных популяций дрозофилы с территорий, различающихся по уровню радиационного

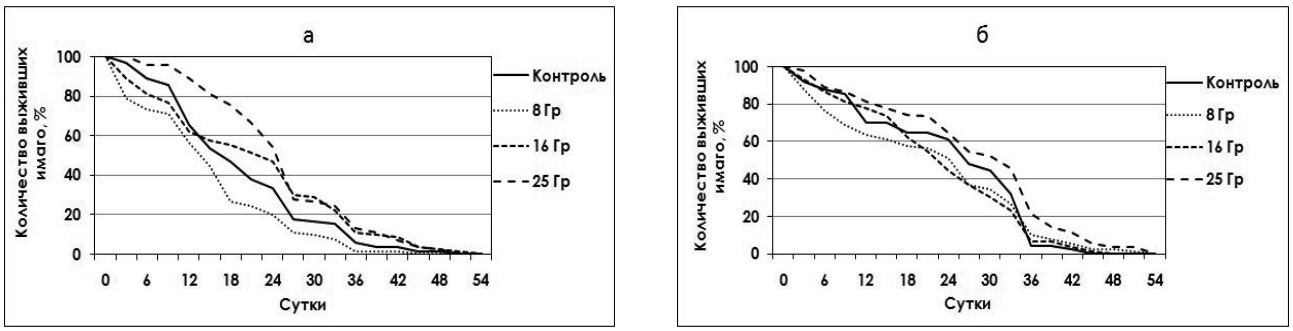


Рис. 5. Кривые выживания имаго у *D. melanogaster* в поколении F_1 после γ-облучения:
а — самцы; б — самки

Таблица

Влияние γ-облучения самок родительского поколения на продолжительность жизни имаго в поколении F_1 у *D. melanogaster*

Доза облучения	Пол	Продолжительность жизни имаго, сутки			
		медианная	средняя	время 90% гибели	максимальная
Контроль	♂	17,5	20,2 ± 1,1	35,7	51
	♀	27,5	24,9 ± 1,3	33,0	45
8 Гр	♂	14,6*	15,8 ± 1,1*	31,0	45
	♀	25,2	22,5 ± 1,5	37,0	54
16 Гр	♂	22,8	22,1 ± 1,5	40,0	54
	♀	23,3	23,4 ± 1,3*	36,4	48
25 Гр	♂	25,5**	26,2 ± 1,1**	40,8*	51
	♀	32,0	28,7 ± 1,4	43,6**	54

Примечания: отличия от контроля достоверны: * — при $p<0,05$; ** — при $p<0,01$.

загрязнения [18, 19]. В соответствии с этими данными можно сделать вывод о том, что при действии радиации у дрозофилы реализуются тенденции *K*-стратегии отбора.

Однако следует отметить, что данные литературы о влиянии радиации на продолжительность жизни дрозофил довольно противоречивы [4, 5, 7, 19]. Последствия облучения зависят, помимо дозы, от генотипа мух, их физиологического состояния на момент облучения, пола, стадии онтогенеза, на которой происходило воздействие, способа облучения (острое, хроническое), характеристик излучения (мощность дозы, энергия квантов и др.).

Известно, что воздействие ионизирующего излучения затрагивает различные системы организма и имеет множественные биологические эффекты [19]. Современная дискуссия по этой проблеме, наряду с традиционными данными о мутагенном и рекомбиногенном влиянии, касается молекулярно-генетических механизмов, в частности, перемещений по геному мобильных генетических элементов [7, 8], радиационно-индуцируемой нестабильности [9], нереципрокной рекомбинации [10], влияния эпигенетических факторов [11–13].

В реализации радиационных эффектов заметную роль играют процессы репарации, работа антиоксидантной системы, системы сверочных точек, апоптоз [5]. В модификации продолжительности жизни в результате хронического облучения малыми дозами участвуют сенсоры, трансдукторы и эффекторы систем передачи стрессовых сигналов [6]. Возможно, эти же механизмы действуют при остром облучении.

Выводы

При действии острого облучения тормозными γ-квантами с увеличением дозы в диапазоне 8–25 Гр в потомстве облученных мух происходит снижение плодовитости, увеличение продолжительности жизни имаго, частота ДЛМ возрастает в поколении F_1 и возвращается к контрольным значениям или (при 25 Гр) снижается у потомков F_2. При этом выход имаго в потомстве облученных мух не изменяется. В соответствии с полученными данными можно сделать вывод о том, что в данных условиях облучения у дрозофилы реализуются тенденции *K*-стратегии отбора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грант В. Эволюция организмов.— М.: Мир, 1980.— 407 с.
2. Touchberry R. W., DeFries J. C. Genetic effects of gamma-irradiation on egg production and adult emergence of *Drosophila melanogaster* // Genetics.— 1964.— № 49.— P. 378–400.
3. Моссэ И. Б. Радиация и наследственность: генетические аспекты противорадиационной защиты. Мн.: Университетское, 1990.— 208 с.
4. Измайлов Д. М., Обухова Л. К., Окладнова О. В., Акифьев А. П. Продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* в ряду поколений после однократного воздействия ионизирующей радиации // Докл. АН СССР.— 1990.— 313, № 3.— С. 718–722.
5. Москалев А. А., Яцкив А. С., Зайнуллин В. Г. Изменения продолжительности жизни у разных линий *Drosophila melanogaster* после облучения в малых дозах // Генетика.— 2006.— 42, № 6.— С. 773–782.
6. Moskalev A. A., Plyusnina E. N., Shaposhnikov M. V. Radiation hormesis and radioadaptive response in *Drosophila melanogaster* flies with different genetic backgrounds: the role of cellular stress-resistance mechanisms // Biogerontology.— 2011.— 12.— P. 253–263.
7. Голуб Н. Я., Черник Я. І. Мутації, індуковані рентгенівським опроміненням та деякими хімічними реагентами, що змінюють тривалість життя *Drosophila melanogaster* // Цитология и генетика.— 2008,— 42, № 1.— С. 37–44.
8. Ратнер В. А., Васильева Л. А. Индукция транспозиций мобильных генетических элементов стрессовыми воздействиями // Соросовский образовательный журнал.— 2000.— № 6.— С. 14–20.
9. Дуброва Ю. Е. Нестабильность генома среди потомков облученных родителей. Факты и их интерпретация // Генетика.— 2006.— 42, № 10.— С. 1335–1347.
10. Скоробагатько Д. А., Страшнюк В. Ю., Мазилов А. А. Влияние γ-облучения на проявление количественных признаков и нестабильность признака *Bar* у *Drosophila melanogaster* Meig. // Вісник проблем біології і медицини.— 2013.— Вип. 2 (100) .— С. 106–111.
11. Вайсерман А. М., Литошенко А. Я., Квитницкая-Рыжова Т.Ю., Кошель Н. М., Мозжухина Т. Г., Михальский С. А., Войтенко В. П. Молекулярные и клеточные аспекты радиационного гормезиса у *Drosophila melanogaster* // Цитология и генетика.— 2003.— 37, № 3.— С. 41–48.
12. Vaiserman A. M. Hormesis and epigenetics: Is there a link? // Ageing Research Reviews.— 2011.— 10.— P. 413–421.
13. Guerrero-Bosagna C., Weeks S., Skinner M. K. Identification of Genomic Features in Environmentally Induced Epigenetic Transgenerational Inherited Sperm Epimutations // Plos One.—2014.— 9, I. 6, e100194.
14. Yamasaki T. Measurement of fitness and its components in six laboratory strains of *Drosophila melanogaster* // Genetics.— 1984.— 108.— P. 201–211.
15. Тихомирова М. М. Генетический анализ.— Л.: Издательство ЛГУ, 1990.— 280 с.
16. Гланц С. Медико-биологическая статистика.— М.: Практика, 1998.— С. 459.
17. Проценко А. В., Козерецкая И. А., Фуллер Б. А., Меллер А. П., Мюссе Т. А. Репродуктивный успех *Drosophila melanogaster* в природных популяциях с радиационно загрязненных территорий Украины // Зб. наук. праць І Міжнар. конф «Дрозофіла в експериментальній генетиці та біології».— Харків, 2008.— С. 89–91.
18. Филипоненко Н. С., Волкова Н. Е., Воробьева Л. И. Анализ продолжительности жизни линий *Drosophila melanogaster*, полученных из природных популяций с территорий с различным уровнем радиационного загрязнения // Фактори експериментальної еволюції організмів.— К.: Логос, 2009.— 6.— С. 402–406.
19. Кудряшов Ю. Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения) .— М.: Физматлит.— 2004.— 448 с.

SKOROBAGATKO D.A.[1, 2], STRASHNYUK V. Yu.[1], MAZILOV A.A.[2]

[1] V.N. Karazin National University of Kharkiv,
Ukraine, 61022, Kharkiv, Svoboda sq., 4, e-mail: d_skorobagatko@bk.ru

[2] NSC «Kharkiv Institute of Physics and Technology»,
Ukraine, 61108, Kharkiv, Academic str., 1

FITNESS COMPONENTS IN THE OFFSPRINGS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* MEIG. AFTER ACUTE γ-IRRADIATION

Aims. The purpose of investigation was to study the effect of acute irradiation by brake γ-quantums on the components of fitness in *Drosophila melanogaster* Meig. ***Methods.*** The effect of acute γ-radiation at doses of 8 Gr, 16 Gr and 25 Gr on the fertility, the number of adults, the level of dominant lethal mutations (DLM) and life span of adults in the wild-type strain *Oregon-R* were investigated. Female adults in the age of 3 days were irradiated by brake gamma rays on the linear electron accelerator LEA-10. The dose rate was 0.4 Gr/sec. ***Results.*** Under the action of acute exposure brake γ-rays with increasing doses in the range of 8–25 Gr a decrease in egg production, increased longevity of adults in the F_1 generation were found. DLM frequency increased in generation $F_1$and returned to the control values, or (at 25 Gr) decreased in the progeny F_2. The number of adults in the progeny was not changed. ***Conclusions.*** In accordance with the data obtained it can be concluded that the trends of K-strategy of selection in these conditions of exposure in *Drosophila melanogaster* were realized.

Keywords: *Drosophila melanogaster* Meig., fitness, egg production, life span, dominant lethal mutations.

UDC 631.523:581.13

IEFIMENKO T. S.[1], FEDAK G.[2], ANTONYUK M. Z.[1], TERNOVSKA T. K.[1]
[1] National University of «Kyiv-Mohyla Academy»,
Ukraine, 04070, Kyiv, Skovorody str., 2, e-mail: centaureinae@gmail.com
[2] Agriculture and Agri-Food Canada, Eastern Cereal and Oilseed Research Center,
Ottawa, Ontario

INTROGRESSIVE WHEAT LINES *TRITICUM AESTIVUM*/*AMBLYOPYRUM MUTICUM* AS TO STRUCTURE OF HOMOEOLOGOUS GROUP 5 CHROMOSOMES

Many genes for resistance to biotic and abiotic stresses have been transferred to the genomes of modern wheat cultivars from wild relatives of wheat [1]. *Amblyopyrum muticum* (Boiss) Eig (*Aegilops mutica* Boiss) is one of diploid wild relatives of wheat which is resistant to fungal diseases, and until recently was not much used for introgressive hybridization [2, 3]. Aurotica is a genome substitution amphidiploid which combines in its genome (AABBTT) tetracomponent (AABB) from common wheat winter cultivar Aurora, and T genome of *Aegilops mutica* [4]. During a 20-year period of monitoring, Aurotica demonstrated resistance to powdery mildew and rust, and additionally was characterized by higher winter hardiness. Using genome mixing method [5], wheat introgressive lines are being developed, which contain different amounts of T genome chromatin in their genomes, and are derived from the initial Aurora x Aurotica cross. Aurotica (AABBTT) is characterized by higher level of winter tolerance compared to Aurora cultivar (AABBDD), and this is supposed to be determined by genes of T genome. Freezing tolerance and winter hardiness in wheat is controlled by genes on chromosomes of homeological group 5 [6], for this reason analyzing the developed lines, first of all we tried to identify those containing introgressions in chromosomes of this group. Microsatellites (SSRs) can be used as markers for identification of alien chromatin in wheat genome. Microsatellite loci specific to chromosomes 5A, 5B, and 5D were used to identify chromatin from T genome in the genomes introgressive lines.

Materials and methods

Plant material: common wheat cultivar Aurora, genome substitution amphidiploid Aurotica, 234 42-chromosome F_5plants from crossing Aurotica and Aurora. DNA was extracted from leaves using CTAB buffer. PCR was done with primers to microsatellite loci specific to the chromosomes of homeological group 5 [7, 9, 10]. Reaction mixture contained 250 nM of each primer, 50 ng of DNA, 0,2 mM of each dNTP, 1,5 mM $MgCl_2$, 1,2 u Taq-polymerase (Fermentas). Conditions of amplification were used as recommended by primers developer. Amplification products were separated in denaturating PAAG.

Results and discussion

Hexaploids Aurora and Aurotica differ from each other by one subgenome: D genome in Aurora and T genome in Aurotica. Tetraploid component AABB in these forms must be identical. For this reason, amplification spectra for chromosomes 5A and 5B are also supposed to be identical for Aurora and Aurotica, which was true for 46 loci on chromosomes 5A and 22 loci on chromosome 5B from 62 and 29 analyzed, respectively. Primers specific to 5D chromosome must not amplify any product with DNA of Aurotica, because it does not contain subgenome D. Nevertheless, amplification product was absent only for two loci from 24 analyzed. This phenomenon could be explained by the transferability of microsatellite loci specificity among chromosomes of the same homeological group of *Triticinae*. This fact has been known from the beginning of use of microsatellite loci for mapping and comparison of *Triticinae* genomes [11]. Transferability of microsatellite loci is confirmed on our material: 8 pairs of primers from 102 analyzed were specific to two chromosomes of homeological group 5, and 3 pairs of primers were shown to be specific to all three homeological chromosomes. According to our results, transferability among D and T genomes is even higher then among other subgenomes of wheat. This could be considered as an evidence for D and T genomes homology, especially taking into account conjugation of the chromosomes from these genomes [4, 12].

Because of the transferability of the microsatellite loci among chromosomes of homeological group

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

5, including 5T chromosome, DNA of Aurora and Aurotica can produce identical spectra of amplification products with primers to loci specific to more than one chromosome (fig. 1).

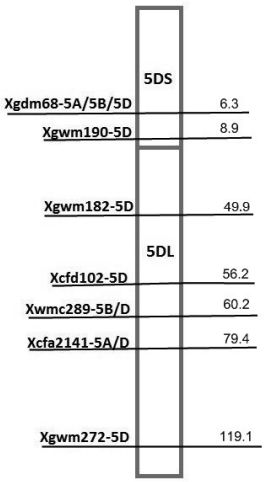


Fig. 1. Localization of analyzed microsatellite loci on 5D chromosome; distance from the distal part of the short arm of chromosome is shown in map units [7, 9, 10]

If SSR loci from T genome have alleles differing from Aurora, then specific components appear in spectra of Aurotica. It was true for microsatellite loci *Xcfa2151* (5A/5D), *Xwmc289* (B, D), *Xgdm68* (5A/5B/5D) та *Xgwm293* (A, B, D). When primers to the loci *Xwmc233, Xcfd18, Xcfd8, Xgpw5098, Xgwm292, Xcfd29, Xcfd183, Xwmc765, Xwmc443, Xgwm654* produce identical spectra with DNA of Aurora and Aurotica, this indicates that these loci are specific not only to the genome D, but also to the genome T, and alleles at these loci in Aurora and Aurotica are identical. The same explanation is true for the loci *Xcfa2104* (A, D), *Xcfa2185* (A, D), *Xbarc316* (A, D), *Xbarc232* (A, B, D).

For the identification of T genome chromosomes in the genomes of introgressive lines only 9 microsatellite loci are appropriate: *Xcfd189, Xcfd102, Xgwm190, Xgwm272, Xgwm182, Xcfa2141* (5A/5D) *Xgdm68 (A, B, D), Xgwm293 (A, B, D) Xwmc289 (B, D)*. Aurotica has specific product of amplification with the primers to these loci. The fact that four of these 9 loci produce amplification product with A and B genomes, could be theoretically ignored, because this part of the genomes of Aurora and Aurotica must be identical and differences in spectra are supposed to be caused by the presence of different alleles of these microsatellite loci in D and T genomes. Microsatellite locus *Xcfd57* does not produce amplification product with DNA of Aurotica, which could be caused by the absence (or rearrangement) of the corresponding region of 5D chromosome. This locus provides no evidence about the presence of chromosome segment from T genome.

As for 5A and 5B chromosomes, difference in spectra of amplification products between Aurora and Aurotica was observed for 12 loci on the chromosome 5A (32% from the studied loci) and for 2 loci on the chromosome 5B (14% of studied loci). Differences between Aurora and Aurotica for microsatellite loci *Xwmc752, Xwmc150, Xcfd40, Xbarc117, Xwmc805, Xbarc1, Xgwm186, Xbarc142, Xgwm179, Xcfd39, Xgwm291, Xcfd47* (chromosome 5A), and *Xgwm544, Xcfd7, Xwmc160* (chromosome 5B), can be caused by one of the three factors. First, while extracting AABB tetracomponent from the AABBDD genome of common wheat, which was done by crossing Aurora cultivar with durum wheat and six backcrosses of pentaploid hybrids with Aurora, recombination between chromosomes of A and B genomes of common and durum wheat occurred [13]. That could be the reason for partly disrupted identity between tetra-Aurora and Aurora AB genomes. Second, information about transferability of studied microsatellite loci among chromosomes of one homeological group was obtained not on Aurora, but other wheat genotypes [7, 9, 10]. It is possible, that in Aurora genome these loci are specific also to 5D chromosome, and it is also possible, that they are as well specific to chromosome 5T of Aurotica. Third, during last decade many works, including those on *Triticinae*, demonstrated that amphidiploidization process (development of Aurotica included amphidiploidization) is accompanied by numerous, and possibly directed, rearrangements in the genome, and these rearrangements include changes in microsatellite loci [14].

For screening of 234 42-chromosome F_5 plants from crossing Aurora x Aurotica 7 SSR loci with diagnostic value for identification of substitution of microsatellite locus characteristic to 5D chromosome to that specific to 5T were used (fig. 1). Aurora x Aurotica hybrid had AABBDT genome structure. Conjugation between D and T chromosomes was demonstrated before, although some univalents were also present in metaphase [4, 12]. This is confirmed by variation of chromosome numbers from 33 to 46 among F_2 offsprings of Aurora x Aurotica hybrid, which occurs because of irregular segregation of chromosomes of D and T genomes to the poles of meiocytes. Only fertile plants participated in forma-

tion of next hybrid generation, which caused narrowing of the variation of chromosome numbers, and in F_5 generation offsprings of only 15 F_2 plants were present. In generations from F_2 to F_5 plants with chromosome numbers near 42 were fertile; they were formed from gametes with almost normal chromosome constitution. For this reason it is credibly that among 15 F_2 plants whose F_5 offsprings were analyzed, ¾ of plants have at least one chromosome 5T (11 plants from 15), and ¼ have only 5D chromosomes (4 plants from 15). Comparison of amplification products spectra of F_5 plants demonstrated that 5T chromosome was present in the genomes of 13 F_2 plants, and it was absent in two plants, which corresponded to the expected chromosome numbers (according to the Fisher's exact test, P = 0,651).

If chromosomes 5D and 5T conjugate, recombination can occur between them, and among offsprings of successive generations not only plants with intact 5T chromosome, but also plants with recombinant 5D/5T chromosome may be present. According to the obtained results, it was possible to make hypothesis about chromosome constitution of plants from generations F_2–F_4 as to the presence of 5T chromosome: was it mono- or disomic substitution 5D/5T. Additionally, it was possible to identify plants with recombinant 5D/5T chromosomes. Evidence that a plant from F_2 generation had a pair of nonrecombinant chromosomes could be represented only as presence of the same (nonrecombinant) chromosome constitution in F_5 generation, and therefore in all in-between generations, which were not analyzed. Only one such plant was identified among F_2 generation. Although that plant could have another chromosome structure, it could not be demonstrated from analysis of the existent offsprings. Other 12 plants must have had two intact chromosomes, 5D or 5T, or one or both of them were recombinant and contained alleles of microsatellite loci characteristic to both chromosomes. These two cases could not be distinguished basing on our results: if F_2 plant had two intact chromosomes 5D and 5T, recombination between them could have occurred during the formation of gametes of any following generation, however only F_5 generation was analyzed. Among the plants of F_3 generation only 6 plants could possibly have nonrecombinant 5T chromosome in the genome. One of them could have disomic substitution 5D/5T, because all the analyzed F_5 offsprings of this plant were characterized by this chromosome constitution. Five other F_3 plants possibly had one intact 5T chromosome, and one chromosome with rearrangements and insignificant (three plants) or significant (one plant) inclusion of fragments from 5T chromosome. Among the offsprings of the F_3 plants, in F_5 generation 21 plants which can be considered disomic substitution lines 5D/5T were identified using microsatellite analysis. All the rest plants from F_3 and F_4 generations contained in their genomes recombinant chromosomes 5D/5T, which combined fragments of these chromosomes in different combinations.

Numerous 5D/5T recombinant chromosomes were observed among F_5 plants, and recombination events could occur in any generation beginning from F_2. This confirms hypothesis [12] about homology of D and T genomes, and indicates that T genome of *Amblyopyrum muticum* belongs to the group of *Triticinae* genomes which can conjugate with chromosomes of at least one of three subgenomes of common wheat. These genomes are very valuable for introgressive hybridization as they give the possibility to obtain introgression of small fragments of alien chromosomes into homeological chromosome of wheat through recombination process (without application of specific methods). It is important to obtain translocations from alien chromosomes, which may carry useful genes, in very small amount of alien chromatin. Identified plants with 5D/5T recombinant chromosomes are promising material for future work on introgressive hybridization and genetic analysis.

On the other hand, recombination between D and T chromosomes makes more difficult identification of alien disomic substitution lines. When D chromosomes do not conjugate with chromosomes from alien genome, it is possible to use only 1–2 biochemical markers on chromosome combined with analysis of univalent numbers in metaphase I of hybrids among recipient genotype (Aurora) and 42-chromosome introgressive line for identification of substitutions of D genome chromosomes by chromosomes of genomes S, S^{sh}, and U of three wild species: *Aegilops speltoides, Ae. sharonensis, and Ae. umbellulata*, respectively. However, when chromosomes of donor (T) and recipient (D) genomes conjugate and form recombinant chromosomes with frequency much higher that frequency of preservation of intact chromosomes in generations, identification of such chromosomes requires screening of the plant material with several marker loci per chromosome. Markers should cover both chromosome arms, and preferably on distal and proximal regions from centromere.

In electrophoretic spectra of some plants appeared such component (amplification product) that differed from both Aurora and Aurotica components, and it was designated as «new» one. Appearance of

new alleles in microsatellite loci can be explained by mutations, as their frequency is higher in genome regions with repeats (such as SSR loci). From 7 studied microsatellite loci, such «new» alleles were absent only for two loci — *Xgdm68* (A, B, D) and *Xgwm182*. New alleles appeared not only on chromosomes D and T, but also on chromosomes of A and B subgenomes.

Conclusions

Comparison of amplification products spectra produced with DNA of Aurora and Aurotica with primers to microsatellite loci specific from one to three chromosomes of homeological group 5, gave the possibility to identify loci which are diagnostically valuable for identification of plants with substitution 5D/5T and recombination 5D/5T among 42-chromosome offsprings of F_5 hybrid from Aurora x Aurotica cross. Among total 234 plants 24 plants with disomic substitution 5D/5T were identified. Numerous plants carry recombinant chromosome 5D/5T. Recombination event could have occurred in any generation beginning from F_2. Microsatellite analysis of introgressive material has some limitations because of high mutation rate in SSR loci, and potential transferability of these loci on more than one chromosome of the same homeological group. Plants with recombinant chromosomes 5D/5T are promising material for future research.

REFERENCES

1. Kazi A. G. Biotic stress and crop improvement: wheat focus around novel strategies / Crop Improvement.— K. R. Hakeem et al. (eds.).— Springer Science+Business Media, 2013.— P. 238–267.
2. Panayotov I., Tsujimoto H. Fertility restoration and NOR suppression caused by *Aegilops mutica* chromosomes in alloplasmic hybrids and lines // Euphytica.— 1997.— 4, N 2.— P. 145–149.
3. Eser V. Characterisation of powdery mildew resistant lines derived from crossesbetween *Triticum aestivum* and *Aegilops speltoides* and *Ae. mutica* // Euphytica.— 1998.— 100.— P. 269–272.
4. Жиров Е. Г. Геномы пшеницы: исследование и перестройка: Дис. … докт. биол. наук: 03.00.15.— Краснодар.— 1989.— 366 с.
5. Жиров Е. Г., Терновская Т. К. Геномная инженерия у пшеницы // Вестник с.-х. науки.— 1984.— № 10.— С. 58–66.
6. Vágújfalvi A., Galiba G., Cattivelli L., Dubcovsky J. The cold-regulated transcriptional activator *Cbf3* is linked to the frost-tolerance locus *Fr-A2* on wheat chromosome 5A // Molecular and General Genetics.— 2003.— 269, N 1.— P. 60–67.
7. Somers D. J., Isaac P., Edwards K. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet.— 2004.— 109.— P. 1105–1114.
8. Kalia R. K., Rai M. K., Kalia S. Microsatellite markers: an overview of the recent progressin plants // Euphytica.— 2011.— 177.— P. 309–334.
9. GrainGenes: A Database for *Triticeae* and *Avena.* http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml.
10. KOMUGI: Wheat Genetic Resources Database. Composite Wheat Map http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/maps/markerMap.jsp; jsessionid=40E62A525FB63D69D63275DF645E308C.lb1?chromosome=5.
11. Kuleung C., Baenziger P. S., Dweikat I. Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale // Theor. Appl. Genet.— 2004.— 108.— P. 1147–1150.
12. Jones J. K., Majisu B. N. The homoeology of *Aegilops mutica* chromosomes. // *Canadian Journal of Genetics and Cytology.*— 1968.— 10 (3).— P. 620–626.
13. Терновская Т. К., Жиров Е. Г. Выделение тетраплоидного компонента AABB из мягкой пшеницы сорта Саратовская 29 // Докл. ВАСХНИЛ.— 1979.— № 3.— С. 8–10.
14. Feldman M., Levy A. A. Allopolyploidy — a shaping force in the evolution of wheat genomes // Cytogenet Genome Res.— 2005.— 109.— P. 250–258.

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

[1] National University of «Kyiv-Mohyla Academy»,
Ukraine, 04070, Kyiv, Skovorody str., 2, e-mail: centaureinae@gmail.com

[2] Agriculture and Agri-Food Canada, Eastern Cereal and Oilseed Research Center,
Ottawa, Ontario

INTROGRESSIVE WHEAT LINES *TRITICUM AESTIVUM / AMBLYOPYRUM MUTICUM* AS TO STRUCTURE OF HOMOEOLOGOUS GROUP 5 CHROMOSOMES

Aims. Using SSR loci specific to homeological group 5 chromosomes, identify T genome introgressions in the genomes of F_5 wheat plants from crossing Aurora x Aurotica. ***Methods.*** DNA extraction using CTAB method, PCR with primers to SSR loci, electrophoresis in PAAG, silver staining. ***Results.*** Comparative microsatellite analysis of Aurora and Aurotica identified 9 SSR loci specific to D genome which produced differing amplicons with Aurotica DNA. These loci were used for screening (Aurora x Aurotica) F_5 progeny (234 plants); 24 plants with disomic substitutions 5D/5T were detected, and a significant number of plants containing recombinant chromosome 5D/5T. The recombination event could occur in any generation from F_2. ***Conclusions.*** Microsatellite loci could be used for identification of introgressions from *Aegilops mutica* in wheat genome (although with some limitations). Identified plants with recombinant 5D/5T chromosomes are perspective for future work.

Keywords: introgressive hybridization, *Amblyopyrum muticum*, microsatellite analysis, SSR loci, alien-substitution lines, recombinant lines.

УДК 575.224:575.826

БІЛОКОНЬ С. В.
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
Україна, 65082, м. Одеса, вул. Дворянська, 2, e-mail: lotuss75@mail.ru

ГЕНОТОКСИЧНИЙ ВПЛИВ ДЕЯКИХ ПЕСТИЦИДІВ У ТЕСТАХ НА *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Інтенсивне сільськогосподарське виробництво для одержання високих урожаїв передбачає системне застосування хімічних засобів захисту рослин від шкідників, бур'янів та хвороб. Однак разом з високою господарською та економічною ефективністю широке використання пестицидів створює потенційну небезпеку забруднення ними об'єктів довкілля, загрозу негативного впливу на здоров'я працюючих і населення та порушення екологічної рівноваги у природі [1].

Одним із найбільш пріоритетних напрямків сучасної науки є вивчення несприятливого впливу на біологічні системи ксенобіотиків, у тому числі пестицидів. За даними Мінагрополітики України, щорічно на 40 млн га сільськогосподарських угідь вноситься до 36 тис. тонн пестицидів. Загрозливих масштабів набуло забруднення пестицидами, накопичення яких тільки в південних регіонах України сягає близько 5 тис. тонн [2].

Пестициди неминуче викликають глибокі зміни екосистем, в які їх впроваджують, оскільки вони мають широкий спектр токсичної дії на всі живі організми. Багато яким пестицидам окрім високої токсичності притаманна яскраво виражена кумулятивна дія, наслідки якої проявляються в порушеннях імунологічного статусу організму, в мутагенній та тератогенній дії [3].

В аналізі токсичної дії пестицидів особливе місце займає вплив на генетичний апарат, бо численні дані літератури свідчать, що саме клітинне ядро є вірогідною мішенню їх дії [4, 5]. Багато пестицидів та їх метаболітів, проникаючи в клітинне ядро, змінюють структурно-функціональну організацію ядерного геному. Відзначено, що пестициди викликають збільшення частоти генних мутацій, хромосомних аберацій, а також порушення реплікації і транскрипції ДНК, синтезу РНК, змінюють роботу ферментних систем, пригнічують репаративні системи клітини і т. ін. [6].

Є достатня кількість фактів, які підтверджують реальність генетичної небезпеки накопичення пестицидів у ґрунті, воді й атмосфері. Тому дослідження їх токсичності дуже важливі. Однак генотоксичний вплив нових впроваджених у сільське господарство пестицидів на життєздатність і репродуктивну функцію тваринних об'єктів досліджено недостатньо [7].

У зв'язку з цим метою роботи було вивчення генотоксичного впливу акарицидів і фунгіцидів у тестах на *Drosophila melanogaster*.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень слугувала *Drosophila melanogaster* Mg. (Diptera, Drosophilidae). Дослідження провадили на лінії дрозофіли дикого типу *Canton-S,* якій властиві гарна життєздатність, висока плодючість та добре вивчений рівень мутабільності [8]. Мухи утримувалися при 24–25 °С в термостаті в цукрових стаканчиках зі стандартним середовищем [9] у контролі та з додаванням препаратів пестицидів до кормової суміші у досліді.

Вивчали дію фунгіцидів «Флінт Стар» 0,005 %, «Превікур Енерджі» 0,015 %, а також акарицидів «Санмайт» 0,001 % і «Омайт» 0,003 % на такі показники пристосованості дрозофіли, як плодючість та тривалість життя. Саме такі концентрації вибраних пестицидів близькі до рекомендованих виробниками (робочі розчини). Препарати «Превікур Енерджі» й «Омайт» належать до класу малотоксичних препаратів, а «Флінт Стар» та «Санмайт» — до помірно токсичних [10, 11]. В окремій серії дослідів визначали мутагенний вплив фунгіцидів за методом Меллер-5 (Basc) [9].

Тривалість життя мух за однократної дії пестицидів визначали, утримуючи по 10 мух кожної статі в пробірках з живильним середовищем, до якого додавали робочу концентрацію фунгіциду чи акарициду в досліді та дистильовану воду в контролі. Підрахунок живих мух вели щодня. Зміну корму здійснювали кожні три доби, резуль-

© БІЛОКОНЬ С. В.

тати виражали кількістю діб, необхідних для загибелі 50 % особин (Lt_{50}).

Плодючість визначали за кількістю нащадків однієї пари мух. Для цього пару мух утримували в пробірці з живильним середовищем, до якого додавали робочу концентрацію фунгіциду чи акарициду в досліді та дистильовану воду в контролі. Підрахунок нащадків, що виникли за цих умов, вели за кількістю лялечок та імаго. У кожному варіанті досліду було закладено по три повтори у трьох поколіннях.

Стисла характеристика досліджуваних препаратів:

«Флінт Стар» — новий фунгіцид мезостемно-системної дії. Препарат містить діючу речовину трифлоксістробін з класу стробілуринів з мезостемним механізмом дії та піріметаніл з класу анілопірімідинів із системним механізмом дії. Обидві діючі речовини препарату ідеально доповнюють одна одну. Винятковий профілактичний ефект тріфлоксістробіну посилюється міцними лікувальними здатностями піріметанілу. Обидві речовини здатні перерозподілятися в газовій фазі по тих частинах рослини, на які препарат не потрапив безпосередньо під час обробки. Різнобічні механізми дії роблять малоймовірною можливість виникнення стійких рас збудників хвороб [10].

«Превікур Енерджі» — фунгіцид повної системної дії з ростостимулюючими властивостями у формі водорозчинного концентрату для захисту овочевих і баштанних культур від патогенів групи несправжніх борошнистих рос та кореневих гнилей. Препарат містить пропамокарб гідрохлорид 530 г/л і фосетил алюмінію 310 г/л. Пропамокарб гідрохлорид відрізняється надзвичайно високою профілактичною активністю проти несправжніх борошнистих рос і кореневих гнилей як за умов обробки рослин беспосередньо, так і шляхом використання через полив ґрунту, в який висаджується насіння або висаджена розсада [10].

«Санмайт» (пірідабен, 200 г/кг) — контактний акарицид, що відрізняється високою активністю при боротьбі з шкідниками на всіх стадіях їх розвитку (яйце — личинка — німфа — дорослий кліщ), ефективний у боротьбі з багатьма видами кліщів. Пірідабен токсичний для птахів, слаботоксичний для бджіл і теплокровних тварин. Помірно небезпечний для людини. За пероральної та термальної токсичності пірідабен помірно небезпечний, за інгаляційної — небезпечний. Побічні негативні ефекти відсутні. Препарат на основі пірідабену належить до 2-го класу небезпеки для людини і 3-го класу небезпеки для бджіл [11].

«Омайт» (пропаргіт) за хімічною структурою є ефіром сірчистої кислоти, належить до малотоксичних речовин. Знищує активні стадії розвитку кліщів (личинка, німфа, доросла особина). Не знищує яйця, але залишкова дія знищує личинки.

Облік рецесивних зчеплених зі статтю летальних мутацій (РЗСЛМ) провадили за методом Меллер-5 (Basc) [9, 12]. Цей метод дозволяє здійснювати кількісний облік рецесивних летальних мутацій, що виникають у Х-хромосомі зрілих сперматозоїдів самців дрозофіли. Самців, які отримували фунгіцид у кормі, віком 3–5 днів, схрещували з віргінними самицями лінії Меллер-5 (Basc). Схрещування проводили сім'ями, по 2 мухи на пробірку (1♂ і 1♀). Всього піддавали дії фунгіцидів по 20 самців кожного варіанту. Через дві доби мух вилучали з пробірки, оскільки на третій день у заплідненні беруть участь статеві клітини, що знаходилися на стадії сперматид на момент обробки самців. Через 9–10 днів проводили аналіз мух F_1 тільки дводенних яйцекладок. Аналіз РЗСЛМ здійснювали в другому поколінні. Частоту леталей визначали як частку (%) Х-хромосом, що несуть летальну мутацію, від загальної кількості проаналізованих Х-хромосом.

Статистичну обробку матеріалу проводили з використанням стандартних і спеціалізованих програм (Statistica) за методами, прийнятими в біології [13].

Результати та обговорення

Облік рецесивних летальних мутацій у Х-хромосомі самців за методом Меллер-5 (Basc) показав, що після додавання в кормову суміш самців фунгіциду «Превікур Енерджі» серед нащадків F_2 не було самців дикого типу в 10,0 % сімей, а при додаванні фунгіциду «Флінт Стар» самців дикого типу не було у 15 % сімей (табл. 1).

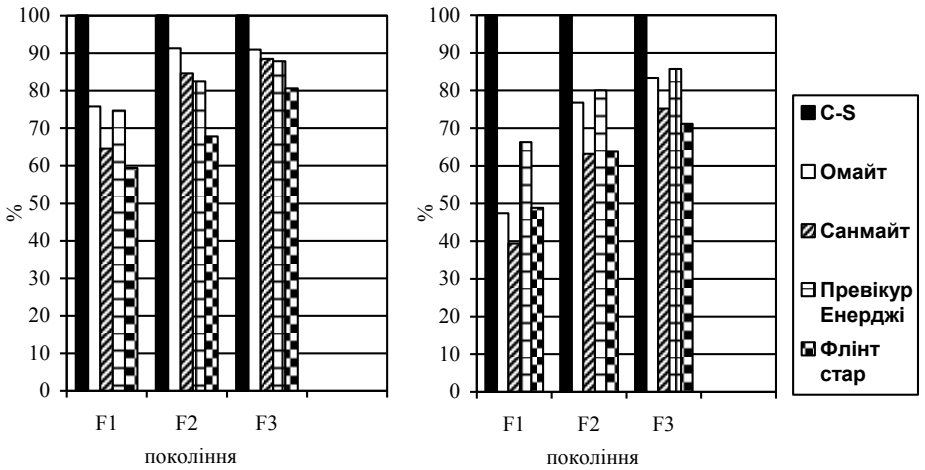
Отримані дані дають змогу стверджувати, що досліджувані препарати фунгіцидів здійснюють мутагенний вплив на дрозофілу.

Вивчали також здатність досліджуваних препаратів фунгіцидів і акарицидів впливати на адаптивні можливості статевих клітин дрозофіли

Таблиця 1

Індукція рецесивних зчеплених зі статтю летальних мутацій у *Drosophila melanogaster* за впливу фунгіцидів

Варіант досліду	Число проаналізованих Х-хромосом ♂	Число Х-хромосом з леталями	Частота РЗСЛМ, %
Контроль	20	0	0
За додавання «Превікур Енерджі»	20	2	10,0
За додавання «Флінт Стар»	20	3	15,0



А Б

Рис. 1. Плодючість досліджуваних мух за додавання до кормової суміші препаратів пестицидів: А — за кількістю лялечок, Б — за кількістю імаго

за показником плодючості (за кількістю лялечок та імаго).

Як відомо, найбільш прямою та безпосередньою характеристикою розмноження є плодючість [8]. Існують декілька способів кількісної оцінки здатності дрозофіли залишати нащадків. За одним із них репродуктивну здатність імаго дрозофіли оцінюють шляхом підрахунку кількості нащадків на стадії лялечки. Цей показник залежить від плодючості імаго і виживання нащадків на ембріональній та личинковій стадії розвитку. Автори визначають плодючість за числом лялькових пупаріїв, отриманих від самки після спарювання та відкладання яєць протягом трьох діб. Визначена таким чином репродуктивна здатність більше відповідає поняттю продуктивність, ніж показник плодючості, який оцінюють за кількістю відкладених самками яєць. Тому часто використовують підрахунок потомків за імаго, і цей показник деякі автори називають «реальна плодючість» [8].

Плодючість мух лінії *C-S* за додавання пестицидів досліджували у нащадків F_1, F_2, F_3. Результати досліджень наведені у табл. 2, на рис. 1 (А, Б).

Як видно з таб. 2, плодючість у мух лінії *C-S* за додавання досліджуваних препаратів була вірогідно меншою за контроль як за кількістю лялечок, так і за кількістю імаго, що узгоджується з даними літератури про негативний вплив препаратів пестицидів на організм тварин, людини і довкілля в цілому [14, 15].

Показники плодючості *Drosophila melanogaster* в F_2 і F_3 за додавання препаратів акарицидів «Омайт» і «Санмайт» були вірогідно більшими, ніж в F_1 як за кількістю лялечок, так і за кількістю імаго, що може бути пов'язано з адаптацією дрозофіли до дії токсичних речовин, що входять до складу цих препаратів.

Порівнюючи між собою дію цих препаратів на плодючість дрозофіли, можна відзначити більш жорсткий вплив препарату «Санмайт». Можливо, це пов'язано з тим, що «Санмайт» відрізняється високою активністю при боротьбі з шкідниками на всіх стадіях їх розвитку, а «Омайт» знищує активні стадії розвитку кліщів (личинка, німфа, доросла особина) і не проявляє своєї дії на стадії яйця.

Вважають, що «Омайт» (пропаргіт) належить до малотоксичних речовин. Однак показ-

Таблиця 2

Показники плодючості *Drosophila melanogaster* за впливу препаратів пестицидів, n = 40–50

Варіанти дослідів	Кількість лялечок		Кількість імаго	
	M ± m	%	M ± m	%
Контроль *C-S* F_1	80,91 ± 2,98	100	74,42 ± 1,86	100
F_2	76,32 ± 3,12	100	68,51 ± 2,83	100
F_3	81,65 ± 3,25	100	73,64 ± 3,00	100
C-S + «Омайт» F_1	61,32 ± 2,42*	75,8	35,28 ± 2,08*	47,4
F_2	69,65 ± 2,64* #	91,3	52,6 ± 2,53* #	76,8
F_3	74,23 ± 3,02* #	91,0	61,28 ± 1,83* #	83,3
C-S + «Санмайт» F_1	52,24 ± 2,62* **	64,6	29,35 ± 1,44* **	39,4
F_2	64,53 ± 2,45 #	84,6	43,31 ± 2,08* ** #	63,2
F_3	72,25 ± 3,06* #	88,5	55,32 ± 1,44* ** #	75,2
C-S + «Превікур Енерджі» F_1	60,47 ± 4,27*	74,7	49,37 ± 3,93*	66,3
F_2	62,96 ± 4,72*	82,5	54,8 ± 3,87*	80,0
F_3	71,77 ± 3,85* #	87,9	63,1 ± 3,13* #	85,7
C-S + «Флінт Стар» F_1	48,06 ± 4,31* **	59,4	36,42 ± 4,56* **	48,9
F_2	51,74 ± 3,67* **	67,8	43,74 ± 4,58* **	63,8
F_3	65,8 ± 3,97* #	80,6	52,39 ± 3,63* ** #	71,2

Примітки: * достовірність відмінностей у порівнянні з контролем; ** достовірність відмінностей у порівнянні з варіантом дослідів за участю іншого препарату аналогічної дії; # достовірність відмінностей у порівнянні з F_1.

ники токсичності пестициду в роботах різних дослідників відрізняються в два і більше разів. Не повністю розкрито характер і не описано механізми дії препарату. При дослідженні токсикокінетики більша увага приділялася біотрансформації та виведенню «Омайту» з організму. Проте майже немає даних щодо його розподілення та накопичення в органах і тканинах тварин [16] та рослин [17].

За додавання препаратів фунгіцидів до кормової суміші мух не відзначено різкого збільшення плодючості в F_2, як це відзначалося за впливу акарицидів. Достовірність відмінностей у порівнянні з F_1 зафіксовано тільки у третьому поколінні мух. За впливу фунгіциду «Флінт Стар» плодючість мух була вірогідно меншою, ніж за впливу препарату «Превікур Енерджі».

З літератури відомо, що тривалість життя, тобто здатність підтримувати життєздатність організму тривалий час, є комплексною кількісною ознакою, що вносить певний внесок у пристосованість організмів. Вивчення тривалості життя дрозофіли в умовах стресу — цікава і водночас важлива проблема сучасної генетики та науки в цілому. Якщо організм зміг вижити після дії стресового фактора, то у нього виробляються специфічні адаптації, які пом'якшують наслідки при повторній його дії. Корисний ефект помірного стресу полягає в тому, що він дозволяє організму справитися з подальшим більш жорстким стресом [18].

Таблиця 3

Тривалість життя дрозофіли за впливу препаратів пестицидів, n = 150–200

Варіанти дослідів	Тривалість життя (Lt_{50}), дні	%
Контроль C-S	21,45 ± 1,35	100,0
За додавання «Омайт»	17,78 ± 2,78	82,9
За додавання «Санмайт»	14,26 ± 2,42*	66,5
За додавання «Превікур Енерджі»	19,15 ± 1,25	89,3
За додавання «Флінт Стар»	13,97 ± 1,36*	65,1

Примітка: * достовірність відмінностей у порівнянні з контролем при P<0,001.

Тривалість життя мух за впливу препаратів пестицидів наведено в табл. 3.

Відзначено тенденцію до зменшення тривалості життя мух у досліді. Однак достовірні відмінності у порівнянні з контролем було виявлено за додавання до живильного середовища мух препаратів «Санмайт» (на 33,5 %) та «Флінт Стар» (на 34,9 %).

Висновки

1. Досліджувані препарати пестицидів виявили генотоксичну активність за ознаками плодючості та тривалості життя мух.

2. За методом Меллер-5 встановлено мутагенну дію препаратів фунгіцидів «Превікур Енерджі» та «Флінт Стар».

ЛІТЕРАТУРА

1. Коршун М. М., Карпенко В. В. Гігієнічна оцінка поведінки та екотоксикологічного ризику застосування сучасних сульфонілсечовинних гербіцидів на посівах зернових культур (огляд літератури та результати власних досліджень) // Довкілля та здоров'я.— 2009.— № 2 (49).— С. 56–63.
2. Редька О. Г. Механізм дії хлорфеноксігербіциду 2,4 Д на морфофункціональний стан організму людини та тварин (огляд літератури) [Електронний ресурс].— Режим доступу: http://sites.znu.edu.ua/bioindication/issues/15–2/Redka.pdf.
3. Волков О. Г. Правда и вымысел о пестицидах [Електронний ресурс] // Охрана дикой природы.— 2005.— № 3 (33).— С. 13–16.— Режим доступу: http://biodiversity.ru /publications/odp/archive/33/n33.pdf.
4. Куринный А. И., Пилинская М. А. Исследование пестицидов как мутагенов внешней среды.— К.: Наук. думка, 1976.— 113 с.
5. Мирахмедов А. К., Мирахмедова П., Сагатова Г. А. Действие факторов внешней среды на клеточное ядро.— Ташкент: ФАН, 1990.— 124 с.
6. Левицкий Е. Л., Марченко А. Н., Губский Ю. И. Механизмы генотоксичности фосфорорганических соединений // Современные проблемы токсикологии.— 1998.— № 1.— С. 47–50.
7. Яблоков А. В. Об отрицательных последствиях применения пестицидов // Сельскохозяйственная биология.— 1987.— № 3.— С. 99–105.
8. Волкова Н. Е., Немчук Н. В., Воробьева Л. И. Влияние возраста родителей на половое поведение Drosophila melanogaster // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: біологія.— 2005.— Вип. 1–2, № 709.— С. 77–84.
9. Тихомирова М. М. Генетический анализ.— Л.: Изд-во ЛГУ, 1990.— 280 с.
10. Безопасное применение продуктов Bayer CropScience [Електронний ресурс].— Режим доступу: http://www.bayercropscience.com.ua.
11. АгроУкраїна [Електронний ресурс].— Режим доступу: http://agroua.net/plant/chemicaldefence/protect.
12. Іванов Ю. Н. Определение количества спонтанных доминантных летальних мутаций в геноме *Drosophila melanogaster* // Вавиловский журнал генетики и селекции.— 2011.— 15, № 3.— С. 595–599.
13. Атраментова Л. А., Утевская О. М. Статистические методы в биологии.— Горловка: Ліхтар.— 2008.— 248 с.
14. Пак И. В., Читаева Е. А., Хмелев А. В., Сивков Г. С. Токсико-генетические эффекты малых доз дельтаметрина (дельцида) в опытах с *Rattus Norvegicus* // Вестник Тюменского государственного университета.— 2011.— № 6.— С. 11–17.
15. Кузнецова Т. Ю., Демчук Е.В, Пак И. В. Влияние пестицидов на онтогенетическую изменчивость *Drosophila melanogaster* // Вестник Тюменского государственного университета.— 2009.— № 3.— С. 248–254.
16. Герілович І. О. Щодо аспектів дерматотоксичності омайту для кролів // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і ДНДІ ветпрепаратів і кормових добавок.— Львів, 2005.— Вип. 6, № 3.— С. 100–106.
17. Малінін О. О., Куцан О. Т., Герілович І. О. Динаміка вмісту залишкових кількостей омайту в об'єктах довкілля після обробки винограду і яблунь // Вет. мед.: Міжвідомчий тематичний науковий збірник.— 2005.— Вип. 85.— С. 728–732.
18. Rogina B., Helfand S. L. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 2004.— 101, N 45.— P. 158–160.

BELOKON S. V.

Odesa National Mechnykov University, Department of Genetics and Molecular Biology,
Ukraine, 65082, Odesa, Dvoryanska str., 2, e-mail: lotuss75@mail.ru

GENOTOXIC EFFECTS OF SOME PESTICIDES IN TESTS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Aims. We studied the genotoxic effect of acaricides and fungicides in tests of *Drosophila melanogaster*. ***Methods.*** The object of the study was to analyze the effect of fungicides «Flint Star», «Previkur Energy» and acaricides «Sanmayt» and «Omayt» on fecundity and longevity of *Drosophila*. Mutagenic effects of fungicides were determined according to Muller-5 (Basc) method. ***Results.*** Fecundity of *C-S* line flies was significantly less than the control, both by the number of pupae and the number of adults in case adding drugs. The reduction of life expectancy of flies in the experiment, by adding to the feeding of flies drugs «Sanmayt» and «Flint Star» was marked. By using Muller-5 (Basc) method, the mutagenic effect of fungicides «Previkur Energy» and «Flint Star» was established. ***Conclusions.*** The genotoxic activity of pesticides in the studied drugs on the basis of fertility and life expectancy of flies was found. By using Muller-5 (Basc) method the mutagenic effect of fungicides «Previkur Energy» and «Flint Star» was set.

Keywords: pesticides, mutagenicity, genotoxicity, fecundity, *Drosophila melanogaster*.

УДК 633.111«324»:631.527.5

БУРДЕНЮК-ТАРАСЕВИЧ Л. А.[1], ЛОЗІНСЬКИЙ М. В.[2]

[1] Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України,
Україна, 03141, м. Київ, вул. Клінічна, 25, e-mail: Burdenyuk@gmail.com
[2] Білоцерківський національний аграрний університет,
Україна, 09117, м. Біла Церква, Соборна площа, 8/1, e-mail: Lozinskk@ukr.net

ПРИНЦИПИ ПІДБОРУ ПАР ДЛЯ ГІБРИДИЗАЦІЇ В СЕЛЕКЦІЇ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ *T. AESTIVUM* L. НА АДАПТИВНІСТЬ ДО УМОВ ДОВКІЛЛЯ

Пшениця, поряд з кукурудзою і соєю, є основною продовольчою культурою світу з щорічними валовими зборами зерна понад 600 млн тонн, що забезпечує населення планети харчовими калоріями на 21 % [1]. В Україні озима пшениця — основна зернова культура. В останні роки в усьому світі спостерігається зниження посівних площ під пшеницею. Пов'язано це з тим, що сучасні сорти пшениці не витримують конкуренції з високотехнологічними сортами сої і кукурудзи за показниками урожайності і рентабельності. Основними способами вирішення цієї проблеми є створення і впровадження у виробництво нових сортів з високим генетичним потенціалом урожайності і розробка ефективних технологій для конкретних генотипів за певних екологічних умов їх вирощування.

Метою нашої роботи був аналіз результативності різних підходів при оцінці вихідного матеріалу і підборі батьківських пар для схрещування на різних етапах селекції пшениці озимої на Білоцерківській дослідно-селекційній станції (БЦДСС).

Матеріали і методи

Предмет дослідження — районовані сорти і найбільш результативні лінії гібридних популяцій, створені на БЦДСС впродовж 1924–2014 рр. Для характеристики господарсько-цінних ознак сортів користувалися польовими, лабораторними, статистичними, візуальними методами, які прийняті для державного сортовипробування. Для генетичних досліджень застосовували гібридологічний аналіз.

Результати та обговорення

Найбільш результативним методом селекції озимої пшениці і на сьогоднішній день залишається внутрішньовидова міжсортова гібридизація з наступними відборами. *T. aestivum* L. характеризується великим поліморфізмом і різноманіттям екотипів, що дає можливість для її удосконалення [2]. В результаті схрещування сортів, різних за морфологічними, біологічними і фізіологічними ознаками, з різним рівнем генетичного потенціалу продуктивності і стійкості до біотичних і абіотичних несприятливих факторів середовища утворюється велика кількість генетично змінених форм від кількох батьків, об'єднаних в одному генотипі. Таке різноманіття рекомбінантів слугує вихідним матеріалом для подальшого створення якісно нових генотипів в тісному зв'язку з умовами середовища [3]. Для успішного підбору пар для схрещування перш за все визначається напрям селекції і вивчаються агроекологічні умови для запланованої зони вирощування з урахуванням факторів, які можуть лімітувати потенційну врожайність сорту. В умовах Лісостепу України такими факторами є несприятливі зими, часті посухи, вилягання, екзосмос та періодичне проростання на пні, ураження кореневими гнилями, фузаріозом колоса та листковими хворобами. Існує генетична варіабельність ліній гібридних популяцій залежно від зовнішніх умов. Працюючи в певній кліматичній зоні, селекціонер протягом багаторічної роботи має можливість відбирати генотипи, стійкі до несприятливих умов саме цієї зони.

Перший районований білоцерківський сорт — Велютинум 37 (1928)* (тут і далі — рік державної реєстрації) — створено методом індивідуального відбору з місцевої популяції.

Їх недоліками були схильність до вилягання на високих агрофонах, посередні хлібопекарські якості та низька продуктивність. Вони належали до сортів екстенсивного типу і були використані як цінний вихідний матеріал для наступного етапу селекції з використанням гібридизації. Сорт Лісостепка 74 (1938) виведений методом індивідуального добору з гібридного сорту Схрещена

© БУРДЕНЮК-ТАРАСЕВИЧ Л. А., ЛОЗІНСЬКИЙ М. В.

(Ранній Бастард / Банатка). Він не набув широкого розповсюдження через недостатню посухостійкість, але послужив вихідним матеріалом для одержання методом простих схрещувань першого, створеного в Україні, стійкого до бурої іржі сорту Лісостепка 75 (1945), який зайняв у виробництві 1 млн га [4]. Справжнє визнання сорту як важливої складової у виробництві сільськогосподарської продукції здобув сорт Білоцерківська 198 (БЦ 198), створений відомим селекціонером А. А. Горлачем. На початку 60-х років сорт БЦ 198 займав в Україні понад 3 млн га, а також був районований у Росії, Молдавії та Казахстані. БЦ 198 створена методом віддаленого еколого-географічного схрещування сорту Еритроспермум 15, виведеного на Верхняцькій СС відбором з сорту Українка, та американського сорту Ковейл, який походить від українських Кримок, завезених на американський континент ще з першою хвилею української еміграції в кінці XIX століття. Врожайність БЦ 198 в 1961 р. в середньому на 98 сортодільницях 21 області України склала 3,23 т/га, а знаменитої Українки 0246 в середньому за 11 років — лише 2,55 т/га, обидва ці сорти — напівінтенсивного типу.

З ростом інтенсифікації виробництва перед селекціонерами постало принципово нове завдання — вивести сорти з високою потенційною врожайністю, придатні для інтенсивних технологій. Досягти цього можна було лише шляхом створення нової моделі сортів: стійких до вилягання, з підвищеною реакцією на внесення добрив і одночасно високо зимостійких. З цією метою було використано спонтанний Мутант 3, відібраний у посіві сорту Білоцерківська 41. Для зниження висоти стебла Мутант 3 шляхом складного багатоступеневого схрещення був введений у гібридизацію з короткостебловим сортом північно-кавказького екотипу Кавказ та низькорослим сортом Киянка. Одержано два сорти: середньорослий (86–100 см) з підвищеною зимостійкістю — Веселка (1997) та напівкарликовий (77–82 см) — Олеся (2001). Останній показав досить високу посухостійкість, а завдяки підвищеній регенеративній здатності і швидким темпам весняного відростання — підвищену зимостійкість.

Наші дослідження показали, що в селекції на підвищену адаптацію до умов довкілля найбільш вдалими є ті комбінації схрещувань, де одним з компонентів береться добре вивчений і створений в умовах Лісостепу сорт, або селекційний номер білоцерківської селекції, а другим — високопродуктивний сорт інорайонної селекції, який за своїми ознаками доповнює перший за умови, що зимостійкість і хлібопекарські якості його — не нижче середнього. Сорти ж кормового напряму і низько зимостійкі нами в гібридизацію не вводяться.

Новий етап селекції озимої пшениці розпочався зі створенням акад. П. П. Лук'яненком сорту Безоста 1 (Б 1), який мав порівняно коротке міцне стебло і належав до сильних пшениць. Але в зв'язку з тим, що сорт створювався в ґрунтово-кліматичних умовах Північного Кавказу, він виявився недостатньо зимостійким для Лісостепу і Полісся України і в окремі зими вимерзав. З метою створення сорту інтенсивного напряму, який об'єднав би в собі зимостійкість з пристосованістю до умов Лісостепу, з високою пластичністю, здатністю використовувати високі агрофони в 1961 р. Б 1 було введено в схрещування з БЦ 198. Але просте схрещування Б1 / БЦ 198 не дало бажаних результатів, оскільки одержані гібриди характеризувалися все ще недостатньою зимостійкістю. Тому надалі проведено низку складних ступеневих схрещувань з повторним використанням БЦ 198 та раніше створених гібридних популяцій. У результаті було одержано сорт Білоцерківська 39 (БЦ 39). Він мав коротке (80–90 см) міцне стебло, підвищені зимостійкість, посухостійкість, стійкість до бурої іржі, був ранньостиглим з відмінними хлібопекарськими якостями, але в роки з сильним розвитком церкоспорельозної кореневої гнилі виявився схильним до прикореневого вилягання. БЦ 39 тривалий час зберігав гетерозиготність за багатьма морфологічними і біологічними ознаками. Це пояснюється тим, що в його виведенні брали участь Б 1 та БЦ 198, кожен з яких створювався методом віддаленого еколого-географічного схрещування. Такі гібриди характеризуються високим ступенем формотворчих процесів, які можуть привести до вищеплення цінних ліній у пізніх поколіннях. Так, після повторних індивідуальних відборів з сорту БЦ 39 було виділено три короткостеблових сорти: Білоцерківська 47 (БЦ 47) (1981), Білоцерківська 18 (БЦ 18) (1982), і Новоукраїнка білоцерківська (Новоукраїнка б. ц.). Всі три сорти широко введені в подальші схрещування з сортами різних екотипів і стали батьківськими компонентами низки білоцерківських сортів (рис. 1). Крім цього, селекціонерами

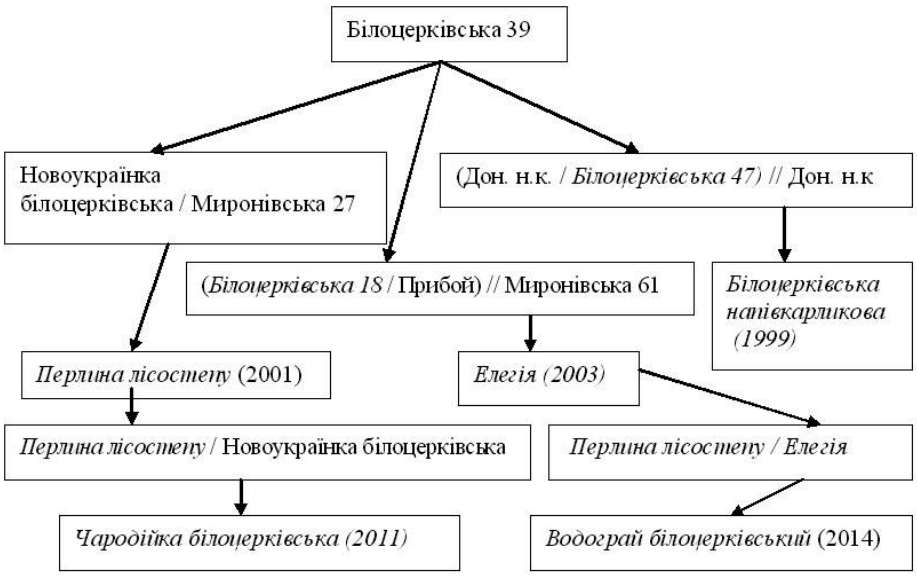


Рис. 1. Схема одержання сортів *T. aestivum* L. шляхом внутрішньовидової гібридизації сортів різних екотипів (курсивом позначені білоцерківські сорти, занесені до реєстру)

Північного Кавказу БЦ 47 використана при створенні сорту Сєвєродонська 5, а БЦ 18 — сорту Родник тарасовський (рис. 1).

У розсаднику вихідного матеріалу сорти умовно діляться нами на групи за екологічним принципом: степовий, лісостеповий, західноєвропейський, північнокавказький і поволзький екотипи. Сорти різних екотипів адаптовані до умов еколого-кліматичних зон, у яких вони виведені. Вони різняться за темпами розвитку, тривалістю вегетаційного періоду, висотою рослин, морфологічними ознаками, витривалістю до несприятливих умов довкілля. Вчення про розвиток екологічної системи селекції започаткувала ще Є. М. Сінська [5]. Існуюча еколого-географічна диференціація генетичних ресурсів рослин надає безмежні можливості їх використання для одержання сортів з бажаними біологічними властивостями. Так, в селекції на зимостійкість у схрещування з сортами лісостепового екотипу нами залучаються сорти західноєвропейської селекції, які добре витримують теплі зими з глибоким сніговим покривом, стійкі до випрівання і до найбільш шкодочинних в зоні Лісостепу хвороб. Результативними в цьому плані виявилися схрещування з тими миронівськими сортами, родовід яких йде від західноєвропейських сортів, це Миронівська 61 (Мир. 61) і Миронівська 27 (Мир. 27). Так, від схрещування (Прибой / БЦ 18) // Мир. 61 одержано сорт Елегія, який вдало поєднав за зимостійкістю три екотипи: степовий, лісостеповий і західноєвропейський. Елегія — стійка до найбільш шкодочинних хвороб, має цінне зерно, потенційну врожайність 9,20 т/га, добре зарекомендувала себе в сурові зими в лівобережному Лісостепу України.

Шляхом схрещування Новоукраїнки б.ц. зі стійким до хвороб, але недостатньо високим за якістю клейковини сортом Мир. 27 одержано високопродуктивний, з потенційною врожайністю 11 т/га, посухостійкий, з підвищеною зимостійкістю, цінний за хлібопекарськими якостями, середньорослий, середньостиглий, стійкий до осипання, до бурої іржі і до проростання на пні сорт Перлина лісостепу (2001). Одержана досить рідкісна трансгресія стійкості до полягання. Сорт занесений до Реєстру сортів України і визнаний національним стандартом для зон Лісостепу і Полісся.

Еколого-географічно віддалене схрещування французького сорту Roason з Безенчуцькою ювілейною також виявилося успішним: одержано високопродуктивний сорт Щедра нива (2012), який поєднав посухостійкість і відмінну якість зерна сорту з Поволжя зі стійкістю до вилягання і до хвороб сорту західноєвропейського екотипу.

Для підсилення певної ознаки користуємося методом одноразового повторного схрещення з однією з батьківських форм. Так, при створенні сорту Білоцерківська напівкарликова (БЦ н/к) для подальшого зниження висоти і подовження періоду післязбирального дозрівання провели одноразовий беккрос F_1 (Донський напівкарлик / БЦ 47) // Донський напівкарлик. Одержаний сорт

БЦ н/к має підвищену зимостійкість, ранньостиглий, стійкий до вилягання, до бурої іржі, до проростання на пні, стабільний за високою якістю зерна, з потенційною врожайністю 9,60 т/га, визнаний національним стандартом для напівкарликових сортів зон Полісся і Лісостепу України.

Повторне схрещення з вихідним сортом Новоукраїнка б.ц. було використане і для підвищення хлібопекарських якостей уже створеного сорту Перлина лісостепу. Одержано сильний за якістю і високоврожайний сорт Чародійка білоцерківська.

Для створення сортів, які б об'єднували максимальну продуктивність зі здатністю протидії лімітуючим факторам необхідно постійно відшуковувати нові вихідні матеріали для збагачення геноплазми пшениці. В цьому плані важливим етапом в селекційному процесі на БЦДСС в 1988–2012 рр. стало вивчення і введення в схрещування чорнобильських радіомутантів (ЧРМ) [6]. Прямі відбори з мутантів не дали позитивних результатів через велику нестабільність усіх показників протягом багатьох поколінь, відбувалося розщеплення перш за все за ознаками різновидності і висоти рослин. В той же час окремі лінії мутантів за господарськими показниками перевищували вихідні сорти й успішно були використані як цінні компоненти для схрещування. Так, константні сім'ї мутанта Л 147/91 (ЧРМ Л 147) з нормальним безостим колосом були використані як батьківський компонент для схрещування з сильним за хлібопекарськими якостями сортом Новоукраїнка б.ц. Сорт під назвою Либідь пройшов державне сортовипробування, рекомендований для вирощування в усіх зонах України. Сорт безостий, середньостиглий, має підвищену зимостійкість, задовільно витримав 90-денну льодову кору 2003 року. Посухостійкість підвищена, резистентний до бурої іржі, борошнистої роси і септоріозу. Середньорослий, має підвищену стійкість до вилягання, високопродуктивний, максимальна врожайність — 9,68 т/га, належить до категорії сильних пшениць (рис. 2).

Мутант Л 147 брав участь також і в схрещуванні з сортом Напівкарлик 3, в результаті індивідуальних відборів з гібридної популяції одержано сорт озимої пшениці Ясочка. Остистий, з вище середньою зимостійкістю і високою посухостійкістю, з підвищеною стійкістю до бурої іржі і септоріозу, цінний за хлібопекарськими якостями.

Групу мутантів під назвою ЧРМ — БЦ 47 сверхед (БЦ 47 скв) використано в схрещуванні з Одеською 162 з метою підвищити зимостійкість сорту степового екотипу. Після багаторічних відборів з цієї популяції гібридів відібрано три сорти: Царівна (2008), Лісова пісня (2008) і Романтика (2009). Усі сорти від мутанта БЦ 47 скв одержали підвищену зимостійкість, віднесені до групи сильних пшениць, мають високу продуктивність: максимальна врожайність сорту Царівна — 8,82, Лісова пісня — 8,97, Романтика — 8,50 т/га. Сорт Лісова пісня з 2015 р. визнаний національним стандартом для Лісостепу і Полісся.

Від схрещування Новоукраїнка б.ц. / ЧРМ 20104 створено сорт Відрада (2011) з надсильними хлібопекарськими якостями. За даними лабораторії ІЕС, у 2008 р. на Первомайській СВС Миколаївської обл. одержане зерно мало вміст білку 19,2 %, клейковини — 44,2 %, силу борошна — 649 о.а. Сорт рекомендований для всіх зон України.

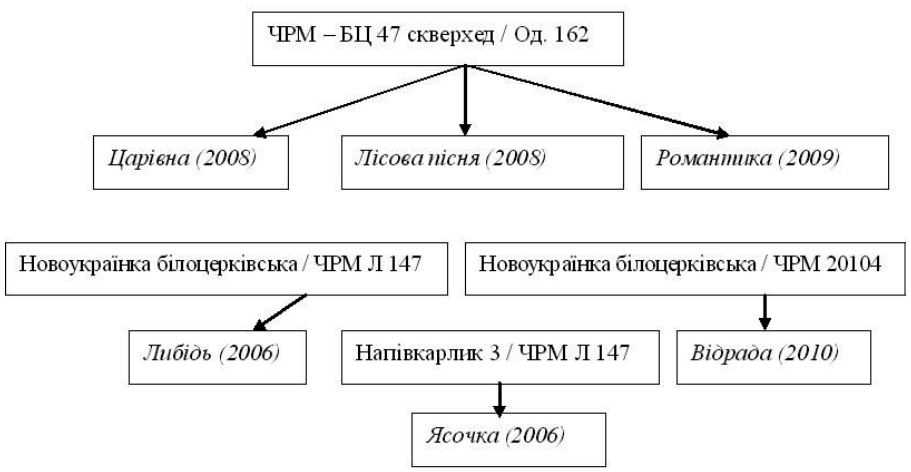


Рис. 2. Використання в селекційному процесі чорнобильських радіомутантів

Висновки

T. aestivum L. характеризується великим поліморфізмом і різноманіттям екотипів. Тому і на сьогоднішній день найбільш результативним методом селекції озимої пшениці все ще залишається внутрішньовидова міжсортова гібридизація з наступними відборами. В результаті схрещування сортів, різних за морфологічними, біологічними і фізіологічними ознаками, з різним рівнем генетичного потенціалу продуктивності і стійкості до біотичних і абіотичних несприятливих факторів середовища утворюється велике різноманіття нових генотипів у тісному зв'язку з умовами середовища.

У родоводі білоцерківських сортів одним із батьків обов'язково є географічно віддалені форми, або сорти степового, західноєвропейського, північнокавказького чи поволзького екотипів. При цьому другим компонентом схрещування є оригінальний районований сорт інтенсивного типу або кращий селекційний номер конкурсного сортовипробування, створений і адаптований в умовах Лісостепу України.

Для підсилення окремих ознак сорту використовується також одноразовий беккрос із одним з батьків.

Використання в селекційній програмі константних за морфологічними ознаками чорнобильських радіомутантів з підвищеним вмістом білка, зі стійкістю до стресових біотичних і абіотичних факторів розширило генофонд озимої пшениці і стало вихідним матеріалом для одержання нових високопродуктивних сортів: Ясочка, Царівна, Романтика, Лісова пісня, Либідь і Відрада.

ЛІТЕРАТУРА

1. Сільське господарство України. Статистичний збірник. Рослинництво.— 2013.— 82 с.
2. Лукьяненко П. П. Гибридизация отдаленных эколого-географических форм озимой пшеницы // С. х. биология.— М., 1968.— № 1.— С. 3–11.
3. Жученко А. А. Экологическая генетика культурных растений (адаптация, рекомбиногенез, агробиоценоз).— Кишинев: Штиинца, 1980.— 588 с.
4. Горлач А. А. Исходный материал и методы селекции озимой пшеницы на устойчивость против поражения бурой и желтой ржавчиной на Белоцерковской опытно-селекционной станции // Краткие выводы науч.-исслед. работ по селекции зерновых, зернобобовых культур и трав за 1968–1970 гг.— К., 1971.— С. 53.
5. Синская Є. Н. Экологическая система селекции кормовых культур.— Л.: ВИР, 1933.— 44 с.
6. Burdenyuk-Tarasevych L. A. Results of Utilization of Chernobyl Radio Mutant in Breeding Programms of *Triticum aestivum* L. // Induced Plant mutations in the genomics Era joint FAO / JAEA Programe nuclear Techniques in Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations.— Rome, 2009.— P. 80–82.

BURDEYNYUK-TARASEVYCH L.A.[1], LOZINSKI M.V.[2]

[1] Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet NAAS of Ukraine,
Ukraine, 03141, Kyiv, Clinichna str., 25, e-mail: Burdenyuk@gmail.com

[2] Bila Tserkva National Agrarian University,
Ukraine, 09117, Bila Tserkva, Soborna Square, 8/1, e-mail: Lozinskk@ukr.net

PAIR SELECTION PRINCIPLES FOR HYBRIDIZATION OF *TRITICUM AESTIVUM* L. WINTER ON ADAPTABILITY TO ENVIRONMENTAL CONDITIONS

Aims. The study assess different approaches to evaluation of the source material and breeding pairs selection for *Triticum aestivum* L. winter on adaptability for agroecological zone of Ukraine's forest steppe conditions. ***Methods.*** Different ecotype varieties and hybrid population lines became sources for breeding. Field, laboratory, statistical and visual methods used in official state evaluation were used for characterization of the useful traits. ***Results.*** In genealogy of Bila Tserkva varieties one parent is original intensive type variety or the best subpopulation defined in competitive quality testing, created and adapted to the conditions of forest-steppe of Ukraine. The second parent is geographically and genetically distant or variety originated from the steppe, Western European, North Caucasus, or Volga ecotypes. ***Conclusions.*** Interspecies invariant hybridization was found to be an efficient method of assessment.To enforce selected traits of the variety backcross with one the parentsis used. Stable Chernobyl radiomutants resistance to biotic and abiotic stress factors and increased protein contents were used to enrich germplazm.

Keywords: wheat, breeding, adaptability, varieties, crossing.

УДК 633.522

ВИРОВЕЦ В. Г.[1], ЛАЙКО И. М.[1], ГОРШКОВА Л. М.[2], КИРИЧЕНКО А. И.[1], МИЩЕНКО С. В.[1]

[1] Опытная станция лубяных культур Института сельского хозяйства Северо-востока Украины НААН, Украина, 41400, Сумская обл., г. Глухов, ул. Терещенков, 45, e-mail: ibc_cannabis@ukr.net

[2] Глуховский национальный педагогический университет имени Александра Довженко, Украина, 41400, Сумская обл., г. Глухов, ул. Киево-Московская, 24, e-mail: gdpu@ukrtel.net

ОДНОДОМНОСТЬ И НЕНАРКОТИЧНОСТЬ *CANNABIS SATIVA* L. КАК НОВЫЕ СОСТАВНЫЕ СИСТЕМАТИКИ СОВРЕМЕННОЙ КУЛЬТУРЫ

В современных условиях сельского хозяйства весьма ограничен список полевых культур, возделывание которых приносит существенную прибыль. В связи с этим остальным уделяется меньше внимания и поэтому отдельные из них имеют небольшие посевные площади или им грозит вообще определенное забвение. В таких условиях не может вызывать удивление такая культура, как конопля, которая появилась в обработке если не одновременно с зерновыми, то и не так уж и отстала от них, играя существенную роль в выживании человека, обеспечивая его потребности в одежде и предметах быта, а также в продуктах питания.

Позже по мере развития цивилизации постепенно стала стратегической культурой, играя существенную роль в развитии торгового и военного флотов. Однако со снижением спроса на паруса и канаты в связи с переходом от парусного до парового и дизельного флотов конопля стала отходить на второй план. В 60-е годы прошлого столетия наблюдается снижение спроса на тканевые изделия под действием рекламы на товары из искусственного волокна, вследствие чего эта тенденция усилилась.

Развитие наркомании и обвинения конопли в ее наркотичности также привело к значительному сокращению ее посевов. Однако успешно начатая селекция на создание ненаркотических сортов в определенной мере спасла культуру от полного забвения. Значительный вклад в сохранение посевов внес творческий коллектив путем создания ненаркотических сортов и разработки новых технологий возделывания и переработки.

Материалы и методы

Организация Института конопли в 1931 году по инициативе акад. Н. И. Вавилова совпала с началом усиленного развития промышленности, строительства новых фабрик, заводов, предприятий и других объектов, которые нуждались в обеспечении продукцией коноплеводства. В связи с этим наряду с освоением новых агротехнических приемов в технологии выращивания конопли быстро было разработано ряд мероприятий относительно применения селекции на повышение урожая волокна. Первыми шагами научной селекции стало выявление лучших местных сортов-кряжей среднерусского и южного типов конопли как наиболее приспособленных к условиям выращивания и удовлетворяющих потребности населения в волокне, масле и семенах.

Конопля является однолетним лубоволокнистым монокарпическим анемофильным двудомным безлепестковым растением. Эти особенности явились следствием длительной эволюции, отражением которых стали ее генеративные органы, а дифференциация их на отдельных растениях привела к появлению более совершенной в биологическом отношении двудомной формы [1, 2].

Создание института привело не только к началу научных систематических исследований, но и способствовало анализу накопленного мирового научного багажа и первых исследований относительно ботаники и систематики культуры. С тех пор прошло сравнительно немало времени, в течение которого были разработаны новые методики и повышена урожайность, была создана новая однодомная форма, улучшены хозяйственные и биологические признаки и свойства, проведена элиминация наркотических свойств посевной конопли, продолжаются исследования относительно дальнейшего применения конопли [3–8].

В соответствии с решаемыми проблемами разрабатывались новые и усовершенствовались существующие методы селекции [9, 10]. В поисках нового исходного материала для селекции получали полиплоидные формы, создали желтую двудомную и однодомную коноплю, выявляли природные и получали искусственные мутации и др.

В таких условиях к культуре конопли относились как к изученному ботаническому виду, аккумулирующему в себе результаты определенных исследований, не вызывающих никаких сомнений. Однако с дальнейшим изучением посевной конопли как культуры на основании полученного нового селекционного материала с пониженным

© ВИРОВЕЦ В. Г., ЛАЙКО И. М., ГОРШКОВА Л. М., КИРИЧЕНКО А. И., МИЩЕНКО С. В.

или почти с полным отсутствием тетрагидроканнабинола (ТГК) и других компонентов каннабиноидов считаем возможным внести некоторые дополнения в ее таксономическую характеристику.

Результаты и обсуждение

Конопля настолько распространилась по всему миру благодаря ее широкому использованию, что порой ботаники и систематики теряются в определении ее родовой классификации. Так, Т. Я. Серебрякова и И. А. Сизов (1940), А. А. Яценко-Хмелевский (1980) и другие относят ее к *Cannabaceae* (*Cannabinaceae*) [11, 12]. Другие считают, что конопля вместе с семействами *Morus* и *Humulus* ближе до крапивовых (*Urticaceae*) или тутовых (*Moraceae*) [1, 13]. Однако это не последние определения, учитывая ее такие признаки, как пластичность и вариация фармакохимических показателей железистых волосков в зависимости от эколого-географических условий.

Большинство коноплеводов на основании многолетних исследований по селекции конопли разделяет предложения Г. И. Сенченко (1965), Г. Г. Давидяна (1972), А. И. Жатова (1974) и других селекционеров относительно признания данной классификации, которая отвечает уровню современных познаний о культуре [14–16].

Касаясь утверждения некоторых исследователей относительно общности трех семейств, следует подчеркнуть, что они небезосновательны. Особенно четко прослеживается наличие общих признаков для конопли и крапивы. По данным ботаника И. А. Грудзинской, можно привести больше 1,5 десятка общих признаков, характерных для этих двух культур, главными из которых являются: волокнистость, одно- и двудомность, наличие железистых и цистолитовых волосков, подковки у основания семян и др. [17]. В частности, она выделяет крапиву двудомную (*Urtica dioica*), жгучую (*U. urens*) и коноплевую (*U. cannabina*). У последней листья пальчатораздельные, как у конопли.

О неоднозначности положения конопли в ботанической системе говорят многие источники. Даже наиболее авторитетный систематик К. Линней (1707–1778) всю коноплю относил к одному виду — *Cannabis sativa*. Г. Г. Давидян [15] посылается на немецких исследователей Mez и Tischler о филогенетической близости упомянутых 3-х семейств, несмотря на различия в гаплоидном числе хромосом. Позже их соотечественник-ботаник O. Heuser все существующие формы конопли относил к одному виду — *Cannabis sativa* L.

Акад. Н. И. Вавилов весьма осторожно относился к делению конопли на виды, посылаясь на то, что чрезвычайно трудно определить, когда возникла культура конопли и, вероятнее всего, одновременно и независимо в нескольких местах [15]. Неудивительно, что он в своем классическом труде о центрах происхождения растений отмечает, что *C. sativa* L. появилась в первом (Китайский очаг), а *C. indica* L. во втором (Индийский очаг) [18]. Тем не менее, почему-то он не отнес коноплю к первичным культурам.

Исходя из всего можно заключить, что конопля как культура могла возникнуть независимо в Старом и Новом свете еще до открытия последнего Х. Колумбом, не исключая проникновения семян дикой конопли с аборигенами через Аляску. В таком случае заключение известного ботаника П. М. Жуковского (1888–1975) о том, что в науке нет примеров о культурах, имеющих общее происхождение как в Старом, так и Новом свете, может быть поколеблено.

Выводы

Изучение растений конопли проводилось нами на протяжении более полувека как объекта для селекционного улучшения по хозяйственным и биологическим признакам, опираясь на результаты исследований селекционеров и растениеводов старшего поколения.

На основании проведенных исследований и полученных результатов с уверенностью можем утверждать, что в происхождении конопли активная роль принадлежала деятельности человека по удовлетворению своих потребностей в определенных эколого-географических условиях, которые явились превалирующими.

Селекция современной посевной конопли охватывает сравнительно солидный отрезок времени по созданию и улучшению сортов однодомной конопли. При всех важных направлениях исследований, которыми предусматривалось в первую очередь повышение урожайности разными методами, повышения однородности стеблестоя однодомной формы по половым типам, повышения семенной продуктивности и улучшения качества волокна всегда опирались на лучшие образцы народной и научной селекции. Только селекционная работа с ненаркотической посевной коноплей от первых шагов до создания новых высокопродуктивных сортов практически не только без ТГК, но и других каннабиноидов до настоящего времени охватывает больше 40 лет.

Практически создана новая культура, которая по идентичности полиморфологических и биологических признаков представляет новый вариант посевной конопли, которую можно именовать по сумме вклада в общее дело селекции как *Cannabis sativa* L. var. *non-narcotic* Virovets.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гришко Н. Н. Биология конопли.— К.– Харків: Держвидав. колг. і радгосп. літер. УСРР, 1935.— 270 с.
2. Малецкий С. И., Левитес Е. В., Батурин С. О., Юдамова С. С. Репродуктивная биология покрытосеменных растений // Генетический словарь.— Новосибирск, 2004.— 106 с.
3. Аринштейн А. И. Итоги селекции однодомной конопли. Задачи селекции и история вопроса // Конопля и новые лубяные культуры: сб. научн. тр.— М., 1957.— Вып. 22.— С. 157–168.
4. Сенченко Г. И. Гибридизация географически отдаленных форм конопли // Конопля и новые лубяные культуры: сб. научн. тр.— М., 1959.— Вып. 25.— С. 120–134.
5. Вировец В. Г., Ситник В. П. Изучение некоторых физиологических особенностей желтостебельной конопли // Сб. тр. ВНИИЛК.— Глухов, 1975.— Вып. 38.— С. 29–33.
6. Вировець В. Г., Лайко І. М., Щербань І. І. Пріоритет українських вчених в селекції ненаркотичних конопель // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: зб. наук. пр.— К.: Логос, 2012.— 3.— С. 37–45.
7. Вировець В. Г., Лайко І. М., Ситник В. П. Однодомні посівні коноплі (*Cannabis sativa* L.) як приклад реверсної еволюції культури // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / За ред. В. А. Кунаха [та ін.].— К.: Логос, 2006.— 3.— С. 18–22.
8. Вировець В. Г., Лайко І. М., Онупрієнко Л. Г., Ситник В. П., Щербань І. І., Кириченко Г. І. Збільшення вмісту волокна в стеблах посівних конопель (*Cannabis sativa* L.) як результат цілеспрямованої комплексної дії селекції // Селекція і насінництво: міжвідомч. тем. наук. зб.— Харків, 2008.— Вип. 96.— С. 195.
9. Вировец В. Г., Горшкова Л. М., Сенченко Г. И., Сажко М. М. Методические указания по селекции конопли на снижение содержания каннабиноидов.— М., 1985.— 14 с.
10. Сажко М. М., Вировец В. Г., Горшкова Л. М., Сидоренко Н. М., Орлов Н. М. Методические указания по качественной оценке конопли на содержание каннабиноидов, получению тетраплоидных форм и использованию этрела.— М., 1985.— 16 с.
11. Серебрякова Т. Я., Сизов И. А. Семейство *Cannabinaceae* Lindl: Коноплевые // Культурная флора.— М.-Л.: Госсельхозиздат, 1940.— 5: Прядильные.— С. 1–53.
12. Яценко-Хмелевский А. А. Семейство коноплевые (*Cannabinaceae*) // Жизнь растений / Под ред. А. Л. Тахтаджяна.— М.: Просвещение.— 1980.— 5 (1) .— С. 279–282.
13. Жуковский П. М. Культурные растения и их сородичи.— Л.: Колос, 1964.
14. Сенченко Г. И. Высоковолокнистые сорта конопли и методы их выведения: автореф. дис. ... докт. с.-х. наук // Всес. научн.-иссл. ин-т растениеводства им. Н. И. Вавилова.— Л., 1965.— 57 с.
15. Давидян Г. Г. Конопля (биология и исходный материал для селекции) // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекц. ВНИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова.— Л., 1972.— 48, вып. 3.— 160 с.
16. Жатов А. И. Методы получения исходного материала и селекция конопли: автореф. дис. … д-ра с.-х. наук.— Л., 1974.— 54 с.
17. Грудзинская И. А. Семейство крапивные (Urticaceae) // Жизнь растений / Под. ред. А. Л. Тахтаджяна.— М.: Просвещение.— 1980.— 5 (1) .— С. 284–289.
18. Вавилов Н. И. Теоретические основы селекции.— М.: Наука, 1987.— 512 с.

VYROVETS V.H.[1], LAYKO I.M.[1], HORSHKOVA L.M.[2], KYRYCHENKO H.I.[1], MISHCHENKO S.V.[1]

[1] Research Station of Bast Crops of the Institute of Agriculture of Northern East NAAN of Ukraine, Ukraine, 41400, Sumy region, Hlukhiv, Tereschenkiv str., 45, e-mail: ibc_cannabis@ukr.net

[2] Hlukhiv National Pedagogical University named after Oleksandr Dovzhenko, Ukraine, 41400, Sumy region, Hlukhiv, Kyevo-Moskovska str., 24, e-mail: gdpu@ukrtel.net

MOMECIOUSNESS AND DRUG FREE PROPERTY OF INDUSTRIAL HEMP (*CANNABIS SATIVA* L.) AS A NEW COMPONENTS OF TAXONOMY OF THE MODERN CROP

Aims. Authors appealed to the very eccentric theme of researches, touching position of hemp in biotaxonomy, taking into account its signs as plasticity, economic setting and variation of pharmacy-chemical indexes depending on ecologically-geographical terms. ***Methods.*** Modern confession of hemp in the period of hard agrarian competition, due to ability to give a large income, is investigation of successes of breeding. On the basis of the worked out methodologies the productivity was considerably enhanceable and new drug free varieties are created. ***Results.*** In spite of antiquity of the crop, until now doubts are not blown about in relation to belonging of hemp to family of *Cannabaceae*, as other consider that hemp together with genera of *Morus* and *Humulus* nearer to nettle (*Urticaceae*) or mulberry (*Moraceae*). Like it there are no single opinion and relatively specific division: to attribute a hemp to two kinds — *Cannabis sativa* L. and *Cannabis indica* L. or only to the first. On the basis of undertaken studies and created varieties we consider that in the origin of hemp an active role belonged to economic activity of man in certain ecologically-geographical terms that are predominating. ***Conclusions.*** The shown out new highly productive drug free varieties testify that a new crop, that on the identity of polymorphological signs presents the new variant of industrial hemp that can be named as *Cannabis sativa* L. var. *non-narcotic* Virovets.

Keywords: industrial hemp, families and species, breeding, drug free varieties.

УДК 632.51:631.52

ГУРАЛЬЧУК Ж. З., МОРДЕРЕР Є. Ю.
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: azhanna@ukr.net

ПРОБЛЕМА РЕЗИСТЕНТНОСТІ РОСЛИН ДО ГЕРБІЦИДІВ: ГЕНЕТИЧНИЙ ТА МЕТАБОЛІЧНИЙ АСПЕКТИ

Однією з передумов реалізації генетичного потенціалу продуктивності сільськогосподарських культур є ефективний захист посівів від бур'янів. Найбільш ефективним та економічно рентабельним на сьогодні є хімічний метод контролювання бур'янів, який передбачає використання селективних гербіцидів.

З моменту відкриття явища вибірної фітотоксичності вважалося, що стійкість чи чутливість рослин до того або іншого гербіциду є видовою ознакою. Однак у деяких регіонах на площах, де тривалий час застосовувались одні й ті ж гербіциди, в популяціях чутливих до даних препаратів видів бур'янів було виявлено високостійкі біотипи. У зв'язку з цим виникла необхідність відрізняти різні види стійкості рослин до гербіцидів, для чого американським товариством гербологів було запропоновано вживати терміни «толерантність» та «резистентність» [1]. Толерантність — це природжена здатність видів рослин до виживання і відтворення після обробки гербіцидом. Це означає, що селекція або генетичні маніпуляції не використовувалися для надання толерантності рослинам, вони є такими від природи. Толерантність є основою традиційних технологій застосування гербіцидів. Резистентність — успадкована здатність рослин виживати і відтворюватися після впливу гербіциду в дозі, зазвичай летальній для дикого типу. У рослин резистентність може бути природною або індукованою з використанням, наприклад, таких методів, як генна інженерія або селекція.

Останнім часом проблема резистентності до гербіцидів набуває глобального масштабу. На сьогодні серед 245 видів бур'янів виявлено 449 резистентних до гербіцидів біотипів [2]. Чинником природного виникнення резистентності є селекційний тиск гербіцидів на популяції бур'янів. Не знайшло підтвердження припущення, що виникнення резистентності зумовлено мутаціями, індукованими впливом гербіцидів. Навпаки, було встановлено, що у популяціях бур'янів, які не оброблялися гербіцидами, зустрічаються рослини з мутантними генами, які зумовлюють стійкість до гербіцидів. Зокрема, геномний аналіз гербарних зразків китника мишохвостого, які збиралися у період між 1788 і 1975 рр., виявив один гетерозиготний мутантний зразок, датований 1888 роком, з мутацією лейцину у кодоні 1781 [3]. На сьогодні ця мутація зустрічається у біотипів бур'янів, резистентних до гербіцидів інгібіторів ацетил-КоА-карбоксилази. Зрозуміло, що на момент збирання такого зразка гербіциди не використовувались, отже ця мутація є спонтанною. Таким чином, наявність спонтанних мутацій при тривалому застосуванні гербіцидів призводить до відбору особин, стійких до їх дії. За умов перманентного застосування гербіцидів з одним механізмом фітотоксичності особини, що вижили, мають значну перевагу і можуть стати домінуючими в популяції та витіснити вихідний тип. При цьому чисельність резистентних рослин може зрости аж до рівня, коли їх уже неможливо контролювати даним гербіцидом [4].

Уперше появу біотипів рослин, резистентних до гербіцидів, було помічено у 70-і роки минулого століття в розплідниках хвойних, де упродовж багатьох років для знищення бур'янів використовували гербіцид із групи сим-триазинів симазин [5]. Дослідження показали, що резистентний біотип жовтозілля звичайного має стійкість не лише до симазину, але й до атразину та інших сим-триазинів. Було встановлено, що стійкість зумовлена мутацією хлоропластного гена, що кодує білок, з яким відбувається зв'язування сим-триазинів. Відтоді серед 72 видів бур'янів (як однодольних, так і дводольних) було виявлено біотипи, резистентні до сим-триазинів, стійкість яких виникла в результаті аналогічної мутації того ж гена [2].

У рослин розрізняють резистентність до гербіцидів, що пов'язана або ж не пов'язана з сайтом дії. Якщо сайтом дії гербіциду є певний фермент, то пов'язана з сайтом дії резистентність може бути зумовлена мутацією гена, який кодує цей фермент. Внаслідок такої мутації може лімітуватися зв'язування гербіциду з ферментом, що зменшує інгібувальну дію гербіциду. Альтерна-

© ГУРАЛЬЧУК Ж. З., МОРДЕРЕР Є. Ю.

тивним механізмом резистентності може бути надпродукування цього ферменту (надекспресія чи ампліфікація гена). Резистентність, не пов'язана з сайтом дії, зумовлена активацією систем, які перешкоджають потраплянню гербіциду до цього сайту. Відбуватися це може завдяки зменшенню поглинання чи транслокації гербіциду, збільшенню його секвестрування (компартментації) або підвищенню рівня метаболічної детоксикації гербіциду [6].

За застосування ефективних доз гербіцидів, які забезпечують високий рівень контролювання бур'янів, більш вірогідним є виникнення резистентності, що пов'язана з сайтом дії. При внесенні гербіцидів у низьких дозах чи за дії інших чинників (несвоєчасного внесення гербіцидів, несприятливих погодних умов тощо) їх ефективність стає меншою, рослини виживають головним чином через їх здатність метаболізувати гербіцид (розкладати гербіцид або знешкоджувати його дію). З часом кількість особин рослин із генами, що кодують ферменти, які забезпечують метаболізацію гербіциду, може збільшитись, особливо завдяки перехресному запиленню. Внаслідок цього рівень резистентності популяції до гербіциду може підвищитися в рамках навіть невеликої кількості наступних поколінь.

Метаболічна резистентність може бути притаманна рослинам через збільшену активність ендогенних цитохром Р450-монооксигеназ, глікозилтрансфераз, глутатіон-S-трансфераз та/або інших ферментних систем, таких як ациламідаза [7].

Більшість досліджень метаболічної резистентності було проведено на злакових рослинах [6], однак останнім часом з'являються дані про деякі види дводольних бур'янів, зокрема щириці (*Amaranthus tuberculatus* (Moq.) Sauer), резистентні до мезотріону й атразину [8]. Це свідчить про здатність до прискореної трансформації гербіцидів не лише в однодольних, як вважали раніше, але й у дводольних видів бур'янів і можливість розвитку у них метаболічної резистентності до гербіцидів.

На сьогодні в аграрному секторі багатьох країн широко застосовуються гербіциди — інгібітори ферменту ацетолактатсинтази (АЛС), який бере участь у синтезі амінокислот з розгалуженим ланцюгом: валіну, лейцину, ізолейцину. Гербіциди інгібітори АЛС є найбільш ефективними з відомих на сьогодні груп гербіцидів. При нормах внесення від одиниць до десятків грамів діючої речовини на гектар гербіциди цієї групи контролюють широкий спектр видів бур'янів та є селективними до значної кількості культур. Однак уже через 4 роки після початку застосування гербіцидів цієї групи було виявлено біотипи латука компасного і кохії віничної, резистентні до цих гербіцидів. На сьогодні відомо 153 види бур'янів, що мають резистентні до інгібіторів АЛС біотипи, ареал розповсюдження яких постійно зростає [2]. В основі резистентності головним чином знаходиться мутація гена, що кодує АЛС, яка призводить до заміни проліну-197 на гістидин чи триптофан [9]. Пізніше було показано 22 пов'язані з резистентністю заміни амінокислот у 8 сайтах АЛС [10, 11], однак заміна проліну-197 на інші амінокислоти (на сьогодні показано, що їх може бути 11) зустрічається найчастіше. В той же час заміщення проліну-197 на серин потребує лише однієї нуклеотидної мутації, тоді як для заміни його на інші амінокислоти (зокрема, ізолейцин, метіонін, лізин, триптофан) необхідні дві нуклеотидні зміни, що загалом відбувається більш повільно [12]. Оскільки заміщення амінокислот може відбуватися в багатьох сайтах ферменту, це призводить до збільшення резистентності до різних класів речовин усередині групи інгібіторів АЛС. Молекулярно-структурні дослідження показали, що сайти зв'язування з гербіцидами і каталітичний просторово розділені і деякі мутації чинять незначний ефект на функціонування ферменту. Саме тому, мабуть, може спостерігатися так багато мутацій генів, які зумовлюють резистентність до цих гербіцидів. Крім того, поширення стійких до гербіцидів інгібіторів АЛС біотипів бур'янів не обмежується лише мутаціями гена, що кодує цей фермент, а може бути зумовлене і резистентністю, що не пов'язана з сайтом дії, яка ґрунтується на прискореній метаболічній детоксикації ксенобіотиків.

Поряд з гербіцидами інгібіторами АЛС широкого розповсюдження набули препарати, фітотоксична дія яких пов'язана з інгібуванням активності ацетил-КоА-карбоксилази (АКК), ключового ферменту біосинтезу жирних кислот. Гербіциди інгібітори АКК діють виключно на бур'яни із родини злакових, тому їх об'єднують у групу під назвою граміциди. Вибірність дії граміцидів на злаки детермінована не відмінностями у швидкості детоксикації цих гербіцидів злаковими та іншими родинами рослин,

а особливостями сайту дії [13]. Злакові рослини містять у пластидах еукаріотичну форму АКК, яка є чутливою до грамініцидів, у той час як у інших видів рослин у пластидах знаходиться стійка прокаріотична форма цього ферменту. Завдяки виключно високій селективності граміниціди широко застосовуються у посівах дводольних культур для контролювання одно- і багаторічних злакових бур'янів. Деякі препарати цієї групи мають достатній рівень селективності, зумовлений швидкою детоксикацією діючих речовин цих гербіцидів, також і щодо пшениці та ячменю і можуть застосовуватись у посівах цих культур. На сьогодні резистентність до грамініцидів було виявлено у 46 видів бур'янів [2], ареал поширення яких є досить значним у різних частинах світу. У більшості видів відсутність чутливості до грамініцидів зумовлена мутаціями гена, який кодує АКК. Виявлено 8 таких мутацій, серед яких найчастіше зустрічається заміна лейцину на ізолейцин у кодоні 1781 карбоксилтрансферазного домену пластидної АКК [12]. Різні мутації гена АКК призводять до різних проявів резистентності. При цьому рівень резистентності до грамініцидів визначається як типом мутації, так і гербіцидом та його дозою, використаною для оцінки чутливості [13, 14]. Наприклад, вищезгадана заміна лейцину на ізолейцин у залишку 1781 сприяє високому рівню резистентності до багатьох грамініцидів похідних арилоксифеноксипропіонової кислоти, але в той же час спостерігається дуже низький ступінь резистентності до гербіциду клетодиму, який є похідним циклогександіону.

Слід зазначити, що поряд із пов'язаною з АКК резистентністю може спостерігатись і резистентність, що не пов'язана з сайтом дії. Так, у більшості резистентних рослин популяцій китника мишохвостого (*Alopecurus myosuroides Huds.*) у Франції не спостерігалася жодна з відомих мутацій АКК [15]. Понад 75% рослин цього виду, резистентних до гербіцидів інгібіторів АКК, можуть набути цю властивість через збільшений рівень метаболізації гербіцидів. Аналогічний тип резистентності до інгібіторів АКК було виявлено у пажитниці жорсткої (*Lolium rigidum* Gaud.) та вівсюга (*Avena* spp.), що зростають в Австралії [16, 17].

Культурні рослини з пов'язаною з сайтом дії резистентністю до гербіцидів можуть бути отримані шляхом клітинної селекції, мутагенезу, відбору і розмноження рослин з природною стійкістю, а також з використанням методів генетичної інженерії [18, 19]. Так, наприклад, соняшник, резистентний до гербіцидів похідних імідазолінону, які є інгібіторами АЛС, було отримано шляхом селекції з використанням резистентного дикорослого соняшнику [19]. Резистентність до тріазинів у ріпаку розвилася завдяки схрещуванню з його диким родичем суріпкою, яка є стійкою до цих гербіцидів [20].

Трансгенні культури з резистентністю до неселективних гербіцидів гліфосату і глюфосинату були створені генно-інженерними методами шляхом перенесення одного або декількох генів з інших організмів, що дозволило культурним рослинам набути стійкість до цих гербіцидів. Більшість резистентних до гліфосату культур були отримані шляхом інсерції бактеріального гена, що кодує 5-енолпірувілшикимат-3-фосфатсинтазу, нечутливу до гліфосату внаслідок конформаційних змін, зумовлених порушеннями амінокислотної послідовності в ділянці зв'язування з гербіцидом [21, 22]. Нині спостерігається широкомасштабне вирощування трансгенних культур, стійких до гліфосату і глюфосинату, площі під цими культурами у світі оцінюються приблизно в 70 млн га [23]. В той же час, паралельно зі стрімким ростом площ під трансгенними культурами, до яких головним чином належать кукурудза, соя, бавовник і ріпак, спостерігається така ж стрімка поява нових резистентних біотипів бур'янів. На сьогодні такі біотипи знайдено у 32 видів бур'янів, значна частина яких має крос-резистентність. Фітотоксична дія гліфосату зумовлена інгібуванням активності ферменту 5-енолпірувілшикимат-3-фосфатсинтази, який бере участь у синтезі ароматичних кислот, зокрема триптофану. Відомо два механізми резистентності: перший пов'язаний з мутацією гена, що кодує сайт дії гліфосату; другий детермінований появою у рослин здатності блокувати переміщення гербіциду з листків у меристематичні тканини. Вважають, що зумовлена обмеженою транслокацією резистентність до гліфосату є навіть більш поширеною, ніж цільова, що пов'язана з мутацією гена, який кодує 5-енолпірувілшикимат-3-фосфатсинтазу [12]. При цьому у деяких популяцій пажитниці (*Lolium*) резистентність до гліфосату забезпечується відразу двома вищезгаданими механізмами [24, 25]. Механізм, який дозволяє обмежити переміщення гліфосату всередині рослини, поки що невідомий. Є припущення та перші докази того, що у ньому може

бути задіяний мембранний переносник, який помпує гліфосат до вакуолі [12, 26]. Більша порівняно з іншими гербіцидами швидкість прояву резистентності до гліфосату зумовлена тим, що при вирощуванні трансгенних культур застосовуються нульові технології (no-till), тобто практично виключаються агротехнічні прийоми контролювання бур'янів, у зв'язку з чим різко зростає жорсткість і направленість відбору.

Подальше розповсюдження резистентних до гербіцидів біотипів бур'янів може призвести до значного зменшення ефективності захисту посівів. Особливо небезпечним є поширення біотипів, стійких до різних гербіцидів. При цьому така стійкість може бути зумовлена одним (кросрезистентність) або кількома механізмами резистентності (мультирезистентність). Єдиним на сьогодні засобом попередження та подолання явища резистентності є ротація у сівозміні гербіцидів з різними механізмами фітотоксичності, а також застосування гербіцидних комплексів та сумішей для захисту окремих культур. Реальні можливості ротації та комплексування лімітовані обмеженістю існуючого асортименту гербіцидних препаратів. Оновлення цього асортименту останнім часом практично припинилося внаслідок високої витратності традиційного методу пошуку нових гербіцидів шляхом емпіричного скринінгу. У зв'язку з цим актуальним є впровадження новітніх молекулярно-біологічних методів пошуку гербіцидів, реалізація яких вимагає поглиблення уявлень щодо механізмів індукованого гербіцидами патогенезу.

Висновки

Проблема резистентності рослин до гербіцидів є відображенням їх адаптації до хімічних препаратів і процесів, спричинених селекційним тиском від застосування гербіцидів. Зміни відбуваються на фізіологічному і молекулярному рівнях та імітують біологічні процеси рослин, толерантних до даних гербіцидів. Необхідне подальше дослідження процесів, які відбуваються на молекулярно-генетичному та метаболічному рівнях і беруть участь у формуванні резистентності рослин до гербіцидів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Vencill W. K., Nichols R. L., Webster T. M., Soteres J. K., Mallory-Smith C., Burgos N. R., Johnson W. G., McClelland M. R. Herbicide resistance: toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops // Weed Science.— 2012.— 60 (sp. 1).— P. 2–30.
2. Heap I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds [Електронний ресурс].— Режим доступу: http://www.weedscience.com. Accessed: March 25, 2015.
3. Délye C., Deulvot C., Chauvel B. DNA analysis of herbarium specimens of the grass weed *Alopecurus myosuroides* reveals herbicide resistance pre-dated herbicides // PloS ONE.— 2013.— 8 (10): e75117. Doi:101371/journalpone0075117 Resource Number (2013).
4. О резистентности сорняков: [Если появились признаки резистентности сорняков к гербицидам] // Агро XXI.— 1997.— № 3.— С. 6–7.
5. Timmons F. L. A history of weed control in the United States and Canada // Weed Sci.— 1970.— 18.— P. 294–307.
6. Yu Q., Powles S. Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: a threat to herbicide sustainability and global crop production // Plant Physiol.— 2014.— 166, N 3.— P. 1106–1118.
7. Carey V. F., Hoagland R. E., Talbert R. E. Resistance mechanism of propanil-resistant barnyardgrass: II. *In-vivo* metabolism of the propanil molecule // Pestic. Sci.—1997.— 49.— P. 333–338.
8. Ma R., Kaundun S. S., Tranel P. J., Riggins C. W., McGinness D.L., Hager A. G., Hawkes T., McIndoe E., Riechers D. E. Distinct detoxification mechanisms confer resistance to mesotrione and atrazine in a population of waterhemp // Plant Physiol.— 2013.— 163.— P. 363–377.
9. Guttieri M. J., Eberlein C. V., Mallory-Smith C.A., Thill D. C., Hoffman D. L. DNA sequence variation in Domain A of the acetolactate synthase genes of herbicide-resistant and -susceptible weed biotypes // Weed Sci.— 1992.— 40.— P. 670–676.
10. Tranel P. J., Wright T. R., Heap I. M. ALS mutations from herbicide-resistant weeds.— 2009. [Електронний ресурс].— Режим доступу: http://www.weedscience.org.
11. Tranel P. J., Wright T. R. Resistance of weeds to ALS inhibiting herbicides: what have we learned? // Weed Sci.— 2002.— 50.— P. 700–712.
12. Powles S. B., Yu Q. Evolution in action: plant resistant to herbicides // Annu. Rev. Plant Biol.— 2010.— 61.— P. 317–347.

13. Delye C., Matejicek A., Michel S. Cross-resistance pattern to ACCase-inhibiting herbicide conferred by mutant ACCase isoforms in *Alopecurus myosuroides* Huds. (black-grass) re-examined at the recommended herbicide field rate // Pest Manag. Sci.— 2008.— 64.— P. 1179–1186.
14. Neve P., Powles S. B. Recurrent selection with reduced herbicide rates results in the rapid evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum* // Theor. Appl. Genet.— 2005.— 110.— P. 1154–1166.
15. Delye C., Menchari Y., Guillemin J. P., Matéjicek A., Michel S., Camilleri C., Chauvel B. Status of black grass (*Alopecurus myosuroides*) resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in France // Weed Res.— 2007.— 47.— P. 95–10.
16. Owen M., Walsh M., Llewellyn R., Powles S. B. Widespread occurrence of multiple herbicide resistance in Western Australian annual ryegrass (*Lolium rigidum*) populations // Aust. J. Agric. Res.— 2007.— 58.— P. 711–718.
17. Owen M. J., Powles S. B. Distribution and frequency of herbicide-resistant wild oat (*Avena* spp.) across the Western Australian grain belt // Crop Pasture Sci.— 2009.— 60.— P. 25–31.
18. Duke S. O. Taking stock of herbicide-resistant crops ten years after introduction // Pest Manag. Sci.— 2005.— 61.— P. 211–218.
19. Tan S., Bowe S. J. Developing herbicide-tolerant crops from mutations [Електронний ресурс] // Induced plant mutations in the genomics era (Q. Y. Shu, ed.).— Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009.— Режим доступу: http://www.fao.org/docrep/012/i0956e /i0956e10.pdf.
20. Hall J. C., Vanderloo M. J., Hume D. J. Triazine-resistant crops: the agronomic impact and physiological consequences of chloroplast mutation // Herbicide-resistant crops: agricultural, environmental, economic, regulator and technical aspects (S. O. Duke, ed.).— Boca Raton, FL, CRC, 1996.— P. 107–126.
21. Duke S. O., Powles S. B. Glyphosate-resistant crops and weeds: now and in the future // Agbioforum.— 2009.— 12.— P. 346–357.
22. Powles S. B., Preston C. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance // Weed Technol.— 2006.— 20.— P. 282–289.
23. Price A. J., Balkcom K. S., Culpepper S. A., Kelton J. A., Nichols R. L., Schomberg H. Glyphosate-resistant Palmer amaranth: a threat to conservation tillage // J. Soil Water Conserv.— 2011.— 66.— P. 265–275.
24. Preston C., Wakelin A. M., Dolman F. C., Botamam Y., Boutsalis P. A decade of glyphosate-resistant *Lolium* around the world: mechanisms, genes, fitness and agronomic management // Weed Sci.— 2009.— 57.— P. 435–441.
25. Yu Q., Cairns A., Powles S. B. // Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance in a *Lolium rigidum* biotype // Planta.— 2007.— 225.— P. 499–513.
26. Ge X., Ackerman J. J. H., Sammons R. D. *In vivo* ^{31}P-nuclear magnetic resonance studies of glyphosate uptake, vacuolar sequestration, and tonoplast pump activity in glyphosate-resistant horseweed // Plant Physiol.— 2014.— 166, N 3.— P. 1255–1268.

GURALCHUK ZH.Z., MORDERER YE.YU.

Institute of Plant Physiology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17, e-mail: azhanna@ukr.net

PROBLEM OF PLANT RESISTANCE TO HERBICIDES: GENETIC AND METABOLIC ASPECTS

Aims. The plant resistance to herbicides is a big problem of modern agriculture. Thus, knowledge of the mechanisms of resistance to herbicides is very important due to the emergence of a large number of herbicide-resistant weeds. ***Results.*** Analysis of the literature data shows a significant contribution of gene mutations to the evolution of resistance. Metabolic processes are important too, due to enhanced metabolic capacity to detoxify herbicides. ***Conclusions.*** Some progress in understanding the mechanisms of plant resistance to herbicides achieved, but further studies of phytopathogenesis of herbicides and processes that occur at the molecular genetic and metabolic levels and are involved in the formation of plant resistance to herbicides are needed.

Keywords: herbicide, resistance, target-site resistance, non-target-site resistance.

УДК 575.222.73

ДУБОВЕЦ Н. И., СЫЧЕВА Е. А., БОНДАРЕВИЧ Е. Б., СОЛОВЕЙ Л. А.
Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,
Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая,27, e-mail: N.I.Dubovets@igc.bas-net.by

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К УЛУЧШЕНИЮ ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ТРИТИКАЛЕ

Тритикале (×*Triticosecale* Wittmack) является одной из важнейших зерновых культур для Республики Беларусь и в настоящее время возделывается на площади около 500 тыс. га. Столь значительный рост посевных площадей обусловлен успехами, достигнутыми за последние десятилетия в селекции данной культуры. Современные сорта тритикале успешно конкурируют по урожайности зерна и зеленой массы с лучшими сортами ржи, ячменя, овса и пшеницы; имеют высокие кормовые достоинства и повышенное содержание лизина в белке; способны расти на бедных, подтопляемых и кислых почвах; хорошо переносят неблагоприятные условия перезимовки и резкие похолодания в весенне-летний период; лучше других зерновых культур подходят для малозатратных, ресурсосберегающих технологий (из-за способности усваивать больше питательных веществ из почвы и существенно меньшей потребности в химической защите). Вместе с тем в селекции тритикале имеется целый ряд нерешенных проблем, к наиболее существенным из которых относятся склонность посевов к полеганию и предуборочному прорастанию зерна в колосе. Представленные в литературе данные свидетельствуют о сложном генетическом контроле данных признаков у тритикале, что значительно затрудняет селекцию на их улучшение с использованием классических подходов. Возможности традиционной селекции существенно ограничивает и то, что ряд значимых для проявления анализируемых признаков генов локализован в хромосомах D-генома пшеницы, отсутствующего у обычных гексаплоидных пшенично-ржаных амфидиплоидов [1]. Наиболее реальный выход из сложившейся ситуации видится в использовании хромосомно-инженерных технологий в сочетании с методами молекулярно-цитогенетического и ДНК-маркирования. В статье изложены результаты создания вторичных рекомбинантных форм тритикале и их изучения на перспективность использования в селекции на короткостебельность и устойчивость к предуборочному прорастанию.

Материалы и методы

Для получения вторичных рекомбинантных форм тритикале были использованы современные сорта тритикале Лана, Карго, Мешко (2n = 6x = 42; AABBRR), отобранные по комплексу хозяйственно-полезных признаков, а также D(A)- и D(B)-замещенные формы гексаплоидных тритикале, синтезированные в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси в 90-х годах прошлого столетия на основе популярных в то время образцов октоплоидных тритикале [2]: ПРАГЗ-2 с 1D (1A), 2D (2B)-замещениями, ПРАГЗ-3 с 1D (1A), 6D (6B)-замещениями, ПРАГЗ-4 с 1D (1A), 2D (2B), 6D (6B)-замещениями.

Анализ геномной структуры экспериментального материала проводился с помощью метода дифференциального окрашивания хромосом по Гимза (С-бэндинг) [3, 4]. Выделение и очистку ДНК осуществляли с помощью готовых наборов реактивов «Genomic DNA Purification Kit» K0512 («Fermentas», Литва). Для выявления аллельного состава генов короткостебельности *Rht-B1* и *Rht8* использовались праймеры в модификации Zhang X. et al. (2006) [5]. Для определения аллельного состава гена *Viviparous-1B* использовали STS-маркер Vp1B3, разработанный Yang et al. (2007) [6]. Продукты ПЦР фракционировали методом горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле в 1×TAE буфере в течение 45 минут при напряжении в 100 В. Результат документировался в системе гель-документации QUANTUM ST4-1100. Для точного определения размера амплифицированных фрагментов с SSR-маркерами был проведен фрагментный анализ продуктов ПЦР. Данные анализировались в программной среде, поставляемой с прибором AppliedBiosystems 3500 Genetic Analyzer.

Результаты и обсуждение

Получение линейного материала вторичных рекомбинантных форм гексаплоидных тритикале

С целью создания вторичных хромосомно-замещенных форм гексаплоидных тритикале замещенные линии гексаплоидных тритикале

© ДУБОВЕЦ Н. И., СЫЧЕВА Е. А., БОНДАРЕВИЧ Е. Б., СОЛОВЕЙ Л. А.

ПРАГЗ-2, ПРАГЗ-3 и ПРАГЗ-4 были скрещены с сортами тритикале Лана, Карго, Мешко. Полученные гибриды F_1 и F_2 выращивались в условиях принудительного самоопыления. Для создания линейного материала сбор урожая в F_3 был произведен индивидуально по каждому растению. Часть собранных с растения зерен была использована для идентификации хромосомного состава с помощью метода дифференциального окрашивания хромосом по Гимза (С-бэндинг). Анализ геномной структуры гибридных форм показал, что хромосомы D-генома пшеницы включаются в кариотип сортов тритикале с высокой частотой. В общей сложности по всем комбинациям скрещиваний было проанализировано 96 индивидуальных растений, из которых 73 (76%) содержали хромосомы D-генома пшеницы в моносомном и дисомном состоянии, при этом наблюдалась зависимость процесса интрогрессии D-хромосом от генотипической среды вновь синтезированного гибридного растения. Самая низкая частота интрогрессии хромосом D-генома (41,2%) отмечена в комбинации скрещивания Лана×ПРАГЗ-4, тогда как в комбинации Лана×ПРАГЗ-3 этот показатель был равен 100%, из чего следует, что, расширяя генетическое разнообразие включенных в гибридизацию сортов и хромосомно-замещенных линий, можно существенно повысить частоту образования рекомбинантных A/B/DRR форм.

Если оценивать в целом частоту интрогрессии индивидуальных хромосом D-генома в кариотип гексаплоидных тритикале, то более низкой частотой характеризовалась хромосома 6D (36,1%). Хромосома 2D в проанализированном материале встречалась с частотой 49%, причем у 88% индивидуальных растений присутствовала в дисомном состоянии (рис. 1, *а*). Самая высокая частота интрогрессии была отмечена для хромосомы 1D — её содержали 65,6% растений F_4, в том числе в дисомном состоянии — 73%. В потомстве F_4 были отмечены случаи образования аберрантных хромосом: 1DS.1DL-1AL (рис. 1, *б*) у двух растений (Лана×ПРАГЗ-4) и 3DS-3AS.3AL у растения в комбинации Лана×ПРАГЗ-3.

По результатам геномного анализа из гибридных популяций F_4 было выделено 8 стабильных рекомбинантных линий с различными типами D(A)- и D(B)-замещений хромосом в дисомном состоянии (табл. 1, рис. 1, *а*).

У отобранных рекомбинантных линий гексаплоидных тритикале с помощью ДНК-маркеров был изучен аллельный состав генов, влияющих на формирование короткостебельности (*Rht-B1*, *Rht8*) и устойчивости к предуборочному прорастанию (*Vp-1B*), для оценки на перспектив-

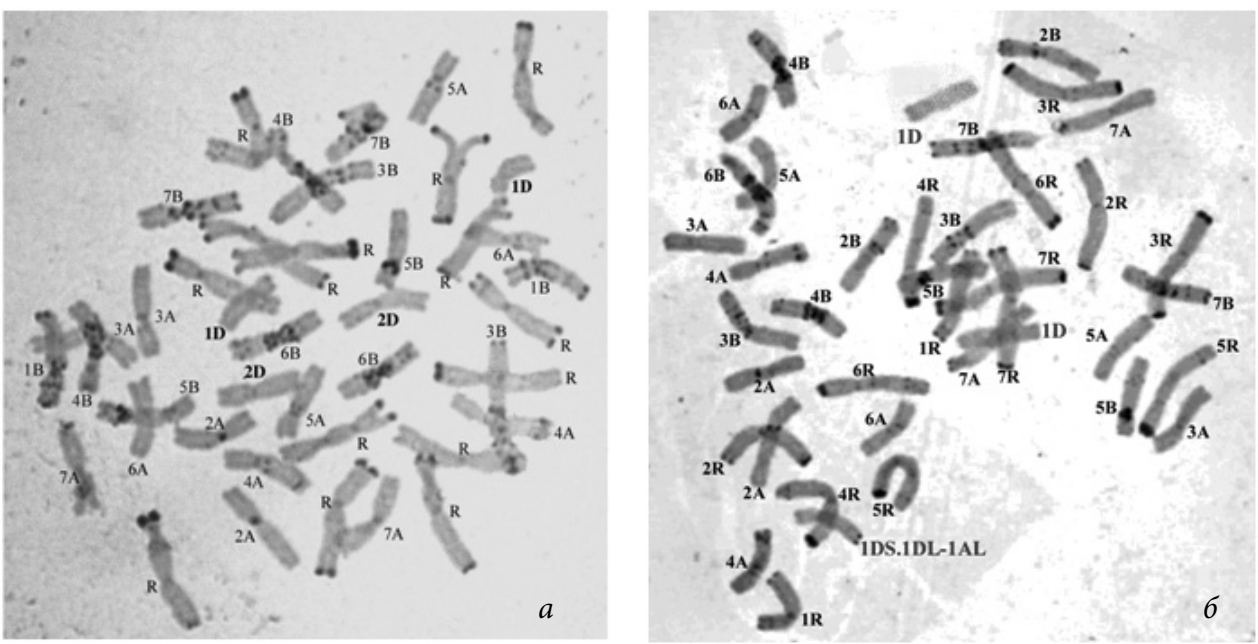


Рис. 1. Кариотипы растений: *а* — рекомбинантная линия № 12 с 1D(1A)- и 2D(2B)-замещениями хромосом; *б* — форма из комбинации скрещивания Лана×ПРАГЗ-4 с 1D(1B)-замещением хромосом и аберрантной 1DS.1DL-1AL-хромосомой

Таблица 1

Типы межгеномных замещений хромосом у вторичных рекомбинантных форм гексаплоидных тритикале

Комбинация скрещивания	Номер линии	Типы межгеномных замещений хромосом
Лана × ПРАГЗ-2	6	2D (2B)
	12	1D (1A), 2D (2B)
Лана × ПРАГЗ-3	4	6D (6B)
	11	1D (1A), 6D (6B)
Карго × ПРАГЗ-3	14	1D (1A)
	22	1D (1A)
Мешко × ПРАГЗ-3	3	1D (1A)
	7	1D (1A)

ность использования в селекции по данным признакам.

Анализ аллельного состава генов короткостебельности Rht-B1 и Rht8 у рекомбинантных линий гексаплоидных тритикале

Проведенный нами предварительный анализ геномной структуры вторичных линий тритикале с помощью дифференциального окрашивания хромосом по Гимза дает возможность целенаправленно использовать ПЦР-маркеры для идентификации аллелей генов короткостебельности. Как известно, ген *Rht-B1* локализован в коротком плече хромосомы 4B и, следовательно, будет присутствовать у всех отобранных рекомбинантных линий. Интерес для селекции на короткостебельность представляет мутантный аллель этого гена *Rht-B1b*, гомозиготность по которому по имеющимся данным обеспечивает снижение высоты растений пшеницы на 41–42 %.

Анализ рабочей коллекции по аллельному составу гена *Rht-B1* показал, что мутантный аллель *Rht-B1b* содержат все рекомбинантные линии, за исключением № 3 и № 7. Линия № 3 характеризуется наличием дикого аллеля гена *Rht-B1* (*Rht-B1a)* (рис. 2), а у линии № 7 ген *Rht-B1* представлен как диким, так и мутантным аллелем.

Ген *Rht8* локализован в коротком плече хромосомы 2D. Согласно данным кариотипирования хромосома 2D присутствует в геноме двух отобранных вторичных рекомбинантных линий — № 6 и № 12 (табл. 1). При использовании молекулярного маркера *Xgwm261* к гену *Rht8* амплифицируются фрагменты размером 165, 174, 180, 192, 200, 204 п.н., однако только фрагмент 192 п.н. специфичен для коммерческого аллеля данного гена *Rht8c*. В ходе фрагментного анализа полученных продуктов ПЦР было установлено, что у исследованных замещенных форм гексаплоидных тритикале присутствует аллель дикого типа *Rht8a* (165 п.н.) (рис. 3).

Анализ аллельного состава гена Vp-1B, ассоциированного с устойчивостью к предуборочному прорастанию, у рекомбинантных линий гексаплоидных тритикале

Ген *Viviparous-1B*, локализованный в длинном плече хромосомы 3B пшеницы, идентифицирован в качестве основного гена, детерминирующего покой семян. Установлено, что аллель дикого типа данного гена *Vp-1Ba* (652 п.н.) ассоциирован со склонностью к предуборочному прорастанию зерна, тогда как аллели мутантного

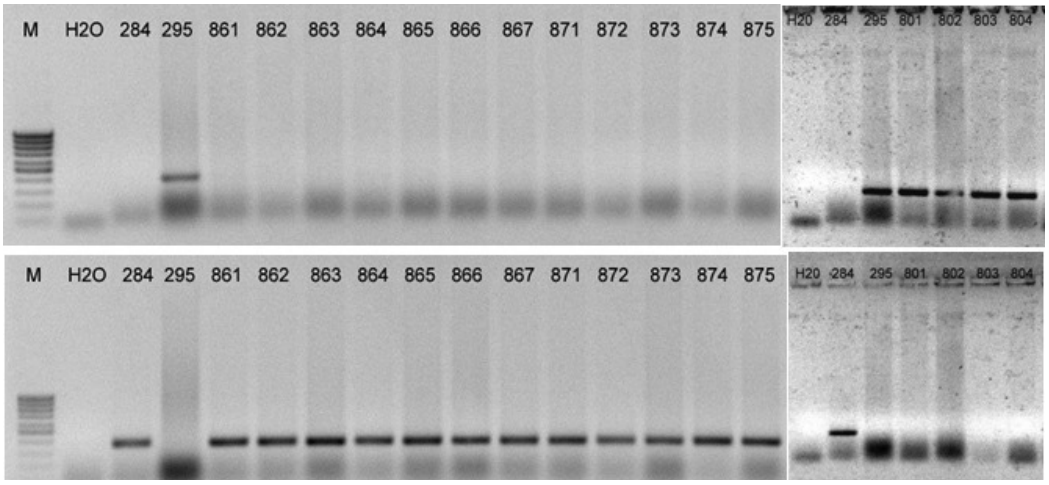


Рис. 2. Электрофореграмма детекции аллелей *Rht-B1a* (верхняя) и *Rht-B1b* (нижняя) у рекомбинантных линий тритикале № 14, № 22 и № 3. M — маркер молекулярного веса Праймтех™, M100 bp, 284 — DEO6232/01 (положительный контроль на *Rht-B1b*), 295 — ПРАГЗ-5 (положительный контроль на *Rht-B1a*); с 861 по 867 — образцы линии № 14; с 871 по 875 — образцы линии № 22; с 801 по 804 — образцы линии № 3

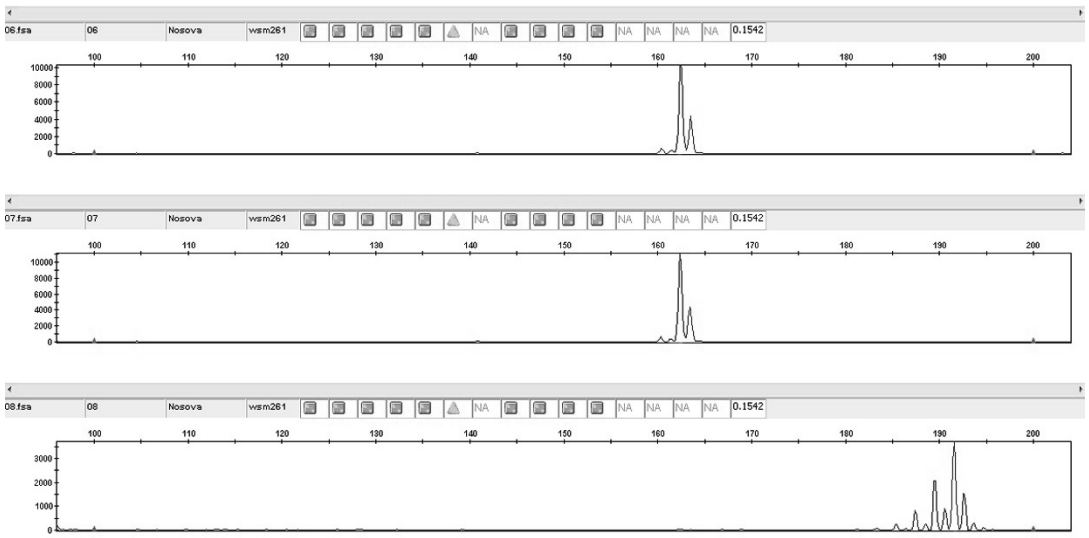


Рис. 3. Данные фрагментного анализа образцов: 1 — Лана×ПРАГЗ-2, линия № 6; 2 — Лана×ПРАГЗ-2, линия № 12; 3 — Безостая (положительный контроль на *Rht8c,* 192 п. н.) в среде программы GeneMapper 4.1

типа *Vp-1Bв* (845 п. н.) и *Vp-1Bc* (569 п. н.) определяют устойчивость к прорастанию зерна в колосе.

У вторичных рекомбинантных форм тритикале, включенных в исследование, были идентифицированы два аллеля гена *Vp-1B: Vp-1Ba* и *Vp-1Bc*. Мутантный аллель *Vp-1Bc* содержали рекомбинантные линии № 3, № 4, № 7 и № 14. Линии № 6 и № 12 характеризовались наличием аллеля дикого типа *Vp-1Ba,* а у линий № 11 и № 22 ген *Vp-1B* представлен как диким *Vp-1Ba*, так и мутантным *Vp-1Bc* аллелями.

Выводы

Представленные выше результаты исследований свидетельствуют об эффективности применения хромосомно-инженерных технологий для расширения генетического разнообразия гексаплоидных тритикале. В ходе экспериментов показана высокая частота включения хромосом D-генома в кариотип сортов тритикале и довольно быстрая стабилизация хромосомного состава гибридного материала. Выявлена зависимость результативности процесса интрогрессии хромосом D-генома пшеницы в кариотип гексаплоидных тритикале от генотипической среды создаваемой гибридной формы, из чего следует, что, расширяя генетическое разнообразие включенных в гибридизацию сортов тритикале, можно существенно повысить частоту образования рекомбинантных A/B/DRR форм. По совокупности молекулярно-цитогенетического и молекулярно-генетического анализа выделены рекомбинантные линии гексаплоидных тритикале, которые могут быть использованы в селекционном процессе в качестве исходного материала при создании сортов тритикале, устойчивых к полеганию и предуборочному прорастанию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Куркиев К. У., Тырышкин Л. Г., Колесова М. А., Куркиев У. К. Идентификация генов короткостебельности Rht2 и Rht8 у образцов гексаплоидного тритикале с помощью ДНК маркеров // Информационный вестник ВОГиС.— 2008.— 12, № 3.— С. 372–376.
2. Дубовец Н. И., Дымкова Г. В., Соловей Л. А., Штык Т. И., Бормотов В. Е. Реконструкция кариотипа гексаплоидных тритикале путем межгеномных замещений хромосом // Генетика.— 1995.— 31, № 10.— С. 1394–1399.
3. Бадаева Е. Д. Изменение хромосом ржи в кариотипе тритикале: дис. … канд. биол. наук: 03.00.15 «Генетика».— М., 1984.— 181 с.
4. Badaeva E. D., Sozinova L. F., Badaev N. S., Muravenko O. V., Zelenin A. V. «Chromosomal passport» of *Triticum aestivum* L. em Thell. cv. Chinese Spring and standartization of chromosomal analysis of cereals // Cereal Res. Commun.— 1990.— 18, № 4.— P. 273–281.
5. Zhang X., Yang S., Zhou Y., He Z., Xia X. Distribution of the *Rht-B1b*, *Rht-D1* and *Rht8* reduced height genes in autumn-sown Chinese wheats detected by molecular markers // Euphytica.— 2006.— 152, № 1.— P. 109–116.

6. Yang Y., Zhao X. L., Xia L. Q., Chen X. M., Xia X. C., Yu Z., He Z. H., Röder M. Development and validation of a Viviparous-1 STS marker for pre-harvest sprouting tolerance in Chinese wheats // Theor. Appl. Genet.— 2007.— № 115 (7).— P. 971–980.

DUBOVETS N.I., SYCHEVA Y.A., BONDAREVICH Y.B, SOLOVEY L.A.

Institute of Genetics and Cytology of Natl. Acad. Sci. of Belarus,
Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27, e-mail: N.I.Dubovets@igc.bas-net.by

BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES TO IMPROVEMENT OF TRITICALE ECONOMICALLY VALUABLE TRAITS

Aims. Development of triticale secondary recombinant gene pool for use in breeding for semidwarfness and resistance to pre-harvest sprouting. ***Methods.*** Chromosome-engineering technologies in combination with molecular-cytogenetic and DNA labelling of genotypes. ***Results.*** Hybridization of substituted 6x-triticale forms with modern crop cultivars was carried out. Eight stable recombinant lines with different D(A)- and D(B)-chromosome sunstitutions were selected out of hybrid populations F_4 by chromosome differential Giemsa staining (C-banding). Allelic composition of genes affecting formation of semidwarfness (*Rht-B1, Rht8*) and resistance to pre-harvest sprouting (*Vp-1B*) was investigated in the selected forms. ***Conclusions.*** A high frequency of D-genome chromosome inclusion in karyotype of triticale cultivars and dependence of the effectiveness of the introgression process on the genotypic environment of the developed hybrid form were revealed. Recombinant triticale lines, promising for breeding, were selected according to the data of molecular-genetic analysis.

Keywords: triticale, chromosome-substitution lines, semidwarfness, resistance to pre-harvest sprouting, molecular markers.

УДК 581.1

ЖУК О.І.
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: zhuk_bas@voliacable.com

РОСТОВІ ПРОЦЕСИ У СТЕБЛІ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ ЗА РІЗНОГО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ МІНЕРАЛЬНИМ ЖИВЛЕННЯМ

Формування продуктивності озимої пшениці відбувається протягом всього періоду онтогенезу, а інтенсивність ростових процесів у стеблах відіграє визначну роль у надходженні до репродуктивних органів асимілятів, води, розвитку фотосинтетичного апарату. Забезпеченість рослин азотом, фосфором і калієм та ефективність їх використання кореневою системою культурних високопродуктивних сортів злаків належить до важливих проблем підвищення їх врожайності та якості зерна [1]. Дефіцит макроелементів лімітує реалізацію потенціалу сортів інтенсивного типу в несприятливих умовах навколишнього середовища. Формування адаптивної відповіді на стрес відбувається протягом онтогенезу рослини і реалізується у вигляді відповідного фенотипу [2]. В умовах вегетативного стресу ефективність реалізації потенційної продуктивності рослин забезпечує максимальну врожайність сільськогосподарських рослин. Сучасні технології створення нових сортів пшениці включають залучення елементів геному інших видів злаків, зокрема житніх транслокацій, що дозволяє підвищити продуктивність рослин за рахунок посилення їх стійкості до несприятливих умов навколишнього середовища, зокрема забезпечення мінеральним живленням [3, 4]. Стебло пшениці належить до найважливіших органів, які постачають до колоса необхідні ресурси від кореневої системи і листкового апарату. Вважають, що стебло також слугує резервом вуглеводів для колоса в період від цвітіння до наливу зерна, особливо в умовах природної посухи, прискореного старіння прапорцевого і підпрапорцевого листків і обумовлює кінцевий врожай пшениці [5–8]. Найбільше накопичення цукрів відзначено у двох верхніх міжвузлях і залежить як від швидкості транспорту цукрів від листків, так і розмірів верхніх міжвузлів. Нами раніше було досліджено вплив забезпечення рослин пшениці елементами мінерального живлення на будову стебла озимої пшениці і розвиток зернівки за різного забезпечення азотом, фосфором і калієм [9]. Встановлено, що за недостатнього забезпечення живленням послаблювався розвиток стеблової паренхіми, судин ксилеми і флоеми, зменшувався діаметр стебла, особливо на рівні четвертого і п'ятого міжвузлів. Однак закладання і структура елементів колоса, розміри зернівок значною мірою обумовлюються розмірами верхніх міжвузлів стебла, які безпосередньо взаємодіють з колосом і прапорцевим листком. Метою нашої роботи було дослідження динаміки росту міжвузлів озимої пшениці за оптимального і недостатнього забезпечення рослин озимої пшениці мінеральним живленням та зв'язку з елементами структури врожаю.

Матеріали і методи

Рослини озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сортів Миронівська 808 і Фаворитка вирощували в умовах вегетаційного досліду на суміші дерново-підзолистого ґрунту з піском у співвідношенні 4:1 у посудинах місткістю 7,5 кг. У контрольному варіанті вміст основних елементів мінерального живлення складав $N_{90}P_{90}K_{90}$ за діючою речовиною, у дослідному — $N_{32}P_{32}K_{32}$. Добрива вносили у період набивки ґрунту перед посівом та як підживлення наприкінці фаз кущіння та цвітіння. Для удобрення використовували нітроамофоску. Вологість ґрунту підтримували на оптимальному для пшениці рівні 70 % ПВ. Протягом періоду від початку виходу рослин у трубку до молочної стиглості зерна відбирали по 10 типових за розмірами та розвитком рослин, у яких виділяли головне стебло. Після видалення листків проводили виміри довжини міжвузлів, висоти головного стебла у міліметрах з наступним знаходженням середнього для кожного відбору значення. Дозрілі рослини видаляли з посудин, висушували до повітряно-сухого стану і потім проводили аналіз структури врожаю, який включав такі параметри, як висота головного стебла, довжина колоса, кількість зерен у колосі, маса 1000 зерен. Результати досліджень були статистично оброблені з використанням програми Microsoft Excel. На графіках та в таблиці наведено величину дисперсії.

© ЖУК О.І.

Результати та обговорення

Дослідження динаміки росту головного стебла рослин озимої пшениці за різного забезпечення макроелементами дозволило встановити, що в умовах їх дефіциту значне інгібування приросту пагонів відбувається уже після початку виходу в трубку і було більшим у високорослого сорту Миронівська 808 порівняно з відносно низькорослим сортом Фаворитка (рис. 1).

Найбільш значна затримка росту головного стебла в обох досліджених сортів пшениці відзначена у фазі колосіння, яка в подальшому зберігалася до завершення ростових процесів. При цьому загальна висота стебла у пшениці сорту Миронівська 808 зменшилася майже вдвічі, а у сорту Фаворитка — на 40 %.

Аналіз динаміки росту міжвузлів головного стебла пшениці від початку виходу в трубку виявив, що забезпеченість мінеральним живленням найзначніше впливала на ріст четвертого і п'ятого міжвузлів (рис. 2, 3). Інгібування росту міжвузлів відзначали вже на початкових етапах їх формування, що вказувало на дефіцит необхідних ресурсів для проліферативних процесів, наслідком чого стало зменшення кількості новоутворених клітин. Кінцеві розміри четвертого міжвузля у пшениці сорту Миронівська 808 зменшилися на 70 мм. Відставання у рості четвертого міжвузля у пшениці сорту Фаворитка було менш значним, а в період після початку цвітіння навіть зменшувалося. Кінцеві розміри четвертого міжвузля рослин контрольного і дослідного варіантів у сорту Фаворитка відрізнялися менше порівняно з сортом Миронівська 808. Інтенсивність росту п'ятого міжвузля, яке утримує колос, значно інгібувалась у сорту Миронівська 808 за дефіциту живлення протягом всього періоду його формування і саме за рахунок цього відбувалося значне зменшення висоти рослин. У сорту Фаворитка дефіцит мінерального живлення спричиняв менш значне інгібування ростових процесів. Ріст п'ятого міжвузля у сорту Фаворитка в контрольному і дослідному варіантах припинявся значно раніше, ніж у сорту Миронівська 808 і збігався з завершенням цвітіння і початком формування зернівок. У сорту Миронівська 808 ріст п'ятого міжвузля тривав до початку дозрівання зернівок. Регуляція ростових процесів у міжвузлі, яке тримає колос, очевидно, обумовлена не лише забезпеченням необхідними ресурсами, а і генетичною програмою, яка керує потоками асимілятів і енергії. У сортів інтенсивного типу відносно раннє припинення ростових процесів у стеблі визначає спрямування ресурсів до колоса, посилення атрагуючої ролі зернівки для збільшення її розмірів і маси.

Аналіз структури врожаю дозволив встановити, що найбільш значний внесок у формування висоти рослин пшениці належав четвертому та п'ятому міжвузлям, однак за дефіциту головних елементів мінерального живлення суттєвого інгібування ростові процеси у стеблі зазнавали

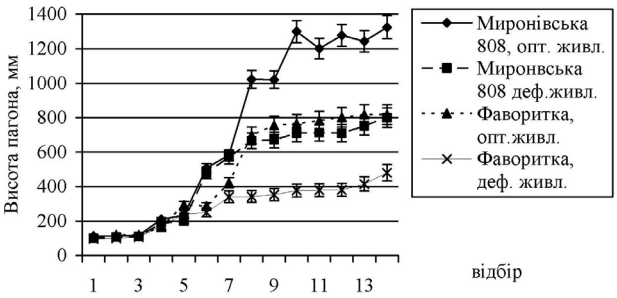


Рис. 1. Динаміка росту головного стебла озимої пшениці сортів Миронівська 808 і Фаворитка за різного забезпечення головними елементами мінерального живлення

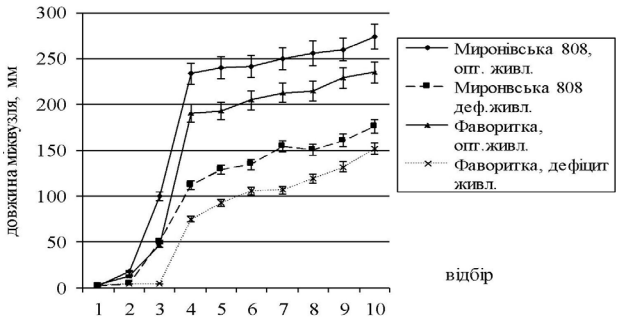


Рис. 2. Динаміка росту четвертого міжвузля озимої пшениці сортів Миронівська 808 і Фаворитка за різного забезпечення головними елементами мінерального живлення

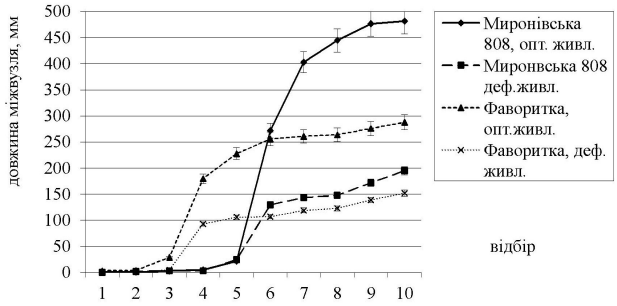


Рис. 3. Динаміка росту п'ятого міжвузля озимої пшениці сортів Миронівська 808 і Фаворитка за різного забезпечення головними елементами мінерального живлення

Таблиця

Структура врожаю пшениці за різного забезпечення мінеральним живленням

Варіант	Довжина міжвузлів, мм					Висота рослин, мм	Кількість зерен у колосі, шт.	Довжина колоса, мм	Маса 1000 зерен, г
	1	2	3	4	5				
Миронівська 808, оптим. живлення	79±5	166±6	199±7	289±8	471±9	1267±9	30±2	79±1	53,4±0,9
Миронівська 808, дефіцит живлення	61±5	121±5	126±5	155±5	195±8	738±8	25±3	78±2	43,5±1,1
Фаворитка, оптим. живлення	60±5	117±5	199±8	272±6	307±9	760±9	51±3	96±3	59,4±1,2
Фаворитка, дефіцит живлення	36±5	74±5	86±6	108±7	178±8	559±11	31±5	80±3	43,7±1,3

ще на початку його формування (табл.). Значного зменшення набула також довжина колоса, що свідчить про зменшення періоду функціонування всіх інтеркалярних стеблових меристем. Враховуючи, що клітини інтеркалярних меристем, на відміну від апікальних, детерміновані у напрямку розвитку і часі існування, можна вважати, що дефіцит ресурсів був вагомим регулятором макроморфогенезу на етапі трансформації вегетативної апікальної меристеми у генеративну. На жаль, до цього часу функціонування меристем пагона культурних злаків залишається майже не дослідженим.

Дефіцит мінерального живлення спричиняв не лише зменшення розмірів колоса, а й кількості зерен у ньому та маси 1000 зерен. При цьому кількість зерен у колосі значніше зменшувалась у сорту Фаворитка порівняно з сортом Миронівська 808, що свідчить про редукцію плодоелементів, квіток, недостатнє запилення і запліднення. Зменшення колоса у пшениці сорту Фаворитка супроводжувалося недорозвиненістю нижніх колосків, частковою або повною відсутністю у них квіток. Раніше було встановлено, що за недостатнього забезпечення мінеральним живленням розвиток зернівки озимої пшениці нерідко зупиняється на ранніх етапах і завершується утворенням незначного розміру ендосперму, нерідко без зародка [10]. В таких умовах значно зростала кількість дрібних та щуплих насінин, особливо у центральній частині колоса. Отже, дефіцит азоту фосфору і калію у ґрунті спричиняв інгібування росту, яке посилювалось у період формування верхніх міжвузлів стебла і репродуктивних органів. Зменшення розмірів елементів стебла очевидно обумовлено пригніченням проліферативних процесів в умовах дефіциту необхідних ресурсів для новоутворення клітин.

Висновки

Інгібування росту головного стебла озимої пшениці сортів Миронівська 808 і Фаворитка за недостатнього забезпечення головними елементами мінерального живлення відзначали від початку фази колосіння до фази молочної стиглості зерна. Найбільш значним воно було у високорослого сорту пшениці Миронівська 808, кінцеві розміри стебла у якого зменшувалися на 50 % порівняно з відповідними значеннями у контрольному варіанті. Ріст четвертого міжвузля продовжувався до фази молочної стиглості зерна, однак після фази цвітіння в обох сортів його інтенсивність значно падала. Зупинка росту п'ятого міжвузля у пшениці сорту Фаворитка відбувалась у фазі цвітіння, а у пшениці сорту Миронівська 808 — молочної стиглості зерна. Дефіцит елементів мінерального живлення зменшував продуктивність рослин озимої пшениці за рахунок менших розмірів колоса, зниження кількості і маси зернівок у колосі, що могло бути обумовлено у тому числі і недостатнім запасанням фотоасимілятів у верхніх міжвузлях стебла для забезпечення наливу зернівок, формування запасів ендосперму у період старіння листків.

ЛІТЕРАТУРА

1. Makino A. Photosynthesis, grain yield and nitrogen utilization in rice and wheat // Plant Physiol.— 2011.— 155.— P. 125–129.
2. Lichtenthaler H. K. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants // J. Plant Physiol.— 1996.— 148.— P. 4–14.

3. Huang M.-L., Deng X. P., Zhao Y.-Z., Zhou S.-L., Inanaga Sh., Yamada S., Tanaka K. Water and nutrient use efficiency in diploid, tetraploid and hexaploid wheat // J. Integr. Plant Biol.— 2007.— 49, N 5.— P. 706–715.
4. Whitford R., Fleury D., Reif J., Garcia M., Okada T., Korzun V., Langridge P. Hybrid breeding in wheat: technologies to improve hybrid wheat seed production // J. Exper. Botany.— 2013.— 64.— P. 5411–5428.
5. Blum A. Improving wheat grain filling under stress by stem mobilization // Euphytica.— 1998.— 100.— P. 77–83.
6. Blum A., Sinmena B., Mayer J., Golan G., Shipiler L. Stem reserve mobilization supports wheat grain filling under heat stress // Aust. J. Plant Physiol.— 1994.— 21.— P. 771–781.
7. Ehdaie B., Whitkus R. W., Waines J. G. Genotypic variation in linear rate of grain growth and contribution of stem reserves to grain yield in wheat // Field Crops Res.— 2008.— 106.— P. 34–43.
8. Bancal P. Early development and enlargement of wheat floret primordial suggest a role of partitioning within spike to grain set // Field Crops Res.— 2009.— 110.— P. 44–53.
9. Zhuk O. The stem structure of *Triticum aestivum* L. under different mineral nutrition // Modern Phytomorphology.— 2014.— 6.— P. 109–113.
10. Жук О. И. Ростовые процессы в зерновках пшеницы при различной обеспеченности растений минеральным питанием // Сборник статей Всероссийской научной конференции «Актуальность идей В. Н. Хитровой в исследовании биоразнообразия России», 18–20 сентября 2014 г.— Орел, 2014.— С. 183–186.

ZHUK O.I.

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

THE GROWTH PROCESSES IN WINTER WHEAT STEM UNDER DIFFERENT MINERAL NUTRITION

Aims. The aim of this work was to study the influence of mineral nutrition on stem tissue growth and winter wheat plants productivity. ***Methods.*** Winter wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars *'Mironivska 808'* and *'Favoritka'* were grown on mixture of soil and sand in pots with capacity of 7.5 kg. Optimal plant mineral nutrition was $N_{90}P_{90}K_{90}$, deficit supply was $N_{32}P_{32}K_{32}$. During vegetation period the length of stem and fourth and fifth internodes of winter wheat plants were measured. After maturing the internodes and ears length, quantity of grains in ear, and mass of 1000 grains were measured. Results were statistically analyzed with Microsoft Excel. ***Results.*** The growth of winter wheat internodes and stem was studied under optimal and deficit support of mineral nutrition main elements — nitrogen, phosphor and potassium. The most intensive growth of wheat was detected in booting phase but under the optimal nutrition it was continued to milky ripeness phase. Under mineral nutrition deficit internodes growth stopped in earing-flowering phase. The smallest internodes were formed in in wheat cv. *'Favoritka'*. ***Conclusions.*** It was shown that decreased supply of winter wheat plants of cultivars *'Mironivska 808'* and *'Favoritka'* by nitrogen, phosphorus and potassium during pot experiment inhibited growth stem, internodes and productivity of plants.

Keywords: *Triticum aestivum*, winter wheat, internode, stem, mineral nutrition.

УДК 57.042/57.044:57.017.3/581.5

КАЦАН В. А., ЮРКЕВИЧ Л. Н., ПОТОПАЛЬСЬКИЙ А. І.
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, e-mail: val_katsan@gmail.com

ІЗАТІЗОН ТА НАНОСРІБЛО ЗДАТНІ ІНДУКУВАТИ ЗМІНИ РОСТОВИХ ПРОЦЕСІВ ТА ПРОДУКТИВНОСТІ ВІВСА СОРТУ НЕЗЛАМНИЙ, ЯКІ ЗБЕРІГАЮТЬСЯ В НАСТУПНИХ ПОКОЛІННЯХ

Пошук препаратів нового покоління, здатних забезпечити високий рівень продуктивності рослин в умовах техногенного забруднення довкілля та змін клімату, є однією з найважливіших проблем сьогодення. Попередніми дослідженнями було виявлено підвищення врожайності зернових культур за дії препаратів Ізатізону та наносрібла на насіння перед висівом у ґрунт [1–4] та можливість збереження отриманих ефектів у 2-му поколінні [2–4]. Мета дослідження — вивчити вплив обробок насіння вівса сорту Незламний препаратами Ізатізону та наносрібла на його ростові процеси та зернову продуктивність упродовж 3-х поколінь.

Матеріали і методи

Насіння вівса сорту Незламний обробляли водними суспензіями препарату наносрібла SS1000 (**S**), розробленого в Інституті надтвердих матеріалів ім. М. В. Бакуля НАН України [5] і люб'язно наданого нам; S було використано окремо та в комплексі з розробленим у нашій лабораторії препаратом Ізатізон (**Iz**; розчин N-метил ізатин ß-тіосемікарбазону в композиції диметилсульфоксиду, **D**, та поліетиленгліколю ПЕГ400, **P** [6]); похідним Iz — Ізатітонієм **(It**; Iz+етоній), а також із розчинниками D та P і комплексом D+P (за співвідношення D/P такого ж, як у препараті Ізатізон). Рослини вирощували у відкритому ґрунті.

Інтенсивність ростових процесів оцінювали за довжиною стебла при виході в трубку (**Ls**) в 1-му та 2-му поколіннях; елементи зернової продуктивності: довжину головної волоті (**L**); кількість зерен у головній волоті (**G**); вагу зерна з головної волоті (**W**) та вагу 1000 зерен (**W1000**) досліджували упродовж 3-х поколінь. У дослідженнях використано мінімальну концентрацію препаратів, за якої виявляються бажані ефекти; таку концентрацію було підібрано попередніми дослідженнями, результати яких у цій роботі не наводяться.

Результати та обговорення

1. *Вплив препаратів на ріст та елементи зернової продуктивності вівса в 1-му поколінні*

У 1-му поколінні після обробок насіння препаратами виявлено стимулюючий вплив S на ростові процеси вівса: збільшення Ls на 11,9% ($P<0,001$, $n = 30$; рис. 1, а) У комплексі з Iz та D+P така дія S посилювалась у 1,8 та 1,6 разу ($P<0,001$).

Статистично достовірне зростання L ($P<0,001$; $P<0,01$; $P<0,05$; $n = 30$; рис. 2) спостерігали у всіх варіантах, крім P та D+P: на 7,1–14,8% — для препаратів та їх комплексів з максимальним приростом за дії Iz; на 5,7% — для D; на 6,9%, 8,4% та 12,2% — для P+S, D+S та D+P+S. Для S виявлено тенденцію до збільшення L, а статистично достовірне зростання L проявлялося тільки при застосуванні S із розчинниками, особливо з їх комплексом.

Статистично достовірне збільшення G (на 21,0–37,4%; $n = 30$; $P<0,001$; $P<0,01$; $P<0,02$; $P<0,05$) виявлено в усіх варіантах, крім P та D+P (рис. 2). Найвищі значення приросту G отримано при застосуванні Iz+S (на 37,4%; $P<0,001$) та D+P+S (на 32,8%; $P<0,001$).

Величина W статистично достовірно збільшувалася за дії препаратів It, Iz, S (на 15,4%; 32,3%; 20,0%; $P<0,05$; $P<0,001$; $P<0,02$; $n = 30$; рис. 2), також розчинника D (на 22,3%; $n = 30$; $P<0,01$). Найефективнішим виявився препарат Iz (підвищення W у порівнянні з контролем на 32,3%), а комплекс розчинників D+P поліпшував стимулюючу дію S на 35% до величини 27,7% порівняно з контролем.

На вагу 1000 зерен (рис. 2) препарати не виявили статистично достовірного впливу, за винятком D та D+P+S, де спостерігали статистично достовірне зниження W1000 (на 9,6% та 9,7%; $n = 30$; $P<0,05$) при значному зменшенні варіації цього параметра, що пов'язано з появою значної кількості дрібніших та менш виповнених зерен.

© КАЦАН В. А., ЮРКЕВИЧ Л. Н., ПОТОПАЛЬСЬКИЙ А. І.

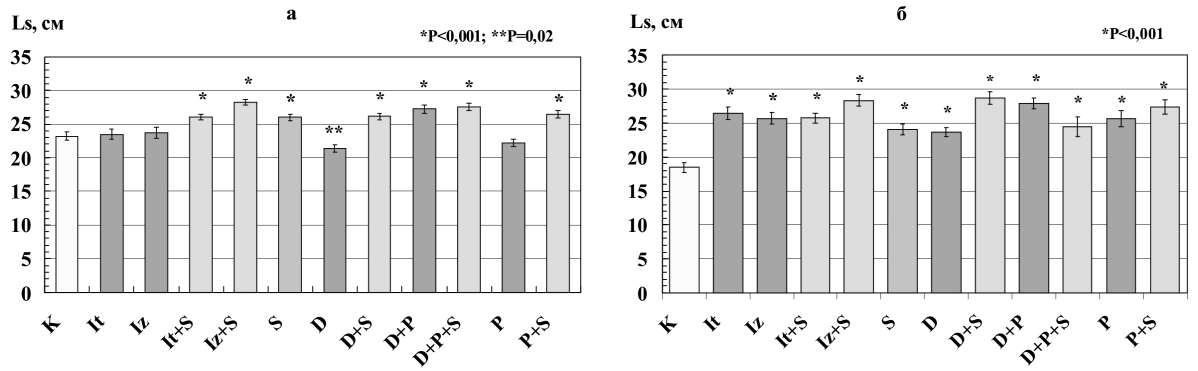


Рис. 1. Довжина стебла вівса сорту Незламний на стадії виходу в трубку (45 доба після посіву) в 1-му (**а**) та 2-му (**б**) поколіннях після обробок його насіння препаратами Ізатізону, Ізатітонію, розчинниками, що є складниками Ізатізону (ДМСО та ПЕГ), наносрібла та їх комплексами. По осі х — варіанти досліду; К — контроль, Iz — Ізатізон, It — Ізатітоній, S — наносрібло SS1000, D — ДМСО, P — ПЕГ400

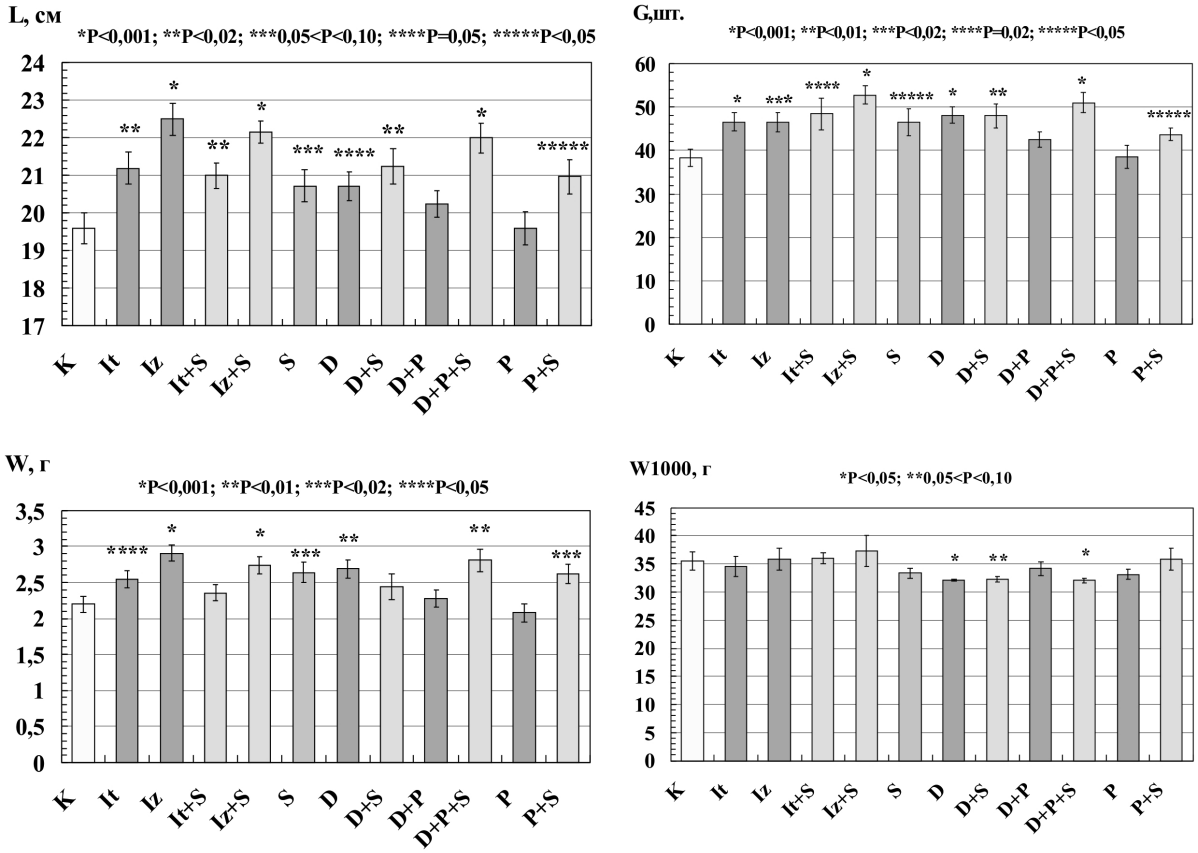


Рис. 2. Елементи зернової продуктивності вівса сорту Незламний (довжина головної волоті, L; кількість зерен у ній, G; вага зерна з головної волоті, W, та вага 1000 зерен, W1000) у 1-му поколінні після обробок його насіння препаратами Ізатізону, розчинниками, що є складниками Ізатізону (ДМСО та ПЕГ), Ізатітонію і наносрібла SS1000 та їх комплексами. Розшифрування варіантів досліду по осі х — як для рис. 1

Отже, в 1-му поколінні вівса після обробки насіння препаратами S спостерігали стимуляцію ростових процесів на стадії виходу в трубку. Препарати Ізатізону самі по собі не виявляли стимулюючого ефекту на ріст стебла, але Iz, використаний у комплексі з наносріблом, значно поліпшував стимулюючу дію останнього, і така дія, скоріше за все, обумовлена комплексом розчинників, які є складниками Iz і можуть сприяти кращому проникненню часточок наносрібла в тканини зародків насіння. Виявлено позитивний вплив Iz, It та S на такі елементи продуктив-

ності, як L, G та W. Збільшення врожаю зерна з волоті у всіх випадках обумовлювалося зростанням кількості зерен, а не їх ваги. Препарат Iz виявив найбільший стимулюючий ефект на довжину головної волоті та врожай зерна з неї.

2. *Вплив препаратів на ріст та елементи зернової продуктивності вівса в 2-му поколінні*

У 2-му поколінні після обробок насіння вівса препаратами, на відміну від 1-го покоління, інтенсивність ростових процесів при виході в трубку була значно вищою (збільшення Ls на 28,0–55,4 %; $P<0,001$; $n \geq 30$), і такий ефект спостерігали в усіх дослідних варіантах (рис. 1, б).

Зростання параметра L було виявлено у варіантах It, It+S, Iz+S (на 8,3–9,4 %; $P<0,001$, $n = 30$); P, P+S, D+S (на 5,9–12,3 %; $P<0,001$; $P<0,01$; $n = 30$); найвищий приріст L (12,3 %) спостерігали для D+S (рис. 3). На відміну від 1-го покоління (рис. 2), у 2-му поколінні L збільшувалася також за дії P та залишалася на рівні контролю — за використання Iz, D, D+P+S.

Величина G у 2-му поколінні зростала в усіх варінтах, крім D та D+P (рис. 3; $P<0,001$, $n = 30$); для препаратів It, S, Iz — на 12,1–20,8 %; для P та D+P+S — на 20,6 % та 20,8 %; з найвищими значеннями — для It+S, P+S (на 28,6; 29,1 %). Навідміну від 1-го покоління (рис. 2), в 2-му поколінні виявлено зростання G за дії P та відсутність ефекту — за дії D.

У 2-му поколінні спостерігали збільшення параметра W у варіанті, де було використано Iz (на 12,5 %; $P<0,02$; $n = 30$; рис. 3). Зниження параметра виявлено у варіантах D+P, D+P+S. Стимулююча дія S проявлялася в комплексі з одним із розчинників: збільшення W на 23,6 % — для D+S та на 22,0 % — для P+S ($P<0,001$ та $P<0,01$; $n = 30$). У 1-му поколінні, на відміну від 2-го покоління, зростання W спостерігали під впливом розчинника D та усіх 3-х препаратів (It, S, Iz; рис. 2) з максимальними значеннями для Iz (на 32,3 %).

Найбільших змін у 2-му поколінні зазнав параметр W1000 — його статистично достовірне збільшення виявлено в усіх варіантах, крім P (рис. 3): для Iz, It, S — на 9,6–13,1 % ($P<0,001$, $n = 10$); для розчинників D, D+P — на 13,0–7,1 % ($P<0,001$; $P<0,01$, $n = 10$); для It+S, Iz+S — на 15,6–18,5 % ($P<0,001$, $n = 10$); для P+S, D+P+S, D+S — на 7,14–16,9 % ($P<0,001$; $P<0,01$, $n = 10$).

Отже, в 2-му поколінні після обробки насіння вівса препаратами у ряді варіантів спостерігали збереження позитивних змін ростових характеристик та елементів зернової продуктивності, отриманих у 1-му поколінні, поряд із появою таких ознак у варіантах, де в 1-му поколінні вони не проявлялися. Заслуговує на увагу поява нової ознаки — збільшення ваги зерен, тому в 2-му поколінні зростання врожайності зерна з волоті зумовлене як збільшенням кількості зерен, так і їхньої ваги.

3. *Вплив препаратів на елементи зернової продуктивності вівса в 3-му поколінні*

У 3-му поколінні варто зазначити появу ознаки збільшення L у варіанті S (на 15,5 %; $P<0,001$, $n = 25$; рис. 4) та збереження цієї ознаки — у варіанті Iz (на 35,6 %; $P<0,001$, $n = 25$). У цих же варіантах, як і в 1-му та 2-му поколіннях, було виявлено збереження приросту G: для S — на 14,6 % ($P<0,05$, $n = 25$); для Iz — на 24,2 % ($P<0,02$, $n = 25$). Для Iz в 3-му поколінні, як і в перших 2-х поколіннях, спостерігали приріст W (на 25,1 %; $P<0,02$, $n = 25$), в той час як за дії S приріст W виявлявся менш стабільно — тільки в 1-му та 3-му поколіннях. Ознака приросту W1000, яка з'явилася в більшості варіантів досліду в 2-му поколінні (рис. 3), у 3-му поколінні зберігалася тільки за дії It, S, Iz+S (на 3,2–4,9 %; $P<0,02$; $P<0,05$; $P<0,01$; $n = 25$).

Отримані дані є свідченням того, що препарати Ізатізону та наносрібла за обраних умов досліду здатні індукувати у вівса позитивні зміни ростових процесів та елементів зернової продуктивності, які можуть зберігатися в наступних поколіннях. Характер таких змін, поряд зі змінами вмісту та співвідношень фотосинтетичних пігментів, про які повідомлялося раніше [2–4], дають можливість зробити припущення, що як наносрібло, так і деякі сполуки, що є складниками Ізатізону, можуть слугувати сигнальними молекулами для активації адаптаційних перебудов метаболізму. З огляду на це варто зазначити, що діюче начало Ізатізону — N-метил ізатин ß-тіосемікарбазон — є похідним ізатину, універсального месенджера стресових сигнальних шляхів [7] та відомого стимулятора росту рослин, а наносрібло здатне виявляти досить широкий спектр біологічної дії, що обумовлюється індукуванням оксидативного стресу і залежить не тільки від концентрації та тривалості його дії, від розмірів та форми його часточок, їх поверхневого заряду, енергії, сольватації, але й від типу клітин та біомолекул, які стають його мішенями [8].

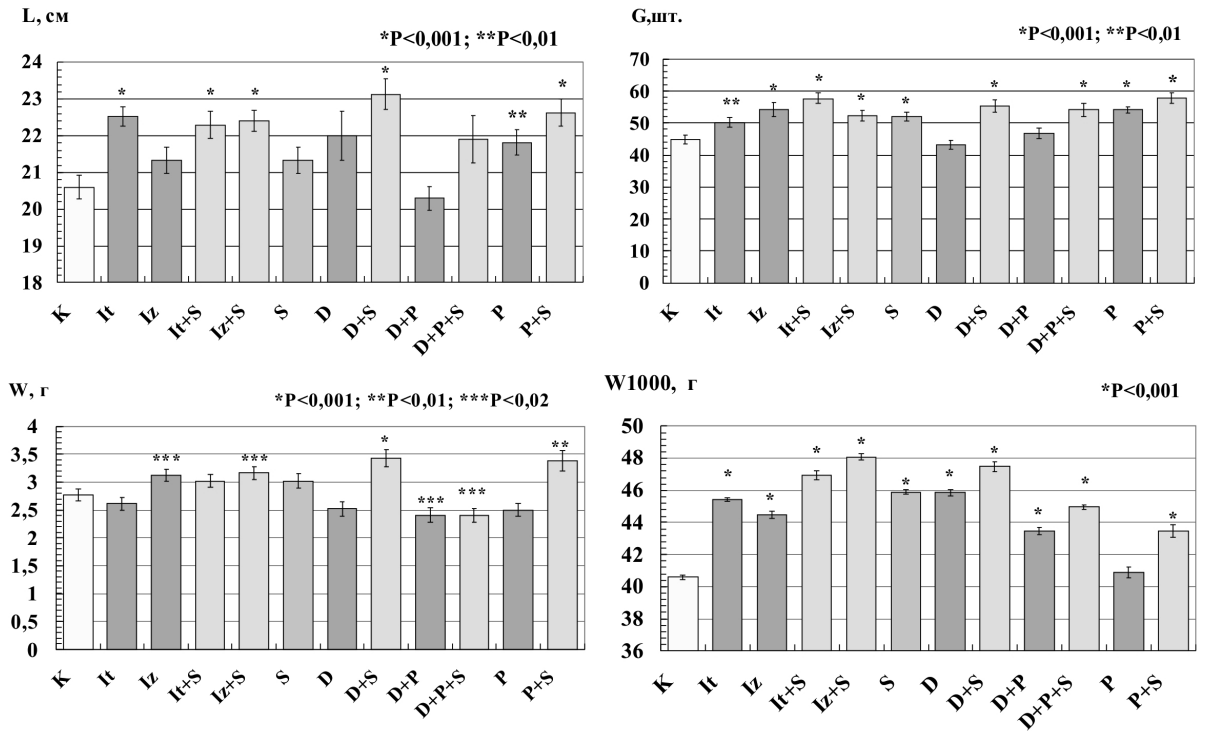


Рис. 3. Елементи зернової продуктивності вівса сорту Незламний у 2-му поколінні після обробок насіння препаратами Ізатізону, Ізатітонію та наносрібла, розчинниками ДМСО та ПЕГ400. Розшифрування варіантів досліду по осі х — як для рис. 1

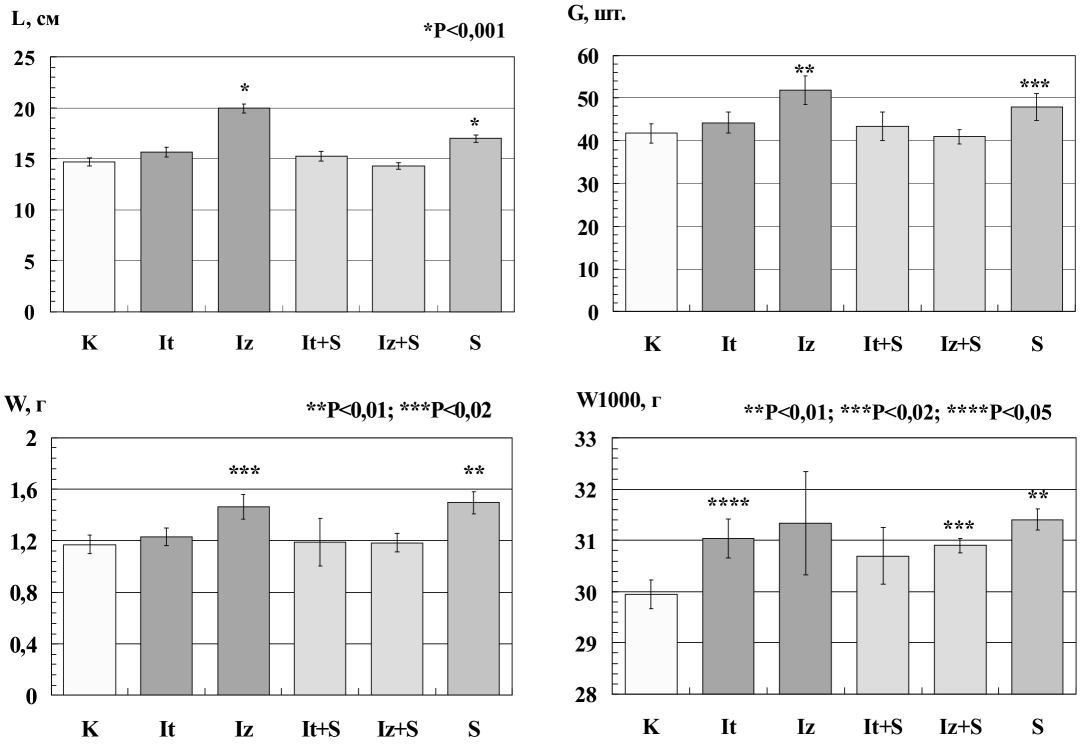


Рис. 4. Елементи зернової продуктивності вівса сорту Незламний у 3-му поколінні після обробок насіння препаратами Ізатізону, Ізатітонію та наносрібла. Розшифрування варіантів досліду по осі х — як для рис. 1

Висновки

1. Для препарату наносрібла SS1000 в 1-му поколінні після обробок насіння виявлено стимулюючий ефект на ростові процеси вівса при вигоні стебла, і цей ефект збільшувався при застосуванні комплексу наносрібла з Ізатізоном та розчинниками, що є його складниками.

2. У 1-му поколінні виявлено також позитивний вплив препаратів SS1000, Ізатітонію та Ізатізону на ріст та розвиток волотей — збільшення врожайності завдяки збільшенню кількості зерен у них.

3. Комплекс розчинників, які є складниками Ізатізону, як і сам Ізатізон, значною мірою посилював стимулюючу дію наносрібла на врожайність волотей у 1-му поколінні, сприяючи збільшенню довжини волотей та кількості зерен у них.

4. У 2-му поколінні вівса виявлено збереження деяких ознак, притаманних 1-му поколінню, та появу багатьох нових ознак як щодо росту, так і продуктивності.

5. У 2-му поколінні після обробок насіння вівса препаратами, на відміну від 1-го покоління, інтенсивність ростових процесів при виході в трубку була значно вищою, і такий ефект спостерігали для всіх досліджених препаратів.

6. У 2-му поколінні спостерігали збереження приросту кількості зерен у волоті за дії Ізатізону, Ізатітонію та SS1000. Збільшення ваги зерна з волоті зберігалося в 2-му поколінні тільки в разі застосування Ізатізону, також наносрібла разом із розчинниками.

7. У зв'язку з появою нової ознаки — збільшення ваги зерен — приріст врожаю зерна з волоті під впливом обробок насіння вівса препаратами в 2-му поколінні зумовлювався як зростанням кількості зерен, так і їхньої ваги.

8. Збереження ефекту збільшення основних елементів продуктивності вівса — довжини головної волоті, кількості зерен у ній та їх ваги — найбільш стабільно проявлялося упродовж 3-х поколінь за використання Ізатізону.

ЛІТЕРАТУРА

1. Potopalsky A. I., Yurkevich L. N., Katsan V. A. Use of Isatizon for Improvement of Plant Adaptability // Proceedings of the Interdisciplinary Scientific Conference «Adaptation Strategies of Living Systems». Novy Svet, AR Crimea, Ukraine, June 11–16, 2012.— P. 309–310.
2. Potopalsky A. I., Yurkevich L. N., Katsan V. A. Influence of Izatison and Nanosilver Preparations on the Growth, the Productivity Elements and on the Photosynthetic Pigments Content of the Oat Plants Cultivar Nezlamny. The Second Generation after Treatment // Proceedings of the Interdisciplinary Scientific Conference «Adaptation Strategies of Living Systems». Novy Svet, AR Krimea, Ukraine, May 12–17.— 2014.— P. 44–45.
3. Katsan V. A., Yurkevich L. N., Potopalsky A. I. Nanosilver and Izatison may Improve Adaptability and Productivity of the Oat Plant Cultivar Nezlamny // Abstract Book of Summer School and International Research and Practice Conference: «Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2014)». 23–30 August.— Yaremche-Lviv, 2014.— P. 543.
4. Юркевич Л. Н., Кацан В. А., Потопальський А. І. Ізатізон та Наносрібло впливають на ріст та розвиток рослин вівса, їхню продуктивність та вміст фотосинтетичних пігментів // Матеріали XI Українського біохімічного конгресу, 6–10 жовтня 2014 р., м. Київ.— Ukrainian Biochemical Journal.— 86, N 5, (Supplement 2).— P. 168–169.
5. Кістерська Л. Д., Співак М. Я., Перевертайло В. М., Лазаренко Л. М. та ін. Нанодисперсні суспензії срібла та їх противірусні властивості // Наноструктурное материаловедение.— 2010.— № 3.— С. 62–69.
6. Заїка Л. А., Болсунова О. І., Потопальський А. І. Противірусні, протипухлинні та імуномодулюючі властивості лікувального препарату ІЗАТІЗОН.— К.: Колобіг, 2010.— 212 с.
7. MedvedevA., Buneeva O., Glover V. Biological Targets for Isatin and its Analogues: Implication for Therapy // Biologics: Targets&Therapy.— 2007.— 1, № 2.— P. 151–162.
8. Bartlomiejczyk T., Lankoff A., Kruszewski M., Szumiel I. Silver Nanoparticles — Allies or Adversaries? // Annals of Agricultural and Environmental Medicine.— 2013.— 20, № 1.— P. 48–54.

KATSAN V.A., YURKEVICH L.N., POTOPALSKY A.I.

Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: val.katsan@gmail.com

IZATISON AND NANOSILVER ARE ABLE TO INDUCE THE CHANGES IN GROWTH AND PRODUCTIVITY OF OAT PLANT CULTIVAR NEZLAMNY PERSISTING IN THE NEXT GENERATIONS

Aims. The aim of this study is the investigations of the influence of the preparations Izatizone (**Iz**), Izatitony (**It;** Iz+etony) and the nanosilver SS1000 preparation (**S**) on the growth of oat cultivar Nezlamny and on the elements of its grain

productivity over three generations. ***Methods.*** Iz and It preparations were designed in our laboratory; S was designed in Institute for Superhard materials V. M. Bakul NAS of Ukraine and was kindly given to us. The oat seeds were treated by the water suspensions of the preparations and the solvents DMSO (**D**) and PEG400 (**P**), to be the constituents of Iz, at the concentrations selected in previous experiments. The plants were grown on the little plots of land; the plant growth intensity was estimated by the stem length at the booting; the analysis of the productivity elements (the primary panicle length, **L**; the grains number in the primary panicle, **G**; the grains weight from the primary panicle, **W**; the weight of 1000 grains, **W1000**) was performed after gather in the harvest over 3 generations after treatment. ***Results.*** The stimulating effect of **S** on the plant growth at the booting was revealed in the first plant generation; such effect enhanced, when S was used in the complex with Iz. The positive effect of Iz, It and S on the panicles growth and development was observed. The crop yield per panicles increased, when Iz**,** It and S were used, caused by the increase of G. In the second generation the increment persisted of G in the variants Iz, It and S and of W — in the variants Iz and P+S, and the increase exhibited of W1000 in the majority variants of experiment. The positive changes of oat productivity were persisting in the third generation also, and the most stable maintenance of L, G and W increase over 3 generations was observed for Iz. ***Conclusions.*** Izatison and nanosilver preparations, used under specified experimental conditions, are able to induce the oat growth promoting and its grain productivity improvement, persisting in the next generations.

Keywords: Izatison, nanosilver, oat, growth, analysis of productivity elements.

УДК 633.11″324″:631.527:631.524.85

КИРИЛЕНКО В. В., ГУМЕНЮК О. В., ДЕРГАЧОВ О. Л., ДУБОВИК Н. С., БЛИЗНЮК Б. В., ХОМЕНКО С. О.

Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла НААН України,
Україна, 08853, с. Центральне, Миронівський р-н, Київська обл., e-mail: verakurulenko@ukr.net

МЕТОДИ ПІДВИЩЕННЯ МОРОЗО-, ЗИМОСТІЙКОСТІ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) В УМОВАХ ЛІСОСТЕПУ УКРАЇНИ

Актуальним для держави є стабільне збільшення виробництва сільськогосподарської продукції, у тому числі пшениці озимої, незалежно від несприятливих умов клімату. Вирішення цієї проблеми потребує глибокого знання біологічних особливостей рослин, їх стійкості до екстремальних умов середовища, у тому числі до дії холоду та морозів. За даними В. В. Моргуна, існує помітний зв'язок між еколого-географічними умовами регіону поширення рослин та генетично обумовленим рівнем їх стійкості до екстремальних факторів [1].

Стреси, які обумовлені дією несприятливих умов зовнішнього середовища, особливо низькою температурою та морозами, є одним із основних факторів, що обмежують продуктивність озимих злаків [2–4]. Різкі коливання температури стримують потенціальні можливості генотипів, знижують продуктивність пшениці, впливають на якість продукції. Проблема стійкості рослин до екстремальних температур є актуальною для України, оскільки загибель від морозів є основною причиною зрідження, а в окремі роки і повного вимерзання посівів на значних площах. Це призводить до різкого падіння урожайності зернових. Зимостійкість є однією з необхідних складових адаптивності сортів пшениці озимої [5–9]. Підвищення врожайності сортів озимої пшениці у ході селекційного процесу часто супроводжується зниженням зимостійкості, однак поєднання в одному генотипі зимостійкості з продуктивністю й іншими корисними ознаками все-таки можливе [10–16].

За даними академіка В. В. Моргуна, селекція пшениці на стійкість до стресових факторів середовища може стати новим етапом генетичного поліпшення культури. До таких досліджень слід віднести методичні рекомендації використання паперових рулонів [17]. Створення сортів з максимально вираженою морозостійкістю і продуктивністю — завдання досить складне. Низькі температури різного рівня (–12,5, –14, –16, –18, –20 °С) при проморожуванні рослин слугують стресовим фактором, тобто фоном, що дає можливість оцінити селекційний матеріал за морозостійкістю. Окрім оцінки за морозостійкістю, необхідним є проведення доборів морозостійких форм із гібридних популяцій з наступним дорощуванням їх у польових умовах. У селекційних програмах на зимостійкість у лабораторії селекції пшениці озимої Миронівського інституту пшениці імені В. М. Ремесла (МІП) такий напрямок є одним із головних.

Мета завдання — провести добори у штучних умовах за морозостійкістю серед гібридів ранніх поколінь (F_2–F_4) пшениці озимої та перевірити їх результативність у більш пізніх поколіннях (F_5–F_6).

Матеріали і методи

Як матеріал для досліджень щорічно (2010–2015 рр.) використовується більше 100 гібридних та гібридно-мутантних популяцій F_2–F_4 на основі використання удосконалених методів проморожування проростків за Г. А. Самигіним (1980 р.) [18] та модифікованим у МІП методом паперових рулонів (1998 р.) [17].

Ці методи визначення відносної морозостійкості сортів пшениці озимої в умовах контрольованого режиму були нами удосконалені та пристосовані для проведення добору морозостійкого матеріалу з гібридних та гібридно-мутантних популяцій. Методи полягають у загартовуванні і проморожуванні пророслих до певної міри насінин з визначенням відсотка їх життєздатності при температурах, близьких до критичних, та наступному дорощуванні живих насінин у польових умовах (рис.).

Робота займає близько чотирьох тижнів і проводиться за такими етапами: 1) пророщування насіння і вибірка проростків для подальшого їх загартовування; 2) проведення першої та другої фаз загартовування; 3) випробування загартованих проростків на стійкість до впливу темпера-

© КИРИЛЕНКО В. В., ГУМЕНЮК О. В., ДЕРГАЧОВ О. Л., ДУБОВИК Н. С., БЛИЗНЮК Б. В., ХОМЕНКО С. О.

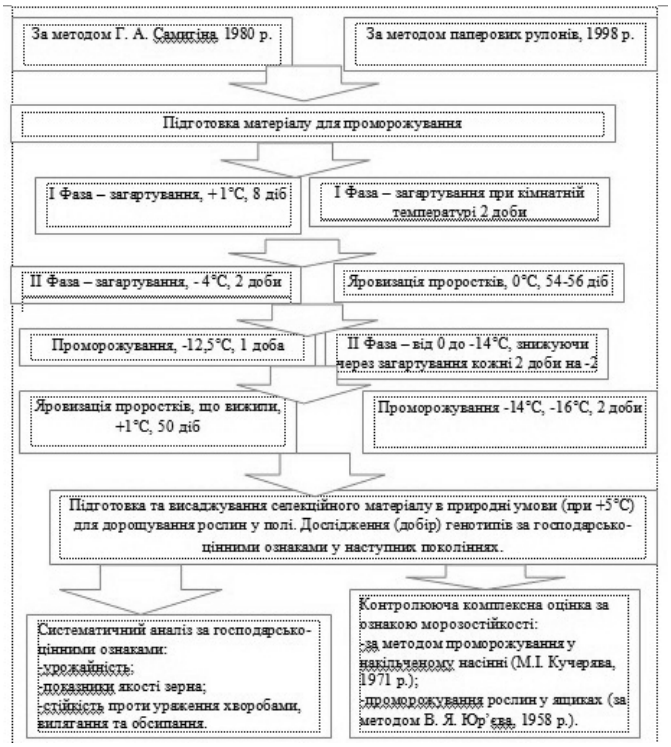


Рис. Схема оцінки та добору морозостійкого матеріалу з гібридних та гібридно-мутантних популяцій пшениці м'якої озимої (МІП, 2010–2014 рр.)

тури, яка поступово знижується до рівня критичної; 4) відтавання досліджуваних зразків; 5) визначення відсотка проростків, які вижили (після їх відрощування); 6) дорощування рослин у полі з використанням системного аналізу селекційного матеріалу за господарсько важливими ознаками. Проморожування проростків озимої пшениці проводили у спеціально пристосованих камерах ЛВН-200 Г. Контроль морозостійкості відібраних з гібридних популяцій пшениці озимої у F_5–F_6 визначали за допомогою методів проморожування проростків [19, 20].

Результати та обговорення

Визначення морозостійкості рослин проводилося у середині зимівлі (січень, лютий), оскільки імовірність виділення генотипів, які переносять понижені температури (морози) за рахунок переохолодження (чи репарації і інших метаболічних активних механізмів) збільшується [21]. З 2010 р. проводили оцінку морозостійкості та добір селекційного матеріалу пшениці озимої у лабораторних умовах за методом Г. В. Самигіна та модифікованим методом паперових рулонів. За роки дослідження, використовуючи дані методи, було проморожено та оцінено 408 комбінацій гібридного походження F_2–F_4 та 202 гібридно-мутантного походження F_5M_4. Рослини, що вижили при проморожуванні, висаджено у польових умовах. Після отримання потомства проводили дослідження у польових умовах з метою відбору кращих за продуктивністю рослин. Частину із морозостійких комбінацій (гібридів), що не відповідали селекційним вимогам, вибраковували, а інші — досліджували у послідуючих ланках селекційного процесу.

Лабораторні методи оцінки морозостійкості пшениці озимої передбачають ступеневе проморожування пророслого насіння рослин з подальшим обрахунком відсотка та рівня їх життєздатності у порівнянні з сортом-класифікатором Миронівська 808 (табл. 1). Ступінь морозостійкості дає можливість детально диференціювати селекційний матеріал ($МЗС_1$) за рівнем морозостійкості з виділенням при цьому трьох груп: слабостійких — < 50 % живих рослин; середньостійких — 51–80 %; морозостійких — 81–100 %.

За роки дослідження з використанням методів Г. В. Самигіна та паперових рулонів виявили різне варіювання морозостійкості, яка коливалася від 0 до 97,2 % життєздатних рослин. До групи слабоморостійких віднесено 43,8 % гібридних комбінацій, до середньостійких — 31,3 %; морозостійких — 24,9 %. У той час рівень сорту стандарту варіював від 48 % до 94,7 %.

Високий рівень морозостійкості мали генотипи, у родоводі яких залучені зимостійкі сорти Володарка, Подолянка, Колумбія, Переяславка (ІФРіГ, МІП), Царівна (Білоцерківська ДС), Заможність, Дальницька (СГІ), Ювілейна 100, Краснодарка (Росія), Миронівська 28, Миронівська 29, Миронівська остиста, Колос Миронівщини (МІП), ДМ 61–72 (Болгарія), Catren (Румунія) (табл. 2). Ранговий аналіз морозостійкості показав, що нові генотипи пшениці озимої перевищують суттєво стандарт-класифікатор Миронівська 808.

Перші місця за сумою рангів посідають генотипи Володарка/Дальницька, (Подолянка/Етюд)/Ювілейна 100, Господиня/Lumai 13, Царівна/ТАМ 201. Ці форми пшениці відзначаються високими рівнями стабільності за 4-ма методами проморожування. Отримані дані підтверджують доцільність проморожування гібридів пшениці озимої F_2–F_4, F_3M_2 з метою отримання прогнозуючої інформації стосовно наявності досліджуваної ознаки у них. Крім того, на основі добору

Таблиця 1

Аналіз селекційного матеріалу пшениці м'якої озимої за відсотком життєздатних рослин

Рік	t, °C	Групи за відсотком життєздатних рослин, %					
		<50		51–80		81–100	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%
2010/11	–12,5[1]	72	87,8	6	7,3	4	4,9
	–14[2]	22	26,8	38	46,4	22	26,8
	–16[2]	17	20,7	45	54,9	20	24,4
2011/12	–12,5[1]	3	5,8	6	11,6	43	82,6
	–14[2]	5	9,6	25	48,1	22	42,3
	–16[2]	9	17,3	15	28,8	28	53,9
2012/13	–12,5[1]	33	89,2	2	5,4	2	5,4
	–14[2]	10	27,0	24	64,9	3	8,1
	–16[2]	16	43,2	20	54,1	1	2,7
2013/14	–12,5[1]	69	97,2	2	2,8	0	0

Примітки: [1] — за методом Г. В. Самигіна; [2] — паперових рулонів.

Таблиця 2

Стійкість генотипів пшениці м'якої озимої до низьких температур у штучних умовах (життєздатність рослин, %)

Гібридна комбінація, сорт	Рік					
	2011				2014	
	проморозка рослин за t, °C					
	–12,5[1]	–14[2]	–16[2]	–14[3]	–18[4]	–20[4]
Володарка/Дальницька	2,5	58	80	66,7	84	75
(Подолянка/Етюд)/Ювілейна 100	4	46	58	58,3	83	70
Господиня/Lumai 13	2,8	58	98	15,8	70	81
Царівна/ТАМ 201	4,3	52	58	36,8	70	76
ДМ 61–72/Краснодарка	4,6	74	60	0	79	59
Catren/Колумбія	3,9	60	80	1,1	81	56
ЛЮТ 53339/МИР 28	3,6	30	24	58,9	72	84
(Переяславка/ЕР E.g.389/06)/Переяславка	5,2	52	58	4,2	88	52
ЕР 36222/МИР остиста/ЛЮТ 2855	4,3	64	78	4,2	39	68
BARJANA/Дальницька	4,3	28	14	1,1	78	78
No-LABEL/ЛЮТ C.h.78/07	3,4	56	60	84,2	35	32
Білосніжка/Lumai 13	2,1	8	34	78,9	77	61
МИР 29/МИР 28 ДМС 0,01%	3,7	62	66	12,6	18	41
Фортуна/Колос МИР	3,7	52	24	12,5	32	73
Есаул/Вдала	2,4	42	46	29,2	44	64
(Виза/Монолог)/МИР остиста	3,6	20	44	1,1	52	76
Дар зерноградa/Деметра	1,3	62	60	8,3	17	75
Паляниця/ТХ 95 А 3091	1,9	10	22	92,6	58	59
Заможність/ТХ 95 А 3091	2	64	48	5,3	56	44
WISDOM/МИР ранньостигла	3	56	20	4,2	64	50
Унікум/ТАМ 107	1,9	52	38	10,5	53	51
Миронівська 808 (МИР)	2,1	52	48	76,8	58	70
x	3,3	47,9	51	27,9	59,5	63,1
max	5,2	74	98	92,6	88	84
min	1,3	8	14	0	17	32

Примітки: [1] — метод Самигіна; [2] — метод паперових рулонів; [3] — метод проморожування у накільченому насінні; [4] — метод Юр'єва.

морозостійких форм у подальшому формуються генотипи з комплексом господарсько-цінних ознак, які представляють практичну цінність для селекції.

Висновки

Проморожування рослин популяцій F_2–F_4 пшениці озимої дає можливість виділити перспективні за ознакою морозостійкості комбінації схрещування, а також відібрати з них лінії з підвищеним рівнем вказаної ознаки. Отримані дані підтверджують доцільність проморожування гібридів пшениці озимої F_2–F_4, F_3M_2 з метою отримання прогнозуючої інформації стосовно наявності досліджуваної ознаки у них. Крім того, на основі добору морозостійких форм у подальшому формуються генотипи з комплексом господарсько-цінних ознак, які представляють практичну цінність для селекції.

Оптимальним методом визначення оцінки та добору морозостійких генотипів пшениці виявилися методи паперових рулонів та Г. В. Самигіна.

Для достовірного підтвердження рівня морозостійкості необхідно використовувати основу методу В. Я. Юр'єва.

ЛІТЕРАТУРА

1. Моргун В. В. Мутационная селекция пшеницы.— К.: Наук. думка, 1995.— 626 с.
2. Проценко Д. Ф. Физиология морозостойких сортов озимых культур // Изд.-во Киевского университета.— К., 1969.— 260 с.
3. Трунова Т. И. Физиологические и биохимические основы адаптации растений к морозу // С-х. биология.— 1984.— № 6.— С. 3–10.
4. Мусич В. Н. Физиологические аспекты селекции озимой пшеницы на морозостойкость // Физиологические аспекты продуктивности и устойчивости озимой пшеницы к стрессовым условиям // Сб. науч. трудов ВСГИ.— Одесса, 1984.— С. 68–77.
5. Лукьяненко П. П. Методы и результаты селекции озимой пшеницы // Избр. тр.— М.: Колос, 1973.— С. 254–287.
6. Ремесло В. Н. Методы и результаты селекции зимостойких высокопродуктивных сортов озимой пшеницы // Селекция, сем-во и сорт. агротех. пшеницы // Избр. тр.— М.: Колос, 1977.— С. 293–300.
7. Ковтун В. И. Селекция высокоадаптивных сортов озимой мягкой пшеницы и совершенствование элементов технологии их возделывания для засушливых условий юга России: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.05.— Краснодар, 2001.— 55 с.
8. Бурденюк-Тарасевич Л. А. Методи селекції сортів озимої м'якої пшениці з підвищеною адаптивністю до умов Лісостепу і Полісся України: автореф. дис. ... д-ра с.-г. наук: 06.01.05.— К., 2001.— 44 с.
9. Литвиненко М. А. Теоретичні основи та методи селекції озимої м'якої пшениці на підвищення адаптивного потенціалу для умов Степу України: автореф. дис. ... д-ра с.-г. наук: 06.01.05.— К., 2001.— 46 с.
10. Кириченко Ф. Г. Результаты селекции озимой мягкой пшеницы // Науч. тр. ВСГИ.— Одесса, 1962.— С. 19–35.
11. Ласкин В. П. К вопросу о методах выведения высокозимостойких сортов сильной озимой пшеницы // Мат. науч. конф. с.-х. опытных учреждений зоны Поволжья.— Саратов, 1968.— С. 159–161.
12. Орлюк А. П. Некоторые генетические аспекты селекции озимой пшеницы на зимостойкость // Методы и приемы повыш. зимостойкости оз. зерн. к-р: Науч. тр. ВАСХНИЛ.— М.: Колос, 1975.— С. 125–130.
13. Ремесло В. Н. Селекция, семеноводство и сортовая агротехника пшеницы // Избр. тр.— М.: Колос, 1977.— 352 с.
14. Лелли Я. Селекция пшеницы: Теория и практика // Пер. с англ. Н. Б. Ронис.— М.: Колос, 1980.— 384 с.
15. Сухоруков А. Ф. Наследование зимостойкости гибридами первого поколения от скрещивания высокозимостойких, высокорослых и полукарликовых сортов озимой пшеницы // Селекция и сем-во полевых культур в Среднем Поволжье.— М., 1985.— С. 46–48.
16. Власенко В. А., Коломієць Л. А. Селекція пшениці м'якої озимої на підвищення загальної адаптивності // Бюл. Ін-ту зерн. госп-ва.— Дніпропетровськ, 2008.— № 5.— С. 83–86.
17. Усовершенствованный способ оценки и отбора морозостойких растений селекционного материала озимых зерновых культур (Поиски и решения) // Под ред. Л. А. Животкова.— К., 1998.— 39 с.
18. Самыгин Г. А. Промораживание проросших семян озимой пшеницы как метод оценки относительной морозостойкости // Сельскохозяйственная биология.— 1980.— XV, № 6.— С. 935–938.
19. Кучерявая М. И. Метод определения морозостойкости озимых зерновых культур путем закаливания семян // Селекция и семеноводство.— К., 1971.— Вып. 18.— С. 8–13.
20. Юрьев В. Я. Методы оценки селекционного материала // Общая селекция и семеноводство полевых культур.— М., 1958.— С. 125–199.
21. Федулов Ю. П., Пучков Ю. М., Беликова Н. М., Набоков Г. Д. Изменение структуры признака морозоустойчивости озимой пшеницы в течение перезимовки // Доклады ВАСХНИЛ.— 1990.— № 6.— С. 2–6.

KYRYLENKO V.V., GUMENYUK O.V., DERGACHOV O.L., DUBOVYK N.S., BLYZNYUK B.V., KHOMENKO S.O.

The V.M. Remeslo Myronivka Institute of Wheat of NAAS of Ukraine,
Ukraine, 08853, Tsentral'ne village, Myronivka district, Kyiv region, e-mail: verakurulenko@ukr.net

METHODS TO IMPROVE FROST RESISTANCE OF WINTER WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) IN CONDITIONS OF FOREST-STEPPE OF UKRAINE

***Aim*.** To carry through selections in artificial conditions by frost resistance among early generations of winter wheat hybrids (F_2–F_4) and to verify their effectiveness in later generations (F_5–F_6). ***Methods*.** As the material for research annually (2010–2014) more than 100 hybrid and hybrid-mutant populations F_2–F_4 through the use of improved methods of freezing seedlings by G.A. Samygin and modified at the Myronivka Institute of Wheat method of paper roll are used. The methods consists in hardening and freezing germinated to some extent seeds by definition viability percent at temperatures close to the critical and subsequent rearing survive seeds in the field. Control of frost resistance of selected from hybrid populations genotypes in F_5–F_6 was determined using methods of freezing seedlings by methods according to V. Ya. Yuryev and M.I. Kucheryava. ***Results*.** Laboratory methods of evaluation of winter wheat frost resistance provide step-wise freezing germinated plant seeds followed by calculation of percentage and their viability compared with variety-classifier Myronivs'ka 808. The degree of frost resistance enables to differentiate detaily breeding material by level of frost resistance with identification three groups: low — < 50% survive plants; medium — 51–80%; frost resistant — 81–100%. Genotypes with winter-hardy varieties involved in their pedigrees had high level of frost resistance. Analysis of frost resistence has shown that new genotypes of winter wheat appreciably exceed standard classifier Myronivs'ka 808. For the sum of ranks genotypes: Volodarka / Dal'nyts'ka, (Podolianka / Etiud) / Yuvileina 100, Hospodynia / Lumai 13, Tsarivna / TAM 201 occupy top places. These winter wheat genotypes are remarkable for high levels of stability for 4 methods of freezing. ***Conclusions*.** The data obtained confirm expediency of freezing F_2–F_4hybrids of winter wheats to obtain predictive information concerning to availability of studied traits. In addition, based on selection of frost resistance forms subsequently genotypes with a set of economically valuable traits representing practical value for breeding are created.

Keywords: soft winter wheat, frost resistance, selection, freezing.

УДК 633.63.631.52

КОРНЄЄВА М. О, МАЦУК М. Б., ЧЕМЕРИС Л. М.
Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України,
Україна, 03141, м. Київ, вул. Клінічна, 25, e-mail: mira31@ukr.net

ВПЛИВ ГЕТЕРОГЕННОСТІ ТЕТРАПЛОЇДНОГО ЗАПИЛЮВАЧА НА ПРОЯВ ГОСПОДАРСЬКО-ЦІННИХ ОЗНАК ЧС ГІБРИДІВ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ

На сучасному етапі у Державному реєстрі сортів рослин, придатних для поширення в Україні, гібриди цукрових буряків на основі використання цитоплазматичної чоловічої стерильності представлені на ди- і триплоїдному рівні. Гібридами нового покоління по праву вважаються триплоїдні ЧС гібриди Злука і Кварта, які показали високий потенціал продуктивності. Тетраплоїдні запилювачі, переведені на лінійну основу, складають вагому частку у вітчизняному генофонді цукрових буряків. Біля половини триплоїдних ЧС гібридів характеризувалися високим (понад 110% до групового стандарту) збором цукру [1, 2].

У разі використання багатонасінних тетраплоїдних запилювачів для створення ЧС гібридів важливо мати якомога більш гомогенний (стабільний за плоїдністю) батьківський компонент, тобто генетично «чисту» за складовими генотипами популяцію тетраплоїдних запилювачів [3, 4]. Різний ступінь гетерогенності батьківського компонента визначає частка триплоїдних рослин, які знаходяться на різних етапах селекційного опрацювання. Чим ретельніше проводяться добори за плоїдністю, тим краще будуть стабілізовані за цією ознакою тетраплоїдні запилювачі [5]. Проте, як показують дослідження, деяка частка генотипів з триплоїдним рівнем геному завжди присутня в популяції запилювачів, що змінює показники кількісних ознак у ЧС гібридів, створених на їх основі.

Метою цього дослідження було встановити вплив ступеня гетерогенності запилювача на прояв господарсько-цінних ознак триплоїдних ЧС гібридів і, зокрема, на енергію проростання, схожість насіння і продуктивність.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на Білоцерківській дослідно-селекційній станції у 2009–2014 рр. Для того щоб визначити її критичний рівень, було проведено схрещування за типом топкрос двох пилкостерильних ліній 27816 і 1316 (уладівського) та 26489 і 1363 (іванівського) походження з тетраплоїдним багатонасінним компонентом 1043, ЧС ліній 1363 (уладівського) та 1361 (іванівського) походження з запилювачами 1013 та 1027. Запилювач цукрових буряків був представлений тетраплоїдною популяцією з вмістом різної кількості триплоїдного компонента (12,5, 25 та 50%) Контролем слугував ЧС гібрид, створений за участю цих стерильних ліній і стабільної популяції тетраплоїдного запилювача, перевіреної цитологічним методом прямим підрахунком кількості хромосом. Посівні якості насіння і визначення продуктивності визначали за загальноприйнятими методиками [6, 7].

Результати та обговорення

Як показали дослідження, наведені у табл. 1, найвища схожість насіння ЧС гібридів була у контрольному варіанті (на основі ЧС лінії 27816 — 94%, на основі ЧС лінії 26489 — 91%). Присутність у тетраплоїдному компоненті 12,5% триплоїдів достовірно не знизила її (на фоні ЧС 27816) і залишилася такою ж (на фоні ЧС 26489) — 91%. Проте цей показник суттєво знижувався зі збільшенням частки триплоїдних рослин у запилювачі до 25% і 50%.

В інших дослідах, проведених у 2011–2012 рр. (табл. 2) та у 2013 р. (табл. 3), було відзначено подібну закономірність, тобто показники енергії проростання і схожості насіння ЧС у варіантах, де присутність триплоїдів у тетраплоїдній популяції становила 25% і вище, на 16–17% були нижчими порівняно з контролем. Причому така ж тенденція спостерігалася на гібридах, створених за участю обох пилкостерильних форм, незалежно від їх походження.

Схожість насіння у ЧС гібридів за присутності у тетраплоїдному запилювачі половини триплоїдних форм різко знизилася: у гібриді 1316/1043 з 92 до 74%, а у гібриді 1363/1043 — з 89 до 73% (табл. 2).

© КОРНЄЄВА М. О, МАЦУК М. Б., ЧЕМЕРИС Л. М.

Таблиця 1

Енергія проростання і схожість насіння триплоїдних ЧС гібридів з різним рівнем гетерогенності у запилювачі, 2009–2010 рр.

Гібриди, частка триплоїдів у запилювачі	Кількість насіння, що зійшло, %, день				Гібриди, частка триплоїдів у запилювачі	Кількість насіння, що зійшло, %, день			
	3-й	4-й	6-й	10-й		3-й	4-й	6-й	10-й
ЧС 27816/1043 4х ММ 12,5 % 3х	66	87	90	91	ЧС 26489/1043 4х ММ 12,5 % 3х	80	89	91	91
ЧС 27816/1043 4х ММ 25 % 3х	65	71	83	84	ЧС 26489/1043 4х ММ 25 % 3х	57	72	77	83
ЧС 27816/1043 4х ММ 50 % 3х	58	70	74	78	ЧС 264891043 4х ММ 50 % 3х	72	78	79	80
ЧС 27816/1043 4х ММ контроль	77	80	86	94	ЧС 26489/1043 4х ММ контроль	82	88	91	91
$НІР_{0,05}$	5,0	4,5	5,0	4,0	$НІР_{0,05}$	5,0	4,5	5,0	4,0

Таблиця 2

Посівні якості насіння триплоїдних ЧС гібридів, створених на основі тетраплоїдних запилювачів різного ступеня гетерогенності, 2011–2012 рр.

Батьківський комптонент і його гетерогенність	Материнський компонент, походження	Однонасінність, %	Маса 1000 насінин, г	Енергія проростання, %	Схожість, %
1043 (4х)	1316 Іван. 1	97	12,0	87	91
12,5 % 3х	1363 Улад. 2	95	12,0	88	88
1043 (4х)	1316 Іван. 1	95	13,5	74	78
25 % 3х	1363 Улад. 2	94	13,0	78	79
1043 (4х)	1316 Іван. 1	95	13,5	70	74
50 % 3х	1363 Улад. 2	95	12,5	66	73
1043 (4х)	1316 Іван. 1	96	13,5	85	92
конт.	1363 Улад. 2	96	13,0	88	89
$НІР_{0,05}$		4,0	2,0	3,0	3,0

Таблиця 3

Посівні якості насіння триплоїдних ЧС гібридів, створених на основі тетраплоїдних запилювачів різного ступеня гетерогенності, 2013–2014 рр.

Батьківський компонент і його гетерогенність	Материнський компонент	Однонасінність, %	Маса 1000 насінин, г	Енергія проростання, %	Схожість, %
1013 (4х) + 12,5 % 3х	1316 ЧС Іван. 1	95	13,5	78	85
	1363 ЧС Улад. 2	94	11,5	83	85
1013 (4х) + 25 % 3х	1316 ЧС Іван. 1	94	13,0	78	82
	1363 ЧС Улад. 2	95	10,0	83	80
1013 (4х) + 50 % 3х	1316 ЧС Іван. 1	93	10,5	73	74
	1363 ЧС Улад. 2	95	10,0	71	77
1013 (4х) + 75 % 3х	1316 ЧС Іван. 1	95	10,0	66	69
	1363 ЧС Улад. 2	95	11,5	62	68
1013 (4х) контр.	1316 ЧС Іван. 1	96	11,5	93	94
	1363 ЧС Улад. 2	94	13,5	82	85
$НІР_{0,05}$		2,0	2,0	3,0	4,0

У 2013–2014 рр. у дослід був введений варіант із 75 % триплоїдних форм у запилювачі. У гібриді на основі материнського компонента іванівського походження 1316 різниця між ним і контролем становила 25 %, а в гібриді за участю ЧС лінії уладівського походження 1363 — 17 % (табл. 3).

Це негативне явище зниження значень ознак — складових посівної якості насіння — пояснюється тим, що гібридизація диплоїдних (ма-

Таблиця 4

Результати сортовипробування триплоїдних гібридів цукрових буряків на ЦЧС основі, 2011–2013 рр.

Запилювач і його гетерогенність	Материнський компонент	Абсолютні показники			% від групового стандарту		
		урожайність, т/га	цукристість, %	збір цукру, т/га	урожайність	цукристість	збір цукру
1027 (4х), 12,5 % 3х	1316 ЧС Іван. 1	37,4	15,3	5,7	94,0	110,6	104,0
	1363 ЧС Улад. 2	40,6	14,1	5,7	102,0	102,0	104,0
1027 (4х), 25 % 3х	1316 ЧС Іван. 1	38,0	14,1	5,4	96,0	102,4	98,0
	1363 ЧС Улад. 2	38,8	14,5	5,6	98,0	105,0	103,0
1027 (4х), 50 % 3х	1316 ЧС Іван. 1	38,3	14,1	5,4	97,0	102,0	99,0
	1363 ЧС Улад. 2	41,6	14,1	5,9	105,0	102,0	107,0
1043 (4х), контроль	1316 ЧС Іван. 1	43,8	14,8	6,5	110,0	107,0	117,0
	1363 ЧС Улад. 2	45,6	15,7	7,2	115,0	114,0	129,0
$НІР_{0,05}$		5,76	0,18	0,85			

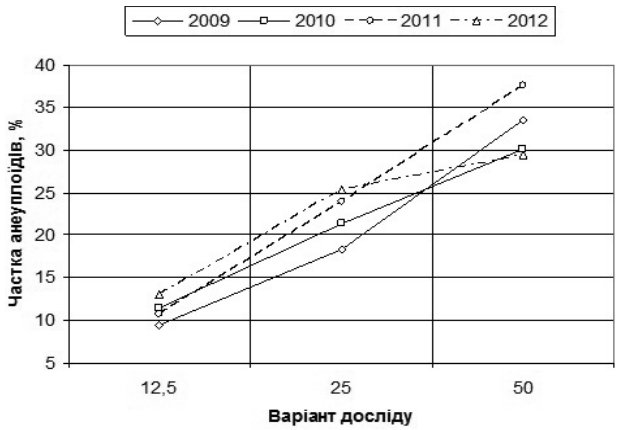


Рис. Вміст анеуплоїдів у триплоїдних ЧС гібридів залежно від гетерогенності тетраплоїдного запилювача, 2009–2012 рр.

теринських) і триплоїдних (батьківських) рослин, що є по суті валентними схрещуваннями, у першому поколінні гібридів змінює хромосомну і генну рівновагу через порушення механізму мейозу, збільшуючи кількість анеуплоїдів у потомстві.

Найбільшу кількість анеуплоїдних рослин спостерігали у варіанті, де у тетраплоїдному запилювачі половина рослин були триплоїдними.

За валентними схрещуваннями (тип схрещування 2n/3n), крім генотипів зі збалансованим геномом, було відзначено високу частку (до 37,5 %) анеуплоїдів, причому вона збільшувалася у варіантах з найбільш гетерогенним запилювачем (варіанти вмісту триплоїдів 25 і 50 %) (рис.).

Результати перевірки посівної якості триплоїдних гібридів у дослідах 2011–2013 рр. показали, що на деякі складові посівної якості насіння, такі як однонасінність та маса 1000 насінин, ступінь гетерогенності запилювача суттєво не впливав.

Наявність певної частки низькопродуктивних анеуплоїдних рослин у потомстві призводила до зниження продуктивних якостей гібридів, створених за участю запилювача 1027-4х. Так, різниця між варіантами, де у запилювачі присутність триплоїдів була на рівні 25–50 %, і контролем за збором цукру становила 20–21 % для гібридів за участю ЧС форми 1363 уладівського походження і 18–19 % — для гібридів на основі ЧС форми 1316 іванівського походження, тобто продуктивність знижувалася відповідно з 117–129 до 98–104 % (порівняно зі стандартом) (табл. 4).

Висновки

На основі експериментальних даних можна стверджувати, що гетерогенність запилювача, починаючи з вмісту 25 % триплоїдних рослин, призводить до суттєвого зниження посівних якостей насіння і продуктивності ЧС гібридів цукрових буряків. Із збільшенням вмісту триплоїдних рослин у тетраплоїдній популяції запилювачів кількість анеуплоїдів у гібридів першого покоління зростає. Це ставить перед необхідністю стабілізації тетраплоїдного компонента за плоїдністю шляхом цитологічного контролю і доборів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Роїк М. В., Корнєєва М. О. Гібриди нового покоління буряку цукрового і їхня роль у процесі інтенсифікації галузі // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин.— 2006.— № 3.— С. 33–39.
2. Роїк М. В., Корнєєва М. О. Оцінка генетичного потенціалу вітчизняних цукрових буряків // Зб. наук. праць.— К.: Поліграф Консалтинг, 2005.— Вип. 8.— С. 17–27.

3. Бормотов В. Е., Загрекова В. Н., Матросов Б. Ф. Эффективность различных вариантов получения мейотических тетраплоидов свеклы от скрещивания растений различной плоидности // Исследования по цитогенетике полиплоидных форм сахарной свеклы.— Минск: Наука и техника, 1976.— С. 88–97.
4. Бормотов В. Е., Загрекова В. Н. Мейотическая полиплоидия у сахарной свеклы // Успехи полиплоидии.— К.: Наукова думка, 1977.— С. 108–115.
5. Чемерис Л. М., Галашевський В. Л. Створення і використання тетраплоїдних форм цукрових буряків на Білоцерківській дослідно-селекційній станції // Зб. наук. праць.— К., 2010.— Вип. 11.— С. 209–219.
6. Методики проведення досліджень у буряківництві / [М. В. Роїк, Н. Г. Гізбуллін, В. М. Сінченко, О. І. Присяжнюк та ін.]; під заг. ред. М. В. Роїка та Н. Г. Гізбулліна.— К.: ФОП Корзун Д. Ю., 2014.— 374 с.
7. Насіння цукрових буряків. Методи визначення схожості, одноростковості та доброякісності: ДСТУ 2292-93.— [Чинний від 1996-01-01] .— К.: Держспоживстандарт України, 1996.— 12 с. (Державний стандарт України).

KORNIEIEVA M.O., MATSUK M.B., CHEMERYS L.M.

Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 03141, Kyiv, Klinichna str., 25, e-mail: mira31@ukr.net

EFFECT OF HETEROGENEITY OF TETRAPLOID POLLINATOR ON AGRONOMIC SIGNS IN TRIPLOID CMS HYBRIDS OF SUGAR BEET

Aims. In triploid CMS sugar beet hybrids, for heterosis by agronomic signs to occur, it is necessary to involve a tetraploid population of pollinators in crossing stable by their ploidy level. However, in practical breeding one can come across triploid forms among tetraploid plants, which may lead to the formation of aneuploidies in F1 affecting the expression of agronomic traits in hybrids. ***Methods.*** By the top cross method, crossed were CMS lines originated from Ivanivska EBS, Uladivka EBS and tetraploid pollinator populations differed by part of triploid plants, namely 12.5, 25 and 50 %. We determined the agronomic performance in CMS hybrids of sugar beet by conventional methods. ***Results.*** With a share of triploid plants in a population of tetraploid component increasing, increased a share of aneuploidies (up to 37.5 %) influencing agronomic traits. In hybrid 1316/1043, germination reduced from 92 to 74 %, in hybrid 1363/1043 from 89 to 73 %. Performance in hybrids involving CMS forms originated from Ivanivska EBS and Uladivka EBS also decreased, respectively, from 117–129 to 98–104 % (as compared to standard). ***Conclusions.*** High degree of heterogeneity of tetraploid pollinators according to their ploidy level influences agronomic characteristics due to the increased number of aneuploidies in CMS hybrids of sugar beet. Having used stabilized tetraploid populations as a parent component we obtain the highest performance; triploids share of 25 % significantly lowers seed germination and performance.

Keywords: sugar beet, hybrid, pollinator, heterogeneity, CMS line, germination, productivity performance.

УДК 631.527:633.34:631.6(477.72)

ЛАВРИНЕНКО Ю. О.[1], ВОЖЕГОВА Р. А.[1], БАЗАЛІЙ В. В.[2], КУЗЬМИЧ В. І.[1]

[1] Інститут зрошуваного землеробства НААН,
Україна, 73483, м. Херсон, с. Наддніпрянське, e-mail: lavrin52@mail.ru
[2] Херсонський державний аграрний університет,
Україна, 73000, м. Херсон, вул. Рози Люксембург, 23

УДОСКОНАЛЕННЯ ДОБОРІВ НА ПІДВИЩЕННЯ ПРОДУКТИВНОСТІ СОЇ В УМОВАХ ЗРОШЕННЯ

Головним завданням селекції будь-яких сільськогосподарських культур у всі часи було і залишається підвищення продуктивності рослин.

Висока продуктивність — це результат найбільш оптимального поєднання елементів структури врожаю [1].

Добір за будь-якою ознакою призводить до підвищення продуктивності лише у тому випадку, якщо інші компоненти продуктивності будуть зберігатися на постійному рівні або не будуть знижуватися нижче певного критичного рівня. Але ознаки продуктивності належать до розряду досить мінливих елементів, тому важливо мати інформацію про закономірності їх одночасної мінливості для того, щоб точно прогнозувати ефект добору за комплексом ознак. У практичній селекції вчення про кореляції кількісних ознак є основою цілеспрямованих доборів [2].

Стан вивчення проблеми. Вивченню кореляційної залежності між продуктивністю та іншими кількісними ознаками сої присвячено багато наукових праць [3–5].

Окремі вчені встановили, що насіннєва продуктивність генотипів сої стабільно та тісно корелює з середнім значенням надземної маси рослин (r = 0,54–0,99). А от зв'язок із кількістю вузлів на рослині змінювався за роками і групами стиглості від r = 0,10 у групі пізньостиглих до r = 0,92 у групі середньостиглих сортів сої [6]. Інші джерела інформують про значні позитивні кореляції між урожаєм насіння і числом вузлів на рослині, а також про ефективність доборів на продуктивність сої за числом вузлів на рослині [7].

Як бачимо, вклад окремої кількісної ознаки у формування продуктивності неоднаковий у різних генотипів і в різних кліматичних умовах. Це, в свою чергу, створює передумови для подальшого вивчення кореляцій між продуктивністю та іншими кількісними ознаками сої.

Матеріали і методи

Метою досліджень було встановлення кореляційного зв'язку між основним показником продуктивності — масою насіння з рослини — та іншими кількісними ознаками сої, а також визначення на основі отриманих кореляцій ознак, які можуть бути селективними, вивчення ефективності доборів за однією з таких ознак у гібридних популяцій F_3–F_5 сої.

Дослідження проводили у гібридному та селекційному розсадниках сої Інституту зрошуваного землеробства НААН протягом 2007–2009 рр., технологія вирощування загальноприйнята для умов зрошення Півдня України.

Узагальнення коефіцієнтів кореляції кількісних ознак здійснювали за допомогою методики Дж. У. Снедекора [8].

При визначенні сили зв'язку між ознаками користувалися запропонованою Б. А. Доспєховим шкалою: при $r < 0,3$ кореляційна залежність між ознаками слабка, r = 0,3–0,7 — середня, а при $r > 0,7$ — сильна [9].

Результати та обговорення

За роки досліджень у гібридів F_3–F_5 сої встановлені прямі середні кореляції між масою насіння з рослини і товщиною стебла — r = 0,513, товщиною основи стебла — r = 0,687, числом гілок на рослині — r = 0,558 і числом продуктивних вузлів на головному стеблі — r = 0,618.

Сильний позитивний зв'язок відзначено між масою насіння з рослини і такими кількісними ознаками, як число продуктивних вузлів на гілках — r = 0,810, число продуктивних вузлів на рослині — r =0,861, кількість бобів з рослини — r = 0,939, кількість насінин з рослини — r = = 0,965, маса рослини — r = 0,956 і маса бобів з рослини — r = 0,993.

Керуючись отриманими кореляціями, а також беручи до уваги зручність у використанні в польових умовах, добори на продуктивність

© ЛАВРИНЕНКО Ю. О., ВОЖЕГОВА Р. А., БАЗАЛІЙ В. В., КУЗЬМИЧ В. І.

Таблиця

Ефективність добору за числом продуктивних вузлів на рослині у гібридів сої F_3–F_5

Вивчено ліній	Кількість ліній, які перевищили стандарт за ознакою				
	число продуктивних вузлів на рослині	кількість бобів з рослини	маса насіння з рослини	маса бобів з рослини	маса 1000 насінин
Юг40 х Lambert					
177	125 / 70,62	103 / 58,19	114 / 64,41	110 / 62,15	117 / 66,10
Даная х Фаетон					
70	39 / 55,71	27 / 38,57	28 / 40,00	27 / 38,57	26 / 37,14
Юг40 х Banana					
60	49 / 81,67	45 / 75,00	46 / 76,67	46 / 76,67	20 / 33,33
Ізумрудна х Tresor					
58	43 / 74,14	31 / 53,45	38 / 65,52	37 / 63,79	36 / 62,07
1814 (2) 90 х КС9					
75	69 / 92,00	67 / 89,33	68 / 90,67	67 / 89,33	17 / 22,67

Примітка: у чисельнику — абсолютна кількість рослин, у знаменнику — кількість ліній у %.

гібридів сої ми проводили за ознакою «число продуктивних вузлів на рослині». Ефективність доборів на підвищення продуктивності сої за числом продуктивних вузлів на рослині показана у табл.

За селективною ознакою, яка одночасно є і факторіальною,— число продуктивних вузлів на рослині — кількість ліній, які перевищили стандарт, була найвищою — 55,71–92,00% від загальної кількості вивчених. Добори за цією ознакою найбільш ефективні для підвищення маси насіння з рослини — частка кращих ліній по популяціях складала 40,00–90,67%. Найнижчою була частота переваги над стандартами за масою 1000 насінин — у більшості гібридів вона склала 22,67–37,14%.

Застосовуючи удосконалену методику добору на продуктивність за числом продуктивних вузлів на рослині, було створено нові сорти сої Святогор і Софія.

Святогор

Соя підвид Маньчжурський, апробаційна група agr. *latifolia* Enk. Вегетаційний період 120–125 діб. Гіпокотиль у рослин сорту з антоціановим забарвленням. Висота рослин 120–150 см, прикріплення нижнього бобу 20–25 см. Стебло з великою кількістю вузлів. Рослини проміжного типу росту з сірим опушенням. Лист ланцетний, більше до клиноподібного. Квітка фіолетового кольору. Боби коричневого кольору, трьох- та чотирьохнасіннєві, слабозігнуті. Довжина і ширина бобу середні. Насіння жовте, кулястої форми, середнього розміру. Рубчик лінійний без вічка, має чорне забарвлення. Урожайність насіння в умовах зрошення досягає 4,2–4,6 т/га. Максимальна врожайність — 5,3 т/га. Сорт стійкий до вилягання, посухи, осипання та проти ураження хворобами. Маса 1000 насінин 163–175 г. У насінні міститься 39,2–39,5% білка та 20,5–21,5% олії.

Сорт занесений до Державного реєстру сортів України з 2014 р. і рекомендований для вирощування на зерно в зоні Степу.

Софія

Підвид Маньчжурський, апробаційна група *Луціда*. Висота рослин середня (80–90 см), кущ стиснутий, компактний з проміжним типом росту. Листя темно-зеленого кольору. Квітка білого кольору. Опушення світле, боби світлі, насіння жовте, рубчик коричневий.

Урожайність насіння в умовах зрошення досягає 3,6 т/га, максимальна — 4,5 т/га. Вегетаційний період 105–115 діб. Маса 1000 насінин 156–175 г. Характеризується підвищеною азотфіксуючою здатністю. У насінні міститься 38,3–40,0% білка та 20,1–21,4% олії.

Сорт перебуває у Державному сортовипробуванні.

Висновки

1. Встановлені позитивні середні кореляції між масою насіння з рослини і товщиною стебла — r = 0,513, товщиною основи стебла — r = 0,687, числом гілок на рослині — r = 0,558 і числом продуктивних вузлів на головному стеблі — r = 0,618.

2. Сильний прямий зв'язок відзначено між масою насіння з рослини і такими кількісними ознаками, як число продуктивних вузлів на гілках — r = 0,810, число продуктивних вузлів на рослині — r = 0,861, кількість бобів з рослини — r = 0,939, кількість насінин з рослини — r = 0,965, маса рослини — r = 0,956 і маса бобів з рослини — r = 0,993. Ці ознаки можна вважати факторіальними і застосовувати при доборах на підвищення продуктивності сої.

3. Добори за числом продуктивних вузлів на рослині найбільш ефективні для підвищення маси насіння з рослини — частка кращих ліній по популяціях складала 40,00–90,67%.

ЛІТЕРАТУРА

1. Іванюк С.В., Глявін А.В. Оцінка сортозразків квасолі звичайної на основі кореляції кількісних ознак та індексів // Селекція і насінництво.— 2012.— Вип. 101.— С. 192–197.
2. Орлюк А.П. Теоретичні основи селекції рослин.— Херсон: Айлант, 2008.— 572 с.
3. Михайлов В.Г., Слісарчук М.В., Щербина О.З., Романюк Л.С. Кореляційна залежність між важливими господарськими ознаками у форм сої з фасційованим і нефасційованим типом стебла // Генетичні ресурси рослин.— Харків, 2008.— № 6.— С. 49–55.
4. Лаврова Г.Д. Зв'язок урожайності з крупністю насіння та висотою прикріплення нижніх бобів у сортів сої різних груп стиглості // Збірник наукових праць СГІ-НЦНС.— 2010.— Вип. 15 (55).— С. 62–73.
5. Хорсун І.А. Визначення кореляцій між ознаками у високобілкових сортів сої // Зрошуване землеробство: Збірник наукових праць.— Херсон: Айлант.— 2012.— Вип. 57.— С. 231–236.
6. Коханюк Н.В. Оцінка сортозразків сої на основі кореляції кількісних ознак та індексів // Вісник ЦНЗ АПВ Харківської області.— 2014.— Вип. 17.— С. 112–116.
7. Xinhai L., Jinling W., Qingkai Y., Shaojie J., Liming W. The effect of selection method on the association of yield and seed protein with agronomic characters in an interspecific cross of soybean [Електронний ресурс] // Soybean Genetics Newsletter.— 1999.— № 26.— Режим доступу: http://www.soygenetics.org/articles/sgn1999–002.html.
8. Снедекор Дж.У. Статистические методы в применении к исследованиям в сельском хозяйстве и биологии.— М.: Сельхозиздат, 1961.— 503 с.
9. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований).— М.: Агропромиздат, 1985.— 351 с.

LAVRYNENKO Y.[1], VOZGEGOVA R.[1], BAZALIY V.[2], KUZMICH M.[1]

[1] Institute of irrigated agriculture of NAAS,
Ukraine, 73483, Kherson, v. Naddnepriynskoe, e-mail: lavrin52@mail.ru

[2] SHEI «Kherson state agrarian university»,
Ukraine, 73000, Kherson, R. Luksemburg str., 23, e-mail: lavrin52@mail.ru

EFFECTIVENESS OF SELECTION FOR INCREASING OF SOYBEAN PRODUCTIVITY IN CONDITIONS OF IRRIGATION

Aims. Installing the correlation between the main indicator productivity — seed weight per plant and other quantitative traits of soybean; study the effectiveness of selection on one of the selective traits in hybrids F_3–F_5 of soybeans. ***Methods.*** The study was conducted in hybrid and breeding nurseries of soybean of Institute of irrigated agriculture NAAS for 2007–2009, growing technology is common for irrigation conditions of southern Ukraine. The generalization of correlation coefficients quantitative traits was performed by the method of J. William Snedekor; bonding force was determined by B. Dospyehov. ***Results.*** We have analyze a correlations between weight of seeds per plant (the basic index of productiveness) and other quantitative trait of soybean; selection effectiveness for productivity of soybean hybrid populations F_3–F_5 by number of productive nodes from plant. There are the characteristics of new soybean varieties that had made by improved method of selection in the article. We have received the positive average correlation between weight of seeds per plant and stem thickness, stem bottom thickness, quantity of branches on the plant and number of productive nodes on a main stem. We have obtained strong correlation between weight of seeds per plant and number of productive nodes on branches, productive nodes on a plant, bean's quantity per plant, quantity of seeds per plant, plant weight and weight of beans. ***Conclusions.*** Signs that had a strong positive correlation with seed weight per plant, we can assume factorial and apply in the selection to improve productivity of soybean. Selection on the number of productive nodes on the plant are most effective for increasing seed mass per plant.

Keywords: soybean, hybrids, selection, correlation, seed weight.

УДК 636.2.082

МАМЕНКО О. М., ЄМЕЦЬ З. В., ХРУЦЬКИЙ С. С.
Харківська державна зооветеринарна академія,
Україна, 62341, м. Харків, смт Мала Данилівка, e-mail: zoya_emez@mail.ru

ПІДВИЩЕННЯ СТІЙКОСТІ ОРГАНІЗМУ КОРІВ ДО НЕГАТИВНОГО ВПЛИВУ ПЛЮМБУМУ КОРМІВ РАЦІОНУ

На якісні показники молочної продуктивності корів суттєво впливає такий чинник, як порода, а кожна порода — це результат багаторічної людської праці як в плані селекції на високу продуктивність, так і пристосованості до нерідко жорстких умов середовища. Так, наприклад, червона степова порода з'явилася внаслідок складного відтворного схрещування місцевих досить витривалих до техногенних умов тварин. На процеси молокоутворення та молоковиділення впливає забрудненість навколишнього середовища шкідливими речовинами, в тому числі і важкими металами, такими як плюмбум [3, 4].

Питання стійкості місцевої червоної степової породи до високого рівня навантаження свинцем є складним, стосується набутого імунітету і потребує детального вивчення [5, 6].

Матеріали і методи

Було проведено науково-господарський дослід у господарстві ТОВ агрофірма «Агротіс» Мар'їнського району Донецької області на 36 коровах — аналогах червоної степової породи третьої лактації методом груп-періодів, з яких було сформовано три групи по 12 корів у кожній (I – контрольна і II, III — дослідні). Тваринам усіх груп протягом зрівняльного періоду згодовували раціон з перевищенням ГДК щодо Pb. Корови II дослідної групи, крім основного раціону, отримували додатково спеціальний кормовий премікс, а III — премікс, що вводили в кількості 1% до складу комбікорму на основі розрахунків з балансування раціонів за деталізованими нормами годівлі тварин і підшкірно ін'єкцію біологічно активного препарату «АВГОР-5» [6–10].

У пробах молока визначали показники згідно з методиками, наведеними в ДСТУ 3662-97 «Молоко коров'яче незбиране. Вимоги при закупівлі» [10].

Матеріали досліджень обробляли методом варіаційної статистики з використанням ПК на основі розрахунку середнього арифметичного (M), середньоквадратичної похибки (m) та достовірності різниці між порівнювальними показниками (p) за методикою М. О. Плохінського, 1970 [11].

Результати та обговорення

Лабораторними аналізами ґрунтів сільськогосподарських угідь ТОВ агрофірма «Агротіс» Мар'їнського району, що розташоване на відстані 18–20 км від крупного промислового центру м. Донецька, було встановлено перевищення ГДК Hg, Cd, Pb, Cu, Zn. На цих ґрунтах вирощувалися корми, які входили до основного раціону годівлі корів, при годівлі ними надходження свинцю в організм корів спричиняло слабку хронічну інтоксикацію та забруднення молока. Так, перевищення ГДК щодо свинцю у середньому склало в 13,4 разу, що викликало зниження рівня продуктивності корів на 0,94–2,46 кг (7,0–16,9%), $p < 0,999$.

Протягом досліду свинець накопичувався в організмі корів I контрольної групи і, як наслідок, трансформувався в молоко, яке не відповідало вимогам вітчизняного і міжнародних стандартів. Було застосовано мінеральні добавки, що в результаті сприяло зменшенню токсичного впливу важких металів на організм корів та зниженню рівня надходження в молоко свинцю (рис.). Однак вимогам ГДК ДСТУ 3662-97, а також європейського стандарту відповідало лише молоко тварин III групи, яке за вмістом свинцю також відповідало вимогам для вироблення молочних продуктів дитячого харчування. Слід зазначити, що цього результату було досягнуто також завдяки посиленню набутого імунітету корів.

Свинець — елемент, що належить до першого класу небезпеки. В земній корі його кількість складає 16 мг/кг, регіональний фон 18–20 мг/кг. ГДК для ґрунту за В. В. Медведєвим дорівнює 30 мг/кг, фоновий вміст — 10 мг/кг. ГДК рухомих форм свинцю у верхньому орному шарі ґрунту становить 2,0 мг/кг.

В організмі корів свинець концентрується, головним чином, у кістках, нирках, шкірі, менше

© МАМЕНКО О. М., ЄМЕЦЬ З. В., ХРУЦЬКИЙ С. С.

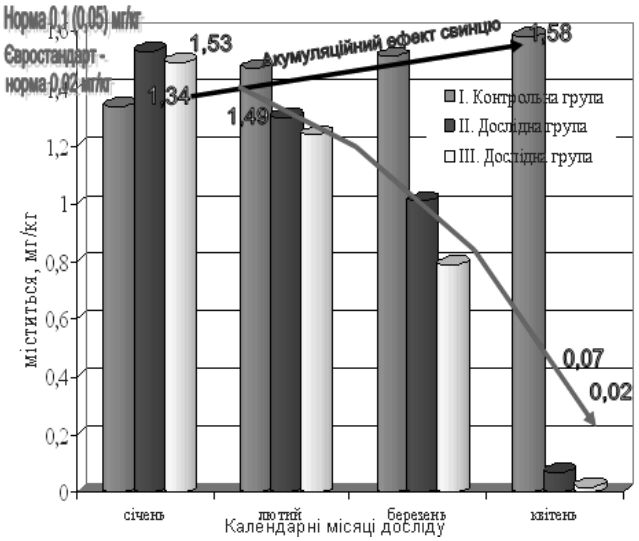


Рис. Зниження вмісту свинцю в молоці корів за дії мінеральної добавки і біологічно активного препарату

у молоці. При виробництві масла у ньому залишається 0,15–1,2 % Pb.

ГДК свинцю для кормів (грубі, соковиті, коренеплоди, комбікорми та премікси) сільськогосподарських тварин складає в середньому 5 мг/кг, м'язової тканини — 0,50 мг/кг, нирок — 1,0 мг/кг, субпродуктів — 0,6 мг/кг, молока — 0,1 (0,05) мг/кг, європейський стандарт — 0,02 мг/кг.

Застосування преміксу та біологічно активного препарату сприяло зменшенню вмісту важких металів у крові та зменшенню кількості соматичних клітин у молоці корів ($r = 0{,}918$). За рахунок преміксу і препарату вдалося збільшити виведення свинцю з організму з сечею в 2,7–2,9 разу у II і III дослідних групах у порівнянні з I контрольною групою ($p \geq 0{,}999$).

У цьому випадку антитоксикохімічний (елімінаційний) ряд ВМ за КП з крові в сечу у тварин контрольної групи був таким: **Pb** (0,212) > Cu (0,045) > Cd (0,012) > Hg (0,005) > Zn (0,0012), але за інтенсивністю виведення з сечею під впливом МКД = **Pb** (4,58) > Cd (4,33) > Hg (3,40) > Zn (2,50) > Cu (1,84) та за умов комплексної дії МКД і фітопрепарату = Cd (9,17) > **Pb** (7,14) > Hg (5,40) > Zn (3,00) > Cu (2,31), тобто кадмій, свинець і ртуть більш інтенсивно виводяться з сечею, ніж цинк і мідь.

Застосування мінеральної кормової добавки і фітобіопрепарату сприяло збільшенню в крові до меж фізіологічної норми загального білка у корів II і III дослідних груп у порівнянні з контрольною групою ($p \geq 0{,}999$), що свідчить про нормалізацію синтезу білка та білкового обміну в організмі тварин.

У тварин, які не потрапляють під інтоксикацію важкими металами, білка в сечі міститься дуже мала кількість, практично — сліди. Поява білка в сечі, що відзначалося у тварин I, II і III груп в порівняльний період на рівні 4,21–4,63 %, — це альбумінурія (точніше, протеїнурія — захворювання, пов'язане з ураженням нирок важкими металами, що порушує реабсорбцію в ниркових канальцях білка).

У молоці піддослідних корів усіх груп відзначено перевищення гранично допустимої концентрації важких металів, і воно не було екологічно чистим. Найбільше перевищення ГДК (у середньому в 13,4–15,3 разу) спостерігалося щодо свинцю, щодо решти елементів — у середньому в 1,2–1,9 разу.

Плюмбум і його похідні інтенсивно виводяться не тільки з калом та сечею, а й з молоком. Вивчення й аналіз деяких основних показників природної резистентності показує опір організму корів II і III груп до впливу полютантів, оскільки відбувся перерозподіл білкових фракцій альфа-, бета- і гамаглобулінів. Вміст бета- і гамаглобулінів у крові тварин II і III груп збільшився в порівнянні з I групою ($p > 0{,}999$). В кінці досліду індекс білкового співвідношення альбумінів до глобулінів становив у тварин I (контрольної) групи — 0,77; II — 0,75; III — 0,66, а глобуліновий індекс (б + в : г) : I — 1,31; II — 0,61; III — 0,54, що свідчить про посилення природної резистентності і відновлення внутрішньої рівноваги організму за дії зовнішніх екологічних факторів, оскільки зросла кількість гамаглобулінів (табл.).

Люди та тварини часто можуть потрапляти в антропогенно змінені геоценози та зазнавати впливу вірусів, мікробів, а також різних отрут, проти яких у них може і не бути природного чи набутого захисту. Підвищення захисних сил організму складає гостру проблему, над вирішенням якої давно вже працюють біологи та лікарі. Але досить досконалі захисні сили організму, що сформувалися в процесі тривалої еволюції, не безмежні, тому живих істот слід оберігати та підтримувати. У зв'язку з цим першочерговим завданням є спрямування зусиль на підтримання набутого (активного і пасивного) імунітету і, перш за все, за рахунок мобілізації специфічних імунних білків — гамаглобулінів, здатних нейтралізовувати певні отрути.

Таблиця

Вміст важких металів у молоці, M ± m, n = 5

Групи тварин	Важкі метали					Відм. про відповід. ГДК
	ртуть, мг/кг	кадмій, мг/кг	свинець, мг/кг	мідь, мг/кг	цинк, мг/кг	
I — контрольна	0,006 ± 0,002	0,077 ± 0,03	1,34 ± 0,05	1,84 ± 0,03	6,07 ± 0,31	не відп.
II — дослідна	0,007 ± 0,001	0,064 ± 0,02	1,53 ± 0,03	1,93 ± 0,02	6,24 ± 0,23	не відп.
III — дослідна	0,007 ± 0,001	0,072 ± 0,01	1,49 ± 0,04	1,98 ± 0,04	6,40 ± 0,32	не відп.
ГДК згідно з ДСТУ 3662-97/ЄС	0,005	0,03 (0,02)	0,1 (0,05)/0,02	1,0	5,0	—

Механізм нейтралізуючої дії антитіл проти отрут певною мірою вже вивчено. Специфічні білкові речовини, тобто імунні гамаглобуліни, при зустрічі з відповідними отрутами взаємодіють з ними (утворюють сполуку), в результаті чого отрута знешкоджується, нейтралізується. Антитіла нібито покривають собою найбільш активну отрутну частину молекули антигену. Комплекс отрути й антиотрути, що утворився під дією фагоцитарних клітин і ферментів, піддається руйнуванню і розпаданню на більш прості сполуки, вже такі, що не є небезпечними для організму. Так організм намагається ефективно захищатися від проникнення в нього отрут, у тому числі і від небезпечних сполук плюмбуму. Захист організму від шкідливої дії потрапляння плюмбуму та інших його сполук відбувається на трьох рівнях: молекулярному, клітинному і на рівні цілісного організму.

Висновки

1. Екоцидне навантаження агробіогеоценозів Pb проявилося зниженням рівня продуктивності тварин на 10,8–11,7% ($p \geq 0,999$), якому можна запобігти за рахунок застосування спеціально розроблених премікса і фітобіопрепарату.

2. Застосування премікса створює можливості для виведення важких металів на рівні обміну речовин, оскільки містить речовини — антагоністи важких металів, препарат «АВГОР-5» сприяє посиленню антитоксичної дії премікса.

3. Молоко корів III групи (ОР + премікс + фітобіопрепарат) відповідало вищому ґатунку ($p \geq 0,999$) у результаті зниження кількості соматичних клітин до рівня 385,1 тис./см^3 та важких металів до ГДК вітчизняного і європейських стандартів.

4. Корови червоної степової породи виявилися відносно стійкими до високого рівня навантаження свинцем, що можна пояснити високою витривалістю і пристосованістю до різних природно-кліматичних умов та позитивною реакцією організму на згодовування премікса та введення фітобіопрепарату.

5. Також з метою зв'язування плюмбуму в організмі корів рекомендується внутрішньовенне введення гіпосульфіту натрію в поєднанні з глюкозою, що обґрунтовується здатністю гіпосульфіту натрію посилювати антитоксичну функцію печінки і позитивно впливати на окиснювальні й обмінні процеси, або застосування препаратів сірчанокислої магнезії з глюкозою (внутрішньом'язово) та з меласою — в складі раціону за посиленої вітамінізації організму.

ЛІТЕРАТУРА

1. Вольфовская А. Н. ТЭС и его смеси. В кн.: Первая помощь при промышленных отравлениях.— М., 1952.— 213 с.
2. Кравців Р. Й., Салата В. З., Дашковський О. О. Свинець: екологічні аспекти, метаболізм, антагонізм, токсичність, лікування і профілактика. Монографія.— Львів, 2001.— 96 с.
3. Ловачев Л., Радионова Н. Некоторые факторы, определяющие стойкость сливочного масла в процессе длительного хранения при низких температурах.— Науч. тр. Литов. фил. ВНИИМСа, 1971.— 6.— С. 55–67.
4. Маменко О. М., Захарченко П. П., Маренець В. М. Довідник начальника комплексу по виробництву яловичини.— К.: Урожай, 1990.— 176 с.
5. Маменко О. М. Молоко коров'яче незбиране (вимоги при закупівлі) ДСТУ 3662-97 — Державний стандарт України.— К.: Держстандарт Укр., 1997.— 10 с.
6. Маменко О. М. Екологічні проблеми виробництва, переробки та забезпечення високої якості продуктів тваринництва // Сучасні проблеми екології та гігієни виробництва продуктів тваринництва: зб. наук. праць Вінницького державного аграрного університету.— 2000.— 1, вип. 8.— С. 3–8.

7. Маменко О.М, Портянник С. В. Зниження вмісту кадмію і свинцю в молоці корів та підвищення продуктивності тварин і екологічної безпеки молока // Підвищення продуктивності тварин: зб. наук. праць Харк. нац. ун-ту; Харк. держ. зоовет. акад.— 2005.— 15.— С. 30–45.
8. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Справочное пособие.— 3-е изд., перераб. и допол. / Под ред. А. П. Калашникова, В. И. Фисинина, В. В. Щеглова, Н. И. Клейменова.— М., 2003.— 456 с.
9. Плохинский Н. А. Биометрия.— 2-е изд.— М.: Ленинские горы, 1969.— 367 с.
10. Резников А. Б. Клиника, патогенез, терапия и профилактика нейроинтоксикации этиловой жидкостью и свинцовым бензином.— М., 1949.— С. 177–185.
11. Руководство по токсикологии отравляющих веществ (под ред. А. И. Черкеса, Н. И. Луганского, П. В. Родионова), 4-я военная типография; изд-во «Здоров'я».— К., 1964.— С. 427–432.
12. Bidappa C. C., Khan M. M., Jooki O. P., Manican-don Bidappa P. Effect of roof feeding of heavy metals on had concentration of. P. z. Ca and Mg in cocant // Plant a sail.— 1987.— Bd. 77, N 2.— S. 266–308.

MAMENKO A.M., YEMETS Z.V., KHRUTSKIY S.S.

Kharkov state zooveterinary Academy,
Ukraine, 62341, Kharkov, Mala Danylivka, e-mail: zoya_emez@mail.ru

INCREASE IN RESISTANCE OF COWS TO NEGATIVE IMPACT OF LEAD IN FEEDS OF RATION

Aims. The technological features of the production of ecologically safe cow's milk have been studied and its compliance with domestic and international quality standards as for the content of Pb (lead) within the specified maximum permissible limits has been assessed. ***Methods.*** The laboratory physical and chemical tests of the experimental material with the use of the atom absorption spectrophotometry AAS-30 method (Carl Zeiss, Jena) have been carried out, the biometric processing of the received results has been done. ***Results.*** Ecocide load agroborealis Pb manifested itself in the decline in the productivity of the animals from 10.8 to 11.7% ($p \geq 0.999$) that can be restored by the use of specially developed premix and phytobioproduct. The above premix promotes the excretion of heavy metals on the level of metabolism because it contains substances that are antagonists to heavy metals and they are capable to replace in metabolic processes (supplant heavy metals mercury, cadmium, lead, copper and zinc), the drug "AUGER-5" enhances the antitoxic action of the premix directly in the tissues and organs of the body. The milk of the cows in group III (RR + premix + phytobioproduct) corresponded to the highest grade ($p \geq 0.999$) by reducing the number of somatic cells to the level 385.1 thousand/cm^3 and heavy metals to the MPC domestic and European standards. ***Conclusions.*** The cows of Red Steppe breed were relatively resistant to the high level of lead that can be explained by their high durability and adaptability to different climatic conditions and a positive reaction to the feeding of the premix and the introduction of phytobioproduct.

Keywords: Red Steppe breed, lead, ecocida load, influence, milk quality.

УДК 631.527:633.11

МОРГУН В. В.[1], СІЧКАР С. М.[1], ПОЧИНОК В. М.[1], ГОЛІК О. В.[2], ЧУГУНКОВА Т. В.[1]

[1] Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: sichkar07@gmail.com
[2] Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН, Національний центр генетичних ресурсів рослин України,
Україна, 61060, м. Харків, просп. Московський, 142

АНАЛІЗ СТРУКТУРИ ПРОДУКТИВНОСТІ КОЛЕКЦІЙНИХ ЗРАЗКІВ МАЛОПОШИРЕНИХ ВИДІВ ПШЕНИЦІ

Стародавні злаки роду *Triticum* L.— спельта і полба — набули достатньо широкого використання в сучасному «екологічному землеробстві» завдяки комплексу господарсько-корисних ознак, успадкованих від диких предків, та невибагливості до умов вирощування [1–3]. Спельта (*T. spelta* L., 2n = 42) — вид гексаплоїдної плівчастої пшениці, має форми ярого та озимого типу розвитку, її геном — A^uBD. Рослини спельти, як правило, високорослі, колоси довгі, вузькі, при дозріванні ламкі, зернівки продовгуваті, тісно охоплені лусками. До цінних властивостей спельти можна віднести високий вміст поживних речовин та білка, який характеризується високим ступенем перетравлюваності, вона має підвищений вміст заліза та вітамінів групи В у порівнянні зі звичайною пшеницею [4]. Завдяки цьому її у країнах Європи, Америки, Австралії все більш використовують для «органічного харчування». Поширені озимі та ярі сорти спельти, створені у Сербії, Італії, Канаді, США та інших країнах світу. В Україні зареєстрований сорт спельти озимої Зоря України [5]. Спельту використовують як донора для покращення та створення нових сортів пшениці.

Полба звичайна, еммер (*T. dicoccum* (Schrank) Schuebl., 2n = 28) — вид тетраплоїдної плівчастої пшениці, диференційований на еколого-географічні групи, більшість форми — ярі, але є й озимі; геном — A^uB [6]. Полба добре схрещується з тетраплоїдною твердою пшеницею. Колосся у полби при натисканні розпадається на окремі колоски, у колоску дві зернівки. Полба невибаглива до кліматичних умов, її можна вирощувати без використання добрив та пестицидів, виявляє стійкість до хвороб, посухостійкість, має високий вміст білка. З зерна культурної двозернянки одержують крупу для виготовлення каші високих смакових якостей, придатну для дієтичного харчування. Полба широко використовується у селекційних програмах, особливо для покращення твердої і м'якої пшениці. У різних країнах світу за участю полби створено багато сортів, гібридів. В Україні на базі Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва одержано ряд ліній з підвищеною урожайністю, зимостійкістю, полегшеним вимолотом зерна, включено до Державного реєстру сортів рослин сорт Полба Голіковська [2] та передано на державне випробування сорт Романівська.

Перспективи застосування у селекції корисних властивостей, якими характеризуються спельта і полба, були причинами різносторонніх наукових досліджень цих культур [7–10]. З метою використання спельти та полби як донорів для покращення пшениці та створення нових сортів досліджували колекцію малопоширених видів *Triticum* за основними агробіологічними показниками, проводили аналіз елементів структури продуктивності рослин.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження були зразки малопоширених видів пшениці, одержані з Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України, Національного центру генетичних ресурсів рослин України, інших науково-дослідних закладів; зразки спельти озимої селекції Інституту фізіології рослин і генетики (ІФРГ) НАН України. Проаналізовано чотири зразки озимої і вісім зразків ярої спельти різного походження; один зразок озимої і 18 — ярої полби та шість представників інших видів пшениці та амфідиплоїдів від схрещування між представниками видів пшениці та інших родів. Рослини вирощували у 2013–2014 роках на полях дослідного господарства ІФРГ НАН України, смт Глеваха Васильківського р-ну Київської обл. Ґрунти дослідного поля світло-сірі і сірі опідзолені супіщані та їх глеюваті відміни на лесових породах. Система основного і передпосівного обробітку ґрунту загальноприйнята для лісостепової кліматичної зони України. Клімат помірно континентальний, м'який, з достатнім зволоженням. Сівба здійсню-

© МОРГУН В. В., СІЧКАР С. М., ПОЧИНОК В. М., ГОЛІК О. В., ЧУГУНКОВА Т. В.

валася в оптимальні строки. Зразки висівали в однорядковому посіві, з кожної ділянки добирали по 20 рослин для проведення структурного аналізу. В лабораторних умовах відібраний матеріал досліджували за такими показниками, як висота рослин (ВР), загальна кущистість (ЗК), продуктивна кущистість (ПК), довжина головного колоса (ДГК), кількість колосків у головному колосі (ККГК), кількість зерен з головного колоса (КЗГК), маса зерна з головного колоса (МЗГК), маса зерна з рослини (МЗР), маса 1000 зерен (МТЗ). Під час вегетації проводили спостереження за рослинами, відзначаючи початок основних фаз розвитку.

Результати та обговорення

Вивчення елементів продуктивності рослин та структури врожаю є важливим при селекційно-генетичному дослідженні видів *Triticum*. Спираючись на багаторічний досвід селекційної роботи, зроблено висновок про те, що основними ознаками, які найбільш впливають на врожайність пшениці, є продуктивна кущистість, кількість колосків у головному колосі, кількість зерен з головного колоса, маса зерна з колоса та маса зерна з рослини. При цьому показник кількості колосків у головному колосі є найбільш стабільним, а продуктивна кущистість та кількість зерен з головного колоса — найбільш варіабельними [3, 11].

При дослідженні зразків спельти озимої із колекції ІФРГ НАН України за стандарт використовували сорт м'якої пшениці Ятрань 60. За ознакою довжини стебла (від 120,4 до 144,8 см) рослини спельти були більш високорослими, ніж рослини пшениці, у яких висота рослин у середньому складала 103,4 см. Загальна кущистість спельти (від 8 до 12 стебел на рослину) також була вищою, ніж у сорту Ятрань 60 (у середньому 7 стебел). За довжиною головного колоса проаналізовані зразки спельти у 1,5–2 рази перевищували м'яку пшеницю. Найвищий показник спостерігали у зразка за № 1115 (20,5 см). Значення інших основних показників структури врожаю представлені у табл. 1.

За більшістю показників зразки спельти достовірно відрізнялися від сорту Ятрань 60. Серед номерів спельти виділився № 1115, який суттєво перевищував сорт за масою 1000 зерен (66,6 г), масою зерна з рослини (26,6 г), масою зерна з головного колоса (4,5 г) та кількістю зерен з головного колоса (53,6 шт.), що дозволяє відзначити його серед інших як перспективний для подальшої селекційної роботи. За вмістом білка (від 16,6 до 17,8 %) всі проаналізовані зразки перевищували сорт Ятрань 60 (14,0 %).

Досліджуючи зразки спельти ярої як стандарту використовували канадський сорт за номером UA 0300392 *T. spelta* CDC Zorba. Морфологічний аналіз показав, що висота рослин спельти ярої коливалася від 120,6 до 136, 2 см, загальна кущистість — від 7 до 13 стебел, що було у межах стандарту. За такими показниками, як довжина головного колоса, кількість колосків у головному колосі, кількість зерен з головного колоса, маса зерна з головного колоса та іншими ярі спельти також не перевищували стандарт.

Проводили аналіз зразка полби озимої. Його порівнювали зі стандартом, яким був сорт озимої пшениці Ятрань 60. Зразок полби озимої № 9613 (*T. dicoccum* W6/14) перевищував стандарт майже за всіма аналізованими показниками. Достовірною була різниця за величиною загальної кущистості, кількістю зерен з головного колоса (47,8 проти 42 шт. у стандарту), масою зерен з головного колоса (2,5 проти 1,8 г), масою зерна з рослини (12,2 проти 7,2 г). Одержані результати свідчать про перспективність даного зразка ози-

Таблиця 1

Показники елементів продуктивності зразків спельти озимої, $\bar{x}$±S

№ зразка	ПК, шт.	ККГК, шт.	КЗГК, шт.	МЗГК, г	МЗР, г	МТЗ, г
Ятрань 60 (ст.)						
1601	5,0±0,2	19,4±0,1	42,0±1,5	1,8±0,1	7,2±0,4	42,0±1,9
Озимі форми						
1114	8,6±0,4*	20,6±0,5*	39,8±0,8	3,3±0,1*	18,1±0,8*	52,8±1,2*
1115	7,6±0,3*	22,2±0,4*	53,6±1,8*	4,5±0,2*	26,6±1,1*	66,6±2,0*
1116	6,5±0,6*	18,0±0,4*	35,7±0,9*	2,8±0,2*	9,8±1,2*	56,5±2,0*
1117	7,0±0,7*	20,6±0,5*	39,8±0,8	3,4±0,2*	16,2±1,7*	55,4±2,0*

Примітка: * — різниця в порівнянні зі стандартом достовірна при $P \leq 0,05$.

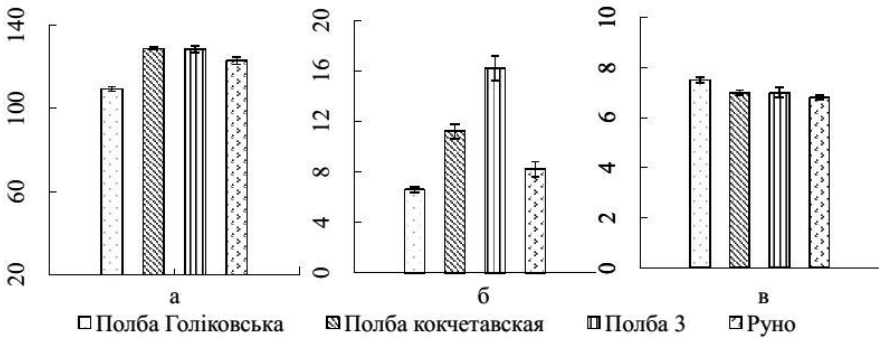


Рис. Характеристика сортів полби ярої: а — висота рослин, см; б — загальна кущистість, шт.; в — довжина головного колоса, см

Таблиця 2

Елементи продуктивності колекційних зразків полби ярої, $\bar{x}$±S

№ зразка	ПК, шт.	ККГК, шт.	КЗГК, шт.	МЗГК, г	МЗР, г
Полба Голіковська (ст.)	3,2±0,1	19,6±0,3	38,0±0,8	1,1±0,05	3,3±0,2
UA 0300021	4,2±0,2*	20,6±0,2*	39,6±0,4	1,4±0,03*	6,5±0,2*
UA 0300183	7,8±0,2*	19,8±0,9	37,8±1,6	1,5±0,04*	7,8±0,3*
UA 0300327	4,2±0,2*	17,0±0,4*	33,4±0,7*	1,7±0,04*	5,3±0,2*
12045	2,4±0,1*	26,6±0,5*	55,2±1,8*	2,5±0,20*	5,1±0,2*
UA 0300002	4,0±0,1*	24,8±0,5*	44,8±0,5*	1,5±0,10*	3,9±0,1*
UA 0300001	6,2±0,5*	26,0±0,3*	50,0±0,5*	1,9±0,07*	8,8±0,9*
12046	6,2±0,5*	24,8±0,2*	48,0±0,4*	2,3±0,06*	10,1±0,6*
UA 0300087	6,8±0,2*	24,6±0,6*	48,4±1,2*	2,3±0,20*	12,2±1,0*

Примітка: * — різниця в порівнянні зі стандартом достовірна при $P \leq 0,05$.

мої спельти для селекційної роботи і доцільність його включення у гібридизацію.

Вивчено 18 колекційних зразків ярих форм полби (*T. dicoccum*), за стандарт використовували новий створений в Україні сорт Полба Голіковська [2]. За результатами порівняльного аналізу чотирьох сортів полби різного походження найменшою висотою рослин (109,4 см) та рівнем загальної кущистості (6–7 стебел) відзначалася Полба Голіковська (рис. а, б). Однак за довжиною головного колоса вона перевищувала досліджувані сорти, крім того її позитивною ознакою є легкий вимолот зерна (рис. в). За показником кількості зерен з головного колоса досліджувані сорти були на одному рівні, однак за масою зерен з головного колоса відзначилися сорти Полба Кокчетавська, Полба 3 і Руно.

Показники головних елементів продуктивності восьми вибіркових зразків полби ярої представлені у табл. 2. За продуктивною кущистістю виділялися рослини номерів UA 0300183, UA 030000, 112046, UA 0300087. Високі показники продуктивної кущистості впливали на показники маси зерна з рослини. Найвищими вони були у номерів UA 0300087 та 12046. Ці ж номери характеризувалися достатньо високою кількістю колосків у головному колосі, кількістю зерен з головного колоса та масою зерен з головного колоса. Зразок № 12045 за кількістю колосків у головному колосі, кількістю зерен з головного колоса та масою зерна з головного колоса перевищував інші. Проведений структурний аналіз свідчить про певні резерви за корисними ознаками у проаналізованих колекційних зразків, що може бути основою для включення їх у селекційні програми.

Досліджували структуру продуктивності у рослин представників малопоширених видів пшениці та амфідиплоїдів від їх схрещування з видами інших родів злаків. Проаналізовані зразки були ярого типу розвитку. Одержані результати представлені у табл. 3.

Найменшу висоту мали рослини *T. sinskajae*. Ця пшениця також характеризувалася низькими показниками всіх елементів структури продуктивності. Однак вона є єдиною серед однозернянок з полегшеним вимолотом зерна. Серед амфідиплоїдів за масою зерна з рослини виділився лише *Ae. ventricosa* × *T. dicoccum*. У цілому, можна зробити висновок, що представлений у табли-

Таблиця 3

Елементи структури продуктивності зразків малопоширених видів та міжродових амфідиплоїдів пшениці, $\bar{x}$±S

Вид, різновид	ПК, шт.	ККГК, шт.	КЗГК, шт.	МЗГК, г	МЗР, г
Полба Голіковська (ст.)	3,2±0,1	19,6±0,3	38,0±0,8	1,1±0,05	3,3±0,2
T. sinskajae var. sinskajae	7,0±0,4	14,2±0,3	8,0±0,8	0,3±0,02	1,6±0,2
T.x hexapolonicum	5,4±0,1	17,2±0,3	43,2±1,6	2,2±0,10	8,5±0,5
T. ispahanicum, var. ispahanicum	4,8±0,2	15,6±0,2	28,4±0,6	1,1±0,07	4,5±0,2
T. durum-Hordeum chilense	7,2±0,3	18,8±0,2	29,2±0,7	1,7±0,05	7,9±0,4
T. timopheevii × *Ae. tauschii*	7,0±0,5	11,8±0,2	25,2±0,4	1,5±0,05	5,2±0,4
T. persicum × *Ae. tauschii*	4,6±0,2	16,0±0,3	45,6±1,5	2,2±0,06	7,6±0,2
T. dicoccum × *Ae. tauschii*	6,0±0,3	14,0±0,1	26,6±0,3	1,5±0,07	6,1±0,3
Ae. ventricosa × *T. dicoccum*	5,6±0,4	13,8±0,2	26,4±0,6	2,1±0,07	13,2±0,7
$НІР_{0,05}$	0,9	0,7	2,6	0,6	1,1

ці матеріал може використовуватись у селекційних програмах після подальшого суттєвого генетичного поліпшення.

Висновки

У результаті досліджень колекційних зразків малопоширених видів роду *Triticum* L. виділено зразки спельти озимої та полби озимої і ярої з високими показниками елементів структури продуктивності. Їх використання шляхом гібридизації, експериментального мутагенезу та генетичної інженерії може бути перспективним при вирішенні питань генетичного поліпшення спельти і полби, а також м'якої пшениці.

ЛІТЕРАТУРА

1. Жуковський П. М. Культурные растения и их сородичи.— Л.: Колос, 1971.— 752 с.
2. Твердохліб О. В., Голік О. В., Нінієва А. К., Богуславський Р. Л. Спельта і полба в органічному землеробстві // Посібник українського хлібороба.— 2013.— С. 154–155.
3. Шелепов В. В., Гаврилюк Н. Н., Вергунов В. А. Пшеница: биология, морфология, селекция, семеноводство.— К.: Логос, 2013.— 498 с.
4. Дробот В. І., Михонік Л. А. Порівняльна характеристика хімічного складу та технологічних властивостей суцільно змеленого пшеничного борошна та борошна спельти // Хранение и переработка зерна.— 2014.— № 4.— С. 37–39.
5. Парій Ф. М., Сухомуд О. Г., Любич В. В. Оцінка господарсько-цінних властивостей нового сорту пшениці спельти озимої Зоря України // Насінництво.— 2013.— № 5.— С. 5–6.
6. Гончаров Н. П., Кондратенко Е. Я. Происхождение, доместикация и эволюция пшениц // Вестник ВОГиС.— 2008.— № S, 12.— С. 159–179.
7. Нінієва А. К., Козуб Н. О., Созінов І. О., Рибалка О. І., Леонов О. Ю., Твердохліб О. В., Богуславський Р. Л. Характеристика зразків *Triticum spelta* L. за показниками якості зерна та електрофоретичними спектрами запасних білків // Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів.— 2013.— № 1, 11.— С. 96–105.
8. Новак Ж. М., Жекова О. І. Характеристика пшениці озимої *Triticum spelta* L. // Збірник наукових праць Уманського національного університету садівництва.— 2011.— № 75.— С. 128–132.
9. Blatter R. H. E., Jacomet S., Schlumbaum A. About the origin of European spelt (*Triticum spelta* L.): allelic differentiation of the HMW Glutenin B1-1 and A1-2 subunit genes // Theor Appl Genet.— 2004.— № 108.— P. 360–367.
10. Ruibal-Mendieta N.L., Delacroix D. L., Mignolet E., Pycke J-M., Marques C., Rozenberg R., Petitjean G., Habib-Jiwan J-L., Meurens M., Quetin-Leclercq J., Delzenne N. M., Larondelle Y. Spelt (*Triticum aestivum* ssp. *Spelta*) as a source of bread making flours and bran naturally enriched in oleic acid and minerals but not phytic acid // J. Agric. Food Chem.— 2005.— № 53.— P. 2751–2759.
11. Звягін А. Ф. Аналіз кореляції між елементами структури продуктивності та морфологічними ознаками у гібридів F_2 пшениці м'якої озимої, їх роль в селекції на підвищену адаптивність та продуктивність // Селекція і насінництво.— 2011.— Вип. 99.— С. 23–29.

MORGUN V.V.[1], SICHKAR S.M.[1], POCHINOK V.M.[1], GOLIK O.V.[2], CHUGUNKOVA T.V.[1]

[1] Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine,
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17, e-mail: sichkar07@gmail.com

[2] The Plant Production Institute nd. a. V. Ya. Yuryev of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, National Center for Plant Genetic Resources Ukraine,
Ukraine, 61060, Kharkov, Moscow av., 142

ANALYSIS OF PRODUCTIVITY STRUCTURE OF COLLECTION SAMPLES OF RARE WHEAT SPECIES

***Aim*.** To analyze a collection of rare species of wheat and select samples with high levels of productivity elements for use in breeding programs and creation of new varieties of spelt and emmer. ***Methods*.** Field and laboratory methods for studying the structure of plant productivity. ***Results*.** The samples of spelt and emmer collections from the Plant Production Institute nd. a. V. Ya. Yuryev of NAAS of Ukraine and other scientific institutions were examined and characteristics of plant productivity structure elements were represented. ***Conclusions*.** Perspective forms of winter spelt as well as winter and spring emmer with high levels of productivity and elements of it structure were selected for genetic improvement of spelt, emmer and bread wheat.

Keywords: *Triticum spelta* L., *T. dicoccum* (Schrank) Schuebl., diversity, plant productivity structure.

УДК 575.858:582.734.3:630*165.6:634.11

ОПАЛКО А. І., ОПАЛКО О. А.
Національний дендрологічний парк «Софіївка» НАН України,
Україна, 20300, м. Умань Черкаської обл., вул. Київська, 12А, e-mail: opalko_a@.ukr.net

ПРОБЛЕМИ І ПЕРСПЕКТИВИ СЕЛЕКЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНОГО ВДОСКОНАЛЕННЯ ЯБЛУНІ (*MALUS* MILL.)

Яблуня належить до найбільш поширених у світі плодових дерев. Світове виробництво яблук становить 70–76 млн тонн на рік, що складає близько 15% від усієї кількості вирощених плодів і ягід, поступаючись за сумарним виробництвом лише цитрусовим і дещо переважаючи показники винограду й бананів. Понад 80% вирощуваних у світі яблук споживається свіжими. Решта — майже повністю використовується для виробництва концентрованого соку. У першу п'ятірку країн — виробників яблук у світі входять Китай (понад 50% світового виробництва), США — 6,8, Польща — 4,2, Туреччина — 4,0 й Італія — 3,6%. На наступних п'яти сходинках з показниками середньорічного виробництва 3,2–1,1 млн тонн розташовуються Індія, Франція, Чилі, Бразилія й Україна. За останні шість років на світовому ринку спостерігається зростання постачання яблук з Китаю на 35%, що в абсолютних показниках становить близько 9 млн тонн (за валового виробництва у цій країні до 22–35 млн тонн). Крім Китаю, до п'ятірки держав, що істотно збільшили виробництво яблук за останні шість років, входять Туреччина, Україна, Чилі й Бразилія. Однак незважаючи на суттєвий приріст виробництва яблук в Україні, абсолютні показники сусідньої Польщі все ще у два з половиною рази більші [1], хоча її агроекологічні умови значно менш сприятливі для яблуневих садів [2].

У структурі промислових садів України частка яблуні складає близько 55%, тоді як у присадибних садках — до 35%, що типово для більшості держав зі схожими агроекологічними умовами. Таке домінування яблуні у насадженнях плодових порід в усіх країнах з помірним кліматом пояснюється надзвичайним поєднанням високих смакових і дієтичних якостей її плодів з технологічністю, транспортабельністю та здатністю до тривалого зберігання. За різноманіттям сортименту яблуня не має конкурентів ні з-поміж зерняткових, ні кісточкових чи будь-яких інших плодових культур [2].

Незважаючи на широку розповсюдженість яблуні і тисячолітню історію її вирощування, яблуня вважається складною для селекційно-генетичних досліджень рослиною. Крім того, існуючі системи класифікації її видів здебільшого суперечливі щодо міжвидових взаємин, у них не завжди враховуються ознаки, що вказують на еволюційні ранги таксонів [3, 4].

У роді *Malus* Mill., що належить до родини Rosaceae Juss., підродини Amygdaloideae Arn., підтриби Malinae Rev. (колишня підродина Maloideae C. Weber), нині налічують близько 50 видів і внутрівидових таксонів яблуні, з яких виділяють як самостійний комплексний вид яблуню домашню — *M. domestica* Borkh. У межах цього виду об'єднують усі культивовані сорти і форми, що вирощуються у теплому й помірному кліматі, хоча деякі з них ведуть свій родовід від різних ботанічних видів та гібридів між ними. У формуванні сучасного сортименту яблуні домашньої брали участь принаймні яблуня лісова — *M. silvestris* Mill. і яблуня низькоросла — *M. pumila* Mill., а також яблуня східна, або кавказька — *M. orientalis* Uglitzk., яблуня Сіверса — *M. sieversii* (Ledeb.) M. Roem, яблуня сливолиста, або китайка — *M. prunifolia* (Willd) Borkh., яблуня сибірська ягідна — *M. baccata* (L.) Borkh., а також яблуня маньчжурська — *M. mandshurica* (Maxim.) Kom. ex Juz. При створенні деяких сортів залучались інші види яблуні: *M. floribunda* Sieb. ex Van Houtte, *M. micromalus* Mak., гібридний вид *M. atrosanguinea* (Spaeth) Schneid (*M. halliana* Koehne × *M. sieboldii* (Regel) Rehder) тощо. Нині з'явилися свідчення молекулярних генетиків, що існуючі сорти яблуні домашньої більш тісно пов'язані з яблунею Сіверса, ніж зі звичайною (лісовою) й сливолистою та сибірською ягідною. При цьому внесок європейського виду яблуні лісової (*M. silvestris*) визнається другим за значенням після яблуні Сіверса (*M. sieversii*) [3, 5, 6].

Матеріали і методи

Зважаючи на важливість проблеми селекції на антропоадаптивність плодових рослин, зокрема стосовно селекційно-генетичного вдоскона-

© ОПАЛКО А. І., ОПАЛКО О. А.

лення яблуні, та беручи до уваги дані, отримані внаслідок аналізу результатів експериментальних і теоретичних досліджень, виконаних у різних країнах світу протягом тривалого історичного періоду вченими різних наукових шкіл [2–19], зроблено спробу узагальнення доступної інформації з матеріалами власних досліджень. При цьому був застосований метод групової вибірки, що дало змогу відокремити сумнівні публікації, застосувавши критерії цитування в професійних рецензованих виданнях.

Результати та обговорення

Однією з головних проблем, які з більшим чи меншим успіхом селекціонери намагаються розв'язувати в процесі вдосконалення рослин, у тому числі яблуні, слід назвати пошук джерел і, особливо, донорів дефіцитних ознак антропоадаптивного комплексу [2, 7, 19, 20]. Знання щодо походження, в тому числі географічного, а також філогенетичних зв'язків культивованих рослин на міжвидовому і міжродовому рівнях необхідні для успішного ведення селекції [3, 4, 14, 16].

Дикорослі родичі досить часто використовуються в гібридизації як джерела генних комплексів або донори окремих генів, що контролюють ознаки витривалості щодо абіотичних і біотичних стресів, однак разом з бажаними генами стійкості здебільшого передають потомству чимало генів, прояв яких погіршує господарчу цінність гібридів. Тому залучати безпосередньо в гібридизацію дикорослі види варто лише тоді, коли в колекції існуючих сортів відсутні донори і джерела шуканих ознак [2, 7, 21].

Сорти яблуні у виробництві вирощуються переважно як сорто-підщепні комбінування, що включають прищепу, на якій формуються очікувані саме від цього сорту плоди, та підщепу, що є основою кореневого живлення плодового дерева. При цьому внаслідок щеплення, що наразі є формою промислового вегетативного розмноження, повністю забезпечується збереження основних генетичних властивостей і господарчо цінних ознак прищепи (розмножуваного сорту). Йдеться насамперед про здатність сорту формувати плоди відповідної якості. Щодо підщепи, від якої великою мірою залежить габітус, рівень адаптивності щодо певних абіотичних та біотичних чинників тощо та прояв деяких ознак плодів, то її особливості визначаються способом розмноження (сіянцева чи клонова), генотипом маточної рослини/рослин, з яких отримана підщепа, та особливостями взаємодії з прищепою [21].

Антропоадаптивний комплекс ознак новостворюваних сортів яблуні для вітчизняного плодівництва нараховує понад 50 важливих показників [7].

Найбільше значення для умов України мають такі з них:

1. Висока й стабільна за роками урожайність.
2. Високі смакові якості плодів.
3. Оптимальний розмір і одномірність плодів.
4. Зовнішня привабливість плодів за формою і забарвленням.
5. Приємний аромат плодів.
6. Оптимальний вміст цінних для організму людини речовин.
7. Енергетична цінність м'якуша плоду.
8. Здатність до самоплідності і відповідні ступені перехресної плодючості з іншими сортами одного строку цвітіння та достигання.
9. Скороплідність та інтенсивне нарощування врожаю у молодому віці.
10. Дружність достигання плодів.
11. Придатність плодів до тривалого зберігання.
12. Придатність плодів для транспортування.
13. Придатність плодів для перероблення.
14. Комплексна стійкість проти поширених патогенних організмів (збудників парші, борошнистої роси, бурої плямистості, європейського раку, бактеріального опіку, плодової гнилі тощо).
15. Витривалість проти абіотичних стресових чинників.
16. Зручність для догляду: збирання врожаю, відповідна сила росту, архітектоніка і габітус дерев.
17. Здатність ефективно акумулювати сонячну енергію, водні й поживні ресурси ґрунту, не накопичуючи при цьому в урожаї шкідливі речовини.
18. Посттравматична регенераційна здатність.

Розглядаючи антропоадаптивність, здатність сорту як спроможність стабільно задовольняти потреби людини: забезпечувати щорічну врожайність і якість продукції, витривалість проти хвороб, шкідників, несприятливих ґрунтово-кліматичних умов, пристосованість до механізованого догляду і збирання врожаю, здатність ефективно акумулювати сонячну енергію, рости на

забруднених фонах без нагромадження в урожаї шкідливих речовин (пестицидів, нітратів, солей важких металів, радіонуклідів), опірність проти антропічних чинників (негативного впливу діяльності людини) [21], варто розрізняти людину-виробника, людину-споживача, людину-переробника і людину-посередника, інтереси яких не завжди збігаються [7].

Яблуня належить до алогамних рослин з моногенним гаметофітним контролем самонесумісності. Виробники яблук, для яких отримання самоплідних сортів було б економічно вигідним, нинішню необхідність якісного комахозапилення для отримання врожаю впродовж тисячоліть сприймають за належне. При цьому проблема **самоплідності і відповідних ступенів перехресної плодючості** з іншими сортами одного строку цвітіння та достигання у цьому переліку на восьмій позиції, що свідчить про важливість роботи у зазначеному напрямі. Однак у тематичних планах селекційно-генетичних досліджень даний напрям здебільшого обмежується пошуком кращих запилювачів для новостворюваних сортів; рівні самоплідності лише констатуються, а окремі публікації з питань селекції на самоплідність [22] носять переважно теоретичний характер. Внаслідок розвитку методів молекулярної біології було розроблено ДНК-маркери різних типів для ідентифікації генів, що дало змогу виявити в межах виду *M. domestica* близько 20 алелей гена самонесумісності [9, 23]. До суттєвих переваг ДНК-маркерного аналізу належить можливість ідентифікувати алельні набори гена самонесумісності у селекційних зразків яблуні ще до їх вступу у фазу цвітіння. До прикладів такої успішної ідентифікації слід зарахувати з'ясування алельного різноманіття *S*-гена у 70 сортів яблуні Шведської селекції, що в комплексі з даними генотипування сортів з використанням мікросателітних ДНК-маркерів було використано для складання генетичних паспортів сортів, а також виявлення ступенів їхньої генетичної спорідненості [24]. Проблема ідентифікації S-алелей є актуальною в генетичних дослідженнях не лише яблуні, а й загалом для багатьох видів культурних рослин з перехресним типом запилення. Стосовно біології запилення і її значення для стабілізації продуктивності яблуні, зокрема закладання врожаю наступного року, заслуговує на увагу огляд Шого Матсумото [25], який проаналізував особливості проростання пилку, значення генотипу маточки щодо взаємодії з пилком, механізми повної й часткової самонесумісності й самоплідності, в тому числі за різної плоїдності компонентів схрещування, що надзвичайно важливо для прогнозування ефективності запилення і, відповідно, для підбору ефективних сортів-запилювачів.

Висока і стабільна врожайність цікавить насамперед виробника. Щодо споживача, то ця ознака має певне значення лише з точки зору стабільності цін, тому що за використання сортів з нестабільною врожайністю у неврожайні роки та за обмеженого імпорту ціни на плоди можуть істотно зростати. Ознаку можна вважати шкідливою для ґрунту і певною мірою для самої рослини, тому що висока і стабільна врожайність виснажує і ґрунт, і рослину. З іншого боку, зважаючи на те, ще йдеться про культурну, а не про дикорослу рослину, ця ознака може вважатися корисною, тому що генотипи, які спроможні забезпечувати високу й стабільну врожайність, будуть розмножуватися людиною і, незважаючи на коротшу тривалість їхнього індивідуального біологічного життя, кількість особин таких генотипів буде зростати. Натомість сади, закладені маловрожайними генотипами, будуть розкорчовуватись (або перещеплюватись) і кількість особин цих генотипів зменшуватиметься до повного елімінування.

Високі смакові якості безумовно цікавлять насамперед споживача і, дещо меншою мірою, посередника. Однак ця ознака, так само як зовнішня привабливість чи аромат, досить суб'єктивна. За незадоволеного попиту саме посередник найбільше впливає на виробника, надаючи перевагу сортам, що формують плоди з дещо невиразним смаком і ароматом, а значить, не викликають спротиву більшості покупців-споживачів, що сприяє прискоренню збуту. Плоди з виразним сильним ароматом і смаком цікавлять обмежену кількість споживачів-гурманів, і тому вирощування сортів з такими плодами не стимулюється посередником. Однак у міру насичення ринку потреби гурманів, кількість яких постійно зростає, можуть невдовзі стати джерелом прибутку для виробників плодів яблуні різноманітного, зокрема й пікантного, смаку й аромату. Тому, незважаючи на різні нинішні кон'юнктурні чинники, селекціонери і генетики повинні зберігати в своїх колекціях унікальні за якістю плодів генотипи.

Вміст цінних для організму людини речовин, **енергетична цінність і придатність пло-**

дів для тривалого зберігання цікавлять лише споживача з обмеженою купівельною спроможністю. Для заможних споживачів плоди яблуні є джерелом насолоди, а не вітамінів, пектинів чи калорій. Тим більше не цікавить заможного споживача тривалість зберігання. Хоча яблука достигають у «вузькому вікні» сезону (зазвичай два-три місяці, залежно від терміну збирання певного сорту у відповідному регіоні), однак заможний споживач не робить заготівлі на зиму, а хоче мати можливість купувати плоди певної, цілком визначеної якості протягом усього року, залишаючи посереднику турботи про зберігання чи транспортабельність.

Вміст певних речовин у плодах яблуні цікавить насамперед переробника, якщо йдеться про вміст, наприклад, пектину, що впливає на якість мармеладу; або вміст і співвідношення цукрів і кислот, від яких залежить якість соку та інших продуктів перероблення (джему, повидла, конфітюру, желе тощо).

Відповідно для посередника мають значення ті ознаки, що збільшують ринкову привабливість, а значить, полегшують реалізацію плодів і зменшують ризик втрат. Тому поряд з привабливістю для покупця-споживача (смак, розмір, колір, аромат) для посередника лежкоспроможність, транспортабельність і придатність для перероблення мають дуже велике значення.

Стійкість рослин проти патогенних організмів корисна для виробника, який при вирощуванні стабільних сортів економить на технологічних операціях і засобах захисту. Корисна для самої рослини й для інших рослин, тому що стійкі генотипи не акумулюють інфекцію і не можуть бути субстратом і проміжним господарем для патогенних організмів. Корисна для ґрунту і його мікроорганізмів, атмосфери і всього довкілля, адже використання стійких генотипів зменшує потребу у внесенні пестицидів, які потрапляють у зовнішнє середовище. Натомість для патогенів така стійкість шкідлива. Йдеться не лише про стійкість стосовно власне патогенних організмів, а також витривалість проти абіотичних стресів і високу регенераційну здатність. Ослаблені морозами чи посухою рослини, а також рослини з пониженою посттравматичною регенераційною здатністю більше потерпають від біотичних стресів, а через травмовані тканини інфекція швидше потрапляє в рослинний організм і спричинює небажані для людини наслідки.

Селекція на підвищення товарності плодів, тобто на комплекс ознак, який зумовлюють привабливість плодів для споживача і який визначається запитами ринку. Це означає, що загалом комплекс ознак товарності плодів має збігатися зі згаданим антропоадаптивним комплексом ознак нових сортів, що стосуються споживача. У реальності і місцевий внутрішній, і зовнішній ринки досить динамічні, що зобов'язує селекціонера працювати на майбутній віртуальний ринок, однак класичний промисловий сад проектується з урахуванням життєвого циклу культивованих яблунь 45–50 років, тоді як тривалість життя інтенсивного саду на карликових підщепах не перевищує 12–16 років. Це означає, що середній показник оновлення садів становить лише близько трьох відсотків на рік.

Ринковий попит на десертні плоди іноді може бути зовсім ірраціональним. Це стосується і забарвлення плоду, і його форми. Мода на яскраво забарвлені плоди змінилася з поширенням зеленоплідного сорту Грані Сміт, і нині на світовому ринку є плоди не тільки жовтого, червоного, зеленого та рожевого, а й інших кольорів й колірних комбінацій. Однак при цьому європейський споживач надає перевагу смугастим плодам з чіткими межами між смугами різного забарвлення, тоді як американський покупець воліє мати плоди з розмитими міжколірними межами. Ще менш зрозумілою видається відмова покупців від плисковатих плодів на користь кулястих та яйцеподібних, які розкуповуються швидше, ніж плисковаті, навіть незважаючи на смакові та інші корисні якості.

На відміну від держав Євросоюзу, в Україні не ведеться селекція сортів яблуні з придатними для виробництва сидру плодами. Однак у колекції гібридних сіянців мліївського селекціонера В. Я. Чупринюка є вихідний матеріал з підвищеним вмістом цукрів, проте через відсутність сидрового виробництва сорти сидрового напрямку наразі не мають перспектив. Зважаючи на те, що Україна має невдовзі освоїти європейський ринок, а також враховуючи динаміку внутрішнього попиту, цілком можливо, що сидром і відповідно сидровими сортами зацікавляться й в Україні [7].

Отже, можна погодитися з висловлюванням відомого російського селекціонера В. В. Кичини щодо того, що створити ідеальний сорт неможливо, тому що розуміння ідеального сорту до-

сить швидко змінюється, однак прагнути до цього слід з урахуванням призначення новостворюваного сорту: десертний, консервний, сидровий тощо.

Висновки

Конкурентоспроможність садівничої галузі України і, зокрема, виробництва яблук для наповнення внутрішнього з перспективою виходу на світовий ринок цілком залежить від її селекційно-генетичного забезпечення. Вітчизняні селекційні програми, кінцевою метою яких є вирішення не лише продовольчих, а й загальноекономічних і навіть соціальних проблем, необхідно розробляти з урахуванням останніх досягнень молекулярної біології і генетики, спрямовуючи об'єднані зусилля селекціонерів і генетиків у напрямі вдосконалення антропоадаптивного комплексу яблуні як провідної плодової породи в Україні.

ЛІТЕРАТУРА

1. Apples // FAOSTAT Domains: Production / Crops [Електронний ресурс].— 2015.— Режим доступу.— http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E.
2. Опалко А. І. Необхідність збагачення різноманіття генотипів садових рослин в Україні // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин.— 2012.— Вип. 3 (13).— С. 35–39.
3. Опалко О. А., Черненко А. Д., Опалко А. І. Філогенетичні зв'язки культивованих в Україні представників роду *Malus* Mill. // Інтродукція рослин.— 2012.— № 1.— С. 16–23.
4. Опалко А. І., Кучер Н. М., Опалко О. А., Черненко А. Д. Філогенез і фітогеографія зерняткових плодових культур // Автохтонні та інтродуковані рослини: Зб. наук. праць НДП «Софіївка» НАН України.— 2012.— Вип. 8.— С. 35–44.
5. Velasco R. Zharkikh A., Affourtit J. [et al.] The genome of the domesticated apple (*Malus*×*domestica* Borkh.) // Nature genetics.— 2010.— 42, № 10.— P. 833–839.
6. Khan M. A., Olsen K. M., Sovero V. [et al.] Fruit quality traits have played critical roles in domestication of the apple // The plant genome.— 2014.— 7, № 3.— P. 1–18.
7. Кондратенко П. В., Балабак А. Ф., Опалко А. І. Програмові засади вдосконалення антропоадаптивного потенціалу виробництва плодів яблуні в Україні // Біологічні науки і проблеми рослинництва: Зб. наук. праць УДАУ (Спец. випуск).— Умань, 2003.— С. 475–480.
8. Лангенфельд В. Т. Яблоня: Морфологическая эволюция, филогения, география, систематика.— Рига: Зинатне, 1991.— 234 с.
9. Broothaerts W. New finding in apple *S*-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some *S*-alleles // Theoretical and applied Genetics.— 2003.— 106, N 4.— P. 703–714.
10. Brown S. K. Apple // Fruit breeding: Handbook of plant breeding [Eds.: Maria L. Badenes, David H. Byrne] .— New York; Dordrecht; Heidelberg; London: Springer, 2012.— 8.— P. 329–367.
11. Ganeva T., Uzunova K. Comparative leaf epidermis study in species of genus *Malus* Mill. (*Rosaceae*) // Botanica Serbica.— 2010.— 4, N 1.— P. 45–49.
12. Hanke M.-V., Flachowsky H. *Malus* Species (Apple) // Biotechnology in agriculture and forestry [Eds.: Jack M. Widholm et al.].— Berlin; Heidelberg: Springer, 2010.— 64. Genetic modification of plants: Agriculture, horticulture and forestry [Eds.: F. Kempken and C. Jung], Ch. 17. Fruit Crops.— P. 308–314.
13. Jackson J. E. Biotechnology of apples and pears // Biology of apples and pears [Ed.: John E. Jackson] .— Cambridge: University press, 2003.— Ch. 14.— P. 472–481.
14. Juniper B. E., Mabberley D. J. The story of the apple.— Portland: Timber press, 2006.—219 p.
15. Ignatov A., Bodishevskaya A. *Malus*. // Wild crop relatives: genomic and breeding resources, temperate fruits [Ed.: Chittaranjan Kole].— Berlin; Heidelberg: Springer, 2011.— Ch. 3.— P. 45–64.
16. Kobel F., Steinegger P., Anliker J. Weitere Untersuchungen über die Befruchtungsverhaltnisse der Apfel- und Birnsorten // Landwirtschaft Jahrbuch Schweizer.— 1939.— 53.— P. 160–191.
17. Sanzol J. Dating end functional characterization of duplicated genes in the apple (*Malus domestica* Borkh.) by analyzing EST data // BMC Plant biology.— 2010.— 10 (87).— P. 1–22.
18. Zamorskyi V. V., Opalko A. I. The study of the anatomical structure of apple-tree tissues and apple fruits (*Malus* Mill.) // Ecological consequences of increasing crop productivity: Plant breeding and biotic diversity [Eds.: Anatoly I. Opalko et al.].— Toronto New Jersey: Apple Academic Press, 2015.— Part 3: Plant breeding in the Ukraine: Agroecological approaches.— P. 127–139.
19. Опалко А. І. Антропоадаптивність рослин як базисний компонент нової хвилі «зеленої революції» // Генетика і селекція: досягнення та проблеми: Тези доп. міжнародної наукової конференції (м. Умань, 18–20 березня 2014 р.) / [Редкол.: О. О. Непочатенко (відп. ред.) та ін.].— Умань: УНУС, 2014.— С. 84–87.

20. Opalko A. I., Opalko O. A. Anthropoadaptability of plants as a basis component of a new wave of the «green revolution» // Biological systems, biodiversity, and stability of plant communities [Eds. Larissa I. Weisfeld, Anatoly Iv. Opalko, Nina An. Bome et al.].— Toronto New Jersey: Apple Academic Press, 2015.— Part 1: The optimization of interaction anthropogenic changes with natural environmental variability for sustainable land use.— P. 3–11.
21. Опалко А. І. Селекція зерняткових культур // Селекція плодових і овочевих культур: підручник / [А. І. Опалко, Ф. О. Заплічко].— К.: Вища шк., 2000.— 440 с.
22. Опалко А. И., Запличко Ф. А. Самофертильность яблони, индуцированная гамма-лучами и химическими мутагенами // Цитология и генетика.— К., 1981.— 15, № 3.— С. 29–32, 40.
23. Sakurai K., Brown S. K., Weeden N. Self-incompatibility alleles of apple cultivars and advanced selections // Horticultural Science.— 2000.— 35, № 1.— P. 116–119.
24. Garkava-Gustavsson L., Kolodinska-Brantestam A., Sehic J. [et al.] Molecular characterization of indigenous Swedish apple cultivars based on SSR and *S*-allele analysis // Hereditas.— 2008.— 145, N 3.— P. 99–112.
25. Matsumoto S. Apple pollination biology for stable and novel fruit production: search system for apple cultivar combination showing incompatibility, semicompatibility, and full-compatibility based on the S-RNase allele database // International journal of agronomy.— 2014.— 2014, Article ID 138271.— 9 p.

OPALKO A.I., OPALKO O.A.

National dendrological park «Sofiyivka» of NAS of Ukraine,
Ukraine, *20300*, *Uman, Kiyivska str., 12A, e-mail: opalko_a@.ukr.net*

THE OUTLOOK FOR THE IMPROVEMENT OF BREEDING AND GENETICS PROBLEMS OF APPLE TREE (*MALUS* MILL.)

Aims. The prevalence of an apple trees in the fruit plantations of Ukraine as well as in the other parts of the world with temperate climate is explained by unusual combination of high flavouring and dietary quality of its fruits with great index, transportability and long-term preservation capacity. In spite of the essential increase of apple production in Ukraine the absolute data of Poland twice as much of that in Ukraine, nevertheless its agro-ecological conditions are less suitable for apple growing. ***Methods.*** The method of group sample for the retrospective review of the experimental and theoretical researches which have been done all over the different countries of the world was used in order to clarify the urgent matters so as to select and improve the breeding and genetics prospects of an apple. ***Results.*** The apple cultivars which have been growing in farming as scion/rootstock combination are combine the targets of breeding apple scion (cultivar where the fruits are formed) so as the rootstock improvement which was the basis of root nutrition in the fruit tree. Anthropoadaptive features complex of the newly-created cultivars has more than 50 important indices hereby the list and economic sense of them should be changed essentially depending from the district, population prosperity and feeding culture dynamics. ***Conclusions.*** Rise in the apple production of Ukraine in order to replenish the home market with the prospect to come out to the world market wholly depend from the breeding and genetics support of the sector of fruit production. The breeders and geneticists forces should be referred in the direction of apple anthropoadaptability complex improvement as the as the top fruit in Ukraine.

Keywords: anthropoadaptability, cultivar, scion, stock apple, self-incompatibility alleles.

УДК 633.112.1:631.527.2:581.5

ПАЛАМАРЧУК А. І.

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення НААН України, Україна, 06536, м. Одеса, вул. Овідіопольська дорога, 3, e-mail: a_palamarchuk@ukr.net

ОСОБЛИВОСТІ МОРОЗО- І ЗИМОСТІЙКОСТІ ПШЕНИЦІ ТВЕРДОЇ ОЗИМОЇ

Зимостійкість культурних видів рослин, в тому числі й пшениці, створювалася в процесі еволюції як адаптивна генетико-фізіологічна властивість організму за конкретних агрокліматичних умов росту і розвитку рослин. Однією з головних властивостей, що досить детально вивчалися серед озимих і факультативних сортів твердої пшениці, були морозостійкість і її складові; тривалість періоду яровизаційного періоду (контролюється системою генів Vrn), реакція на фотоперіод (система генів Ppd), морфофізіологічні ознаки рослин твердої пшениці, що відповідають за стійкість до низьких температур (накопичення цукру в вузлах кущіння на початку зими, стелюща та напівстелюща форми куща рослин в осінній період, інтенсивність забарвлення листків і стебел восени та ранньою весною). Рослини озимих культур, в т.ч. і пшениці твердої озимої, мають онтогенетичну адаптацію, що може бути як генотипічною, так і фенотипічною. Особливе значення в онтогенезі рослин мають регуляторні механізми: фотоперіодизм і яровизація. Потреба в яровизації (реакція на низькі плюсові температури) в початковий період для послідуючого переходу до генеративного розвитку — одна з головних ознак, що відрізняє типово озимі форми від типово ярих.

Поряд з іншими показниками тривалість яровизаційної потреби та фотоперіодична чутливість суттєво визначають рівень адаптації рослинного організму до різноманітних стресових умов довколишнього середовища в зв'язку зі значним впливом цих ознак на морозо- і зимостійкість конкретних генотипів озимої пшениці [1, 2]. Генотипи з тривалою яровизаційною потребою вступають у зимівлю з менш диференційованою точкою росту, що дає можливість їм краще протистояти дії негативних температур. Зимостійкість рослин тісно пов'язана з характером їх фотоперіодичної реакції. Встановлено, що зимостійкі сорти пшениці мають дуже високу фотоперіодичну чутливість порівняно зі слабозимостійкими сортами. Значний ступінь фоточутливості також сприяє протидії негативним температурам як наприкінці перезимівлі після відлиг та при поверненні відчутних морозів навесні [3], так і восени в період загартування рослин. Стійкість до негативних факторів зимівлі знаходяться у прямій залежності і від рівня фотоперіодичної чутливості та затримки інтенсивності росту під впливом осінніх умов, перш за все довжини дня і зниження температури. Затримка в рості визначається фотоперіодичною реакцією рослин. Як правило, сорти з високою фотоперіодичною реакцією восени затримуються в рості більше, ніж сорти з низькою фотоперіодичною чутливістю.

Слід зазначити, що генетика типу розвитку озимої пшениці вивчена практично на основі пшениці м'якої озимої і, незважаючи на всю важливість, досліджень з генетики типу розвитку пшениці твердої проводилося дуже мало [4].

Матеріали і методи

Виходячи з необхідності значно більшого використання в селекційній практиці ознак тривалості яровизаційної потреби і рівня фотоперіодичної чутливості новітнього вихідного матеріалу пшениці твердої озимої, нами проводився аналіз у сучасних сортів та селекційних номерів пшениці твердої озимої. Крім вивчення на продуктивність, значна увага приділяється оцінці генотипів твердої озимої пшениці з морозо- і зимостійкості, посухо- і жаростійкості, стійкості до поширених хвороб та якості зерна. Тому весною 2011 року варіанти з дослідження тривалості яровизації 79 сортозразків озимої твердої пшениці становили 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 і 35 діб. Усього провели 3 серії вирощування висаджених розсадою яровизованих рослин:

в умовах зрошуваної польової ділянки висаджували рослини зі всіх варіантів дробної яровизації від 5 до 35 діб, а також варіант з неяровизованими проростками (травень – липень);

на світловому майданчику висаджували варіанти розсади з яровизованими проростками протягом 35 діб в умовах подовженого (18 годин)

© ПАЛАМАРЧУК А. І.

та скороченого (12 годин) фотоперіодів (травень – липень).

У варіанті з подовженим днем з 6 до 9 годин ранку та з 18 до 24 годин вечора подовжували освітлення за допомогою ламп ДРІ-2000. Скорочення фотоперіоду в останньому варіанті здійснювалося шляхом закривання посудин з рослинами темними ящиками (100 × 100 × 150 см) із затемненими вентиляційними кватирками. В окремих рослин (20–30 у різних варіантах для кожного зразка) реєстрували дату колосіння за допомогою пергаментної етикетки при появі верхівки головного колоса з піхви прапорцевого листа. Рівень тривалості яровизаційної потреби визначали через зіставлення кількості діб до колосіння експериментального зразка у різних варіантах штучної яровизації. Рівень фоточутливості встановлювався шляхом порівняння ступеня затримки колосіння на скороченому фотоперіоді відповідно до строків колосіння на подовженому фотоперіоді.

Шляхом проморожування рослин у посівних ящиках при від –16 °С до –17 °С вивчали морозостійкість експериментального матеріалу. Крім того, перед входом у зиму досліджували також вміст цукру в вузлах кущення і надземній масі. Зимостійкість рослин оцінювали окомірно на початку відновлення весняної вегетації.

Результати та обговорення

Проведені дослідження 79 сортів твердої озимої пшениці з різних еколого-географічних зон на їх чутливість до фотоперіоду в умовах довгого (18 годин) та короткого (12 годин) дня показало, що вони мають різноманітні біологічні особливості росту та розвитку рослин у цих умовах. Досліджені сорти різняться між собою за фотоперіодичною чутливістю. В умовах подовженого дня тривалість періоду цих сортозразків від висадки рослин до колосіння складала від 32 до 46 діб, а на скороченому дні тривалість цього періоду зросла до 53–93 діб (табл. 1). Крім того, проведеними дослідженнями встановлено, що варіанти сортів твердої озимої пшениці з тривалістю яровизації 5 і 10 діб та варіант з неяровизованими проростками зовсім не виколосилися (за винятком окремих рослин у варіанті яровизації 10 діб, що ми віднесли до засміченості сортозразків). У варіанті з яровизованими протягом 15 діб рослинами виколосилося 5 досліджуваних сортозразків, що складає 6,3 відсотка від загальної кількості. Інші сортозразки були ранжовані таким чином: 16–20 діб — 10 штук (12,7%), 21–25 діб — 38 штук (48,1%), 26–30 діб — 26 штук (32,9%) .

Так, сорти Nazimi і ES98/MBVD-14 в умовах скороченого дня характеризуються середнім рівнем фоточутливості, а сорти Safari, ES98/MBVD-11 і 68111/ARD практично в 2 рази переважали затримку сортів Nazimi і ES98/MBVD-14 і тому віднесені до групи сортів з сильною фотоперіодичною чутливістю. Подібним чином розподілено за фотоперіодичною чутливістю і сорти з тривалістю яровизаційного періоду 16–20 діб. Тобто у сортів твердої озимої пшениці з короткою тривалістю потреби в яровизації недостатній рівень морозо-, зимостійкості компенсується за рахунок середнього і сильного рівнів фотоперіодичної чутливості. Характерно, що сорти з більш високою потребою тривалості яровизації (21–25 діб) мають у своєму складі 7 сортів (8,9%), що за фотоперіодичною чутливістю віднесені до середньослабкої групи і 1 сорт (1,3%) — до слабкої. Серед всього дослідженого вихідного матеріалу сорти, що мають тривалість яровизаційної потреби 26–30 діб і середню або сильну фотоперіодичну чутливість, належать до найбільш морозо-, зимостійких сортів твердої озимої пшениці в світі.

Відомо, що загартування рослин, їхня стійкість до негативних факторів зимівлі знаходяться у прямій залежності і від рівня фотоперіодичної чутливості та затримки інтенсивності росту під впливом осінніх умов, перш за все довжини дня і зниження температури. Затримка в рості визначається фотоперіодичною реакцією рослин. Як правило, сорти з високою фотоперіодичною реакцією восени затримуються в рості більше, ніж сорти з низькою фотоперіодичною чутливістю. Таким чином, всі ці ознаки сприяють затримці диференціації конуса наростання рослин та накопиченню в них пластичних речовин, перш за все вуглеводів.

Виходячи з того, що досліджувані сортозразки твердої озимої пшениці значною мірою різняться між собою за тривалістю яровизаційної потреби та рівнем фотоперіодичної чутливості, нами вивчалися й інші показники, які впливають на адаптивність цієї культури до несприятливих умов зимівлі: вміст цукру в рослинах та зимостійкість (табл. 2). Групування отриманих результатів досліджень за такими ознаками, як

Таблиця 1

Відносне ранжування досліджених сортів твердої озимої пшениці за тривалістю яровизаційної потреби та рівнем фотоперіодичної чутливості, СГІ – НЦНС, 2011 р.

Тривалість яровизації, діб	Рівень фотоперіодичної чутливості			
	слабкий	середньослабкий	середній	сильний
15			Nazimi ES98/MBVD-14	Safari ES98/MBVD-11 68111/ARD
16–20			Гавань Amadur Elidur Ancodur Martondur 3 Odmadur 2 5-IR	Гордейформе 335 Acodur Alidur
21–25	1893-Brindur × DF 38–86	Акведук Атол Прозорий 1897-Brindur × DF 38-86 1898-Brindur × DF 38-86 DF900-83/WBD 881 WBD 881/Rodur	Айсберг од. Архіпелаг Бурштин Босфор Дельта ES98/MBVD-12 Крейсер Лінкор Martondur 2 Odmadur 1 Прибуткова Прикумська 63 Таврида Тур 1 Чорноколоса 46 Янтар поволзький 1892-Brindur × DF 38-86	Альона Афіна Донський янтар Золоте руно Континент Лагуна Макар Партеніт Перлина одеська Rodur Topaz 6-IR
26–30		Крупинка	Агат Дону Алий парус Аксиніт Амазонка Білий парус Гардемарин Геліос Гордейформе 6 ES98/MBVD-7 Курант Кремена Леукурум 21 10-IR 12-IR	Аргонавт Aurin Candur Дельфін Дніпряна Дон Дончанка Касіопея Каравела Кристал 2 11-IR

тривалість яровизаційної потреби та рівень фотоперіодичної чутливості, дозволило простежити, наскільки ці ознаки пов'язані з накопиченням цукру в рослинах та їх зимостійкістю. Аналізуючи приведені в табл. 2 результати, доходимо висновку, що досліджені сортозразки твердої озимої пшениці значною мірою різняться між собою.

Сорти, що мають одну тривалість яровизаційної потреби — 15 діб, суттєво вирізняються рівнем фотоперіодичної чутливості. Затримка виколошування на скороченому дні склала для сортів з середнім рівнем — 34 та сильним — 55 діб. Подібні результати отримані і серед сортів з яровизаційною потребою — 16–20 діб. Різниця між сортами в затримці колосіння досягла для середнього рівня фоточутливості — 24 і сильного — 50,3 доби. Серед групи сортів з середньою тривалістю яровизаційної потреби 21–25 діб різниця між фотоперіодично нейтральними сортами на скороченому дні склала

Таблиця 2

Характеристика сортозразків твердої озимої пшениці за яровизаційною потребою, фотоперіодичною чутливістю, вмістом цукру в рослинах та їх зв'язок з зимостійкістю, 2011 р.

Тривалість яровизаційної потреби, діб	Тривалість періоду «висадка розсади — виколошування», діб		Виколошування, тривалість яровизації 40 діб	Вміст цукру в вузлі кущення, %	Вміст цукру в надземній масі, %	Зимостійкість, бал
	подовжений день, 18 год.	скорочений день, 12 год.				
15,0±0,63	37,5±0,95	71,5±1,77	11.06	12,3±1,18	10,9±0,67	2,8±0,17
15,1±0,33	39,7±1,21	94,7±1,09	9.06	14,5±1,04	12,0±0,82	3,5±0,14
19,3±0,17	39,3±1.44	63,3±1,14	8.06	18,0±1,49	14,0±0,90	3,9±0,11
19,4±0,20	36,7±1,70	87,0±1,38	10.06	14,8±1,50	11,1±0,88	3,7±0,16
25,0±0,31	38,0±0,76	48,0±1,16	8.06	10,7±1,27	8,3±0,97	3,7±0,21
24,8±0,40	38,7±1,15	59,0±1,00	7.06	16,4±1,55	11,2±1,04	4,0±0,24
24,9±0,34	40,8±1,39	73,0±1,56	12.06	18,9±1,36	15,8±1,33	4,2±0,35
24,9±0,42	40,8±1,73	85,0±1, 62	15.06	20,8±1,41	16,3±1,00	4,2±0,44
30,0±0,52	42,0±1,05	63,0±1,85	15.06	17,4±1,39	14,5±0,91	4,3±0,79
29,9±0,55	39,6±1,12	72,1±1,73	13.06	20,0+1,30	14,3±1,10	4,9±0,83
30,0±0,57	39,5±0,98	86,2±1,37	14.06	18,6+1,29	15,4±0,85	5,0±0,90

10, середньослабкою — 20,3, середньою — 32,2 і сильною — 44,2 доби. Сорти з досить сильною яровизаційною потребою 26–30 діб склали генотипи з середньою та сильною фотоперіодичною чутливістю, і тільки сорт Крупинка віднесено до середньослабкої групи (різниця на скороченому дні — 21 доба). У групі з середнім фотоперіодом різниця склала 32,5 і сильним — 46,7 доби.

Разом з тим, сорти з низькою тривалістю яровизаційної потреби (15 діб) та різним рівнем фотоперіодичної чутливості не мали достовірної кореляції між фотоперіодом і вмістом цукру у вузлі кущення, надземній масі, а також зимостійкістю. Але серед цих сортів між рівнем фотоперіодичної чутливості та зимостійкістю спостерігається суттєвий зв'язок.

Дещо інші результати отримані серед сортів твердої озимої пшениці з середньою (21–25 діб) тривалістю яровизаційної потреби. Тут сорти зі слабким, середньослабким, середнім та сильним рівнями фотоперіодичної чутливості суттєво відрізняються між собою за вмістом цукру у вузлі кущення (+2,5–10,06%), за рівнем морозостійкості: +0,2 і +0,3 бала і запізнюються на 5–8 діб з колосінням відносно відповідної групи з низькою тривалістю яровизаційної потреби. Характерно, що сорти з середньою та високою тривалістю яровизаційної потреби і сильною фоточутливістю практично близькі між собою за всіма досліджуваними показниками.

Аналіз кореляційних зв'язків між досліджуваними показниками у 79 сортозразків пшениці твердої озимої показав, що тривалість яровизаційної потреби позитивно корелює з усіма наведеними показниками при досить високому рівні достовірності. Корелятивний зв'язок між тривалістю яровизації та рівнем фоточутливості (+0,44**), вмістом цукру у вузлі кущення рослини (+0,52**) та морозостійкістю сортозразків (0,43**) вказує на суттєвий вплив цих показників на стійкість до несприятливих умов перезимівлі пшениці твердої озимої. Рівень фоточутливості також достовірно корелює з вмістом цукру в вузлі кущення (+0,23*), зимостійкістю (+0,32*). Особливо висока достовірна кореляція спостерігається між вмістом цукру в вузлі кущення та його вмістом у надземній масі (+0,77**), морозостійкістю (+0,70**) і зимостійкістю (+0,78**). Вміст цукру в надземній масі рослин має позитивний зв'язок з морозостійкістю (+0,51**) і зимостійкістю (+0,58**) .

Виходячи з результатів досліджень, у селекції пшениці твердої озимої необхідно враховувати практично всі ознаки і властивості, що безпосередньо формують рівень адаптивності до абіотичних факторів довкілля.

Висновки

Кращими за адаптивністю до несприятливих умов зимівлі пшениці твердої озимої слід вважати генотипи з тривалою яровизаційною

потребою (35 діб) та сильним рівнем фотоперіодичної чутливості. Тривалість яровизаційної потреби та сильний рівень фотоперіодичної чутливості рослини мають високу кореляцію з вмістом цукру у вузлах кущення та морозо- і зимостійкістю. Високий вміст цукру у вузлах кущення та надземній масі рослин значно поліпшує стійкість твердої озимої пшениці до несприятливих умов зимівлі, особливо за безсніжної зими та морозного зимового вітру.

ЛІТЕРАТУРА

1. Стельмах А. Ф., Литвиненко М. А., Файт В. І. Яровизаційна потреба та фоточутливість сучасних генотипів озимої м'якої пшениці // Збірник наукових праць СГІ – НЦНС.— Одеса, 2004.— Вип. 5 (45).— С. 118–127.
2. Файт В. И., Федорова В. Р., Нагуляк О. И., Прокопович К. Л., Попова Н. В. Связь фенотипических и генотипических различий по продолжительности яровизации и фенотипической чувствительности с морозостойкостью озимой пшеницы // Збірник наукових праць Уманського державного аграрного університету.— Умань, 2003.— С. 359–364.
3. Фодоров А. К. Фотопериодизм и зимостойкость растений // Методы и приемы повышения зимостойкости озимых зерновых культур.— М.: Колос, 1975.— С. 419–423.
4. Авсєнін В. І., Файт В. І., Стельмах А. Ф. Вивчення системи генів *Vrn* у *Triticum Durum Desf.* // Збірник наукових праць СГІ – НЦНС.— Одеса, 2006.— Вип. 8 (48).— С. 9–18.

PALAMARCHUK A.I.

The Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed & Cultivar Investigation, Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopolska road, 3, e-mail: a_palamarchuk@ukr.net

ESPECIALLY FROST- AND WINTER-RESISTANT ON THE WINTER DURUM WHEAT

Aims. The set of 79 winter durum wheat varieties was studied under different periods of artificial vernalization and subseguent growing under long and short photoperiods. ***Methods.*** The study revealed a significant difference between these varieties in vernalization response and degree of photosensitivity. ***Results.*** Modern varieties possessed low and medium photosensitivity, and had vernalization duration of 20 to 25 days. ***Conclusions.*** The best winter durum wheat varieties by adaptivity to unfavourable winter conditions need vernalization duration of 25–30 days and high degree of photoperiodic sensitivity.

Keywords: durum wheat, adaptivity, vernalization duration, photoperiodic sensivity.

УДК 575.167+57.043

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

[1] Інститут захисту рослин НААН,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 33, e-mail: sia1@i.com.ua
[2] ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України»,
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а

ДОСЛІДЖЕННЯ РЕАКЦІЇ РОСЛИН ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ З ТРАНСЛОКАЦІЄЮ 1BL/1RS НА ГАММА-ОПРОМІНЕННЯ

Пшенично-житня 1BL/1RS транслокація є надзвичайно поширеною у сортів пшениці м'якої *Triticum aestivum* L. [1]. Зокрема, її мають біля 40% сучасних українських сортів пшениці м'якої озимої зони Центрального Лісостепу [2]. 1BL/1RS несе ряд генів стійкості до хвороб — *Pm8* (ген стійкості до борошнистої роси), *Sr31* (ген стійкості до стеблової іржі), *Lr26* (ген стійкості до бурої іржі), *Yr9* (ген стійкості до жовтої іржі) [3], а також гени, що сприяють більшому розвитку кореневої системи [4]. Наявність цієї транслокації негативно впливає на показники хлібопекарної якості: показник седиментації, величину питомої деформації тіста та об'єм хліба [5]. Цей ефект можна компенсувати присутністю алелів високомолекулярних та низькомолекулярних субодиниць глютенінів з позитивним впливом. Щодо впливу присутності транслокації на продуктивність, повідомлення різних авторів неоднозначні. В ряді робіт було показано позитивний вплив присутності 1BL/1RS транслокації на урожай зерна [6–8]. Одною з причин цього може бути позитивний ефект транслокації на біомасу коріння [8]. Однак у деяких роботах виявлено негативний ефект 1BL/1RS на урожайність. Так, при вирощуванні популяції рекомбінантно-інбредних ліній пшениці ярої в умовах посухи було виявлено зв'язок присутності транслокації зі зниженням урожаю зерна [9]. Останні дослідження показали позитивний вплив транслокації 1BL/1RS, зокрема її дистальної ділянки, на урожайність та водний статус надземної частини як в умовах достатнього забезпечення вологою, така і в умовах водного стресу [10].

Відомо, що гамма-опромінення у високих дозах (150–200 Гр і більше) сухих зерен призводить до пригнічення показників фізіологічного стану рослин, яке проявляється, зокрема, у зниженні ознак продуктивності [11, 12], ступінь якого може відрізнятись у різних сортів пшениці м'якої [12–16]. Для дослідження реакції генотипів з присутністю 1BL/1RS транслокації на гамма-опромінення за проявом ознак продуктивності в якості моделі нами використано майже ізогенні лінії озимої м'якої пшениці за гліадиновими локусами на основі сорту Безоста 1 [17]. Для виявлення закономірностей реакції рослин на гамма-опромінення сухого насіння залежно від присутності 1BL/1RS транслокації продовжено дослідження виживання та продуктивності рослин F_2 при вирощуванні в різних умовах.

Матеріали і методи

Виживання досліджуваної популяції рослин F_2 становило 0,600 ± 0,017 у контролі. Після гамма-опромінення сухих зерен дозою 200 Гр рівень виживання був 0,512 ± 0,017, що складало 85% від виживання у контролі. Відмінностей у співвідношенні різних генотипів за локусом Gli-B1 між контролем (154:245:100) та варіантом з опроміненням (127:205:88) не виявлено в даній популяції ($\chi^2 = 0,3$), що вказує на відсутність відмінностей між виживанням певних генотипів при посіві опромінених зерен.

Гамма-опромінення сухих зерен в дозі 200 Гр призвело до суттєвого зниження ознак продуктивності популяції рослин F_2 порівняно з контролем (табл. 1). Маса зерна з рослини знижувалася приблизно на 34%, причому зниження відбувалось як за рахунок зниження числа продуктивних стебел (на 16%), так і маси зерна з колоса (на 20%).

Було досліджено значення ознак продуктивності рослин F_2 при опроміненні сухих зерен залежно від генотипу за маркерними локусами (присутності житньої транслокації). Середні значення ознак продуктивності у рослин F_2 з певним генотипом за *Gli-B1* в контролі і при опроміненні сухих зерен наведено в табл. 2. В контролі гетерозигота за транслокацією мала істотно вище значення маси зерна з рослини, ніж гомозигота за транслокацією ($t = 2,7$, $P < 0,01$). У варіанті з

© СОЗІНОВ І.О., КОЗУБ Н.О., БІДНИК Г.Я., ДЕМ'ЯНОВА Н.О., КАРЕЛОВ А.В., БЛЮМ Я.Б., СОЗІНОВ О.О.

Таблиця 1

Середні значення виживання та ознак продуктивності ± стандартна похибка у популяції рослин F_2 GLI-D1-4 × GLI-B1-3 (K07) в контролі та після гамма-опромінення дозою 200 Гр, в дужках — відносне зниження ознак (порівняно з контролем), %

Варіант	Ознака	
Виживання		
Контроль	0,600 ± 0,017	
200 Гр	0,512* ± 0,017	(14,7%)
Число продуктивних стебел		
Контроль	7,5 ± 0,2	
200 Гр	6,3* ± 0,2	(16,1%)
Маса зерна з рослини, г		
Контроль	15,23 ± 0,49	
200 Гр	10,08* ± 0,36	(33,8%)
Маса зерна з колоса, г		
Контроль	1,949 ± 0,029	
200 Гр	1,550* ± 0,023	(20,5%)

Примітка: * — відрізняється від контролю при P < 0,001.

опроміненням істотних відмінностей не спостерігалося.

Порівняння значень ознак продуктивності у певних генотипів за локусом *Gli-B1* в контролі і при опроміненні сухих зерен показало достовірне зниження ознак продуктивності порівняно з контролем, за винятком числа продуктивних стебел з рослини у гомозигот *Gli-B1l.l* (табл. 3).

У варіанті з опроміненням найменше знижує число продуктивних стебел, масу зерна з рослини і колоса гомозигота за житньою транслокацією. Цю тенденцію спостерігали і при проведеному раніше дослідженні двох аналогічних популяцій, вирощених в інших умовах [19, 20] (табл. 3, рис.).

Отже, результати дослідження вказують на меншу чутливість генотипів з присутністю 1BL/1RS транслокації до стресових факторів (опромінення сухого насіння гамма-променями у високих дозах) порівняно з генотипами без цієї інтрогресії.

Таблиця 2

Середні значення числа ознак продуктивності у рослин F_2 (K07) з певним генотипом за *Gli-B1* в контролі і при опроміненні сухих зерен дозою 200 Гр

Варіант	*Gli-B1b.b*	*Gli-B1b.l*	*Gli-B1l.l*
Число продуктивних стебел			
Контроль	7,40 ± 0,375	7,74 ± 0,30	6,91 ± 0,41
200 Гр	6,06* ± 0,373	6,48** ± 0,28	6,07 ± 0,38
Маса зерна з рослини, г			
Контроль	14,65 ± 0,88	16,42 ± 0,72	13,20 ± 0,96
200 Гр	9,81*** ± 0,69	10,39*** ± 0,52	9,74** ±
Маса зерна з колоса, г			
Контроль	1,910 ± 0,052	2,032 ± 0,039	1,808 ± 0,069
200 Гр	1,555*** ± 0,045	1,540*** ± 0,035	1,564** ± 0,039

Примітка: відрізняється від значення в контролі при * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Таблиця 3

Відносне зниження ознак продуктивності рослин F_2 з різним генотипом за локусом *Gli-B1* після гамма-опромінення зерен (порівняно з контролем), %

Генотип за *Gli-B1*	K07, 200 Гр	K06, 200 Гр [19]	O06 150 Гр [20]
Число продуктивних стебел з рослини			
b.b	18,13	23,22	12,30
b.l	16,23	19,04	11,41
l.l	12,19^{н}	12,69	6,65
Маса зерна з рослини			
b.b	32,97	27,27	30,60
b.l	36,71	24,17	28,95
l.l	26,26	14,90^{н}	20,51
Маса зерна з колоса			
b.b	18,59	5,30^{н}	19,02
b.l	24,21	8,38	18,14
l.l	13,50	5,59^{н}	17,32

Примітка: ^{н} — відмінності від значення в контролі статистично неістотні.

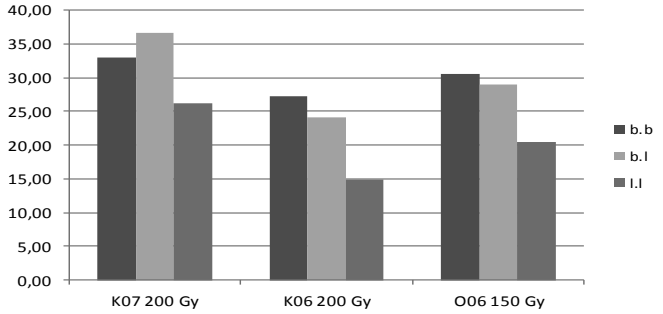


Рис. Відносне зниження (% від значення у контролі) маси зерна з рослини у груп рослин з різним генотипом за локусом *Gli-B1* після гамма-опромінення сухих зерен в різних умовах вирощування (популяції К07, К06 — 200 Гр [19]; популяція О06 — 150 Гр [20])

Висновки

Не виявлено відмінностей за рівнем виживання в популяції рослин F_2 залежно від присутності 1BL/1RS транслокації. У варіанті з гамма-опроміненням у дозі 200 Гр тенденцію до найменшого зниження ознак продуктивності має гомозигота за житньою транслокацією. Результати дослідження вказують на меншу чутливість (за ознаками продуктивності) генотипів з присутністю 1BL/1RS транслокації до опромінення сухого насіння гамма-променями у високих дозах, порівняно з генотипами без цієї інтрогресії та гетерозигот за цією транслокацією.

ЛІТЕРАТУРА

1. Rabinovich S. V. Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. // Euphytica.— 1998.— 100.— P. 323–340.
2. Kozub N. A., Sozinov I. A., Sobko T. A., Kolyuchii V. T., Kuptsov S. V., Sozinov A. A. Variation at storage protein loci in winter common wheat cultivars of the Central Forest-Steppe of Ukraine // Цитология и генетика.— 2009.— 43, N 1.— С. 69–77.
3. Mac Gene, Gene Symbols, Gene Classes and References [Електронний ресурс].— 2005.— Режим доступу: http://shigen.lab.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/ macgene/2005/ GeneSymbol.pdf.
4. Sharma S., Bhat P. R., Ehdaie B., Close T. J., Lukashewski A. J., Waines J. G. Integrated genetic map and genetic analysis of a region associated with root traits on the short arm of rye chromosome 1 in bread wheat // Theor. Appl. Genet.— 2009.— 119.— P. 783–793.
5. Созинов А. А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции.— М.: Наука, 1985.— 272 с.
6. Moreno-Sevilla B., Baenzinger P. S., Peterson C. J., Graybosch R. A., McVey D. V. The 1BL/1RS translocation: agronomic performance of F_3 derived line from a winter wheat cross// Crop. Sci.— 1995.— 35, N 4.— P. 1051–1055.
7. Villareal R. L., Rajaram S., MuJeeb-Kazi A., Del-Toro E. The effect of chromosome 1B/1R translocation on the yield potential of certain spring wheats (*Triticum aestivum* L.) // Plant Breed.— 1991.— 106.— P. 77–81.
8. Ehdale B., Whitkus R. W., Waines J. G. Root biomass, water-use efficiency, and performance of wheat rye translocations of chromosomes 1 and 2 in spring bread wheat 'Pavon' // Crop Science.— 2003.— 43.— P. 710–717.
9. Mathews K. L., Malosetti M., Chapman S., McIntyre L., Reynolds M., Shorter R., Eeuwijk F. van Multi-environmental QTL mixed models for drought stress adaptation in wheat // Theor. Appl. Genet.— 2008.— 117.— P. 1077–1091.
10. Howell T., Hale I.,·Jankuloski L.,·Bonafede M., Gilbert M., Dubcovsky J. Mapping a region within the 1RS.1BL translocation in common wheat affecting grain yield and canopy water status // Theor. Appl. Genet.— 2014.— 127.— P. 2695–2709.
11. Гродзинский Д. М. Радиобиология растений.— К.: Наук. думка, 1989.— 384 с.
12. Моргун В. В., Логвиненко В. Ф. Мутационная селекция пшеницы.— К.: Наук. думка, 1995.— 626 с.
13. Din R., Qasim M., Ahmad K. Radio sensitivity of various wheat genotypes in M1 generation // Int. J. of Agriculture&Biology.— 2004.— 6, N 5.— P. 898–900.
14. Оксьом В. П. Вплив мутагенних чинників на рослини М1 озимої пшениці та його зв'язок із частотою змінених форм у другому поколінні // Физиол. и биохим. культ. раст.— 2010.— 42, № 5.— С. 153–162.
15. Назаренко М. М. Виживаність і структура врожайності як показники мутагенної депресії у першому поколінні мутантів сортів озимої м'якої пшениці // Физиол. и биохим. культ. раст.— 2007.— 39, № 5.— С. 438–446.
16. Irfaq M., Nawab K. Effect of gamma irradiation on some morphological characteristics of three wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars // OnLine J. Biol. Sci.— 2001.— 1 (10).— P. 935–937.
17. Копусь М. М. О естественной геногеографии глиадиновых аллелей у озимой мягкой пшеницы // Селекция и семеноводство.— 1994.— № 5.— С. 9–14.
18. Metakovsky E. V. Gliadin allele identification in common wheat. II Catalogue of gliadin alleles in common wheat // J. Genet. Breed.— 1991.— 45.— P. 325–344.

19. Козуб Н. О., Созінов І. О., Бідник Г. Я., Дем'янова Н.О., Карелов А. В., Блюм Я. Б., Созінов О. О. Вплив гамма-опромінення сухих зерен на продуктивність рослин м'якої пшениці, що відрізняються за присутністю житньої 1BL/1RS транслокації // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / Під ред. В. А. Кунаха [та ін].— К.: Логос, 2013.— 12.— 2013.— С. 42–46.
20. Созінов І. О., Козуб Н. О., Бідник Г. Я., Дем'янова Н.О., Карелов А. В., Блюм Я.Б, Созінов О. О. Вплив гамма-опромінення на ознаки продуктивності м'якої пшениці в залежності від генотипу і умов вирощування // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / Під ред. В. А. Кунаха [та ін].— К.: Логос, 2014.— 14.— С. 39–46.

SOZINOV I.A.[1], KOZUB N.A.[1, 2], BIDNYK H. Ya.[1, 2], DEMIANOVA N.A.[1, 2], KARELOV A.V.[1, 2], BLUME Ya.B.[2], SOZINOV A.A.[2]

[1] Institute of Plant Protection, NAAS,
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 33, e-mail: sia1@i.com.ua

[2] Institute of Food Biotechnology and Genomics, NAS of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskogo str., 2a

INVESTIGATION OF THE RESPONSE OF COMMON WHEAT PLANTS WITH THE 1BL/1RS TRANSLOCATION TO GAMMA-IRRADIATION

Aims. The 1BL/1RS translocation is the most widespread introgression among common wheat cultivars. To reveal regularities of the response of plants to gamma-irradiation of dry seeds depending on the presence of 1BL/1RS, further investigation of survival rate and productivity traits was carried out. ***Methods.*** Dry F_2seeds from crossing Bezostaya 1 lines were treated with gamma-radiation at 200 Gy. Each F_2 plant was characterized with respect to yield traits. The presence of 1BL/1RS was analyzed by electrophoresis of gliadins***. Results.*** No differences in the survival rate depending on the presence of 1BL/1RS were revealed. At gamma irradiation, the homozygote for 1BL/1RS showed the smallest reduction in plant productivity traits, which is in agreement with the previous results. ***Conclusions.*** The results provide further support for lower sensitivity (with respect to productivity traits) of genotypes with the 1BL/1RS translocation to gamma-irradiation of dry seeds.

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

УДК [633.111+16:"324"]58.032.2+631.53.027.32

СТЕЛЬМАХ А. Ф., ФАЙТ В. І.
Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення, Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дорога, 3, e-mail: stegen@ukr.net

СИСТЕМИ КОНТРОЛЮ ПОЧАТКОВОГО РОЗВИТКУ СУЧАСНИХ СЕЛЕКЦІЙНИХ ЗРАЗКІВ ОЗИМИХ ЗЕРНОВИХ КОЛОСОВИХ КУЛЬТУР У СГІ – НЦНС

Селекційні програми Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення (СГІ – НЦНС) щодо зернових колосових культур стосуються тільки робіт з озимими генотипами, які на тлі рецесивного за системою генів *vrn* генофону (що контролює потребу в яровизації та затримку диференціації точки росту перед зимівлею) розрізняються за тривалістю вказаної потреби і рівнем фотоперіодичної чутливості (системи *Vrd* і *Ppd* генів, відповідно). Ні у кого не викликають сумнівів факти, що колишні шедеври вітчизняної селекції пшениці м'якої — сорти Одеська 16 та Миронівська 808 — відзначалися високим ступенем морозо-, зимостійкості, що значною мірою було пов'язано з тривалою потребою в яровизації та сильною реакцією на фотоперіод [1, 2]. Наступний шедевр селекції Безоста 1 (переваги за врожайністю та стійкістю до хвороб) вже виявляв послаблену фотоперіодичну чутливість і скорочену потребу в яровизації, що неодмінно спричинило зниження рівня стійкості до негативних температур [3]. Але ж і явний позитивний вплив на продуктивність таких фізіологічних властивостей призвів до того, що більшість сучасних сортів озимої пшениці не відрізняються тривалою потребою в яровизації та сильною фотоперіодичною реакцією. У результаті темпи їх осіннього розвитку прискорилися, а рівень морозостійкості потребує покращення.

Еволюційне походження різноманіття пшениць за вказаними генетичними системами контролю темпів початкового розвитку призвело до позитивного взаємозв'язку їх ефектів (більша затримка розвитку при посиленні обох фізіологічних властивостей, які ще й позитивно корелюють між собою) — у результаті варіювання дати колосіння мінімальне після тривалої яровизації при вирощуванні на подовженому фотоперіоді [4]. Ячмені ж осіннього строку сівби (озимі та дворучки) були виведені селекційним шляхом, і ефекти їх систем контролю тривалості яровизації та фотоперіодичної реакції на темпи початкового розвитку наче компенсують один одного: у типово озимих генотипів затримка осіннього розвитку обумовлена наявністю суттєвої потреби в яровизації при варіюванні послабленої фотоперіодичної, а у дворучок вона здійснюється лише за рахунок дуже сильної фотоперіодичної чутливості за відсутності значної потреби в яровизації [5].

На жаль, інтенсивне вивчення до 70-х років минулого сторіччя вказаних фізіологічних систем було майже повністю припинено з початком «подолання наслідків лисенківщини», хоча й досі ніхто не заперечує існування цих систем. І лише в останні роки провідні селекціонери знову дійшли до розуміння, що різноманіття даних систем виявляється дуже важливим при селекції на адаптивність до стресових умов певних зон вирощування [6]. При аналізі комбінацій кліматичних параметрів сезонної вологозабезпеченості та температурних режимів зимівлі 43 останніх роки були розташовані у 8 группах і виявилося, що в кожній групі за реальної врожайності мають переваги сорти з певними комбінаціями різноманіття систем контролю початкового розвитку: вони розрізняються між групами і схожі всередині них. Такі факти повністю відповідають сучасній теорії еколого-генетичної організації кількісних ознак рослин [7], за якою в певних умовах виявляється і реалізується різноманіття генетичних систем, що відповідають за рівень стійкості до стресових чинників при вирощуванні (закон лімітуючого фактора або «бочка Лібіха»).

І тому ми за поданням зразків з селекційних підрозділів інституту оцінюємо їх тривалість яровизаційної потреби та рівень фотоперіодичної чутливості, тобто фізіологічні системи, що впливають на темпи початкового розвитку, мають ефект на стійкість до кліматичних стресів та контролюються генетичним різноманіттям.

Матеріали і методи

По 20 зелених 5-добових проростків у паперових рулонах кожного зразка в кожному варіанті дослідів піддавали штучній темпоральній яровизації з розрахунку одночасної висадки

© СТЕЛЬМАХ А. Ф., ФАЙТ В. І.

(25–28 квітня в різні роки, коли природна температура майже не знижується до яровизаційного рівня) протягом 30–40–50 діб для озимих зразків м'якої пшениці (20–30–40 діб для ячменів) в кліматичних камерах при температурі +1–2 °С та 12-годинному освітленні. Варіант максимальної яровизації був повторений для наступного вирощування при штучно скороченому до 10 годин фотоперіоді (закривання темними кабінами з 17^{00} до 7^{00}) і порівняння темпів колосіння з варіантом вирощування на природному фотоперіоді (15–17 годин). Висадку здійснювали по 10 проростків у 5-літрові посудини з ґрунтом, протягом вегетації вживали всіх необхідних заходів щодо поливу, підживлення та боротьби зі шкідниками і хворобами. Під час колосіння фіксували дату появи верхівки колоса на головному стеблі кожної рослини, яку трансформували в кількість діб від висадки до колосіння та згодом піддавали дисперсійному аналізу [8]. Тривалість яровизаційної потреби зразка визначали порівнянням середньої дати його колосіння у двох суміжних варіантах попередньої яровизації, коли затримка колосіння виявлялася вже несуттєвою. Різниця між середніми датами колосіння зразка після максимальної яровизації при вирощуванні на скороченому та природному фотоперіодах характеризувала рівень його фотоперіодичної чутливості.

Розмах рівнів фотоперіодичної чутливості умовно розподілено на 6 груп (за кількістю діб затримки колосіння на скороченому до 10 годин фотоперіоді протягом 6 тижнів після задовільної яровизації): 5–10 діб — слабка фотоперіодична реакція; 10–15 — середньослабка; 15–20 — середня; 20–25 — середньосильна; 25–30 — сильна; 30–35 — дуже сильна.

Майже ізогенні та заміщені лінії з ідентифікованими *Vrd* і *Ppd* генами, які головним чином і визначають різноманіття темпів розвитку пшениць і ячменів осіннього строку сівби, використано як контролі для характеристики вивчених параметрів селекційних зразків, що надавалися для оцінки провідними селекціонерами інституту. Базова скоростиглість характеризувала кількість діб до колосіння від висадки на природному фотоперіоді після максимальної яровизації зелених 5-добових проростків, тільки для зразка Миронівська 808 рецесив — після 60 діб яровизації.

Результати та обговорення

Відмінності середніх показників базової скоростиглості між сезонами та зразками обумовлені середовищнею варіацією режимів природної температури та інтенсивності освітлення і різноманіттям генофонів за системою мінорних генів складної системи генів *Eps* (скоростиглості *per se*). І тому вони вимагають обов'язкового використання однакового контрольного набору ліній при вивченні селекційних зразків у різні сезони для порівняння останніх між собою. Тим не менш, головні параметри, що вивчалися, тривалості яровизаційної потреби та рівня фотоперіодичної чутливості контрольних зразків у різні сезони були константними, що свідчить про їх доволі об'єктивну оцінку навіть при вивченні дослідного зразка в одному сезоні на тлі базової скоростиглості конкретного сезону (табл. 1).

Оскільки умови штучної яровизації (крім варіантів її тривалості) були однаковими для всіх зразків, як і умови догляду (полив та боротьба зі шкідниками та хворобами) при вирощуванні після одночасної висадки, то головними чинниками, які спричинили розмах варіювання дат колосіння між сезонами, були саме неоднакові природні інтенсивність освітлення та температурний режим вегетації.

Вони максимально прискорювали колосіння всіх зразків у 2011 р. та найбільш затримували

Таблиця 1

Характеристика показників контрольних ліній, 2011–2014 рр.

Зразок	Базова скоростиглість	Яровизаційна потреба	Фотоперіодична чутливість
Миронівська 808 рецесив	46,3–53,0	60	сильна
Миронівська 808 *Vrd 1*	46,8–55,9	50	сильна
Миронівська 808 *Vrd 2*	46,9–56,2	55	сильна
Альбідум 114 *Vrd 3*	42,5–45,1	50–55	сильна
Ciano *Ppd-D1a*	43,0–47,3	45	слабка
Cappelle Desperez *Ppd-B1c*	39,2–39,7	30–35	середньослабка
Миронівська 808 *Ppd-A1a*	44,0–50,2	50–55	середньосильна
$НІР_{0,05}$	0,29–0,37		

його у 2013 р., не впливаючи між сезонами на рівень параметрів, що оцінювалися. Так, тривалість потреби в яровизації виявилася завжди від максимальної у Миронівської 808 рецесивного генотипу до мінімальної у лінії Cappelle Desperez з домінантним алелем *Ppd-B1c*, охоплюючи генетичне різноманіття даної ознаки від 60 до 30–35 діб. Оцінка ж фотоперіодичної чутливості вказаних контрольних зразків виявила постійно розмах варіювання її рівня від слабкого у лінії Ciano з домінантним алелем *Ppd-D1a* до сильного у всіх носіїв тільки рецесивних генів даної системи, хоча вони й розрізнялися за алелями генів системи *Vrd*, які контролюють відмінності тривалості яровизаційної потреби.

Виходячи з цього ми мали всі підстави узагальнити за роками результати оцінок показників, що вивчалися, для різних зразків протягом всіх 4 років досліджень. Конкретні дані щодо рівнів яровизаційної потреби та фотоперіодичної чутливості для кожного з 319 оцінених зразків наведені в річних звітах відділу генетики, що надавалися відділенню рослинництва НААНУ, а тут розглянемо лише узагальнений розподіл кількості конкретних зразків різних наукових підрозділів інституту в окремих групах за рівнями оцінених показників. Аналізуючи дані табл. 2, можна констатувати, що розмах варіювання показника базової скоростиглості серед зразків лабораторії селекції інтенсивних сортів пшениці (різниця 16,5 діб) суттєво перевищував рівень середовищної варіації даного показника в межах конкретних ліній (різниці від 0,5 до 9,3 доби).

Скоріш за все це було обумовлено більш широким різноманіттям генетичних систем «скоростиглості *per se*» у даному наборі, ніж у контрольному та двох інших наборах. Серед ліній пшениці, які були виділені селекціонерами за врожайністю після конкурсного сортовипробування і надані нам для аналізу, переважна більшість в наборах відділу селекції і насінництва пшениці та лабораторії селекції інтенсивних сортів пшениці виявила скорочену потребу в яровизації (40–45 діб) і слабше середнього рівень фотоперіодичної чутливості. І лише рослинам одиничних ліній була притаманна тривала потреба в яровизації (55 і > діб) та сильна фотоперіодична реакція. Можливо, це вказувало на переваги селекційної цінності такого поєднання фізіологічних реакцій прискорення початкового розвитку, але ж зовсім не відкидаються факти цілеспрямованого підходу авторів в останні десятиріччя до підбору вихідного матеріалу для схрещувань, який перш за все і був носієм подібних генів. Про це деякою мірою свідчать результати аналізу набору ліній (хоч і меншого за обсягом) з відділу генетичних основ селекції, процентні частки вказаних комбінацій фізіологічних характеристик тут майже протилежні. І скоріш за все причиною цьому був зовсім інший вихідний матеріал, який використано зі світової колекції для створення принципово нових за показниками якості генотипів спеціального призначення. А ось частка неоднорідних зразків з виявленням субліній за вивченими показниками виявилася майже однаковою в усіх наборах.

Досліджені характеристики фізіологічних систем початкового розвитку ячменю осіннього строку сівби (табл. 3) значною мірою відрізняються від таких, що були наведені для пше-

Таблиця 2

Кількість зразків пшениць різних підрозділів інституту з відповідними рівнями показників, 2011–2014 рр.

Показники \ Підрозділ інституту		ВСіНП*	ЛСІСП*	ВГОС*
Усього зразків		93	95	12
Серед них з сублініями		9	9	2
Базова скоростиглість	Ліміти	39,9–48,3	39,5–56,0	44,5–52,9
	$НІР_{0,05}$	0,25–0,38	0,25–0,35	0,27
Яровизаційна потреба	40–45	61	53	2
	45–50	24	35	7
	55 і >	8	7	3
Фотоперіодична реакція	< середньої	82	78	3
	середня	3	8	3
	сильна	8	9	6

Примітка: * ВСіНП — відділ селекції і насінництва пшениці; ЛСІСП — лабораторія селекції інтенсивних сортів пшениці; ВГОС — відділ генетичних основ селекції.

Таблиця 3

Кількість зразків ячменю різних підрозділів інституту з відповідними рівнями показників, 2011–2014 рр.

Показники \ Підрозділ інституту		Відділ селекції та насінництва ячменю		Відділ генетичних основ селекції
		сорти	лінії КСВ	
Усього зразків		32	40	47
Серед них з сублініями		5	9	13
Базова скоростиглість	Ліміти	39,0–66,0	29,0–54,0	36,4–68,8
	$НІР_{0,05}$	0,25–0,29		0,27–0,31
Яровизаційна потреба	< 20	9	23	25
	30–35	13	13	12
	40 і >	10	4	10
Фотоперіодична реакція	дуже сильна	13	20	4
	сильна	6	16	18
	слабше сильної	13	4	25

ниці м'якої. Перш за все, можна наочно бачити зростання частки неоднорідних зразків щодо вивчених показників, які виявляються навіть не тільки серед селекційних ліній, але й у наборі сортів (використаних як вихідний матеріал та/або вже переданих до державного випробування). Подібне зростання в наборі зразків відділу генетичних основ селекції могло бути й не чимось надзвичайним, тому що ця програма створення голозерного та *waxy* типу ячменю для осіннього строку сівби була розпочата зовсім недавно, лінії ще не дійшли до розсадників конкурсного сортовипробування і не завершили гомозиготизацію. Але ж такий факт у матеріалі з відділу селекції та насінництва ячменю, скоріш за все, вказує на труднощі ідентифікації різноманіття даних систем у ячменю в природних умовах (осіння сівба значно нівелює відмінності ефектів різних генотипів щодо темпів колосіння), для виявлення різноманіття за окремими системами потрібне дослідження в модельованих умовах.

В усіх наборах зразків ячменю спостерігали також суттєве зростання розмаху варіювання за базовою скоростиглістю у порівнянні з пшеницею (або через значний вплив систем «скоростиглості *per se*», або, скоріш за все, внаслідок післядії ефектів систем *Vrd* і *Ppd* генів ячменю саме в умовах над'яровизації при вирощуванні на природному фотоперіоді — ячмінь ближче до короткоденних культур). І тому такий розмах варіювання досягав рівнів фізіологічних реакцій. Значна кількість зразків із зовсім низькою потребою в яровизації (менше 20 діб) в усіх наборах була притаманна дворучкам, у яких затримка темпів осіннього розвитку компенсувалася дуже сильним рівнем фотоперіодичної чутливості (хоча серед зразків відділу генетичних основ селекції виявилося, що багато ліній на ранніх етапах селекції при «переводі» *waxy* та голозерних генотипів на озимий генофон ще зберігали більш слабку фотоперіодичну реакцію і могли бути віднесені до типово ярих). А серед типово озимих зразків з суттєвою яровизаційною потребою (навіть більше 40 діб, що доволі рідко для ячменів і вселяє надію на задовільний рівень їх морозостійкості) були виявлені навіть такі, що характеризуються сильною фотоперіодичною чутливістю не тільки серед зразків у наборі вихідних сортів, але й серед перспективних селекційних ліній КСВ. Подібного селекційного матеріалу не виявлялося ще 5–10 років тому назад, хоча й досі зберігається привілей щодо селекції дворучок ячменю, а не типово озимих генотипів.

Висновки

Провідні селекціонери озимих зернових колосових культур знову повертаються до оцінок генетичного різноманіття щодо тривалості яровизаційної потреби та рівня фотоперіодичної чутливості як важливих селекційних властивостей, які обумовлюють темпи початкового розвитку і перехід до диференціації точки росту рослин, впливаючи на рівень адаптивності, тобто стійкості до (або на можливість обминути) стресових лімітів середовища.

Для більшості селекційних зразків озимої пшениці м'якої характерна послаблена фотоперіодична реакція і частково скорочена потреба в яровизації. Зв'язок таких характеристик з перевагами за врожайністю (при зниженні адаптивності під час зимівлі) потребує подальшого вивчення, оскільки серед перспективних ліній останніх років знову почали виявлятися зразки з сильною фотоперіодичною чутливістю та трива-

лою потребою в яровизації. Можливо, при новому оберті спіралі селекційного процесу (до цього після Безостої 1 та інтенсивного використання майже фотонейтрального вихідного матеріалу вся селекція базувалася на подібному генофоні) введення в сучасний підвищений за продуктивністю генофон минулих характеристик темпів початкового розвитку приведе ще й до покращення адаптивних властивостей майбутнього селекційного матеріалу.

При селекції ячменю для осіннього строку сівби й досі перевага надається дворучкам, затримка початкового розвитку яких обумовлена дуже сильною фотоперіодичною реакцією на тлі короткої потреби в яровизації. Але виявлення в останні роки типово озимих генотипів з суттєвою потребою в яровизації, яка у них вже комбінується з сильною фотоперіодичною чутливістю, може слугувати підставою для перегляду точки зору на зазначену перевагу дворучок.

ЛІТЕРАТУРА

1. Стельмах А. Ф. Физиолого-генетические аспекты продуктивности с точки зрения генетики развития мягких пшениц // Теоретические и прикладные аспекты селекции и семеноводства пшеницы, ржи, ячменя и тритикале. — Одесса, 1981. — С. 112–113.
2. Файт В. І. Ідентифікація і ефекти алелів генів темпів розвитку пшениці: автореф. дис. ... д-ра біол. наук: спец. 03.00.15 «Генетика». — Одеса, 2009. — 39 с.
3. Мусич В. Н. Фотопериодическая чувствительность и морозостойкость современных сортов озимой пшеницы // НТБ ВСГИ. — 1983. — № 2 (48). — С. 21–24.
4. Стельмах А. Ф., Файт В. И. Разнообразие генотипов современных сортов озимой мягкой пшеницы по потребности в яровизации и фоточувствительности // Молекулярная и прикладная генетика. — 2011. — 12. — С. 15–18.
5. Стельмах А. Ф., Лінчевський А. А., Файт В. І. Зв'язок реакцій яровизації та фоточутливості у дворучок і озимих сортів ячменю // Зб. наук. праць СГІ. — Одеса. — 2006. — 10. — С. 3–12.
6. Литвиненко М. А. Особисте повідомлення.
7. Драгавцев В. А. Уроки эволюции генетики растений // Биосфера. — 2012. — 4, № 3. — С. 251–260.
8. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — М.: Колос, 1973. — 327 с.

STELMAKH A.F., FAYT V.I.

Plant Breeding and Genetics Institute — NCSCI of NAASU,
Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopolskaya road, 3, e-mail: stegen@ukr.net

SYSTEMS OF INITIAL DEVELOPMENT CONTROL IN MODERN CEREAL BREEDING SPECIMENS AT PBGI-NCSCI

Aims. To evaluate breeding lines and cultivars on their vernalization requirement duration and photosensitivity level. ***Methods.*** Heading date registration after various duration of artificial vernalization and planting in long and short daylength. ***Results.*** The majority of modern winter bread wheat lines showed lowered vernalization requirement and weak photosensitivity, possibly relating to higher yield. And only solitary stocks revealed stronger reactions, although they relate to frost resistance improvement. The lines of alternative barley revealed very strong photoreactions which compensate their losses in autumn initial development delay due to almost full absence of vernalization requirement. The last characteristic was expressed (even pronounced — more than 40 days) in typical winter stocks, what allows to expect sufficient frost resistance when it is followed by strong photosensitivity, although the last was revealed in rare winter lines yet. ***Conclusions.*** Leading breeders of cereals are again interested in evaluation of physiological systems influencing initial development as having adaptive value.

Keywords: winter wheat and barley, modern breeding lines, vernalization requirement duration, level of photosensitivity.

УДК 577.21:633.11

СТЕПАНЕНКО А.І., СТЕПАНЕНКО О.В., МОРГУН Б.В.
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua

ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ ПШЕНИЦІ, ЯКІ ВИЗНАЧАЮТЬ ЯКІСНІ ОЗНАКИ, У ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ

Контроль пшеничного зерна, яке використовується для отримання борошна, є важливим моментом для отримання високоякісного хліба, локшини, здобних виробів, продуктів-напівфабрикатів із замороженого тіста тощо. Проте вимоги для сортів пшениці різного напрямку використання (хлібопекарське, виробництво локшини, кондитерських виробів тощо) є радикально різними.

Так, за даними [1] пшениця, яка придатна для випікання формового хліба, має містити інші алелі високомолекулярних глютенінів, ніж пшениці, основним напрямком використання яких є випікання подового хліба, виготовлення локшини або кондитерських виробів. Для сортів пшениці, які придатні для випікання формового та подового хліба, виготовлення локшини, оптимальним є наявність алелів *Glu-A1 1* або *Glu-A1 2**, проте для отримання якісних кондитерських виробів бажана наявність алеля *c* (відсутність білкових субодиниць локусу — нуль-алель) [1]. Алель *al* є одним з найсильніших серед відомих у пшениці алелів локусу *Glu-B1* за своїм позитивним впливом на якість борошна і широко застосовується у селекційних програмах [2]. Алелі локусу *Glu-D1* мають найсильніший вплив на хлібопекарські властивості пшеничного борошна. За [3] алель *d* (за якого синтезуються субодиниці 5 та 10) з індексом якості 4 має виражений позитивний вплив на якість борошна. З іншого боку, поширений алель *a* (субодиниці 2 та 12) має негативний вплив на отримання якісного формового хліба, проте рекомендований для сортів, які використовуються для виготовлення подового хліба, локшини та кондитерських виробів [1].

Небажане потемніння та знебарвлення макаронних виробів, подового хліба та парових хлібобулочних виробів обумовлюється поліфенолоксидазою (ПФО) — рослинним ферментом, який каталізує окислення фенолів шляхом гідроксилювання і дегідрування з утворенням орто-хінонних сполук [4–6]. Висока активність ПФО погіршує якість більшості класів локшини та продуктів із замороженого тіста, особливо з борошна білозерних сортів пшениці [7].

Багаторічне використання і дослідження сортів з пшенично-житньою транслокацією 1BL.1RS дозволило виявити, що локус *Sec-1*, який входить до її складу, спричиняє негативний вплив на хлібопекарські якості пшениці. Важливу ролі у цьому відіграють білки-секаліни, що кодуються геном *sec-1* жита, який переміщений у хромосому пшениці, незалежно від того, в яку з гомологічних хромосом пшениці 1A чи 1B транслоковано плече 1RS [8, 9]. В основі погіршення хлібопекарської якості лежить неспроможність секалінів жита утворювати з пшеничними білками нерозчинні високополімерні протеїнові комплекси, які є основою формування клейковини з високими фізичними показниками якості [10]. Отже, важливо контролювати алелі генів ВМГ, генів поліфенолоксидазної активності та наявність пшенично-житніх транслокацій у пшеничному борошні та харчових продуктах з нього для вибору оптимальної марки для різного технологічного використання.

Матеріали і методи

Об’єктом дослідження була вибірка харчових продуктів, яка включала в себе: 24 зразки пшеничного борошна вітчизняного та російського виробництва, 14 зразків вітчизняної та зарубіжної локшини, 7 продуктів із замороженого тіста. В якості контролів використовували сорти пшениці вітчизняної селекції, які є носіями пшенично-житніх транслокацій 1AL.1RS1 та 1BL.1RS, різних алелів генів *Glu* та *Ppo*.

Загальна ДНК виділялася за допомогою модифікованого ЦТАБ методу [11]. Визначення алелів генів *Glu-1* базувалося на використанні специфічних праймерів, запропонованих [12, 13] шляхом мультиплексних ПЛР. Визначення поліморфізму локусу *SCM9*, який свідчить про наявність пшенично-житніх транслокацій, здійснювали із застосуванням специфічних праймерів [14] з використанням дуплексної ПЛР. Іден-

© СТЕПАНЕНКО А.І., СТЕПАНЕНКО О.В., МОРГУН Б.В.

тифікація алелей високої та низької активності ферменту ПФО проводилася за допомогою двох STS маркерів PPO33 та PPO29 з використанням специфічних праймерів [15] методом дуплексної ПЛР. Розділення продуктів ампліфікації проводили методом горизонтального електрофорезу в агарозному гелі.

Результати та обговорення

За допомогою маркерних систем нами була проаналізована вибірка харчових продуктів на наявність цінних алелів генів ВМГ, генів поліфенолоксидазної активності та наявність пшеничньо-житніх транслокацій. Зведені результати дослідження наведені в табл.

Серед досліджуваного борошна пшениці та продуктів із замороженого тіста було виявлено гетерогенність усіх зразків за локусом *Glu-A1*. Для локшини вітчизняних та російських торговельних марок «КМФ», «Макфа», «Тая», «Хуторок» та «Чумак» також спостерігали наявність декількох алелів гена, проте у локшинах марок «Букатіні» (ТЦ «Ашан»), ТМ «Циндао», «Pasta di puglia», «Sedanini Rigati» та «Spaghetti» не

Таблиця

Зведені результати дослідження

№	Продукт, торгова марка	Виробник	*Glu-A1*	*Glu-B1al*	*Glu-D1*	1RSтранслокації	*Ppo-A1*	*Ppo-D1*
Борошно								
1	Пшеничне борошно, вг	ОАО «Макфа», Російська Федерація	(1/0)/2*	—	5+10/2+12	—	*a*	*b*
2	Борошно пшеничне, вг	ТОВ «Август-Кий», смт Гостомель	(1/0)/2*	—	5+10/2+12	1AL/1BL	*a*	*b*
3	Борошно цільнозернове пшеничне	ПАТ «Луганськ-Нива», ТМ «Добродія», м. Луганськ	(1/0)/2*	—	5+10	1AL	*a*	*b*
4	Борошно пшеничне, вг	«Хуторок», Дніпропетровська обл.	(1/0)/2*	+/–	5+10/2+12	1AL/1BL	*a*	*b*
5	Борошно пшеничне, вг	ПрАТ «Київмлин», м. Київ	(1/0)/2*	—	5+10/2+12	1AL/1BL	*a*	*b*
6	«Такіда. Зваримо разом». Борошно пшеничне, вг	ПАТ КП Білоцерківхлібопродукт, м. Біла Церква,	(1/0)/2*	—	5+10/2+12	1BL	*a*	*b*
7	«Щедрі Брати». Борошно пшеничне, вг	ТОВ «Альфа-Віста», Київська обл.	(1/0)/2*	—	5+10/2+12	1AL/ 1BL	*a*	*b*
8	«Веселий Кок». Борошно пшеничне, вг	ТОВ «Август-Кий», смт Гостомель	(1/0)/2*	—	5+10/2+12	1AL/1BL	*a*	*b*
9	Борошно пшеничне, вг	ТОВ «Август-Кий», смт Гостомель	(1/0)/2*	—	5+10/2+12	1AL/1BL	*a*	*b*
10	«Повна чаша». Борошно пшеничне, вг	ТОВ «Осавіахім», с. Скворцове, АР Крим	(1/0)/2*	+/–	5+10/2+12	1AL/1BL	*a*	*b*
11	Борошно пшеничне покращеної якості, вг	ПАТ КП «Білоцерківхлібопродукт», м. Біла Церква	(1/0)/2*	+/–	5+10/2+12	1AL/1BL	*a*	*b*
12	«Екород — борошно пшеничне органічне», вг	ТОВ «Органік Оригінал», м. Вишгород	(1/0)/2*	+/–	5+10	1BL	*a*	*b*
13	«Добра вигода». Борошно пшеничне, вг	ПП «Агроінвест», м. Барвінкове, Харківська обл.	(1/0)/2*	+/–	5+10	1AL	*a*	*b*
14	Борошно пшеничне, вг	ТОВ «Міра-Трейд», смт Коцюбинське	(1/0)/2*	+/–	5+10/2+12	1AL/1BL	*a*	*b*
15	Борошно пшеничне	м. Корсунь-Шевченківський, Черкаська обл.	(1/0)/2*	—	5+10/2+12	1AL/1BL	*a*	*b*
16	«Богумила». Борошно пшеничне, вг	ДП «Куліндровський комбінат хлібопродуктів», м. Одеса	(1/0)/2*	+/–	5+10	1AL/1BL	*a*	*b*

Продовження табл.

№	Продукт, торгова марка	Виробник	*Glu-A1*	*Glu-B1al*	*Glu-D1*	1RSтранс-локації	*Ppo-A1*	*Ppo-D1*
17	Борошно, вг	ТОВ «Дніпромлин», м. Дніпропетровськ	(1/0)/2*	+/–	5+10/2+12	1BL	*a*	*b*
18	Борошно жорнове пшеничне цілозернове	ТОВ «Август-Кий», смт Гостомель, Київська обл.	1/0/ (н.д. 2*)	—	5+10/2+12	1BL	*a*	*b*
19	Борошно пшеничне цілозернове грубого помелу	МПП ФПФ «Унава», с. Самгородок, Київська обл.	(1/0)/2*	+/–	5+10/2+12	1AL	*a*	*b*
20	Борошно пшеничне, вг, «Фуршет»	ТОВ «ЗПК», м. Бровари, Київська обл.	(1/0)/2*	+/–	5+10/2+12	1AL	*a*	*b*
21	Борошно пшеничне, перший ґатунок. «Народна марка»	ТОВ «ЗПК», м. Бровари, Київська обл.	(1/0)/2*	—	5+10/2+12	1AL/1BL	*a*	*b*
22	Борошно пшеничне	м. Тальне, Черкаська обл.	(1/0)/2*	+/–	5+10/2+12	1AL/1BL	*a*	*b*
23	Борошно пшеничне	«Хуторок», смт Ювілейне	(1/0)/2*	—	5+10	1AL/1BL	*a/b**	*b*
24	Борошно «Extra»	«Extra», Україна	(1/0)/2*	—	5+10	1BL	*a/b**	*b*
Продукти із замороженого тіста								
1	Тісто заморожене листкове	ТМ «Премія»	(1/0)/2*	+/–	5+10/2+12	1AL	*a*	*b*
2	Равіолі «Русские»	ТМ «Глечик», м. Одеса	(1/0)/2*	+/–	5+10/2+12	1AL	*a/b**	*b*
3	Равіолі «Домашні»	ТМ «Повна чаша»	(1/0)/2*	+/–	5+10	1AL/1BL	*a*	*b*
4	Фірмові пельмені	ТМ «Геркулес», м. Донецьк	(1/0)/2*	+/–	5+10	1AL	*a*	*b*
5	Тісто дріжджове	Російська Федерація	(1/0)/2*	+/–	5+10/2+12	—	*a/b**	*b*
6	Равіолі «Застольні»	ТМ «Экономька», м. Одеса	(1/0)/2*	+/–	5+10	—	*a/b**	*b*
7	Тісто дріжджове	ТМ «Премія», Україна	(1/0)/2*	+/–	5+10 (н.д. 2+12)	1AL/1BL	*a/b**	*b*
Локшина								
1	Вермішель на домашньому бульйоні «Роллтон»	ТОВ «Маревен Фуд Україна», м. Біла Церква	(1/0)/2*	+/–	5+10	—	*a*	*b*
2	Пшенична локшина Удон «JS»	ТМ «Циндао», Китай	1/0	—	2+12 (н.д. 5+10)	1BL	*a/b**	*b*
3	Спіральки з какао-порошком	ТМ «Bella Pasta», Україна	1/0	—	—	1BL	*a*	—
4	Макаронні палички	ТМ «Sedanini Rigati», Італія	1/0	—	– (н.д.)	—	*a*	—
5	Макаронні ріжки	ТМ «Pasta di puglia», Італія	1/0	—	– (н.д.)	—	*a*	—
6	Вермішель	ТМ «Чумак», Україна	(1/0)/2*	+/– (н.а.)	5+10	1AL/1BL	*a*	*b*
7	Спагетті	ТМ «Riscossa Pastificio», Італія	(1/0)/ (2* н.д.)	—	– (н.д.)	—	*a*	—
8	Спагетті «Spaghetti Ristorante»	ТМ «Riscossa Pastificio», Італія	(1/0)/ (2* н.д.)	—	– (н.д.)	—	*a*	—
9	Вермішель тонка	ТМ «КМФ», Україна	(1/0)/2*	+/–	5+10/2+12	1AL	*a/b**	*b*
10	Класичні	ТМ «Тая», Україна, м. Хмельницький	(1/0)/2*	—	5+10/2+12	1AL/1BL	*a*	*b*
11	Спіральки	ТМ «Макфа», Російська Федерація	(1/0)/2*	—	5+10/2+12	—	*a*	*b*
12	«Фантазія»	ТМ «Макфа», Російська Федерація	1/0	—	—	—	*a*	—
13	«Букатіні»	ТЦ «Ашан», Україна	1/0	—	—	—	*a*	—
14	Макаронні ракушки	ТМ «Хуторок», Україна	(1/0)/2*	—	5+10	1AL	*a/b**	*b*

Примітки: «–» — відсутня реакція за локусом; «н.д.» — незначні кількості матеріалу, який несе локус; «1/0» — наявність або алеля *Glu-A1 1*, або *Glu-A1 null;* «(1/0)/2*» — гетерогенність матеріалу за алелями *Glu-A1;* для стовпчика *Glu-B1al*: «+/–» — в зразку наявна значна кількість матеріалу з алелем *al*; «+/– –», «+/ — – –» — в зразку наявні незначні домішки матеріалу з алелем *al;* «н.а.» — зразок несе нетиповий алель локусу *Glu-B1,* характерний для сорту Новокиївська; для стовпчика *Glu-D1*: «5+10» або «2+12» — зразок містить гомогенний пшеничний матеріал за локусом; «5+10/2+12» — зразок гетерогенний за локусом; «1AL», «1BL», «1AL/1BL» — наявність одного або 2-х типів транслокації у зразку; «*a*» — алелі *Ppo-A1a* та *Ppo-D1a*; «*b*» — *Ppo-A1b* та *Ppo-D1b*; «*a/b**» — генотипи з нетиповим ампліконом; «вг» — вищого ґатунку.

було виявлено алеля *Glu-A1 2**. Для локшин ТМ «Riscossa Pastificio» спостерігали незначні домішки алеля *Glu-A1 2**. Ці дані свідчать про значну гетерогенність вихідного пшеничного матеріалу у вітчизняному борошні, продуктах із замороженого тіста та локшини. Варто особливо відзначити, що для елітних італійських та вітчизняних локшин характерна гомогенність пшеничного матеріалу за локусом *Glu-A1*, окрім ТМ «Riscossa Pastificio» (це можна пояснити наявністю домішок борошна м'якої пшениці, що додатково підтверджується виявленням слідових кількостей локусу *Glu-D1*, який не характерний для твердої пшениці).

Алель *Glu-B1al* був ідентифікований в 11 зразках борошна переважно у вигляді домішок. Крім того, алель *al* містився у трьох зразках локшини та в усіх продуктах із замороженого тіста. Проте зразку, який був би носієм суто цього алеля, не було знайдено. Необхідно відзначити, що серед зразків борошна найбільший вміст алеля *al* спостерігається для борошна пшеничного вищого сорту Богумила (м. Одеса). Це корелює з тим, що на сьогодні більшість сортів носіїв даного цінного хлібопекарського алеля належать до одеського центру селекції. Наявність алеля *al* приводить до підвищення хлібопекарської якості борошна, а отже можна прогнозувати, що борошно з ним є більш цінним для випікання формового хліба.

Було виявлено 13 гомогенних зразків за локусом *Glu-D1*, які є носіями алеля 5+10. Усі інші зразки, крім локшини з твердих сортів, виявили наявність як алеля 5+10, так і алеля 2+12. Локшина Удон «JS» виявилася практично гомогенним зразком, який містить алель 2+12. Необхідно відзначити, що алель 5+10 має значний позитивний вплив на якість формового хліба, а отже борошно, гомогенне за цим алелем, матиме підвищені хлібопекарські властивості. Проте для виробництва локшини оптимальним є наявність алеля 2+12.

Житній транслокативний матеріал був виявлений у 23 зразках борошна з 24-х. У 5-ти зразках (20,8 %) виявлено суто 1AL.1RS транслокації, з них у 2-х зразках транслокація визначена у незначних кількостях. У 5-ти зразках (20,8 %) ідентифіковано 1BL.1RS транслокацію, причому у 4-х зразках — у вигляді домішок. В інших зразках (58,3 %) були ідентифіковані обидва типи транслокацій, які визначалися як у значних кількостях, так і у вигляді домішок або обох типів, або одного типу транслокації. Інтрогресивний матеріал також був визначений у 5-ти продуктах з 7-ми із замороженого тіста (71,4 %) та в 6-ти зразках з 14-ти локшини (42,9 %).

Результати підтверджують дуже широке сучасне використання сортів з даними транслокаціями для отримання борошна та харчових продуктів з нього. Разом з тим отримані дані додатково свідчать про гетерогенність вихідного зернового матеріалу, який використовується для виробництва борошна. Враховуючи, що транслокації мають негативний вплив на якість борошна, можна прогнозувати знижені показники окремих марок борошна при приготуванні виробів з нього.

Було також виявлено, що 2 зразки борошна, 3 локшини та 4 продукти з замороженого тіста є носіями алеля *a/b** гена *Ppo-A1a*, тому можна прогнозувати для них зменшення поліфенолоксидазної активності. Решта зразків несли алель високої активності *Ppo-A1a*. Окрім того, всі досліджувані зразки харчових продуктів (окрім локшини з твердих сортів пшениці, для яких не очікували появи позитивного сигналу) є носіями алеля *Ppo-D1b*, який обумовлює високу активність ПФО зерна пшениці. Ці дані свідчать про високу активність ПФО у харчових продуктах, а отже про потенційну здатність їх до потемніння та втрату якості під час зберігання.

Висновки

Отримані дані щодо виявлення алелів генів, які визначають якісні показники пшениці, свідчать про значну гетерогенність вихідного матеріалу, що використовується для виготовлення борошна та виробництва локшини і продуктів із замороженого тіста. В борошні виявлено ряд алелів, які негативно впливають на хлібопекарські властивості, проте є бажаними для інших напрямків використання. Враховуючи отримані дані, системи ДНК-маркерів будуть корисними для додаткового контролю харчових продуктів на придатність їх до певного спеціалізованого технологічного напрямку використання.

ЛІТЕРАТУРА

1. Cornish G. B., Bekes F., Eagles H. A., Payne P. I. Prediction of dough properties for bread wheats.— In Wrigley C. W., Bekes F., Bushuk W. Gliadin and glutenin: the unique balance of wheat quality.— St. Paul, MN, AACC International, 2006.— P. 243–280.
2. Butow B. J., Ma W., Gale K. R., Cornish G. B., Rampling L., Larroque O., Morell M. K., Bekes F. Molecular discrimination of Bx7 alleles demonstrates that a highly expressed high-molecular-weight glutenin allele has a major impact on wheat flour dough strength // Theor Appl Genet.— 2003.— 107 (8).— P. 1524–1532.
3. Payne P., Corfield K., Holt L., Blackman J. A. Correlations between the inheritance of certain high-molecular weight glutenin subunits and bread-making quality in progenies of six crosses of bread wheat // J. Sci. Food Agric.— 1981.— 32.— P. 51–60.
4. Simeone R., Pasqualone A., Clodoveo M. L., Blanco A. Genetic mapping of polyphenol oxidase in tetraploid wheat // Cell Mol Biol Lett.— 2002.— 7.— P. 763–769.
5. McCallum J.A., Walker J. R. L. O-diphenol oxidase activity, phenolic content and colour of New Zealand wheats, flours and milling streams // J Cereal Sci.— 1990.— 12.— P. 83–96.
6. Dexter J. E., Preston K. R., Matsuo R. R., Tipples K. H. Development of a high extraction flour for the GRL Pilot Mill to evaluate Canadian wheat potential for the Chinese market // Can. Inst. Food Sci. Technol.— 1984.— 14.— P. 253–259.
7. Feillet P., Autran J. C., Icard-Verniure C. Pasta brownness: an assessment // J. Cereal Sci.— 2000.— 32.— P. 215–233.
8. Zeller F., Günzel G., Fischbeck G. Veränderung der backeigenschaften der weizen-roggen-chromosomen-translokation 1B/1R // Getreide Mehl Brot.— 1982.— 36.— P. 141–143.
9. Singh N.K, Shepherd K. W., McIntosh R. A. Linkage mapping of genes for resistance to leaf, stem and stripe rusts and ω-secalins on the short arm of rye chromosome 1R // Theoretical and Applied Genetics.— 1990.— 80 (5).— P. 609–616.
10. Рибалка О. І. Якість пшениці та її поліпшення.— К.: Логос, 2011.— 495 с.
11. Stewart C. N., Via L. E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications // BioTechniques.— 1993.— 14 (5).— P. 748–749.
12. Butow B. J., Gale K. R., Ikea J., Juhasz A., Bedo Z., Tamas L., Gianibelli M. C. Dissemination of the highly expressed B×7 glutenin subunit (*Glu-B1al* allele) in wheat as revealed by novel PCR markers and RP-HPLC // Theor. Appl. Genet.— 2004.— 109.— P. 1525–1535.
13. Liu S. X., Chao S. M., Anderson J. A. New DNA markers for high molecular weight glutenin subunits in wheat // Theor. Appl. Genet.— 2008.— 118.— P. 177–183.
14. Saal D., Wricke G. Development of simple sequence repeat markers in rye (*Secale cereal* L.) // Genome.— 1999.— 42.— P. 964–972.
15. He X. Y., He Z. H., Zhang L. P., Sun D. J., Morris C. F., Fuerst E. P. Allelic variation of polyphenol oxidase (PPO) genes located on chromosomes 2A and 2D and development of functional markers for the *PPO* genes in common wheat // Theor. Appl. Genet.— 2007.— 115.— P. 47–58.

STEPANENKO A.I., STEPANENKO O.V., MORGUN B.V.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine,
Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str., 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua

POLYMORPHISM OF WHEAT GENES THAT DETERMINE QUALITATIVE PROPERTIES IN FOOD PRODUCTS

***Aims*.** Control of wheat grain used for flour production is an important issue for high-quality bread, noodles, cakes and semi-frozen dough. Allelic variation of genes of high molecular weight glutenin (*Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*) and polyphenol oxidase (*PPO*) genes, presence of wheat-rye 1RS translocations effect on the quality of flour and determinate the optimal direction of their use. ***Methods*.** We employed the system of molecular markers based on PCR for detection alleles of genes and translocations. ***Results*.** Considerable heterogeneity of alleles in the source material which determine the quality properties of wheat in flour and food products made of flour (noodles and frozen products of dough) was found. A number of alleles with negative effect for the baking properties was identified in flour. But these alleles are desirable to make other products. ***Conclusions*.** The results of the study can be applied efficiently to identify genotypes of wheat that is used to make food products.

Keywords: *Triticum aestivum* L., flour, quality, PCR markers, food products.

УДК 636.4.082.2

ХОХЛОВ А. М., БАРАНОВСКИЙ Д. И., СМИРНОВА А. С.
Харьковская государственная зооветеринарная академия,
Украина, 62341, Харьковская обл., Дергачевский район, п/о Малая Даниловка, ул. Академическая, 1,
e-mail: zoovet.kh.ua

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗМА ЖИВОТНЫХ РОДА *SUS*

Биологический контроль за состоянием организма животных — важная селекционная проблема. Он включает нормы и патологии, что находятся на стыках зоотехнической, иммуногенетической, морфологической и ветеринарной наук. В связи со специализацией пород на одностороннюю максимальную продуктивность увеличивается количество показателей, по которым можно судить об ухудшении генофонда вида.

К параметрам биологического контроля можно отнести крепость конституции, иммуногенетический и цитогенетический контроль, а также качество продукции.

Материалы и методы

Объектом наших исследований послужили дикий европейский кабан (*Sus scorfa ferus*) и крупная белая порода свиней (*Sus scorfa domestica*). В процессе породообразования создано более 400 пород свиней, но наиболее распространенным является пять пород: крупная белая (117 стран), дюрок (93 страны), ландрас (91 страна), гемпшир (54 страны) и пьетрен (35 стран) [2]. Возникает вопрос, какие биологические и генетические различия между современными породами свиней и их исходными формами [1].

Свиньи в отличие от других сельскохозяйственных животных характеризуются рядом биологических особенностей, среди которых наиболее важными являются: высокое многоплодие и скороспелость, короткий период супоросности, высокий убойный выход, качество мясной продукции, широкая адаптация к различным климатическим и экологическим условиям [3–5].

Результаты и обсуждение

Многочисленными исследованиями установлено, что продолжительность эмбрионального развития у свиней равна 114–115 дней (у крупного рогатого скота — 285 дней, у овец — 152 дня). Многоплодие дикой свиноматки 4–6 поросят, крупной белой породы 10–12 поросят, а у китайской породы мейшан 16–20 поросят за 1 опорос. Живая масса новорожденных поросят в среднем 1,2–1,3 кг, а у свиней породы мейшан 0,6–0,8 кг. В их теле содержатся до 81% воды, 14% белка, 2% жира и 3% золы. Живая масса новорожденных телят в среднем составляет 30–45 кг, в их теле содержится 73–75% воды, 18% белка, 3% жира и 4% золы. Новорожденные поросята по сравнению с телятами и ягнятами отличаются плохо развитыми системами терморегуляции, кровообращения и пищеварения, что значительно осложняет их выращивание. Однако новорожденные поросята по сравнению с телятами и ягнятами отличаются более интенсивным обменом веществ и высокой скоростью роста. Так, удвоение живой массы поросят происходит уже на восьмой день жизни (у телят — на 47-й, у ягнят — на 12-й день). Установлено, что значительно более высокая интенсивность роста поросят по сравнению с телятами и ягнятами отмечается и в дальнейшем, во все последующие периоды жизни [4–5].

В кариотипе домашней свиньи имеется 2n — 38 хромосом, из которых 36 аутосом и 2 половые хромосомы X и Y, причем размер X-хромосомы больше, чем размер Y-хромосомы. По расположению центромеры хромосомы подразделяются на 8 пар субметоцентриков, 6 пар акроцентриков и 5 пар метоцентриков (сюда же относятся половые хромосомы). Наибольший размер имеет первая пара субметоцентрических хромосом. У свиней выявлено пространственное расположение гомологичных хромосом ядра. Оно сопровождается соматическим кроссинговером несестринских хроматид, который приводит к явлению мозаицизма. Соматический мозаицизм проявляется в пигментации волоса и кожи свиней [5–6].

Научные данные о проявлении воспроизводительной функции свиней и факторы, влияющие на них, по сравнению с животными других видов ограничены. Важное значение в этом вопросе отводится качеству семени самцов, используемому для искусственного осеменения самок.

© ХОХЛОВ А. М., БАРАНОВСКИЙ Д. И., СМИРНОВА А. С.

Известно, что результативность искусственного осеменения маток в значительной степени зависит от своевременной и правильной оценки количественных и качественных показателей семени. Для изучения биологических и генетических особенностей исследовали нативную сперму хряков современных мясных пород в сравнении с особенностями половых клеток спермы дикого европейского кабана, который является генетическим корнем при создании отечественных и зарубежных пород свиней. В интерференционном микрокопировании спермы изучали как морфологические, так и генетические показатели спермы. Исследования качества спермы диких и домашних хряков показали, что если по сухой массе головки спермиев у дикого европейского кабана и одомашненных свиней различия незначительные, то в соотношении дезоксинуклеиновой кислоты и белка в головке спермия и частоте дефектов в строении половых клеток наблюдаются более существенные различия. Так, крупная белая порода свиней по происхождению от дикого европейского кабана и имеющая с ним общие филогенетические корни имела одинаковое соотношение в головке спермия белка и ДНК (67,4–32,6%). Датская порода ландрас и английская порода уэльс филогенетически созданы при широком участии крупной белой породы свиней. Исследования показали, что у хряков породы ландрас соотношение в головке спермия белка и ДНК (69,6 и 30,4%), а у уэльс (68,2 и 31,8%). У дикого европейского кабана мужская половая клетка резко отличается от женской по величине, форме и подвижности. Длина спермиев колеблется от 35 до 78 мкм, а длина головки — от 7 до 10 мкм. Основой головки сперматозоида является ядро, где от 30,4 до 36,5% сухого вещества содержится в ДНК.

Яйцевые клетки самки — самые крупные в организме. Они богати желтком — запасные питательные материалы. У свиноматок диаметр яйцеклеток и зародыша на первых стадиях дробления — 165 ± 0,8 мкм, объем 3,624 м^3, максимальным диаметр 188,8 мкм. При этом проявляются как возрастные, так и внутривидовые различия. Наши расчеты показали, что при средней площади головки спермия 32 мкм^2 и толщине 1,2 мкм объем головки спермия — 38,4 м^3 или в 110 тыс. раз меньше, чем объем яйцеклетки.

Среди конституционных признаков особое внимание при селекции надо уделять развитию костной ткани, которая оценивается по многим параметрам как кроветворный орган и опорно-двигательный аппарат. Размеры, форма, внутренняя структура кости как органа и физико-механические свойства ее, а также пропорции и относительное развитие отдельных звеньев и конечности в целом характеризуют особенности биомеханики локомоторного аппарата млекопитающих. Объектом исследования служил скелет дикой европейской свиньи и крупной белой породы свиней. Применялись как морфологические методы исследования, так и методы, используемые при изучении сопротивления материалов в технике.

Испытание на сжатие костей в 12-месячном возрасте животных показало, что все абсолютные показатели прочности костей у дикого европейского кабана значительно выше, чем у крупной белой породы свиней. Так, плечевая кость выдерживает испытание на сжатие у дикого кабана — 460,20 ± 6,10 кг/см^2, а у крупной белой породы свиней — 427,20 ± 6,10 кг/см^2 (td = 3,6 при P<0,01). Испытание трубчатых малых (пястная кость) показало, что крепость кости у дикого европейского кабана составляла 380,20 ± 6,12 кг/см^2 (td = 2,44 при P<0,01). Следовательно, прочность длинных трубчатых костей сравнительно выше у диких, чем у домашних животных. Прочность ребер: у дикого европейского кабана — 20,96 ± 0,18 кг/см^2, а у домашних свиней — 19,38 ± 0,15 кг/см^2 (td = 6,8 при P<0,001). Таким образом, снижение двигательной активности у домашних свиней привело к уменьшению прочности кости.

Кожа и глобулины крови являются важнейшими компонентами резистентности, устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды. Исследования показали, что у дикого европейского кабана толщина основы кожи (во взрослом состоянии) составила 4279 ± 19,3 мкм, а у крупной белой породы — 4 002 ± 17,5 мкм. Вероятно, это можно объяснить тем, что у диких свиней обменные процессы в коже протекают более интенсивно, чем у животных крупной белой породы.

Количество завитков в секреторном отделе потовых желез в коже дикого кабана (на определенной площади) составило 126 ± 1,2, а у свиней крупной белой породы — 15,1 ± 0,29, или

в 8,4 раза меньше. Эти железы служат для выделения воды и вместе с этим для терморегуляции. Следовательно, эти физиологические функции достоверно лучше были выражены у дикого европейского кабана по сравнению с породными животными. Сальные железы, наоборот, более крупные у животных крупной белой породы, которым присуща меньшая интенсивность обмена веществ и несколько пониженная окислительная функция ферментативных систем организма. В связи с этим у них усиливается жирообразование.

Мировой и отечественный опыт свидетельствует о том, что основным сырьем для производства высококачественных мясных продуктов питания является свинина. Мясо свиньи высоко ценится по своим вкусовым и питательным свойствам. Оно биологически ценнее, чем говядина и баранина, а его белок обладает наибольшей усвояемостью (коэффициент использования белка свинины — 90%, телятины — 80%, говядины — 75%, баранины — 70%).

По сравнению с говядиной свинина в 3 раза больше содержит незаменимых жирных кислот, в особенности арахидиновой, в 8 раз витамина B_1. Свинина имеет более нежную консистенцию, приятный аромат и вкус.

Однако качество продукции животных устанавливается по комплексу показателей, которые подвержены селекционному процессу. Нами установлено, что в мышечной ткани дикой европейской свиньи содержание миоглобина в 2,5 раза выше, чем у животных крупной белой породы. Этот показатель можно использовать при оценке технологических свойств мышечной ткани у животных. Содержание эластина в мышечной ткани подсвинков крупной белой породы почти в три раза превышает этот показатель у диких свиней. Таким образом, биологический контроль в селекции можно осуществлять на протяжении всего периода онтогенеза или хозяйственного использования животных.

Выводы

1. При оценке спермы диких и домашних животных наиболее информативными показателями ее качества и оплодотворяющей способности является подвижность, концентрация, выживаемость и резистентность.

2. Метод интерференционной микроскопии позволяет достоверно производить морфологическую оценку размеров половых клеток, определять количество сухого вещества, белков и ДНК в головках спермиев и дифференцировать различные дефекты в строении спермиев.

3. Линейные и объемные размеры яйцеклеток у молодых свиноматок мельче, чем у взрослых, что свидетельствует об их биологической неравноценности по сравнению с яйцеклетками взрослых маток.

4. В процессе доместикации происходят морфологические и физиологические изменения не только пищеварительной и дыхательной, но и опорной системы животных. Абсолютные показатели прочности костей у дикого европейского кабана существенно выше по сравнению с домашними животными.

5. Высокий процент миоглобина в мышечной ткани диких свиней является важным генетическим резервом при совершенствовании отечественных пород свиней по качеству мяса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев В. С., Хохлов А. М. Морфофункциональные показатели спермы хряков в интерференционном контрасте // Современные проблемы и технологические инновации в производстве свинины в странах СНГ: сб. науч. тр. — Чебоксары, 2013. — С. 165–172.
2. Гладырь Е. А., Эрнст Л. К. Изучение генома свиней (*Sus scorfa*) с использованием ДНК-маркеров // Сельскохозяйственная биология, 2009. — № 2. — С. 16–17.
3. Понд Дж., Хаунт К. А. Биология свиньи. — М.: Колос, 1983. — С. 8–37.
4. Хохлов А. М. Возрастные особенности размеров яичников и яйцеклеток у свиней крупной белой породы // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини: зб. наук. праць. — Харків, 2013. — Вип. 27. — С. 167–176.
5. Хохлов А. М., Барановский Д. И. Формирование физической и химической терморегуляции у свиней // Вестник Курской сельскохозяйственной академии. — Курск, 2014. — № 1. — С. 72–74.
6. Литвинов Н. С. Исследование дивергенции геномов свиней методом молекулярной гибридизации ДНК // Генетические исследования в селекции животных: Бюллетень науч. работ. — Дубровицы, 1982. — Вып. 65. — С. 8–12.

HOHLOV A.M., BARANOVSKIY D.I., SMIRNOVA A.S.

Kharkov State Zooveterinary Academy,
Ukraine, 62341, Kharkov region, Dergachi district, Malaya Danilovka v., Academichna str., 1, e-mail: zoovet.kh.ua

BIOLOGICAL PECULIARITY OF *SUS* GENUS ANIMAL ORGANIZM

Aims. During many years history of domestication of swine the profounds morphological, physiological and genetical changes have been occurred. Aim of ours investigations was estimation of morphological and biochemical peculiarity of sperm in Sus scrofa ferus and boars of modern breeds. ***Methods.*** The fresh sperm of Sus scrofa ferus have been investigated. By traditional methods the volume, concentration, activity, biochemical and other indexes of sperm wild and domestic boars have been determined. Used interferention microscope the frequents of various defects in structures of sperm, size, dry matter of heads, quantity DNA and protein have been determined. In bone tissue studying of wild and domestic animals morphological methods and methods of bone resistance studying were used ***Results.*** In Sus scrofa ferus length of sperm heads was reliable smaller of sizes sexual cells of modern swine breeds boars. However, for width of sperm heads and length of middle parts take place reliable advantage in boars Sus scrofa ferus. Middle part of sperms has mitochondrial apparate that promoting higer activity and better adaptation of wild Sus scrofa ferus sperm. Also, at experimental animals studying development of bone and muscle tissue, quality of production. Quality of production standing by content of mioglobin and elastin in animal muscle tissue. ***Conclusions.*** At first time the native sperm from wild Sus scrofa ferus have been received and comparative analysis morphofunctional indexes of sperm wild boars and boars of modern breeds have been made. Method of interferention microscoping permissible reliable to estimate the morphological and genetical indexes of sperm wild and domestic boars. Biological set control in animal selection may be developed in all periods of ontogenesis or farming animal using.

Keywords: DNA, mioglobin, bone, muscle.

УДК 635.342:57.015.3:577.21

ШАПТУРЕНКО М. Н., ПЕЧКОВСКАЯ Т. В., ВАКУЛА С.И., ХОТЫЛЕВА Л. В.
Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,
Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: m.shapturenko@tut.by

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АЛЛЕЛЬНОГО СОСТАВА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ *BRASSICA OLERACEA* VAR.*CAPITATA* L.

Капуста белокочанная (*Brassica oleracea* var. *capitata* L. *f. alba* DC) является одной из наиболее важных овощных культур благодаря широкой адаптационной способности, высокой урожайности и питательной ценности. Селекция *B. oleracea* преимущественно базируется на использовании физиологической самонесовместимости и MS (male-sterile) систем и предполагает наличие генетически выровненного исходного материала. Тем не менее, ввиду высокой внутривидовой гетерогенности, связанной с биологическими особенностями этой культуры, существует проблема создания константного генетического материала и поддержания его чистоты [1, 2]. Традиционная оценка селекционных форм, основанная на данных полевого испытания, позволяет отобрать образцы, выровненные по срокам созревания, размеру и форме кочана. Тем не менее, генетическая компонента изменчивости, обусловленная гетерозиготностью особей по разным аллелям, как правило, остается за пределами такой оценки. Следовательно, возможности семейственного отбора, так же как и контроль типичности наследуемого в поколениях генетического материала, в значительной мере ограничены.

Доступные к настоящему времени методические подходы к анализу вариабельности ДНК способны облегчить создание константных форм за счет отбора индивидуальных растений с установленным профилем амплифицированных ДНК фрагментов, а также обеспечить подбор дивергентных пар скрещивания перспективной межлинейной комбинации при селекции на гетерозис.

Удобным и технологичным методом ДНК-скрининга является микросателлитный (SSR — Simple sequence repeat) анализ, который эффективно используется для картирования, выявления сцепления и закономерностей наследования. Микросателлиты относятся к тандемно повторяющимся последовательностям ДНК, которые широко представлены в геноме растений и животных, включая кодирующие и некодирующие области [3, 4]. SSR локусы выявляют большое разнообразие аллелей, поскольку события, обусловливающие вариацию в количестве повторов, являются частыми и обратимыми [5]. В некоторых случаях отмечается существование более 10 аллелей для одного маркера [6]. Эта информация может быть полезна, так как обеспечивает эффективный способ отслеживания аллелей в популяции и позволяет дифференцировать генотипы при использовании относительно небольшого числа маркеров.

В настоящем исследовании проведены изучение генетического разнообразия селекционной коллекции капусты белокочанной и оценена эффективности использования микросателлитных (SSR) маркеров для анализа генетического полиморфизма и типирования *Brassica oleracea* var. *capitata* L.

Материалы и методы

Объектом исследования служила селекционная коллекция образцов капусты белокочанной, полученных на основе коммерческих сортов различного эколого-географического происхождения: Альфредо (Alf) и Ротонда (Rot) голландской селекции; Арктика (Ark) и Семко юбилейный (Sem) селекции РФ; Гранада (Gran), Роксана (Rok), Сулейка (Sul), Увертюра (Uver) и Халиф (Khal), а также линии L251, L264, L407, L573, L574, L575, L576, L577, L578, L580, L583, L661, L728, L783, L860, L962 немецкой селекции; линии Gr, Pl9 селекции РБ.

ДНК выделяли из этиолированных проростков в трехкратной повторности при помощи набора реагентов Genomic DNA Purification Kit (#K0512, Fermentas) согласно инструкции. Каждая повторность представляет собой смесь (bulk) ДНК из 3–9 индивидуальных растений. Препараты ДНК разводили до конечной концентрации 10 ng/ml^{-1} в деионизированной воде и хранили при температуре +4 °C.

Для молекулярно-генетического анализа использовали 14 SSR-маркеров (BoABI1, BoIAB20TR,

© ШАПТУРЕНКО М. Н., ПЕЧКОВСКАЯ Т. В., ВАКУЛА С.И., ХОТЫЛЕВА Л. В.

BoIAB15TF, BoAP1, BoCALa, BoCALb, BoCALc, BoDEL9, BoDCTD1, BoPLD1, BoPLD2, BoPC34, BoREM1b, BoTHL1), отобранных из литературных источников [7, 8]. Амплификацию проводили на оборудовании «Biometra» (Германия) в стандартном режиме.

Анализ флуоресцентно-меченых SSR-фрагментов выполнен на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500 (США). Размер продуктов амплификации определяли с применением стандарта молекулярного веса S450 (Синтол). Полученные данные анализировали при помощи пакета прикладных программ GeneMapper Software (vers. 4.1).

Оценку аллельного состава SSR-локусов осуществляли на основе бинарных матриц. Расчет генетических расстояний и кластеризацию экспериментального материала методом UPGMA выполняли с использованием программы DARwin 5.0 (vers. 1.3b). Генетическую структуру определяли при помощи анализа главных компонент (PCA). Анализ частот SSR-локусов и информационного содержания соответствующих маркеров выполнен при помощи приложения GenAlEx 6.5.

Результаты и обсуждение

При изучении генетического разнообразия селекционной коллекции капусты белокочанной Института овощеводства НАН Беларуси, представленной 27 образцами различного происхождения, использовали 14 пар микросателлитных маркеров. В результате ДНК-типирования рассмотрено 78 аллелей в 14 SSR-локусах. Уровень наблюдаемого полиморфизма составил 97,9%. Фактический размер фрагментов варьировал по отношению к теоретически ожидаемому, за небольшим исключением. Количество рассмотренных аллелей на локус достигало 2–11 и в среднем составило 5,7 на 1 локус. Также отмечено значительное варьирование частот SSR-аллелей (рис. 1). Наблюдаемые частоты минорных аллелей (MAF — Minor Alleles Frequencies) были сдвинуты к MAF<0,32.

На долю редких (MAF<0,05) пришлось около 16% аллелей, которые были выявлены в локусах: BoDCTD8 (174bp), BoIAB15TF (218bp, 240bp, 293bp), BoIAB20TR (204bp), BoTHL1 (140bp), PLD2 (243bp, 247bp, 254bp), REM1b (172bp), BoPLD1 (302bp), BoABI1 (169bp), BoCalc (140bp). Тогда как наиболее распространенные (MAF>0,5) составили 26,9% от общего числа аллелей. Размер фрагментов BoDel9 (262bp), BoIAB15TF (302bp), BoIAB20TR (197, 314bp), BoCalb (242bp), BoTHL1 (149bp), BoPLD2 (188bp), Rem1b (163bp) соответствовал теоретически ожидаемому.

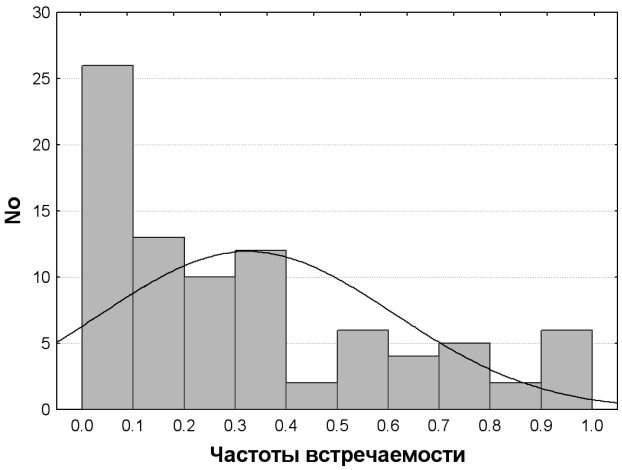


Рис. 1. Характер распределения частот встречаемости SSR-аллелей в коллекции капусты белокочанной

Среди 14 анализируемых SSR-локусов индекс информативности PIC ранжировался от 0,193 (для BoIAB15TF) до 0,866 (для BoIAB20TR) и в среднем достигал 0,62. Уровень гетерогенности варьировал от 0,071 до 0,436 и имел среднее значение 0,25, подтверждая существование полиморфизма во всех исследуемых SSR-локусах. Наиболее информативными (PIC>0,7) оказались локусы BoDCTD1, BoIAB20TR, BoPC34, BoCALa, BoPLD1, BoCALc, которые также характеризовались высокими значениями индекса Шеннона (I) и числа эффективных аллелей (Ne).

При изучении генетической гетерогенности капусты белокочанной на основе полиморфизма SSR-локусов рассчитаны генетические дистанции (GD) между образцами. Величина GD варьировала от 0,089 (Khal, Rot) до 0,573 (Sul, Pl9), со средним уровнем 0,333.

Для выявления топологической дифференциации и внутрисортового полиморфизма методом UPGMA выполнен кластерный анализ (рис. 2), в результате которого экспериментальные формы дифференцированы на две группы сходства.

Максимальная величина межгрупповых дистанций GD достигает 0,573. Согласно иерархической дифференциации в субкластере I выделены два класса общности: (A) L661, Gran, Pl9, Rok, Alf, L580, L789, L583; (B) L264, L574, L728, L575, L407, L578, L577, L576, L860, L573, а так-

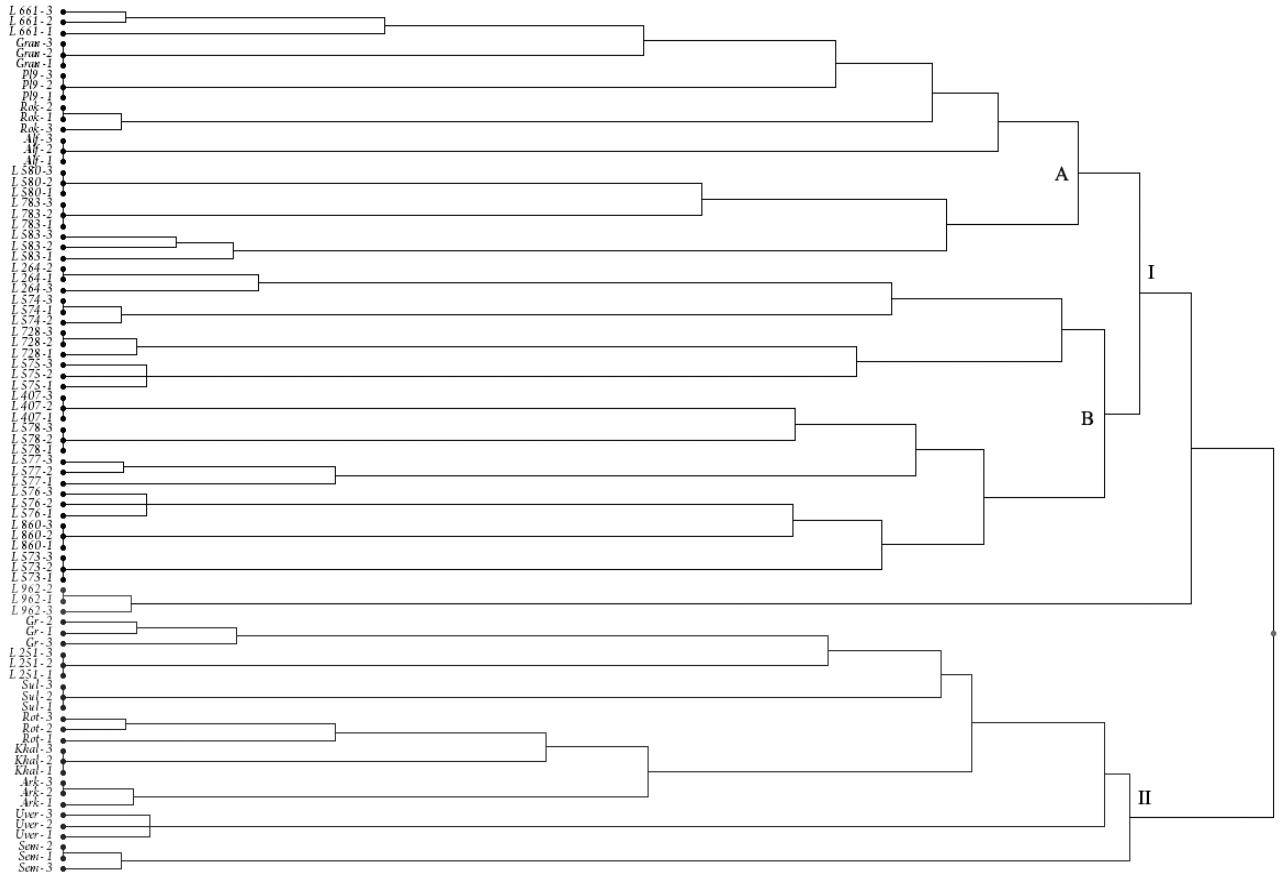


Рис. 2. Топологическая дифференциация образцов капусты белокочанной методом UPGMA, выполненная на основе анализа аллельного состава 14 микросателлитных локусов

же отдельная топологическая ветвь, образованная L962. Здесь величина генетических дистанций (GD) варьирует от 0,137 до 0,444, в зависимости от топологии ветвления. Субкластер II образуют 8 образцов (Khal, Rot, Sul, Ark, Gr, Uver, L251, Sem) с величиной межкластерных расстояний 0,102–0,346. Наибольшая генетическая общность характеризует Khal и Rot. Образцы Uver и Sem топологически выделены отдельными ветвями, что обусловлено наличием у них наибольшего числа уникальных сочетаний SSR-аллелей.

По результатам изучения аллельного состава SSR-локусов коллекции капусты белокочанной наиболее информативными оказались маркеры Bo20TR, BoDCTD4, BoPC34, BoPLD1, BoCalc, которые позволяют проводить как межсортовую, так и межлинейную дифференциацию *B.oleracea var. capitata*, включая типироване индивидуальных растений. Также установлено высокое разнообразие экспериментальных форм, которое свидетельствует о широкой генетической основе коллекции, которая преимущественно представлена образцами, полученными на основе сортов зарубежной селекции различного эколого-географического происхождения (Россия, Германия, Голландия). Межсортовой полиморфизм, выраженный в аллельном разнообразии изученных SSR-локусов, в значительной мере облегчает сортовую идентификацию и типирование индивидуальных растений при создании базовых популяций для последующей селекции на гетерозис.

При изучении внутрисортового полиморфизма показано, что наиболее выровненными по аллельному составу SSR-локусов являются Gran, Pl9, Alf, L580, L783, L407, L578, L860, L573, L251 и Khal. Остальные образцы выявляют гетерогенность, которая, вероятно, связана с высоким полиморфизмом исходных форм, вследствие чего целесообразно провести семейственный отбор для получения генетически выровненного поколения.

В результате исследования определены доноры редких аллелей: линии Gr, Alf, Pl9, Rot, Rok, L583, L578, L577, L573, L407, которые необходимо сохранять для поддержания разнообразия базовой коллекции, а также включать в гибриди-

зацию с целью выделения ценных генетических сегрегаций.

Сгруппированные в общие субкластеры образцы, несмотря на различное происхождение, с высокой вероятностью имеют общую предковую генетическую основу. Это может быть связано с использованием на ранних этапах селекции европейского региона ограниченного числа выдающихся генотипов.

Выводы

Полученные результаты подтверждают, что предложенный набор SSR-маркеров может успешно использоваться не только для оценки внутривидового разнообразия *B. oleracea,* но также для анализа меж- и внутрисортовой гетерогенности.

Информация о топологической дифференциации коллекции капусты белокочанной, полученная в результате кластерного анализа, является основой для селекционного отбора генетически выровненного материала, а также дивергентных комбинаций скрещивания при селекции на гетерозис.

Выражаем благодарность сотрудникам РУП Институт овощеводства НАН Беларуси за предоставленный для исследований селекционный материал капусты белокочанной.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ye Sh., Wang Y., Huang D., Li J., Gong Y., Xu L., Liu L. Genetic purity testing of F_1 hybrid seed with molecular markers in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) // Scientia Horticulturae.— 2013.— 155.— P. 92–96.
2. Liwang Liu, Guang Liu, Yiqin Gong Evaluation of Genetic Purity of F1 Hybrid Seeds in Cabbage with RAPD, ISSR, SRAP, and SSR Markers // Hortscience.— 2007.— 42, № 3.— P. 724–727.
3. Zhang L., Yuan D., Yu Sh., Li Zh., Cao Y., Miao Zh., Qian H., Tang K. Preference of simple sequence repeats in coding and non-coding regions of Arabidopsis thaliana // Bioinformatics.— 2004.— 20, № 7.— P. 1081–1086.
4. Senan S., Kizhakayil D., Sasicumar B., Sheeja Th. Methods for Development of Microsatellite Markers: An Overview // Not. Sci. Biol.— 2014.— 6, № 1.— P. 1–13.
5. Kashi Y., King D.G. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution // Trends Genet.— 2006.— 22.— P. 253–259.
6. Reif J.C., Warburton M.L., Xia X.C., Hoisington D.A., Crossa J., Taba S., Muminovic J., Bohn M., Frisch M., Melchinger A.E. Grouping of accessions of Mexican races of maize revisited with SSR markers // Theor Appl Genet.— 2006.— 113.— P. 177–185.
7. Louarn S., Torp A.M., Holme I.B., Andersen S.B., Jensen B.D. Database derived microsatellite markers (SSRs) for cultivar differentiation in *Brassica oleracea* L. // Genet. Resour. Crop. Evol.— 2007.— 54.— P. 1717–1725.
8. Tonguc M., Griffiths Ph.D. Genetic relationships of Brassica vegetables determined using database derived simple sequence repeats // Euphytica.— 2004.— 137.— P. 193–201.

SHAPTURENKO M.N., PECHKOVSKAYA T.V., VAKULA S.V., KHOTYLEVA L.V.

Institute of Genetics and Cytology of Natl. Acad. Sci. of Belarus,
Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27, e-mail: m.shapturenko@tut.by

COMPARATIVE DIVERSITY SIMPLE SEQUENCE REPEAT LOCI FROM *BRASSICA OLERACEA* VAR. *CAPITATA* L.

Aims. White cabbage is characterized by high level of intraspecific heterogeneity due to some biological features that causes difficulties for breeding at creation constant form and maintaining of their genetic typicality. Thus, we studied the effectiveness the set of SSR markers for both white cabbage diversity analysis and pure lines genotyping. ***Methods.*** Molecular-genetic studies were performed trough SSR PCR. Effectiveness the set of markers was evaluated by counting allelic richness, PICs, heterogeneity, allele frequencies using GenAlEx 6.5. To determine *B.o.var capitata* diversity with low and high variations, Jaccard dissimilarity index was estimated by Darwin software. ***Results.*** 15 microsatellite loci were characterized for the information content, allelic frequencies and heterogeneity level. The effective multiallelic markers (Bo20TR, BoDCTD4, BoPC34, BoPLD1, BoCalc) with high information content (PIC > 0.7) that could be successfully used for the analysis of inter- and intravarietal polymorphism *B. oleracea var.capitata* were defined. Based on the SSR-evaluation and subsequent clustering the genetic structure of breeding collection was established, which showed that most experimental forms have a common ancestral genetic basis, in spite of different origins. ***Conclusions.*** Proposed set of informative SSR markers is a useful tool for the selection of genetically constant material, as well as divergent cross combinations for the hybrid breeding. Identified donors of rare SSR alleles potentially could be a source of valuable genetic segregation for further *B. oleracea* improvement.

Keywords: *Brassica oleracea* var. *capitata* L. *f. alba* DC, genetic diversity, SSR.

BI H.[1], KOVALCHUK N. V.[1], DIAS D.[2], ROESSNER U.[2], LANGRIDGE P.[1], LOPATO S.[1], BORISJUK N. V.[1]

[1] Australian Centre for Plant Functional Genomics, University of Adelaide, Australia, Adelaide, Hartley Grove, Urrbrae SA 5064, e-mail: mykola.borysyuk@acpfg.com.au

[2] School of Botany, University of Melbourne, Australia, Melbourne, e-mail: u.roessner@unimelb.edu.au

NATURAL VARIATION OF WHEAT CUTICULAR WAXES IN RELATION TO DROUGHT TOLERANCE

Bread wheat, *Triticum aestivum*, represents about 30% of the world's cereal cultivation area and provides 20% of the calories for the human population. Wheat is cultivated over 220 million ha of soil worldwide, which is often under the influence of abiotic stresses such as limited water supply, high salinity and heat that significantly impair crop's yield. It is the growing consensus among the scientific community, that the need to compensate the potential yield losses associated with these challenges could be achieved through selection and adaptation of cultivars with improved genetic potential [1]. Understanding how plant copes with the environmental challenges has a vital significance for improvement of crop tolerance and yield. Plant cuticle, a continuous protective sheet that covers aerial surfaces of plant organs has evolved as an exterior extension of epidermal cell walls. The biochemical composition of cuticle is not only species/cultivar specific, but differs also between organs of the same species and is modulated by environmental conditions, defining the plant tolerance level to drought and excessive UV radiation. While there is a range of scientific indications about a connection of plant cuticle with plant stress tolerance, these data, obtained mostly on model plant *Arabidopsis* [2]. As a consequence, little is known about the biochemical details of cuticle composition and regulation in wheat and its relation to drought. The new knowledge on the biodiversity in cuticle composition of wheat varieties, the cuticle composition changes during the drought stress and particularly, the differences between tolerant and intolerant varieties, would be a great support for the wheat breeding programmes.

Materials and methods

Plant material. Wheat plants for all experiments were grown from seeds available at the ACPFG collection in greenhouse under well-watered and drought conditions in large containers. Containers were equipped with an automatic watering system and four soil water tensiometers were installed at 0.1 and 0.3 m soil depths, and connected to a data logger for continuous monitoring of soil water tension. **Cuticular wax metabolomics.** For wax component analysis, 6.5 cm long flag leave blades from the base at 24 days after anthesis were used. Leaf samples were weighted before placing into liquid nitrogen, after which samples were stored at –80 freezer until wax extraction with chloroform or hexane. Following extraction, waxes were dried using stream of nitrogen and redissolved in a small amount of n-hexane prior to analysis using gas chromatography-mass spectrometry. Mass spectra of eluted waxes were identified using commercial mass spectra library NIST08 (http:/www.nist.gov) and the in-house Metabolomics Australia (Schholl of Botany, Melbourne) mass spectral library. **Scanning electron microscopy (SEM).** Flag leaf blades collected at 10 days after anthesis were examined using Philips XL30 Field Emission Scanning Electron Microscope, equipped with a Gatan CT1500 HF Cryotransfer Stage (Adelaide Microscopy). Samples attached to the holder were frozen in nitrogen slush, and transferred under vacuum to the preparation chamber where it was coated with platinum under low temperature of –110 °C. It was then loaded onto the microscope chamber (held at a temperature lower than –150 °C) and examined. **Gene expression analysis.** Wheat genes coding for 10 cuticle biosynthesis related transcription factors were amplified by PCR from cDNA of wheat cv RAC875 using homology cloning based on previously characterized genes in Arabidopsis, Medicago and maize. Following cloning and sequencing the confirmed wheat gene sequences were used to design specific primers for gene expression analysis by quantitative RT-PCR using a series of cDNA from different tissues of T. aestivum cv. Chinese Spring available at the ACPFG qPCR facility.

© BI H., KOVALCHUK N. V., DIAS D., ROESSNER U., LANGRIDGE P., LOPATO S., BORISJUK N. V.

Results and discussion

Due to recent technological advances in plant genomics and metabolomics, cuticle emerged as a crucial barrier that control water lose and help plant to survive under drought and high UV radiation conditions [3]. Accumulation of epicuticular wax on plant surfaces often results in a bluish-white coloration termed glaucousness (fig. 1 A), which is the visible form of densely distributed epicuticular wax crystals. Glaucousness increases light reflectance and reduces leaf temperatures and transpiration, thereby enhancing leaf survival under water stress and improving water use efficiency [4]. As a classical genetic marker and agricultural trait, glaucousness has been intensively studied in association with drought/heat tolerance and yield in Australian wheat varieties [5, 6]. However, the precise value of this trait in biomass production and grain yield remains somewhat uncertain because of the complex biochemical/genetic nature of the phenotype. Based on solubility in organic solvents, the cuticle components can be divided into insoluble cutin and soluble cuticle waxes. Intracuticular wax is embedded in the underlying cutin framework and epicuticular wax is overlaid on the cutin matrix and intracuticular wax.

The waxes are typically a complex mixture of derivatives of very-long-chain (24–34 carbons) saturated fatty acids, such as alkanes, aldehydes, ketones, primary alcohols, and secondary alcohols [2]. Fig. 1 B schematically summarizes the gene networks and biochemical pathways responsible for biosynthesis of major cuticle wax species which have been deciphered through characterization of plant mutants, mostly in Arabidopsis, barley and maize.

In order to get insights into the nature of cuticle components variations in spring wheats in relation to drought tolerance, we initiated a project on targeted/quantitative analysis of cuticle lipophilic waxes and the genes related to wax biosynthesis. Primarily, five elite Australian wheat varieties: Kukri, Excalibur, RAC875, Gladius and Drysdale, which are under intensive genetic [5, 6] investigation related to drought tolerance at the ACPFG, have been included in the project. Earlier comparative metabolite of Kurki (nonglaucous, drought intolerant, high quality grain) vs Gladius, Excalibur and RAC875 (all are glaucose, drought tolerant cultivars) revealed significant differences in their stress reactions. Other wheat cultivars which have been included in the analysis are commercial varieties cultivated in different regions of Australia: Alsen, Baxter, Berkut, Chara, Pastor, Volkani, Westonia and Wialkat [8]. Altogether, twelve Australian wheat cultivars with different levels of tolerance to drought and heat were compared for cuticle structure properties (Light and Electron Microscopy) and wax composition (GC–MS). Metabolomics analyses of chloroform and hexane extracted waxes using GC–MS demonstrated significant quantitative differences between drought-sensitive and drought-tolerant cultivars in

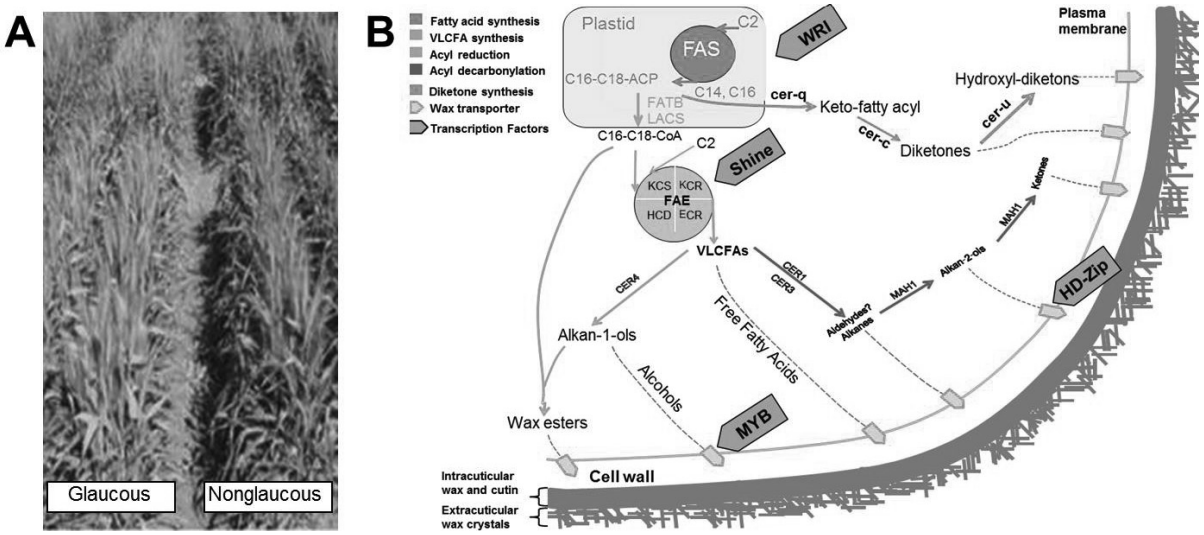


Fig. 1. Glaucous (waxy) and non-glaucous (waxless) wheat varieties (**A**), and schematic overview of pathways involved in cuticle wax biosynthesis (**B**). CER1–4: cuticular wax mutations; FAS: Fatty Acid Synthase complex; FAE — Fatty Acid Elongation complex; WRI, Shine, MYB, HD-Zip — Transcription Factors involved in biosynthesis pathways (reviewed in Borisjuk et al., 2014) [7]

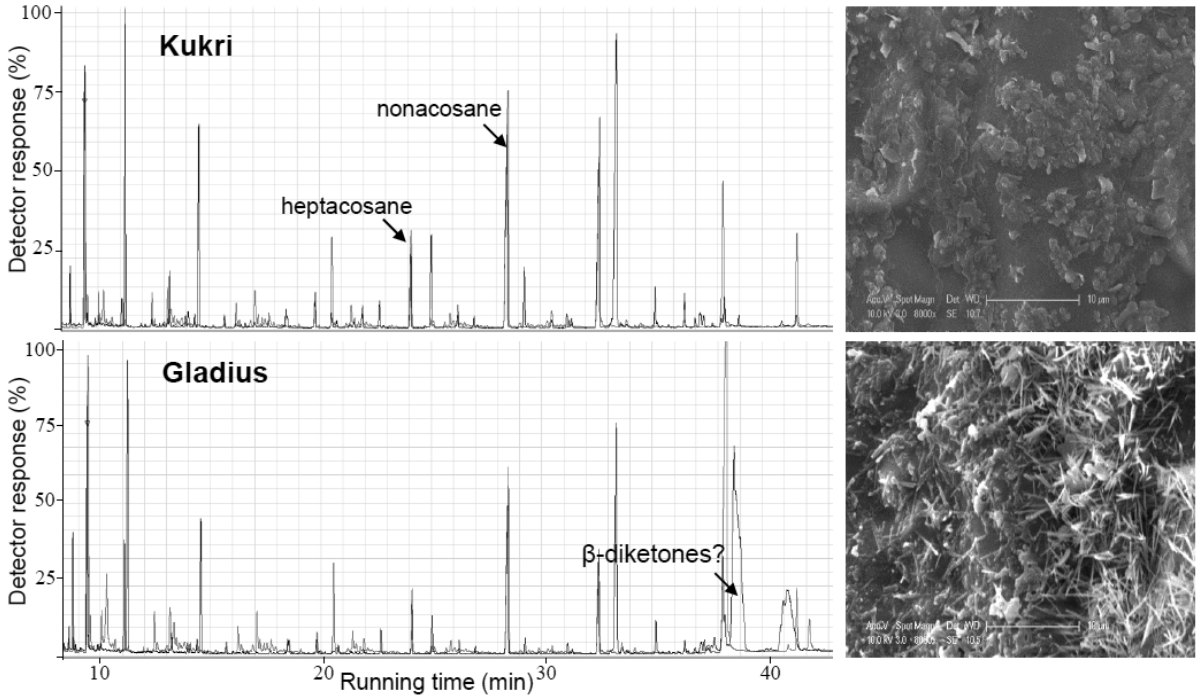


Fig. 2. GC–MS chromatograms of wax components and SEM image of flag leaf surface crystals in wheat cultivars Kukri (waxless, not tolerant; top) and Gladius (glaucous, drought tolerant; bottom)

several types of wax components. Table 1 represents the cumulative relative amounts (chloroform plus hexane extraction) of wax component in the analysed cultivars compared to cv. Kukri. While the majority of wax components, many of them still not properly identified, are relatively even represented in all analysed cultivars within two-folds range of variation, the unidentified components 7–9 show much higher representation in most cultivars (up to 186.9 fold difference for unknown 8 in cv Gladius) compared to Kukri. The chromatogram in fig. 2, where the peaks between 36 and 43 min represent unknown components 7–9 in the table 1, further details the cuticular wax components difference between Kukri and Gladius. While we were not able to precisely identify the 36–43 min components, there are good reasons to assume that those components belong to beta-diketones, which has been recently identified as key cuticle compounds contributing to wheat drought tolerance [9]. The revealed variation in wax component biochemistry is also translated in the drastic difference of the morphology of leaf surface wax crystal as revealed by SEM (fig. 2, right block).

The SEM has been useed to assess cuticular waxes in cv Gladius grown in greenhouse under well watered and drought conditions. As evident from fig. 3, the load of wax crystals on wheat leaves grown under drought is higher compared to well watered plants. The wax crystals under drought also are bigger and are differently shaped. The detailed comparative metabolomics analysis of waxes extracted from well-watered and drought treated plants is in progress.

Twelve Australian wheat cultivars with different levels of tolerance to drought and heat were compared for cuticle structure properties (SEM) and wax composition (GC–MS). Metabolomics analyses of chloroform and hexane extracted waxes using GC–MS demonstrated significant quantitative differences between drought-sensitive and drought-tolerant cultivars in several types of wax components. Acquired data are currently being used for identification of enzymes and upstream regulatory genes responsible for the biosynthesis of cuticular components.

Conclusions

Abiotic stresses such as drought, heat and high UV-irradiation adversely influence crop growth and productivity. While the nonglaucous phenotypes dominate among wild wheat ancestors, glaucousness positively correlates with yield in cultivated wheat varieties, especially under drought conditions. The trait depends on cuticle wax composition. Using GC–MS analysis we have identified wheat cuticle

Table

Comparison of wax components in 12 selected Australian cultivars

Cultivar/ Compound	Kukri	Gladius	RAC 875	Excalibur	Alsen	Baxter	Chara	Pastor	Volcani	Westonia	Wildkat	Drysdale
IS Nonadecane	1	0.9	1.0	1.0	1.2	1.1	1.1	1.1	1.0	1.0	1.5	1.0
Alkane-1	1	1.2	1.2	0.8	1.0	1.7	0.8	0.9	1.7	0.9	1.4	1.4
Alkane-2	1	1.2	1.2	0.8	1.0	1.7	0.8	0.8	1.7	0.9	1.4	1.4
Octanoic Ac*	1	1.5	1.6	1.1	2.2	4.4	0.2	1.2	5.3	3.4	3.7	1.3
Dodecanoic Ac	1	0.6	0.7	0.9	0.4	0.9	0.7	0.4	1.1	0.7	0.7	1.4
Alkane-3	1	1.2	1.2	0.8	1.0	1.7	0.9	0.9	1.5	0.8	1.3	1.5
Aconitic Ac	1	1.2	1.0	0.8	4.3	5.4	1.0	1.8	5.4	7.7	3.5	2.8
Azelaic Ac	1	1.4	1.6	1.2	1.0	2.2	0.3	0.9	2.8	1.7	1.8	1.0
Alkane-5	1	1.2	1.2	0.8	1.2	1.6	1.3	1.1	1.4	1.2	1.6	1.5
Alkane-6	1	1.0	1.2	1.0	0.8	1.0	0.1	0.7	1.3	0.8	0.9	1.6
Unknown-1	1	1.2	0.7	0.3	1.1	1.4	0.6	1.1	1.3	3.3	1.2	1.0
Linoleic acid	1	1.9	0.6	0.3	5.1	7.9	0.2	2.9	5.6	12.1	5.8	2.8
Unknown-2	1	0.9	0.9	0.6	3.2	1.0	0.5	2.2	1.0	2.8	1.2	0.9
Octadecanoic Ac	1	1.0	1.2	1.0	0.7	1.1	0.8	0.6	1.1	0.9	1.1	1.1
Alkane-7	1	0.9	1.0	0.7	1.3	1.5	1.6	1.0	1.4	1.3	1.4	1.1
Unknown-3	1	1.0	1.1	1.2	1.3	1.2	0.6	1.2	1.2	1.0	1.1	1.1
Alkane8	1	0.9	1.2	1.3	1.8	2.6	1.7	1.4	1.7	1.3	1.6	1.5
Docosanoic Ac	1	1.1	1.8	0.9	1.4	1.5	0.7	1.4	1.5	1.4	1.6	1.5
Heptacosane	1	0.9	1.3	1.1	1.4	1.8	1.8	0.9	1.8	1.8	1.7	1.6
Tetracosan-1-ol	1	0.8	0.7	0.2	0.7	1.4	0.5	0.5	1.5	1.1	1.5	0.5
Octacosane	1	1.0	1.2	1.0	1.6	2.6	3.8	1.2	2.4	3.0	1.8	1.6
Hexacosanol	1	0.4	1.2	1.1	1.3	3.3	0.8	2.0	1.1	0.7	1.8	1.0
Hexacosanoic Ac	1	1.3	1.4	1.3	1.5	1.3	0.3	0.9	1.0	0.7	1.4	1.0
Unknown-4	1	1.0	1.8	1.1	1.4	1.3	0.2	0.9	1.2	1.1	1.6	1.1
Hentriacontane	1	0.5	1.2	0.4	1.6	2.8	3.7	1.6	2.6	1.2	2.3	1.5
Octacosanol	1	1.1	1.3	1.0	1.0	1.0	0.6	0.7	1.0	0.7	1.5	1.0
Octacosanoic Ac	1	1.2	1.4	1.0	0.9	0.8	0.2	0.6	0.7	0.9	1.3	0.9
Unknown-5	1	0.9	1.1	0.6	0.9	1.2	0.2	0.7	0.9	1.0	1.5	0.6
Unknown- 6	1	1.7	0.9	1.4	1.1	1.7	0.1	1.2	1.2	0.6	1.3	1.0
Dotriacontane	1	0.6	1.2	0.5	1.4	3.6	2.7	1.5	1.0	1.1	2.5	1.7
Triacontanol	1	0.8	1.0	1.0	0.7	0.9	0.3	0.5	0.8	0.5	1.0	0.7
Unknown- 7	1	33.9	8.8	1.4	2.2	0.8	6.1	33.4	0.2	1.5	1.4	12.1
Unknown-8	1	186.9	26.2	2.7	3.7	0.7	39.1	146	0.0	1.4	0.7	49.2
Unknown-9	1	176.8	28.5	2.5	1.4	0.6	44.2	40.1	0.0	1.1	0.1	13.6
Tricontanoic Ac	1	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6	0.2	0.7	0.8	0.9	1.1	0.8

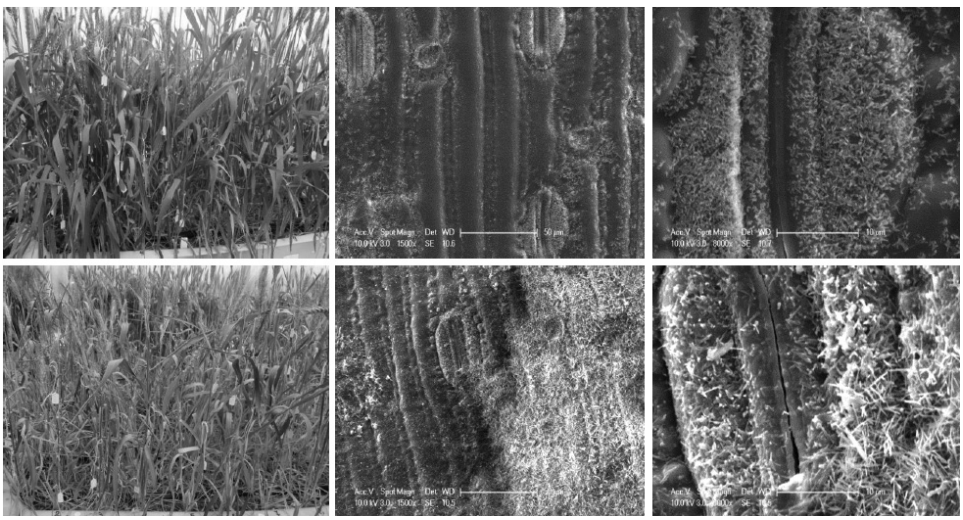


Fig. 3. Cryo-scanning electron micrographs of the abaxial side of the wheat flag leaf (cv. Gladius) grown under well watered (top) and drought conditions (bottom)

wax components that are present in drought resistant wheat cultivars and absent in the sensitive cultivar. Most likely these components represent beta-diketones which have been previously suggested to affect drought tolerance in wheat. The variation in wax components composition define shape of wax crystals on leaf surface as revealed by scanning electron microscopy. A detailed biochemical and molecular biology study of wheat cuticular wax regulation in relation to drought tolerance is in progress.

The reported study has been partially supported by an ACPFG — DuPont/Pioneer collaborative grant. The China Scholarship Council is acknowledged for providing a fellowship to PhD student Huihui Bi. The authors thank Yuan Li for conducting RT-qPCR analysis and Gwen Mayo for advises and help with SEM analyses.

LITERATURE

1. Reynolds M., Foulkes J., Furbank R., Griffiths S., King J., Murchie E., Parry M., Slafer G. Achieving yield gains in wheat // Plant Cell Envir.— 2012.— 35.— P. 1799–1823.
2. Yeats T. H., Rose J. K.C. The formation and function of plant cuticles // Plant Physiol.— 2013.— 163.— P. 5–20.
3. Javelle M., Vernoud V., Rogowsky P. M., Ingram G. C. Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue // New Phytol.— 2011.— 189.— P. 17–39.
4. Richards R. A., Rawson H. M., Johnson D. A. Glaucousness in wheat: its development and effect on water-use efficiency gas exchange and photosynthetic tissue temperatures // Aust. J. Plant Physiol.— 1986.— 13.— P. 465–473.
5. Bennett D., Izanloo A., Reynolds M., Kuchel H., Langridge P., Schnurbusch T. Genetic dissection of grain yield and physical grain quality in bread wheat under water-limited environments // Theor. Appl. Genet.— 2012.— 25.— P. 255–271.
6. Izanloo A., Condon A. G., Langridge P., Tester M., Schnurbusch T. Different mechanisms of adaptation to cyclic water stress in two South Australian bread wheat cultivars // J. Exp. Bot.— 2008.— 59.— P. 3327–3346.
7. Borisjuk N., Hrmova M., Lopato S. Transcriptional regulation of cuticle biosynthesis // Biotechnol. Advances.— 2014.— 32.— P. 526–540.
8. Wheeler R. Wheat Variety Sowing Guide.— 2013. http://www.nvtonline.com.au/wp-content/ uploads/2013/03/ Crop-Guide-SA-Wheat-Variety-Sowing-Guide-2012.pdf.
9. Adamski N. M., Bush M. S., Simmonds J., Turner A. S., Mugford S. G., Jones A., Findlay K., Pedentchouk N., von Wettstein-Knowles P., Uauy C. The inhibitor of wax 1 locus (Iw1) prevents formation of β- and OH-β-diketones in wheat cuticular waxes and maps to a sub-cM interval on chromosome arm 2BS // Plant J.— 2013.— 74, N 6.— P. 989–1002.

BI H.[1], KOVALCHUK N.V.[1], DIAS D.[2], ROESSNER U.[2], LANGRIDGE P.[1], LOPATO S.[1], BORISJUK N.V.[1]

[1] Australian Centre for Plant Functional Genomics, University of Adelaide,
Australia, Adelaide, Hartley Grove, Urrbrae SA 5064, e-mail: mykola.borysyuk@acpfg.com.au

[2] School of Botany, University of Melbourne,
Australia, Melbourne, e-mail: u.roessner@unimelb.edu.au

NATURAL VARIATION OF WHEAT CUTICLE WAXES IN RELATION TO STRESS TOLERANSE

Aims. The aim of our research is to investigate the role of wheat leaf cuticle in drought and heat protection by characterizing natural variability of cuticle components and revealing genetic and biochemical background of this variability in Australian wheat varieties. ***Methods.*** Cultivars with different levels of drought tolerance were analyzed for cuticle wax composition by gas chromatography (GC–MS) and for cuticle structure properties by scanning electron microscopy (SEM). ***Results.*** Metabolomics analyses demonstrated significant quantitative differences between drought-sensitive and drought-tolerant cultivars in several types of wax components. These data are complemented by differences in cuticle structure revealed by SEM. Ten wheat genes potentially involved in regulation of cuticle biosynthesis have been cloned and analysed for expression profiles in wheat by RT-qPCT. ***Conclusions.*** Acquired data are currently being used for identification of enzymes and genes responsible for drought-related cuticular components.

Keywords: wheat, drought tolerance, cuticle waxes, gene expression.

UDC 579.264

DABROWSKA I. V.[1], TKACHENKO K. S.[2], PODGORSKY V. S.[2], FOMINA M. O.[2]

[1] Educational and Scientific Centre «Institute of Biology» of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine, 0160, Kyiv, Volodymyrska str., 64/13, e-mail: dabrowska_irena@yahoo.com

[2] D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Academika Zabolotnoho str., 154, e-mail: M.Fomina@ukr.net

ANTI-*STAPHYLOCOCCI* ACTIVITY OF YEAST ISOLATES AFFECTED BY pH OF EXPERIMENTAL MEDIUM

Diverse biological activities of yeasts make them promising candidates for a wide range of applications not limited to the food industry. Traditionally yeasts are involved in the wine, bread, beer, fermented foods manufacturing having a long history of use as a source of protein, organic acids, vitamins and minerals. Yeasts are receiving also increasing interest for the development of biotechnological production of aromatic alcohols, enzyme, xanthines, aromatic amino acids, cholesterol-lowering statins, hypocholesterolemic components, natural pigments and others bioactive compounds [1–5].

In addition to these properties yeasts are known for their antagonistic activities toward undesirable bacteria and fungi. The use of antagonistic bacteria to inhibit pathogenic bacteria has been studied extensively over the years, while little attention has been given to yeasts in a similar role. The study and potential applications of antibacterial compounds produced by yeasts are still at early stage of development. The first positive indications of the activity of yeasts against Gram-positive and Gram-negative bacteria were discovered by Hayduck and Fernbach in 1909. Since then there have been reported antibacterial activity of *Debaryomyces hansenii* against *Clostridium tyrobutyricum* and *Clostridium butyricum*, inhibition of the growth of the beer spoilage bacteria *Bacillus megaterium* and *Lactobacillus plantarum* by *Kloeckera apiculata* and *Kluyveromyces thermotolerans*, inhibition of *Listeria* by a strain of *Geotrichum candidum, Debaryomyces hansenii, Candida intermedia*, *Kluyveromyces marxianus, Pichia norvegensis* [6, 7].

Many yeasts also demonstrated antifungal activity towards other yeast cultures described as the killer phenomenon [8]. However it was no clear evidence that the killer toxins formation directly correlated with antibacterial activity in yeasts [9].

Antagonism of microorganisms by yeasts has been attributed broadly to 1) competition for nutrients; 2) pH changes; 3) production of high concentrations of ethanol; 4) killer toxins or mycocins; 5) mycocin causes ion leakage by the formation of channels on the cytoplasmic membrane; 6) mycocin inhibits the synthesis of cell wall component β-1,3-glucan; 7) mycocin interrupts cell division by blocking the DNA synthesis; 8) proteases degrade bacterial toxins; 9) stimulate the immune response; 10) yeasts inhibit attachment to intestinal cells [7].

The discovery of antagonistic activities of yeasts may have a significant impact in numerous fields such as food, agriculture, medicine, veterinary, environmental protection. Yeasts have been proposed as a new generation of biocontrol agents and basis for new kind of probiotics. Yeasts cultures with pronounced antibacterial properties may serve as an attractive alternative to becoming increasingly controversial antibiotic-based therapy of bacterial infections. It is well known that *Staphylococci* are leading group causing infectious diseases being ubiquitous agents of nosocomial infections. They are evolving resistance to antibiotics or biocides resulting, for example, in the phenomenon of methicillin-resistance. Currently methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) is one of the most greatly feared bacterial strains which resistance is commonly caused by the widespread use of antibiotics in the husbandry of livestock, including prevention or treatment of an infection as well as promoting growth.

The aim of this work was to study the antagonistic activity of yeasts against various isolates of potentially pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* in relation to the acidity of the experimental medium for yeasts growth.

Materials and methods

Yeasts were isolated from the samples of authentic homemade dairy products and from the gastro-intestinal tract (GIT) of healthy Hucul long-livers from Ukrainian Carpathians by using wort agar (1.3% maltose, 1.5% malt extract; 3.0% dextrin, 1.0% K_2HPO_4; 1.0% NH_4Cl; 1.8% agar, pH 7). The bacterial cultures used in this study included standard reference strain *Staphylococcus*

© DABROWSKA I. V., TKACHENKO K. S., PODGORSKY V. S., FOMINA M. O.

aureus ATCC 25923 from Ukrainian Collection of the Microorganisms and three clinical isolates of *S. aureus*. The organisms were maintained by routine culture on agar slants and stored at 4 °C between transfers. At least two additional subcultures of microorganisms (24 h, 28 °C for yeast and 37 °C for bacteria) were made in fresh medium prior to their use in the experiment.

The pure cultures of yeasts were tested for antagonistic activity towards *S. aureus* strains *in vitro* by using an agar plug method [10]. The agar plugs inoculated on agar plates were initially prepared by plating 1 ml (6 x 10^8 cells mL^{-1}) of yeasts cell suspension on wort agar (20 ml) at different pH values (5.0; 5.5; 6.0; 6.5; 7.0). The plates were incubated at 28ºC for 72 h. Adjustment of the pH was performed using sterile citrate-phosphate buffer before pouring the plates. Agar plugs were prepared by growing the yeasts on wort agar for three days. A sterile 8-mm-diameter cork borer was used to obtain the agar plugs from these culture plates.

The cell suspensions of 24 h bacterial cultures (1 mL, 1.5×10^8 cells mL-1) were pour-plated on meat peptone agar (MPA) (20 ml). Plugs of yeast cultures were placed onto MPA containing a lawn of bacterial strains. After an incubation period of 24 h at 37 °C, the diameter of clear zones surrounding the plugs was measured. The experiment was carried out in triplicates.

Results and discussion

The yeasts screening for their antagonism towards *S. aureus* was performed using fifty-two strains of yeast isolates (table 1).

Of the total yeasts tested, eight cultures were positive for the antagonistic activity comprising 15.4%. Six out eight yeast isolates showed growth inhibition of more than two sensitive *S. aureus* bacterial strains (table 2). The antagonism yeasts towards *S. aureus* was affected by pH of experimental medium for yeasts cultivation showing generally the best performance of this activity at pH values ranging between 6.0 and 7.0.

It is worth mentioning that *Staphylococci* together with *Escherichia coli* were the first microorganisms against which the phenomenon of yeasts antagonism towards bacteria was discovered [7]. Generally the best anti-*Staphylococci* performance in terms of the high values of growth inhibition zone for all tested bacteria at the wide range of tested pH values of experimental medium was observed for *Saccharomyces pastorianus* strains FF7 and FF18 isolated from dairy products. These yeast isolates manifested the highest values of antagonistic activity with diameter of growth inhibition zone reaching 25–28 mm at comparatively low pH values range 5.0–6.0. This may be related to their origin being dairy products and associations with lactic acid bacteria. Microbial evolution of yeasts and lactic acid bacteria populations in dairy products involved the various mechanisms giving microorganisms a competitive advantage. It is well known that synthesis of alcohols is a compensatory mechanism to resist the high acidity stress. In *S. cerevisiae*, for example, citric acid shifted the primary metabolism towards higher glycerol production [11]. In addition to synthesis of alcohols, yeasts produce other metabolites that broadly inhibit cell growth. The yeast adaptations to the conditions of low pH can be used for the selection of probiotic strains for complex probiotics. The behaviour of yeasts in experimental treatments might be similar to those found in commercial products.

The rest of the tested yeast isolates did not manifest any inhibition of *Staphylococci* growth at pH 5.0–5.5. Apart of *Rhodotorula spp.* S1 inhibiting all tested *Staphylococci* reaching the growth inhibition values of 20–25 mm at pH 6.0, all other cultures showed considerably weaker antagonistic activity towards bacteria. The lowest performance was observed for *Candida magnoliae* S13 which was able to inhibit only growth of standard reference *S. aureus* strain reaching only 12 mm of inhibition zone at pH 6.5–7.0 but did not affect any of clinical isolates of *S. aureus*.

Table 1

Yeast isolates and their origin

Yeast strain code	Source and year
F2, F15, F21, F23, F25, F26, F27, F28, F29, F31, F35, F36	Dairy products, 2013
FF1, FF2, FF4, FF5, FF6, FF7, FF8, FF9, FF10, FF11, FF12, FF13, FF14, FF15, FF16, FF18	Dairy products, 2014
S1, S2, 3S, S4, S5, S7, S10, S11, S12, S13, S14, S15, S16, S17, S19, S21, S22, S23, S24, S25, S28, S30, S31, S32	Long-livers GIT, 2013

Table 2

Antagonistic activity of the yeast isolates against *S. aureus* depending on pH values of the experimental medium

Yeast isolate	pH	Diameter of growth inhibition zone (mm)			
		S. aureus ATCC 25923	*S. aureus* 19	*S. aureus* 33	*S. aureus* 38
S1 *Rhodotorula spp.*	5.0	0	0	0	0
	5.5	0	0	0	0
	6.0	24.3 ± 0.5*	22.1 ± 1.7	20.5 ± 2.5	25.1 ± 0.3
	6.5	19.4 ± 0.2	19.1 ± 1.1	17.6 ± 0.3	19.1 ± 0.1
	7.0	16.7 ± 1.6	14.1 ± 0.9	11.2 ± 0.2	14.4 ± 0.7
S2 *Debaryomyces hansenii*	5.0	0	0	0	0
	5.5	0	0	0	0
	6.0	20.5 ± 0.5	0	19.4 ± 0.2	17.1 ± 1.1
	6.5	18.2 ± 0.4	0	15.3 ± 0.7	15.2 ± 1.2
	7.0	13.6 ± 1.3	0	13.3 ± 0.8	12.3 ± 0.9
S3 *Debaryomyces hansenii*	5.0	0	0	0	0
	5.5	0	0	0	0
	6.0	15.5 ± 0.5	13.1 ± 0.1	12.2 ± 1.4	19.5 ± 0.5
	6.5	13.2 ± 0.4	11.3 ± 0.6	11.3 ± 0.3	17.2 ± 0.6
	7.0	12.2 ± 1.2	10.3 ± 0.5	10.8 ± 1.4	15.5 ± 0.5
S5 *Debaryomyces hansenii*	5.0	0	0	0	0
	5.5	0	0	0	0
	6.0	17.2 ± 0.6	0	0	19.2 ± 0.2
	6.5	17.2 ± 0.4	0	0	18.5 ± 0.5
	7.0	15.8 ± 0.4	0	0	18.2 ± 1.2
S11 *Candida spp.*	5.0	0	0	0	0
	5.5	0	0	0	0
	6.0	15.2 ± 0.4	14.2 ± 0.1	14.3 ± 0.6	20.2 ± 0.4
	6.5	14.3 ± 0.8	12.2 ± 0.6	13.2 ± 1.4	15.7 ± 0.4
	7.0	10.1 ± 0.4	11.2 ± 0.2	11.2 ± 0.8	12.2 ± 0.2
S13 *Candida magnoliae*	5.0	0	0	0	0
	5.5	0	0	0	0
	6.0	0	0	0	0
	6.5	12.6 ± 0.4	0	0	0
	7.0	12.2 ± 0.2	0	0	0
FF7 *Saccharomyces pastorianus*	5.0	13.1 ± 0.3	14.2 ± 0.1	10.2 ± 0.2	25.3 ± 0.8
	5.5	24.2 ± 0.4	19.2 ± 0.6	15.2 ± 0.2	25.2 ± 0.1
	6.0	20.2 ± 0.8	19.1 ± 0.4	15.6 ± 0.4	23.5 ± 0.5
	6.5	19.1 ± 0.1	15.2 ± 0.2	15.2 ± 0.4	20.6 ± 1.8
	7.0	16.4 ± 0.4	14.7 ± 0.1	15.1 ± 0.1	20.3 ± 0.3
FF18 *Saccharomyces pastorianus*	5.0	0	0	0	0
	5.5	28.5 ± 0.5	25.2 ± 1.2	23.2 ± 0.4	28.1 ± 0.1
	6.0	28.2 ± 1.1	25.5 ± 0.5	20.4 ± 0.2	26.1 ± 0.2
	6.5	21.3 ± 0.7	19.2 ± 0.6	20.2 ± 0.6	20.5 ± 0.5
	7.0	18.2 ± 0.4	19.1 ± 1.3	17.7 ± 0.1	19.2 ± 0.8

Note: * ± SEM.

Conclusions

In conclusion the anti-*Staphylococci* activity of yeast isolates was species- and strain-depended and affected by pH values of experimental medium for yeast cultivation.

The sources of yeasts isolation in the present study were authentic and safe for the development of the perspective biocontrol agents against *Staphylococci*. The further research on the yeasts dwelling in previously unstudied unique environments is essential not only for potential application of their antagosnism properties towards harmful bacteria and other useful biological properties but also for elucidation of their biodiversity and ecological roles.

LITERATURE

1. Mapari S. A., Thrane U., Meyer A. S. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? // Trends Biotechnol.— 2010.— 28, N 6.— P. 300–307.
2. Liu H., Xie Y. H., Xiong L. X., Dong R. T., Pan C. L., Teng G. X., Zhang H. X. Effect and mechanism of cholesterol-lowering by *Kluyveromyces* from tibetan kefir // Advanced Materials Research.— 2011.— 343–344.— P. 1290–1298.
3. Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. The Yeasts: A Taxonomic Study. 5th edn.— Elsevier Science B. V., 2011.— 1053 p.
4. Liu P., Cheng Y., Yang M., Lui Y., Chen K., Long C. Mechanisms of action for 2-phenylethanol isolated from *Kloeckera apiculata* in control of *Penicillium* molds of citrus fruits // BMC Microbiol.— 2014.— 14, N 1.— P. 242–256.
5. Mattanovich D., Sauer M., Gasser B. Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks // Microb Cell Fact.— 2014.— 13.— P. 34–39.
6. Goerges S., Koslowsky M., Velagic S., Borst N., Bockelmann W., Heller K. J., Scherer S. Anti-listerial potential of food-borne yeasts in red smear cheese // Int. Dairy J.— 2011.— 21.— P. 83–89.
7. Hatoum R., Labrie S., Fliss I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications // Front Microbiol.— 2012.— 3.— P. 421–433.
8. Polonelli L., Morace G. Reevaluation of the yeast killer phenomenon // J Clin Microbiol.— 1986.— 24, N 5.— P. 866–869.
9. Nagornaya S. S., Zharova V. P., Kotlyar A. N. Yeast-antagonists in the normal microflora of the intestine tract in long-livers of Abkhazia // Mikrob Zhurnal.— 1989.— 51, N 5.— P. 34–39.
10. Visser R., Holzapfel W. H., Bezuidenhout J. J., Kotzé J. M. Antagonism of lactic acid bacteria against phytopathogenic bacteria // Appl Environ Microbiol.— 1986.— 52, N 3.— P. 552–555.
11. Nielsen M. K., Arneborg N. The effect of citric acid and pH on growth and metabolism of anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* cultures // Food Microbiol.— 2007.— 24, N 1.— P. 101–105.

DABROWSKA I. V.[1], TKACHENKO K. S.[2], PODGORSKY V. S.[2], FOMINA M. O.[2]

[1] Educational and Scientific Centre «Institute of Biology» of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine, 0160, Kyiv, Volodymyrska str., 64/13, e-mail: dabrowska_irena@yahoo.com

[2] D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Academika Zabolotnoho str., 154, e-mail: M. Fomina@ukr.net

ANTI-*STAPHYLOCOCCI* ACTIVITY OF YEAST ISOLATES AFFECTED BY pH OF EXPERIMENTAL MEDIUM

The ***aim*** of this work was to study the antagonistic activity of yeasts isolates towards various strains of potentially pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus*. ***Methods.*** Over 50 yeasts isolates from authentic dairy products and gastro-intestinal tract (GIT) of Hucul long-livers from Ukrainian Carpathians were tested for antagonistic activity towards *S. aureus* strains by using a conventional agar plug method at pH values of wort agar ranging from 5.0 to 7.0. ***Results.*** The anti-*Staphylococci* activity was found in 15.4% of tested yeast isolates. In general, the best antagonistic activity towards *S. aureus* was observed for *Saccharomyces pastorianus* isolated from dairy products followed by GIT isolates *Rhodotorula spp.* S1 > *Debaryomyces hansenii* isolates > *Candida spp.* S11 > *Candida magnoliae* S13. The majority of yeasts isolates inhibited tested *S. aureus* strains at pH 6.0–7.0. ***Conlusions.*** Anti-*Staphylococci* performance of yeast isolates was affected by pH values of experimental medium and depended on yeast species and strains.

Keywords: yeasts, *Staphylococcus aureus*, antagonism, pH.

УДК 575.224.4./6:578.083.5

БОДНАР І. В.[1], ЗУБКО О. С.[2], БОДНАР Л. С.[1]
[1] Львівський національний університет імені Івана Франка,
Україна, 79005, м. Львів, вул. Грушевського, 4, e-mail: bodivas@gmail.com
[2] Інститут екогігієни і токсикології ім. Л.І. Медведя,
Україна, 03680, м. Київ, вул. Героїв оборони, 6

КОРЕКЦІЯ ВІТАМІННИМИ ХІМІОПРЕВЕНТЕРАМИ МУТАГЕННИХ ФОНІВ, СПРИЧИНЕНИХ ДІЄЮ АРОМАТИЗАТОРІВ ПРОДУКТІВ ХАРЧУВАННЯ

Особливу групу харчових добавок становлять ароматизатори — речовини, що підсилюють смак і аромат. Їх умовно можна розділити на природні і речовини, що імітують природні: перші виділяють з фруктів, овочів і рослин у вигляді соків, есенцій або концентратів, другі отримують синтетичними і нетрадиційними шляхами. Хімічна природа останніх може бути дуже різною. Вони переважно складаються з великої кількості компонентів: ефірні олії, альдегіди, спирти, складні ефіри та ін. [1, 2].

Одним з доказових показників мутаційного процесу на клітинному рівні є виявлення хромосомних аберацій, підвищений рівень яких розглядається як хромосомна нестабільність, яка в подальшому може спричиняти розвиток злоякісних новоутворень [3]. З метою дослідження впливу ароматизаторів на геном соматичних клітин ссавців використовували метод метафазного аналізу аберацій хромосом у клітинах кісткового мозку мишей *Mus musculus* L. з допомогою рутинного забарвлення. Метод вивчення хромосом на стадії метафази є найбільш інформативним, оскільки дозволяє дослідити широкий спектр структурних і кількісних пошкоджень хромосом.

Одним з перспективних напрямків сьогодення є виробництво функціональних продуктів харчування, які не лише забезпечують фізіологічні потреби організму в поживних речовинах і енергії, але й мають профілактичне або й лікувальне значення. Вітаміни, зокрема А та С, є незамінними факторами живлення, які забезпечують нормальний розвиток організму, служать необхідним захистом для тварин і людини та можуть бути використані для зняття або зменшення сумарних мутагенних фонів [4, 5]. Саме цей підхід був нами використаний для з'ясування можливих змін щодо мутагенних активностей при одночасному згодовуванні мишам ароматизаторів та вітамінних хіміопревентерів.

Матеріали і методи

Досліджували 5 харчових ароматизаторів фірми «Etol» (Словенія): «Grapes 82085p» (до складу входять: етилацетат, 1-гексен-3-ол, ванілін, мальтодекстрин), «Chocolate 82100p» (диацетил, масляна кислота, дигідрокумарин, гамаокталактон, етилбутират), «Petit Beurre 02974» (ацетоїн, геліотропін, діацетил, масляна кислота), «Rafaelo 82129p» (пропіленгліколь, ванілін, гамаокталактон), «Aromat 22062» (природний ізоаміловий спирт, 1-гексенол, нерол, оксид ліналоолу, етилбутират, мальтол, етанол). Дослідні концентрації зразків вираховували таким чином: рекомендовану технологічну дозу, яка розрахована на 1 кг продукції, зменшували вдвічі, припускаючи, що за день людина може спожити не більше півкілограма готової продукції. Така концентрація нами названа добовою. Досліджували також дозу, збільшену в 10 разів від добової [1].

Дослідження проводили у декількох варіантах: в гострому та хронічному експерименті та при сумісній дії ароматизаторів з речовинами, що мають антимутагенні властивості (вітамінами). Речовини, що досліджували, вводили у вигляді розчину зондом внутрішньошлунково: у гострому експерименті — одноразово (експозиція — 24 години), у хронічному експерименті — протягом 10 діб з інтервалом 24 години.

Статистичну обробку даних виконували з використанням критерію Стьюдента t. Здійснювали кореляційний аналіз залежності мутагенного ефекту ароматизаторів від дози.

© БОДНАР І. В., ЗУБКО О. С., БОДНАР Л. С.

Результати та обговорення

Дію ароматизаторів на індукування хромосомних аберацій аналізували за результатами двох варіантів експерименту — хронічного та гострого. Перший етап — проводили аналіз розчинів харчових ароматизаторів і викликали появу хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку *M. musculus* шляхом проведення хронічного експерименту. Протягом 10 днів мишам згодовували розчини зразків харчових ароматизаторів, що відповідали дозі, збільшеній в 10 разів від добової. Позитивним контролем служив циклофосфан у дозі 4 мг/кг маси тіла, при дії якого середня частота метафаз з аберраціями хромосом становила 13,00 ± 1,50 %, що свідчить про адекватність даної тест-системи (табл. 1).

На наступному етапі досліджень проаналізували рівень хромосомних аберацій, індукованих ароматизаторами в гострому експерименті. Розчини вводили одноразово внутрішньочеревно в концентрації добової дози і/або дози, збільшеної в 10 разів від добової. Результати представлені в табл. 2. При дослідженні харчового ароматизатора «Chocolate 82100p» в концентрації, що відповідає збільшеній у 10 разів добовій дозі (0,4 г/кг), виявлено шість метафазних пластинок з аберраціями хромосом серед 500 проаналізованих метафаз. Середня частота метафаз з аберраціями складала 1,20 ± 0,49 % (табл. 2). За дії харчового ароматизатора «Chocolate 82100p» в концентрації, що відповідає рекомендованій добовій дозі (0,04 г/кг), виявлено три метафазні пластинки з аберраціями хромосом серед проаналізованих метафаз. Середня частота метафаз з аберраціями складала 0,60 ± 0,35 %. У групі тварин, що піддавалися дії циклофосфану, відзначено статистично достовірне ($P \leq 0,001$) перевищення спонтанної частоти аберацій, що доводить адекватність використання даної тест-системи для оцінки мутагенних властивостей хімічних агентів. Середня частота метафаз за дії циклофосфану на мишей групи позитивного контролю з аберраціями хромосом у клітинах кісткового мозку мишей складала 14,00 ± 1,55 %. В групі негативного контролю виявлено одну аберацію на 500 метафаз (0,20 ± 0,19 %) (табл. 2). За дії харчового ароматизатора «Chocolate 82100p» всі аберації, що спостерігалися, були представлені одинарними фрагментами, які утворюються в результаті хроматидних делецій.

Таблиця 1

Частота хромосомних аберацій, індукованих харчовими ароматизаторами у хронічному експерименті на *Mus musculus*

Зразок	Доза, г/кг	Загальна кількість метафаз	Кількість аномальних метафаз	Частота метафаз з аберраціями хромосом (M ± m), %	t	P
«Grapes 82085p»	0,14	500	18	3,60 ± 0,83	2,76	≤0,05
«Petit Beurre 02974»	0,28	500	22	5,40 ± 1,01	3,99	≤0,05
«Rafaelo 82129p»	0,14	500	35	7,00 ± 1,14	4,91	≤0,05
Позитивний контроль	4 мг/кг маси тіла	500	65	13,00 ± 1,50	7,67	≤0,002
Негативний контроль		500	5	1,00 ± 0,44		

Таблиця 2

Частота хромосомних аберацій, індукованих харчовими ароматизаторами в гострому експерименті на *Mus musculus*

Зразок	Досліджувана доза, г/кг	Загальна кількість метафаз	Кількість аномальних метафаз	Частота метафаз з аберраціями хромосом (M ± m), %	t	P
«Chocolate 82100p»	0,4	500	6	1,20 ± 0,49	1,90	≥0,05
	0,04	500	3	0,60 ± 0,35	1,00	≥0,05
«Grapes 82085p»	0,14	500	9	1,80 ± 0,59	2,55	≥0,05
	0,014	500	5	1,00 ± 0,44	1,64	≥0,05
«Rafaelo 82129p»	0,14	500	6	1,20 ± 0,49	1,90	≥0,05
«Aromat 22062»	0,06	500	10	2,00 ± 0,63	2,73	≤0,05
Позитивний контроль	40 мг/кг	500	70	14,00 ± 1,55	8,82	≤0,001
Негативний контроль		500	1	0,20 ± 0,19		

Таким чином, хронічний і гострий варіанти тесту на виявлення індукції хромосомних аберацій у *M. musculus* не виключають одне одного і є взаємодоповнюючими. В нашому експерименті з хронічним впливом вдалося виявити ширший діапазон аномалій, оскільки під час аналізу відзначено не тільки мутації окремих хромосом, але й геномні мутації (полі- та анеуплоїдії). Це може свідчити про порушення функціонування веретена поділу та нерозходження хромосом як результат тривалого впливу мутагенних агентів, серед яких можуть бути і самі складові ароматизаторів, і їх метаболіти. Натомість, у гострому експерименті в основному зафіксовано утворення делеційних фрагментів, та рідше — транслокацій хромосом.

Для зниження або зняття мутагенної дії ароматизаторів використали відомі хіміопревентери з ряду вітамінів, а саме вітамін А (доза 0,1 мг/кг) і вітамін С (100 мг/кг), згодовуючи їх мишам з концентраціями ароматизаторів, що відповідають рекомендованій добовій дозі і дозі, збільшеній у 10 разів. Дози вітамінів підібрані на основі аналізу літературних даних [6]. Вітамін С є найважливішим природним антиоксидантом; його роль пов'язана, насамперед, з перехопленням супероксиданіон-радикалу кисню в водному середовищі клітини. В експериментах на мишах показано, що вітамін С в дозах від 1,56 до 200 і від 86 до 256 мг/кг знижував мутагенний ефект циклофосфаміду й інсектициду диметоату, що реєструвалися методом врахування мікроядер в еритроцитах, а в дозах 10, 20 і 40 мг/кг проявляв антикластогенний вплив щодо дії пестицидів [6]. Сполуки групи вітаміну А розглядаються як важливі елементи антиокислювальної системи організму; вони є пастками активних форм кисню, володіють антиоксидантною активністю, взаємодіють з радикалами органічних молекул, мають активуючий вплив на репарацію ДНК [7–9].

Результатами наших досліджень показано, що використання вітаміну А як хіміопревентера зумовлювало зниження аберантних метафаз за дії ароматизаторів «Grapes 82085p» та «Chocolate 82100p» до рівня контролю (0,20 ± 0,19%), що свідчить про сильні антимутагенні властивості цього вітаміну (рис.). При дослідженні харчового ароматизатора «Виноград» у концентрації, що відповідає збільшеній у 10 разів добовій дозі (0,14 г/кг), в поєднанні з вітаміном С виявлено п'ять метафазних пластинок з аберраціями хромосом на

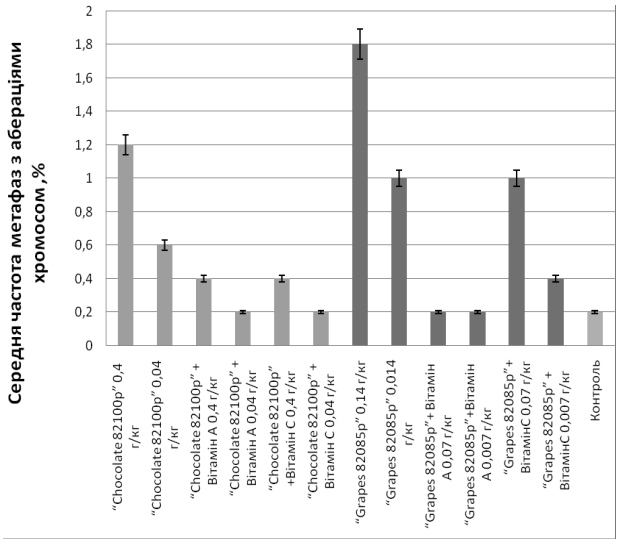


Рис. Частота аберантних метафаз у клітинах кісткового мозку *Mus musculus* при сумісному впливі ароматизаторів та вітамінів

500 метафаз (1,00 ± 0,44%). Рівень хромосомних аберацій, спричинених дією добової дози ароматизатора «Grapes 82085p» в поєднанні з хіміопревентерами, коливався від 1,00 ± 0,44% до 0,40 ± 0,28%, що вдвічі нижче від даних, отриманих при дослідженні ароматизаторів без додавання вітамінів.

Висновки

Особлива небезпека використання органічних складових ароматизаторів як добавок до продуктів харчування полягає в тому, що в їх молекулах часто присутні алкільні радикали та кільцеві структури. Останні в ході метаболічних процесів можуть перетворюватися в аналоги азотистих основ, викликати збільшення кількості помилок за комплементарного злучення нуклеотидів. Такі передмутаційні зміни можуть призвести до виникнення мутацій типу заміни пар основ. Етилацетат, гамаокталактон, ацетоїн, геліотропін, диацетил, що входять до складу досліджуваних ароматизаторів, мають алкільні радикали, здатні зв'язуватися з певними ділянками макромолекул клітини (РНК, ДНК, білками). Ті алкілюючі агенти, які містять дві і більше функціональних груп у молекулі, можуть утворювати поперечні зв'язки з обома ланцюгами ДНК і спричинити їх розрив. Це пов'язано з депуринізацією пошкоджених нуклеотидів сусідніх ділянок двох ниток ДНК, з наступним одночасним виокремленням їх за допомогою ендонуклеаз. Під час «зшивання» двониткових розривів хромосом часто трапля-

ються помилки. Основні види порушень, що виникають при цьому, — делеції, транслокації та інверсії частин хромосом. Зміна кількості окремих хромосом або наборів хромосом у клітині може стати наслідком порушення процесу їх розподілу під час мітозу між двома дочірніми клітинами. В результаті утворюються клітини з більшим чи меншим набором хромосом або анеуплоїди. Серед складових ароматизаторів можуть бути такі, що здатні викликати поліплоїдію, зв'язуючись з мономерами тубуліну, блокуючи його полімеризацію і порушуючи утворення мітотичного веретена.

Забезпечення цілісності та стабільності спадкових структур має багаторівневий, системний та ієрархічний характер, який умовно можна розділити на три рівні: 1) специфічна антимутагенна система клітин — комплекс ферментів з антиоксидантною активністю (супероксидисмутаза, каталаза); кон'югуючі ферменти (глутатіонтрансферазна система); ендогенні антиоксиданти (токофероли, вітамін К, вітаміни А і С, каротиноїди, поліаміни, пуринові рибозиди); 2) репаративні системи, об'єктом яких є премутаційні ушкодження ДНК; 3) захисно-відновні системи, які працюють на рівні організму (гормони, пігменти, плазма крові). Функціонування в організмі ферментних систем, які здійснюють метаболічну активацію багатьох ксенобіотиків, робить неоднозначний внесок у роботу антимутагенного апарату. Кінцевим результатом перетворення кожного конкретного мутагену може бути як його знешкодження, так і утворення нових, більш генотоксичних сполук. Фенотип антиоксидантної системи визначається активністю ферментів антиоксидантного захисту та стійкістю тканин до індукції перекисного окиснення ліпідів. Характерною особливістю антимутагенної системи організму є те, що кількість багатьох метаболізуючих ферментів підвищується відповідно до збільшення рівня чужорідних сполук, що надходять ззовні. Разом з тим, за дії генотоксичних метаболітів ферментативна активність буде знижуватися. Саме тому внесення в організм додаткової кількості речовин, зокрема вітамінів, що є коферментами ензимів антиоксидантної та антимутагенної системи організму, дозволить забезпечити додатковий захист від екзогенних генотоксикантів. У цьому дослідженні отримано підтвердження такого припущення, оскільки одночасне згодовування мишам вітамінів А та С при введенні ароматизаторів продуктів харчування дозволило отримати суттєве зниження мутагенної активності останніх.

ЛІТЕРАТУРА

1. Булдаков А. С. Пищевые добавки. Справочник. — Санкт-Петербург: Ut, 1996. — 240 с.
2. Скурихин И. М., Нечаев А. П. Все о пище с точки зрения химика: Справочное изд. — М.: Высшая школа, 1991. — 288 с.
3. Верголяс М. Р., Луценко Т. В., Гончарук В. В. Цитотоксичний вплив хлорфенолів на клітини кореневої меристеми насіння цибулі батуна (*Allium fistulosum* L.) // Цитология и генетика. — 2013. — 47, № 1. — С. 44–49.
4. Дурнев А. Д. Мутагены и антимутагены в продуктах питания // Генетика. — 1997. — 33. — С. 165–176.
5. Никитина Л. П., Соловьева Н. В. Клиническая витаминология. — Чита: ИИЦ ЧГМА, 2002. — 66 с.
6. Дурнев А. Д., Середенин С. Б. Мутагены (скрининг и фармакологическая профилактика воздействий). — М.: Медицина, 1998. — 328 с.
7. Дворник А. С., Перерва Т. П., Кунах В. А. Антимутагенез як система захисту організму від ушкоджуючих факторів ендогенного та екзогенного походження // Цитологія і генетика. — 2004. — 38, № 5. — С. 62–71.
8. Петрова О. А., Липатов Г. Я., Адриановский В. И., Береснева О. Ю. Результаты оценки антимутагенных свойств различных антиоксидантов // Современные наукоемкие технологии. — 2005. — № 8. — С. 91–92.
9. Стрижельчик Н. Г., Бариляк И. Р. Мутагенные и антимутагенные свойства пищевых добавок. — Харьков: ХНУ имени Каразина, 2009. — 152 с.

BODNAR I.V.[1], ZUBKO O.S.[2], BODNAR L.S.[1]

[1] Ivan Franko National University of Lviv,
Ukraine, 79005, Lviv, Hrushevskogo str., 4, e-mail: bodivas@gmail.com

[2] Medved's Institute of Ecohygiene and Toxicology,
Ukraine, 03680, Kiev, Heroiv Oborony str., 6

CORRECTION OF MUTAGEN LOAD CAUSED BY ACTION OF FOOD FLAVORS USING VITAMIN CHEMIOPREVENTERS

Aims. Food flavors — a natural or artificially-synthesized substances that enhance the flavor and aroma products, which include components with various chemical nature, which theoretically can produce mutagenic effects. Among the methods for detection of mutations on chromosomal level special place is occupied by test systems on animals. In the action of newsynthesized food flavors «Grapes 82085p», «Petit Beurre 02974», «Chocolate 82100p», «Rafaelo 82129p», «Aromat 22062» showed the induction of chromosome aberrations in metaphase bone marrow cells of white mice *Mus musculus* L. ***Methods.*** The study was conducted in several versions of experiments: in acute and chronic experiment and with combined action of flavors and substances with antimutagenic properties (vitamins). ***Results.*** The spectrum of chromosome aberrations was presented as chromosomal aberrations (deletions) and genomic mutations (aneuploidies and polipoyidies). ***Conclusions.*** Simultaneous feeding of mice by flavorings and vitamins A and C showed a reduction in mutagenic activity for doses of flavor that corresponds to the recommended daily — to the level of control, for dose, increased in 10 times of the recommended — in the range of 40–50 %.

Keywords: chromosome aberrations, food flavorings, mutagenic activity, antimutagens.

УДК 618.19-006.6:575(477.85)

ГОРОДЕЦЬКА Є. В.[1], СЕРГА С. В.[1], ЛАГУТА Т. І.[1], ЛЕВКОВИЧ Н. М.[2], АНІКУСЬКО М. Ф.[3], ТИМОВСЬКА Ю. О.[3], ЧЕШУК В. Є.[3], СМОЛАНКА І. І.[4], СКЛЯР С. Ю.[4], ПОЛЕНКОВ С. Е.[5], БОЙЧЕНКО О. І.[6], ДЕМИДОВ С. В.[1], ЖУК О. В.[1], КОЗЕРЕЦЬКА І. А.[1]

[1] Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології», Україна, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64, e-mail: liza.gorodetskaya@gmail.com

[2] Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика МОЗ України, Україна, 04112, м. Київ, вул. Дорогожицька, 9, e-mail: nata.levkovich83@gmail.com

[3] Київський міський онкологічний центр, Україна, 03115, м. Київ, вул. Верховинна, 69, e-mail: timovska79@gmail.com

[4] Національний інститут раку, Відділення пухлин грудної залози та її реконструктивної хірургії, Україна, 03022, м. Київ, вул. Ломоносова, 33/43, e-mail: iislomanka@gmail.com

[5] Чернігівський обласний онкологічний диспансер, Україна, 14029, м. Чернігів, проспект Миру, 211, e-mail: dokpolenkov@rambler.ru

[6] Житомирський обласний онкологічний диспансер, Україна, 10013, м. Житомир, вул. Фещенка-Чопівського, 24/4, e-mail: aleksandr-bojchenko@yandex.ru

ЧАСТОТИ МУТАЦІЇ 5382INSC ГЕНА *BRCA1* У ЖІНОК, ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ, В ТРЬОХ ОБЛАСТЯХ УКРАЇНИ

Рак молочної залози (РМЗ) — онкологічне захворювання, що зустрічається у жінок найбільш часто. Щорічно в світі ця патологія виявляється у 1,4 млн пацієнток. З року в рік частота діагностованих випадків РМЗ неухильно зростає в усіх країнах світу і складає від загальної онкологічної захворюваності в Європі — 25%, США — 30%, Росії — 20,1% [1]. В Україні щорічно виявляється близько 16–17 тис. хворих на РМЗ, а показники захворюваності складають приблизно 66 випадків на 100 тис. населення [2]. Дослідження функції генів *BRCA1* (breast cancer 1) та *BRCA2* (breast cancer 2) дозволило виявити асоціації гермінальних мутацій цих генів зі спадковими формами РМЗ. Частота спадкового РМЗ становить 5–20%, і мутації генів *BRCA1/2* відіграють значну роль у формуванні цієї патології [3, 4]. Ген *BRCA1* (OMIM*113705) локалізований на ділянці хромосоми 17q21.1.–21.2. Більше 70% мутацій гена *BRCA1* належать до мікро- та міні-делецій, що призводять до зсуву рамки зчитування. Спектр мутацій гена *BRCA1* сильно варіює між різними популяціями та етнічними групами, і в кожному регіоні є свої набори мажорних і мінорних мутацій, що можуть стати причиною виникнення захворювання [7–11]. За даними низки досліджень, у населення Східної та Центральної Європи (Польща, Литва, Німеччина, Угорщина, Росія та Україна) найчастіше зустрічаються три мажорні мутації: дві в гені *BRCA1* (5382insC і 185delAG) та одна в гені *BRCA2* (6174delT) [1, 5]. Роботи, що опубліковані за результатами молекулярно-генетичних досліджень, проведених в різних регіонах України, дозволили визначити частоту мутацій в гені *BRCA1* у жінок з РМЗ [12–15]. Проведені раніше дослідження поширеності зазначених мутацій в цих країнах демонструють «ефект засновника» мутації 5382insC в гені *BRCA1* (частота 70–90% за даними різних авторів).

Метою цього дослідження був порівняльний аналіз частоти мутації 5382insC гена *BRCA1* у жінок, хворих на РМЗ, що проживають у різних областях України.

Матеріали і методи

До дослідження було залучено 155 жінок, хворих на РМЗ. Діагноз РМЗ встановлювався лікарем-онкологом в умовах онкологічного диспансеру. Всі жінки підписали інформовану згоду на участь у дослідженні.

Матеріалом для молекулярно-генетичного дослідження слугувала периферійна кров, що зберігалася в закритих системах для забору венозної крові з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) як антикоагулянта.

Виділення геномної ДНК з периферійної крові проводили фенольним методом за стандартним протоколом. Наявність мутації 5382insC гена *BRCA1* визначали методом мутаційно-індукованої ПЛР з використання специфічних праймерів [16]. Для ідентифікації мутації ставили дві реакції: в першу додавали загальний (Р1) та специфічний для алеля дикого типу (Р2) праймери,

© ГОРОДЕЦЬКА Є. В., СЕРГА С. В., ЛАГУТА Т. І., ЛЕВКОВИЧ Н. М., АНІКУСЬКО М. Ф., ТИМОВСЬКА Ю. О., ЧЕШУК В. Є., СМОЛАНКА І. І., СКЛЯР С. Ю., ПОЛЕНКОВ С. Е., БОЙЧЕНКО О. І., ДЕМИДОВ С. В., ЖУК О. В., КОЗЕРЕЦЬКА І. А.

в другу — загальний (Р1) та специфічний до мутантного алеля (Р3) праймери.

Реакція ампліфікації проводилась у об'ємі 20 мкл (2 мкл 10хПЛР-буферу (10X DreamTaq Buffer, «Thermo Scientific», USA), 2 мкл 2 мМ dNTP («Thermo Scientific», USA), 2 мкл 2,5mM $MgCl_2$ («Thermo Scientific», USA), по 0,4 мкл 20 мМ праймерів, 0,2 мкл Taq-полімерази (5 од. акт/мкл «Thermo Scientific», USA), 10 мкл дистильованої води) та 3 мкл геномної ДНК. Температурний режим реакції був таким: 3 хв при 95 °С, 40 циклів, кожен з яких включав по 30 с при 94 °С, 25 с при 57 °С та 30 с при 72 °С і кінцева стадія елонгації 4 хв при 72 °С.

Після проведення ПЛР 4 мкл ампліконів переносили на 8% поліакриламідний гель (6,5 мл дистильованої води, 2,7 мл поліакриламіду (29 г акриламіду, 1 г бісакриламіду, 100 мл дистильованої води), 1 мл 10хТВЕ (108 г Tris base, 55 г борної кислоти, 40 мкл 0.5М ЕДТА), 70 мкл 10% персульфату амонію та 15 мкл TEMED (тетраметилетилендіамін). Сила струму становила 40мА, а напруга — 170 В.

Статистичну обробку даних проводили з використанням пакета статистичних програм Microsoft Excel. Різницю досліджуваних частот визначали за F критерієм. За рівень статистичної значущості приймали $P < 0,05$.

Результати та обговорення

Результати молекулярно-генетичного аналізу дозволили визначити частоту мутації 5382insC гена *BRCA1* у жінок групи дослідження. Загалом 9 жінок (5,8%) з 155 мали зазначену мутацію.

Електрофореграма продуктів ампліфікації наведена на рис. 1.

За регіоном проживання спостерігався такий розподіл мутацій у пацієнток: Київська

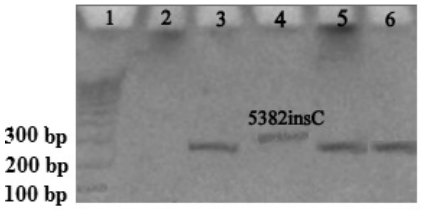


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації гена *BRCA1*: 1 — маркер молекулярної ваги 100bp; 2 — негативний контроль; 3, 4 — мутація 5382insC в гетерозиготному стані; 5, 6 — генотип «дикий» тип

(104 хворих, з них 7 з мутацією), Чернігівська (13 хворих, 1 з мутацією) та Житомирська область (38 хворих, 1 з мутацією). Обраховані частоти складали: 6,73 ± 2,45% для Київської області, 2,63 ± 2,59% — для Житомирської та 7,69 ± 7,39% — для Чернігівської. Частоти мутації 5382insC в цих областях достовірно не відрізнялися між собою ($F = 0,53$, $P > 0,05$).

Для жінок, хворих на РМЗ, з Донецької області колективом авторів [12] визначено частоту мутації 5382insC гена *BRCA1*, яка склала 5,31 ± 2,3%. У Львівській області із 78 пацієнток з РМЗ мутація 5382insC гена *BRCA1* була виявлена у 2 хворих, що становило 2,6 ± 1,7% [13]. У Чернівецькій області мутація 5382insC гена *BRCA1* виявлена у 1 пацієнтки (2,5 ± 2,46%) з 40 [14]. Результати зіставлення частот мутації 5382insC гена *BRCA1* в різних регіонах України представлено на рис. 2.

Висновки

Проведений аналіз не виявив достовірних відмінностей у розподілі частоти мутації 5382insC гена *BRCA1* у пацієнток з РМЗ, що проживають у різних регіонах України.

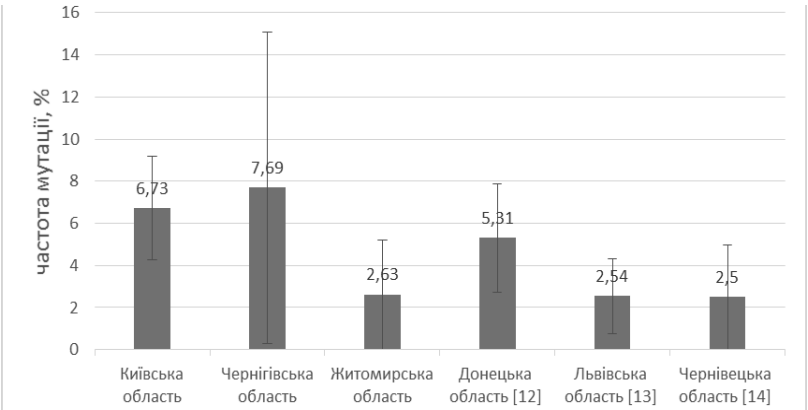


Рис. 2. Частота мутації 5382insC гена *BRCA1* в різних областях України

ЛІТЕРАТУРА

1. Мерабишвили В. М. Рак молочной железы: заболеваемость, смертность, выживаемость (популяционное исследование) // Вопросы онкологии.— 2011.— 57, № 5.— С. 609–615.
2. Рак в Україні 2012–2013. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби // Бюлетень національного канцер-реєстру в Україні.— 2013.— 15.— С. 3–7.
3. Petrucelli N., Daly M. B., Feldman G. L. *BRCA1* and *BRCA2* Hereditary Breast and Ovarian Cancer [Електронний ресурс].— Режим доступу: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247.
4. Campeau P. M., Foulkes W. D., Tischkowitz M. D. Hereditary breast cancer: New genetic developments, new therapeutic avenues // *Human Genetics*.— 2008.— 124 (1).— P. 31–42.
5. Janavičius R. Founder *BRCA1/2* mutations in the Europe: implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control // EPMA J.— 2010.— 1.— P. 397–412.
6. Tom Walsh, Silvia Casadei, Kathryn Hale Coats, Elizabeth Swisher, Sunday M. Stray, Jake Higgins, Kevin C. Roach, Jessica Mandell, Ming K. Lee, Sona Ciernikova, Lenka Foretova, Pavel Soucek, Mary-Claire King Spectrum of mutations in *BRCA1, BRCA2*, *CHEK2*, and *TP53* in families at high risk of breast cancer // *JAMA*.— 2006.— 295 (12).— P. 1379–1388.
7. Tong A., Kelly S., Nusbaum R., Graves K., Peshkin B. N., Valdimarsdottir H. B., Wood M., McKinnon W., Garber J., McCormick S.R., Jandorf L., Schwartz M. D. Intentions for risk-reducing surgery among high-risk women referred for *BRCA1/BRCA2* genetic counseling // Psychooncology.— 2014. Doi: 10.1002/pon.3560.
8. Karami F., Mehdipour P. A comprehensive focus on global spectrum of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in breast cancer // Biomed Res Int.— 2013. Doi: 10.1155/2013/928562.
9. Navarro de Souza A, Groleau D, Loiselle CG, Foulkes WD, Wong N. Cultural aspects of healthy *BRCA* carriers from two ethnocultural groups // Qual Health Res.— 2014.— 24.— P. 665–681.
10. Sharma P., Klemp J. R., Kimler B. F., Mahnken J. D., Geier L. J., Khan Q. J., Elia M., Connor C. S., McGinness M.K., Mammen J. M., Wagner J. L., Ward C., Ranallo L., Knight C. J., Stecklein S. R., Jensen R. A., Fabian C. J., Godwin A. K. Germline *BRCA* mutation evaluation in a prospective triple-negative breast cancer registry: implications for hereditary breast and/or ovarian cancer syndrome testing // Breast Cancer Res Treat.— 2014.— 145.— P. 707–714.
11. Rubinstein W. S. Hereditary breast cancer in Jews // Fam Cancer.— 2004.— 3.— P. 249–257.
12. Бондарь Г. В., Седаков И. Е., Кайряк О. В., Скочиляс Т. Л., Фефелов А. И., Смирнов В. Н. *BRCA1* и *BRCA2* у больных раком молочной железы Донецкой области // Медико-соціальні проблеми сімї.— 2009.— 14, № 4.— С. 53–58.
13. Кіцера Н. І., Шпарик Я. В., Білинський Б. Т., Тріль О. В. Аналіз мутацій у генах *BRCA1/2* у хворих на сімейний/спадковий рак молочної залози, які проживають у Львівській області (Україна) // Онкологія.— 2012.— № 11.— С. 44–49.
14. Крук Т. В., Пересунько О. В., Волков Р. А. Молекулярно-генетичне вивчення типів мутацій гену *BRCA1* у хворих на рак молочної залози та їх родичів Чернівецької області України // Новоутворення.— 2012.— 12.— С. 310–314.
15. Довженко С. П., Расси Х., Захарцева Л. М., Подольская С. В., Мясоедов Д. В., Горовенко Н. Г. Некоторые факторы риска развития рака молочной железы и прогноз течения заболевания // Лікарська справа.—2007.— № 7.— С. 80–82.
16. Chan P. C., Wong B. Y., Ozcelik H., Cole D. E. Simple and rapid detection of *BRCA1* and *BRCA2* mutations by multiplex mutagenically separated PCR // Clin Chem.— 1999.— 45.— P. 1285–1287.
17. Negură L., Carasevici E., Negură A., Uhrhammer N., Bignon Y.-J. Identification of a recurrent *BRCA1* mutation in two breast/ovarian cancer predisposition families with distinct phenotypes, by allele-specific multiplex-PCR // Romanian Review of Laboratory Medicine.— 2010.— 18 (2).— P. 53–61.

GORODETSKA I.V.[1], SERGA S.V.[1], LEVKOVICH N.M.[2], LAHUTA T.I.[1], ANIKUSKO N.F.[3], TYMOVSKA Yu.O.[3], CHESHUK V. Ie.[3], SMOLANKA I.I.[4], SKLYAR S. Yu.[4], POLENKOV S.E.[5], BOICHENKO O.I.[6], DEMYDOV S.V.[1], ZHUK O.W.[1], KOZERETSKA I.A.[1]

[1] Taras Shevchenko National University of Kyiv, Educational and Scientific Centre «Institute of Biology», Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str., 64, e-mail liza.gorodetskaya@gmail.com

[2] Shupik National Postgraduate Education Medical Academy, Ukraine, 04112, Kyiv, Dorohozhytska str., 9, e-mail: levkovich83@mail.ru

[3] Kiev municipal clinical oncological centre, Ukraine, 03115, Kyiv, Verkhovyna str., 69, e-mail: timovska79@gmail.com

[4] Ukrainian National Cancer Institute, Ukraine, 03022, Kyiv, Lomonosova str., 33/43, e-mail: iislomanka@gmail.com

[5] Chernihiv Regional Oncology Center, Ukraine, Ukraine, 14029, Chernihiv, Miry av., 211, e-mail: dokpolenkov@rambler.ru

[6] Zhytomyr Regional Oncology Center, Ukraine, Zhytomyr, 10013, Feschenko-Chopyvskoho str., 24/4, e-mail: aleksandr-bojchenko@yandex.ru

THE FREQUENCY OF *BRCA1* MUTATION 5382INSC AMONG WOMEN WITH BREAST CANCER FROM THREE REGIONS OF UKRAINE

***Aims*.** Breast cancer ranks first among cancers of the female population in Ukraine and in most countries abroad. However, data on the mutations frequencies in Ukraine for *BRCA1* gene is limited. We investigated the variation and frequency of mutations in gene *BRCA1* among patients with breast cancer in three regions of Ukraine. ***Methods*.** Mutation 5382insC was screened by PCR using specific primers as described in Negură L., et al., 2010, with some optimization. ***Results*.** In total, we screened 155 breast cancer patients for the 5382insC mutation. Nine BRCA1 mutations 5382insC were detected (5.8 ± 1.87%). The study was conducted in Kyiv region (104 patients, including 7 with mutation), Chernihiv region (13 patients, 1 with mutation) and Zhytomyr region (38 patients, 1 with mutation). ***Conclusions*.** Frequencies of 5382insC did not differ between three regions and from the data obtained by our colleagues in Donetsk, Lviv and Chernivtsi regions.

Keywords: *BRCA1*, 5382insC, mutation, Ukraine.

УДК 575.17

ГОРПИНЧЕНКО М. Ю., АТРАМЕНТОВА Л. О.
Харківський національний університет імені В.Н. Каразина,
Україна, 61022, м. Харків, пл. Свободи, 4

ЗДАТНІСТЬ ПОКАЗНИКА I_P РОЗРІЗНЯТИ УКРАЇНСЬКІ ПОПУЛЯЦІЇ РЕГІОНАЛЬНОГО РІВНЯ

Маркери є основним інструментом популяційно-генетичних досліджень. У ролі генетичних маркерів можуть виступати будь-які особливості організму, що несуть інформацію про генотип. Традиційно у популяційно-генетичних дослідженнях використовують класичні маркери, а також ДНК-маркери [1]. В останні роки все популярнішими стають квазігенетичні маркери [2], серед яких найбільш зручними є прізвища. На популяціях різних народів отримані переконливі докази про існування зв'язку між прізвищами та істинними генетичними маркерами — як білковими [5, 6], так і ДНК-маркерами [3–11]. З допомогою прізвищ розраховані найважливіші показники популяційної структури, охарактеризовано спрямованість і інтенсивність генетичних процесів. Ці ж показники розраховані з використанням інформації про «справжні» маркери. Між показниками, отриманими на основі біологічних маркерів і прізвищ, виявлено збіг [1, 2, 4, 5, 7]. Заміна «справжніх» маркерів прізвищами виявилася продуктивною в деяких видах досліджень, наприклад при оцінці рівня інбридингу і пов'язаного з ним вантажу спадкових захворювань [1–7]. Дослідження українських прізвищ як інструменту популяційно-генетичних досліджень були розпочаті нами недавно. Мета цієї статті — визначити, якою мірою використання прізвищ дозволяє диференціювати генофонд населення України, що проживає в регіонах з різною демографічною історією.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження служив список жителів України за даними 2005 р., що містить 52 414 884 позиції, кожна з яких відповідає одній людині. Зі списку виключені 6 435 146 осіб, які народилися за межами країни. Серед решта 46 449 268 корінних українців було виявлено 697 147 прізвищ. Розраховані частоти прізвищ. Прізвищам у загальноукраїнському списку, розташованим за зменшенням частоти, присвоєні ранги. Найчастіше прізвище отримало ранг 1, наступне за ним — ранг 2 і т. д. Складено списки прізвищ для кожного з п'яти регіонів України. Для кожного регіону розраховані середні індекси місця [1] та проведено їх порівняння з показниками для всього населення України. Для розрахунків використані програми *Cronos* і *Microsoft Office Excel*.

Результати та обговорення

Найчастіше прізвище в Україні *Мельник*. Західний — це єдиний регіон, у якому це прізвище займає перше місце. Лише з цього єдиного прізвища західний регіон найближче збігається із загальноукраїнським списком. У трьох регіонах (східному, центральному і північному) найчастішим прізвищем є *Шевченко*, що посіло друге місце в загальному списку. На Півдні перше місце належить російському прізвищу *Иванов* (ранг 8).

Для аналізу узято двадцять найпоширеніших прізвищ в Україні та в окремих регіонах (табл. 1). Для кожного регіону обчислено середній індекс місця, який розраховується як середнє арифметичне для десяти (I_{10}) або двадцяти (I_{20}) найчастіших прізвищ. Індекси місця регіонів порівнювали з відповідним показником для загальноукраїнського списку (I_{10} = 5,5, I_{20} = 10,5). Чим більше середній індекс місця регіону відрізняється від загальноукраїнського, тим більш своєрідним є його генофонд [1].

Найбільше за індексом місця I_{10} відрізняється західний регіон (I_{10} = 22,5). Північ, Південь і Центр утворюють кластер, близький до середньоукраїнського значення: I_{10} знаходяться в межах 6,3–7,0. Отже, генофонд населення цих регіонів є «найбільш типовим» для України в цілому. Ця закономірність зберігається, якщо провести порівняння з використанням двадцяти прізвищ. Західний регіон (I_{20} = 37,1) знаходиться також далі за всіх від загальноукраїнського. Дещо ближче знаходиться східний регіон (I_{20} = 24,2). Північний, південний та центральний регіони зберегли найбільшу близькість до загального значення по Україні.

Для з'ясування того, яку кількість частих прізвищ доцільно використовувати для того, щоб

© ГОРПИНЧЕНКО М. Ю., АТРАМЕНТОВА Л. О.

Таблиця 1

Часті прізвища в Україні і регіонах

Україна		Регіони									
		Схід		Південь		Центр		Північ		Захід	
Часті прізвища	Місце	Часті прізвища	Місце	Часті прізвища	Місце	Часті прізвища	Місце	Часті прізвища	Місце	Часті прізвища	Місце
МЕЛЬНИК	1	ШЕВЧЕНКО	2	ІВАНОВ	8	ШЕВЧЕНКО	2	ШЕВЧЕНКО	2	МЕЛЬНИК	1
ШЕВЧЕНКО	2	БОНДАРЕНКО	4	ШЕВЧЕНКО	2	МЕЛЬНИК	1	КОВАЛЕНКО	3	КОВАЛЬЧУК	9
КОВАЛЕНКО	3	ІВАНОВ	8	БОНДАРЕНКО	4	КОВАЛЕНКО	3	ТКАЧЕНКО	6	ШЕВЧУК	11
БОНДАРЕНКО	4	ТКАЧЕНКО	6	КОВАЛЕНКО	3	БОНДАРЕНКО	4	МЕЛЬНИК	1	ТКАЧУК	17
БОЙКО	5	КОВАЛЕНКО	3	КРАВЧЕНКО	7	ТКАЧЕНКО	6	КРАВЧЕНКО	7	БОЙКО	5
ТКАЧЕНКО	6	ПОПОВ	14	ТКАЧЕНКО	6	БОЙКО	5	БОЙКО	5	ПОПОВИЧ	48
КРАВЧЕНКО	7	КРАВЧЕНКО	7	ПОПОВ	14	КРАВЧЕНКО	7	БОНДАРЕНКО	4	САВЧУК	29
ІВАНОВ	8	КОВАЛЬОВ	25	БОЙКО	5	КОВАЛЬ	10	КОВАЛЬЧУК	9	КОВАЛЬ	10
КОВАЛЬЧУК	9	ГОНЧАРОВ	43	МЕЛЬНИК	1	ОЛІЙНИК	12	ПОЛІЩУК	13	МЕЛЬНИЧУК	51
КОВАЛЬ	10	САВЧЕНКО	18	РУДЕНКО	20	ПОЛІЩУК	13	МАРЧЕНКО	19	РОМАНЮК	44
I_{10}	5,5	I_{10}	13,0	I_{10}	7,0	I_{10}	6,3	I_{10}	6,9	I_{10}	22,5
ШЕВЧУК	11	БОЙКО	5	ПЕТРОВ	45	ІВАНОВ	8	САВЧЕНКО	18	ОЛІЙНИК	12
ОЛІЙНИК	12	ЛИСЕНКО	15	ВОЛКОВ	46	ЛИСЕНКО	15	ХОМЕНКО	38	КРАВЧУК	26
ПОЛІЩУК	13	ВОЛКОВ	46	КОВАЛЬ	10	ШЕВЧУК	11	ПЕТРЕНКО	21	ПАВЛЮК	47
ПОПОВ	14	РУДЕНКО	20	ЛИСЕНКО	15	РУДЕНКО	20	КУЗЬМЕНКО	27	КОЗАК	68
ЛИСЕНКО	15	ШАПОВАЛОВ	97	КОВАЛЬЧУК	9	БОНДАР	22	КЛИМЕНКО	23	ГАВРИЛЮК	38
МОРОЗ	16	МАРЧЕНКО	19	МАРЧЕНКО	19	МАРЧЕНКО	19	ПАВЛЕНКО	24	МАРТИНЮК	53
ТКАЧУК	17	ПОНОМАРЕНКО	28	ПЕТРЕНКО	21	МОРОЗ	16	КОВАЛЬ	10	СЕМЕНЮК	61
САВЧЕНКО	18	ПЕТРЕНКО	21	КОВАЛЬОВ	25	КОВАЛЬЧУК	9	РУДЕНКО	20	ПОЛІЩУК	13
МАРЧЕНКО	19	ЗАЙЦЕВ	80	САВЧЕНКО	18	ПЕТРЕНКО	21	ЛИСЕНКО	15	БОЙЧУК	140
РУДЕНКО	20	КЛИМЕНКО	23	КЛИМЕНКО	23	САВЧЕНКО	18	ШЕВЧУК	11	КУШНІР	58
I_{20}	10,5	I_{20}	24,2	I_{20}	15,1	I_{20}	11,1	I_{20}	13,8	I_{20}	37,1

Таблиця 2

Значення індексів місця

I	Україна	Регіони				
		Захід	Північ	Центр	Південь	Схід
I_5	3	8,6	3,8	3,2	4,8	4,6
I_{10}	5,5	22,5	6,9	6,3	7	13
I_{15}	8	27,7	13,1	9,3	13	20,9
I_{20}	10,5	37,1	13,8	11,1	15,1	24,2
I_{25}	13	48	17,6	15	16,4	30,5
I_{30}	15,5	60,9	18,4	17,8	22	37,8
I_{35}	18	72,8	24,7	22,2	29,8	41,1
I_{40}	20,5	81	27,1	28,8	34,2	46
I_{45}	23	93,2	31,9	33,2	37,2	47,8
I_{50}	25,5	100,3	36,5	37,3	39,7	50
I_{55}	28	108,5	40	38,9	43,2	53,5
I_{60}	30,5	120,4	46,3	40,7	45,6	58,5
I_{65}	33	131,5	51,9	43,9	48	63,8
I_{70}	35,5	139,5	54,3	47,7	57,7	67,3
I_{75}	38	153,7	63,7	50,2	59,9	72,1
I_{80}	40,5	169,5	66,2	54,1	62,9	77,8
I_{85}	43	181,9	69,4	57,1	66,8	78,9
I_{90}	45,5	190	75,5	59	71,8	80,4
I_{95}	48	200,2	76,2	64	75,2	85,7
I_{100}	50,5	214,2	80,8	68,6	77,7	88,8

Примітка: I — індекс місця з позначкою кількості прізвищ, узятих для розрахунку.

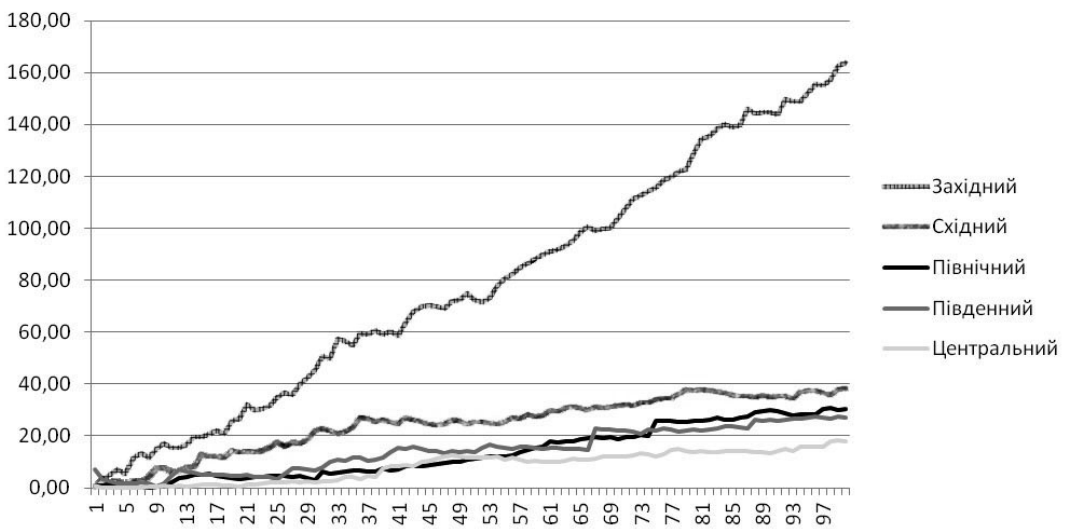


Рис. Показник «індекс місця» залежно від числа прізвищ (по горизонталі — число частих прізвищ, по вертикалі — відстань від індексу місця для України)

виявляти відмінності між регіонами, розрахували індекси місця для числа прізвищ в інтервалі 1–100. В табл. 2 представлено значення середнього індексу місця з інтервалом в п'ять прізвищ. Видно, що з підвищенням числа прізвищ зростає і індекс місця. Більш детально індекси місця представлено на рис., який свідчить, що західний регіон сильніше за інших відрізняється від загальноукраїнського, причому ця різниця починає виявлятися з трьох прізвищ. Зі збільшенням числа взятих для аналізу прізвищ своєрідність західного регіону проявляється особливо сильно.

За значенням індексу місця східний регіон також віддаляється від українського. Південний, північний та центральний на всьому протязі графіка почергово займають різні положення віднос-

но один одного. Ближче за всіх до українського значення індексу місця знаходиться центральний регіон, і його практично неможливо відрізнити від північного регіону, якщо в аналіз включені менше 50 прізвищ. «Типовість» центрального регіону починає чітко проявлятися при використанні більше 50 прізвищ. Південний і північний регіони за середнім індексом місця розрізнити практично неможливо на всьому протязі графіка, що охоплює 100 частих прізвищ. Це спонукає в подальшому провести аналіз на наступному ієрархічному ступені — популяціях рівня області.

Висновки

Українські прізвища можуть виконувати роль показника, що відображає особливості регіонів країни. За показником індексу місця найбільш своєрідним виявився західний регіон. Решта регіонів утворюють кластер, близький за значенням індексу місця до загального українського. Серед останніх «найбільш типовим» є центральний регіон.

Автори висловлюють глибоку подяку професору Олені Володимирівні Балановській (МГНЦ РАМН) за методичну підтримку.

ЛІТЕРАТУРА

1. Балановская Е. В., Балановский О. П. Русский генофонд на Русской равнине.— М.: Луч, 2007.— 416 с.
2. Балановская Е. В., Романов А. Г. Балановский О. П. Однофамильцы или родственники? Подходы к изучению связи между гаплогруппами Y-хромосомы и фамилиями // Молекулярная биология.— 2011.— 45, № 3 — С. 473–485.
3. Гинтер Е. К., Мамедова Р. А., Брусинцева О. В. Генетическая структура популяций и особенности территориального распределения аутосомно-рецессивных заболеваний в Кировской области // Генетика — 1994.— 30, № 1 — С. 107–111.
4. Ельчинова Г. И., Кадошникова М. Ю., Мамедова Р. А., Букина А. М., Петрова Н. В., Старцева Е. А. О частотном критерии выбора фамилий для изучения генетической структуры популяций // Генетика.— 1991.— 27.— С. 358–360.
5. Казаченко Б. Н., Ревазов А. А., Тарлычева Л. В., Лавровский В. А. Использование фамилий для изучения факторов динамики популяционной структуры // Генетика.— 1980.— 16, № 11.— С. 2049–2057.
6. Рычков Ю. Г., Балановская Е. В. Этническая генетика: Соотношение адаптивной и нейтральной генетической дифференциации этносов // Генетика.— 1990.— 26.— С. 541–549.
7. Ревазов А. А., Парадеева Г. М., Русакова Г. И. Пригодность русских фамилий в качестве «квазигенетического» маркера // Генетика.— 1986.— 22.— С. 699–703.
8. Barrai I., Formica G., Scapoli C., Beretta M., Mamolini E., Volinia S., Barale R., Ambrosino P., Fontana F. Microevolution in Ferrara: Isonymy 1890–1990 // Ann. Human Biol.— 1992.— 19, № 4.— P. 371–385.
9. Bedoya G., Montoya P., Garcia J. Admixture dynamics in ispanics: a shift in the nuclear genetic ancestry of a South American population isolate // Proc. Nat. Acad. Sci.— USA, 2006.— N 103 (19).— P. 7234–7239.
10. Crow I., Mange A. Measurement of inbreeding from the frequency or marriages between person of the same surname // Eugen. Quart.— 1965.— 12.— P. 199–203.
11. Immel U. D., Krawczak M., Udolph J., Richter A., Rodig H., Kleiber M., Klintschar M. Y-chromosomal STR haplotype analysis reveals surname associated strata in the East8German population // Eur. J. Hum. Genet.— 2006.— N 14 (5).— P. 577–582.
12. Jobling M. A. In the name of the father: surnames and genetics // Trends Genet.— 2001.— N 17 (6).— P. 353–357.
13. King T. E., Ballereau S. J., Schurer K. E., Jobling M. A. Genetic signatures of coancestry within surnames // Curr. Biol.— 2006.— 21.— P. 384–388.
14. King T. E., Jobling M. A. Founders, drift, and infidelity: the relationship between Y chromosome diversity and patrilineal surnames // Mol. Biol. Evol.— 2009.— 26 (5).— P. 1093–1102.
15. Rodriguer-Larralde A., Gonzales-Martin A., Scapoli C., Barrai I. The names of Spain: a study of the isonymy structure of Spain // Am. J. Phys. Antropol.— 2003.— 121, N 3.— P. 280–292.

GORPYNCHENKO M.YU., ATRAMENTOVA L.A.

V.N. Karazin Kharkiv National University,
Ukraine, 61022, Kharkov, Svobody sq., 4, e-mail: Gelios-01@mail.ru

ABILITY OF I_p INDEX TO DISTINGUISH BETWEEN THE UKRAINIAN POPULATIONS OF THE REGIONAL LEVEL

Aims. An important indicator of a marker is its resolving power, i.e. the ability to differentiate the data. Therefore the goal of this study is to determine how using surnames allows to differentiate the gene pool of the Ukrainian population living in regions with different demographic history. ***Methods.*** Surnames in a nationwide ukrainian list arranged in descending order of frequency and they are assigned in rank. For each region average Location Index is calculated and compared with the all population of Ukraine. ***Results.*** The distribution of frequent surnames across the border of the Ukraine including its five regions is studied. We established that the Location Index differs the average Ukrainian values from the Western region (I_{10}= 22.5, I_{20}= 37.1) in a greater extent than Central region (I_{10}= 6.3, I_{20}= 11.1). Central, Southern, Northern and Eastern regions form a cluster, where the Eastern region (I_{10}= 13.0, I_{20}= 24.2) is most distant from the average Ukrainian values. ***Conclusions.*** Ukrainian surnames can serve as an indicator reflecting the characteristics of the regions of the country. The Location Index indicates the Western region as most specific. Other regions form the cluster close to the nationwide ukrainian by the value of the Location Index. The most «typical» is the Central region.

Keywords: quasigenetic markers, population, surnames, location indexes of surnames.

УДК 616.71-007.157-07:575.224.2

ДМИТРУК І. М., МАКУХ Г. В., ТИРКУС М. Я., ШУВАРСЬКА В. І., МАРКЕВИЧ Н. В., ЛЯЛЮК О. В.

ДУ «Інститут спадкової патології Національної академії медичних наук України», Україна, 79008, м. Львів, вул. Лисенка, 31А, e-mail: irynamdmytruk@gmail.com

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ДІАГНОСТИКА МУТАЦІЙ ГЕНА *FGFR3* ПРИ АХОНДРОПЛАЗІЇ ТА ГІПОХОНДРОПЛАЗІЇ

Природжені аномалії — головна причина дитячої смертності, захворюваності і втрати плодів. Найуразливішими системами людського організму в процесі онтогенезу є кістяк, мозок і серце. Патогенетичні механізми природжених вад різноманітні. Вади, що є результатом порушеного розвитку, можуть виникати внаслідок хромосомних відхилень, дефектів генів чи зміненого балансу факторів, що керують станом гена протягом розвитку [1].

Ахондроплазія (АХ) — аутосомно-домінантне захворювання з повною пенетрантністю, яке є найбільш поширеною формою спадкової диспропорційної низької статури й одним із найпоширеніших захворювань (1 на 25 000–40 000 новонароджених), яке успадковується за моногенним менделівським типом. У понад 80 % випадках, АХ виникає внаслідок мутації *de novo* в сперматозоїді чи яйцеклітині, а гомозиготна форма АХ, яка характеризується важкими аномаліями скелету, є фатальною в перші роки життя [2–6]. Причиною появи АХ є генетичний дефект у гені рецептора фактору росту фібробластів 3 (*FGFR3*), а саме: 98 % випадків АХ спричинені мутацією c.1138G > A, в 1 % усіх випадків детектовано мутацію c.1138G > C та 1 % інших рідкісних мутацій, які викликають АХ [2, 3, 5, 7].

Гіпохондроплазія (ГХ), або нетипова ахондроплазія,— аутосомно-домінантне захворювання, яке входить до скелетних дисплазій. Захворювання часто проявляється після трирічного віку і фенотипово нагадує прояви АХ, що ускладнює діагностику та лікування цього захворювання. ГХ викликана трансверсією C > A або C > G в нуклеотиді 1620 гена *FGFR3* і спричинює мутацію *p.Asn540Lys* на білковому рівні, що зустрічається у 55–60 % пробандів з усіх виявлених випадків ГХ [3, 8].

Молекулярно-генетичне тестування мутацій *c.1138G > A* та *c.1138G > C*, *c.1620C > A* та *c.1659C > G* гена *FGFR3* забезпечує можливість пренатального діагностування ахондроплазії та гіпохондроплазії, що є особливо важливим у сім'ях, де батьки хворі на скелетну дисплазію. Диференційне діагностування ахондроплазії чи гіпохондроплазії дозволяє виключити нанізми іншої етіології, що відіграє важливу роль при призначенні ефективного лікування. Рання діагностика дозволяє застосовувати специфічні профілактичні заходи для полегшення перебігу медичних ускладнень при ахондроплазії, що характеризується важчими ускладненнями, ніж у пацієнтів із гіпохондропатією.

Таким чином, метою цієї роботи є розробка та впровадження молекулярно-генетичного тестування мутацій гена *FGFR3* для диференційної та пренатальної діагностики скелетних дисплазій серед українського населення.

Матеріали і методи

Групу обстеження склали 62 пробанди з підозрою на АХ чи ГХ, а також 99 членів їх сімей, включаючи батьків та сибсів. Вік пацієнтів становив від 3 місяців до 40 років. Пробанди з підозрою на АХ та ГХ відбиралися шляхом консультацій у спеціалізованих дитячих відділеннях (неврологічному, педіатричному) західноукраїнського спеціалізованого дитячого медичного центру (ЗУСДМЦ), Львівському міжобласному медико-генетичному центрі (ЛММГЦ) та активно скеровувались із 8 областей західного регіону України. Обстеження пробандів проводили за схемами індивідуальної карти клінічного огляду. Усім пацієнтам проводились обстеження, які включали збір генеалогічного анамнезу, клінічний огляд, опис фенотипу та молекулярно-генетичні дослідження.

Діагностичні обстеження були проведені у всіх 62 дітей у повному обсязі, ідивідуалізовані залежно від особливостей клінічних проявів у конкретної дитини. Зокрема, бралися до уваги основні діагностичні критерії: темпи росту, невідповідні до паспортного віку та стадії дозрівання; зріст, менший за 2–2,5 сигми від середнього зросту для даного паспортного віку; низькоросла дитина, батьки якої нормального зросту або

© ДМИТРУК І. М., МАКУХ Г. В., ТИРКУС М. Я., ШУВАРСЬКА В. І., МАРКЕВИЧ Н. В., ЛЯЛЮК О. В.

високі; дитина з відставанням кісткового віку (більше 2 років для цього паспортного віку); наявні дисморфічні риси, що вказували на можливі генетичні синдроми, що супроводжуються низькорослістю; дитина з диспропорційною будовою тіла, або аномаліями скелета (наприклад, прояви гіпохондроплазії чи ахондроплазії, інші скелетні дисплазії).

Матеріалом для дослідження служила ДНК, виділена з лейкоцитів периферійної крові методом висолювання [9]. Проводили ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro,* використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для ідентифікації мутацій *1138G > A* та *1138G > C*, *1659C > A* та *1659C > G* гена *FGFR3* застосовували метод поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ) [10, 11]. Для детекції отриманих рестриктних фрагментів проводили електрофорез у 2% агарозному гелі. Після цього проводили візуалізацію на УФ-трансілюмінаторі та порівнювали з маркерами довжин. Результати сканування гелів знімали цифровою камерою «Gel Imager» при довжині хвилі 256 нм. Отримані сигнали порівнювали з маркерами довжин і на основі цього детектували розміри отриманих фрагментів.

Результати та обговорення

У результаті цієї роботи апробовано методику молекулярно-генетичного тестування мутацій *c.1138G > A*, *c.1138G > C* та *p.Asn540Lys* гена *FGFR3*. В результаті проведення ПДРФ аналізу ампліфікованого продукту у випадку присутності *1138A* алеля продукт величиною 164 п.н. під дією рестриктази *Sfel* розщеплюється на два фрагменти розміром 109 п.н. та 55 п.н. (рис. 1). Мутацію *c.1138G > C* детектовано з використанням рестриктази *MspI*, яка, за наявності мутації, розрізає продукт розміром 164 п.н. на два фрагменти — 107 п.н. та 57 п.н. (рис. 2).

При аналізі мутації *p.Asn540Lys* гена *FGFR3* в продукті ПЛР створюється сайт ендонуклеази рестрикції *HindII.* За наявності у пробандів мутації *p.Asn540Lys* (c.1620C > A або c.1659C > G) продукт ампліфікації розчепиться на фрагменти розміром 161 п.н., 136 п.н. та 25 п.н. (не відображається в гелі) (рис. 3). З'ясування, яка саме транзиція, C > A чи C > G, присутня у пробандів, планується на подальшому етапі досліджень.

Проведено молекулярно-генетичний аналіз та встановлено частоти мутацій *c.1138G > A, c.1138G > C* та *p.Asn540Lys* гена *FGFR3* у 160 осіб: 62 особи з підозрою на АХ чи ГХ та 99 членів їхніх родин (табл.).

У результаті проведеного дослідження у 27 пацієнтів виявлено мутації в гені *FGFR3.* У 22 осіб віком від 5 місяців до 40 років виявлено мажорну мутацію *c.1138G > A* в гетерозиготному стані. Мутацію *c.1138G > C* ідентифіковано в чотирьох пацієнтів віком від 3 місяців до 29 років, мутація *p.Asn540Lys* виявлена у двох осіб віком 5 місяців та 1 пробанда віком 7 років. Серед родичів пробандів виявлено двох гетерозиготних носіїв мутації *c.1138G > A* та *c.1138G > C*. Отже, два випадки успадковані від матері до сина (6,8%) та у 27 випадках відбулося виникнення мутації *de novo* (93%).

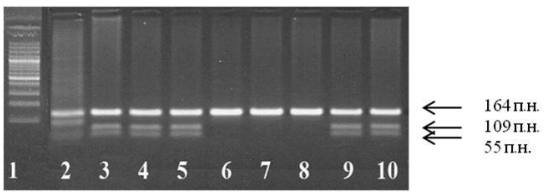


Рис. 1. Електрофореграма рестрикційного аналізу мутації *c.1138G > A* гена *FGFR3* (2% агарозний гель): 1 — маркер молекулярної ваги 100 b.p.; 2, 3, 4, 5, 9, 10 — гетерозиготний носій мутації *c.1138G>A*; 6, 7, 8 — відсутність мутації *c.1138G>A*

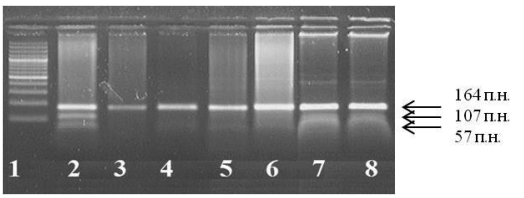


Рис. 2. Електрофореграма рестрикційного аналізу мутації *c.1138G > C* гена *FGFR3* (2% агарозний гель): 1 — маркер молекулярної ваги 100 b.p.; 2 — гетерозиготний носій мутації *c.1138G > C*; 3, 4, 5, 6, 7, 8 — відсутність мутації *c.1138G > C*

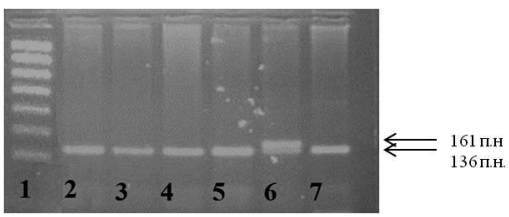


Рис. 3. Електрофореграма рестрикційного аналізу мутації *p.Asn540Lys* гена *FGFR3* (2% агарозний гель): 1 — маркер молекулярної ваги 100 b.p.; 2, 3, 4, 5, 7 — відсутність мутації *p.Asn540Lys*; 6 — гетерозиготний носій мутації *p.Asn540Lys*

Таблиця

Частота мутацій *c.1138G > A*, *c.1138G > C* та *p.Asn540Lys* (*c.1620C > A* або *c.1659C > G*) гена *FGFR3* в обстежених пацієнтів

Генотипи	Пробанди N = 62		Родичі пробандів N = 99	
	n	%	N	%
1138GG / 1620 CC	35	56	97	98
1138GA	21	34	1	1
1138GC	3	5	1	1
1620CA або1620CG	3	5	—	—

Примітка: N — кількість осіб у дослідній групі.

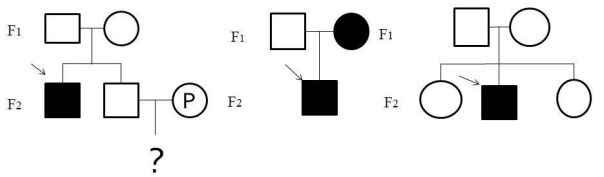


Рис. 4. Родоводи обстежених родин, у яких виявлено випадки нанізму

Таким чином, як видно із даних, наведених у табл., проведений молекулярно-генетичний аналіз підтвердив наявність мутації гена *FGFR3* в 44% пробандів. У 34% пацієнтів підтверджено наявність мутації *c.1138G>A*, у 5% — мутації *c.1138G>C*, а у 5% виявлено мутацію *p.Asn540Lys.* Серед групи родичів пробандів ідентифіковано один випадок успадкованої передачі мутації *c.1138G>A* та один випадок успадкування *c.1138G>A* мутації в гені *FGFR3,* що склало 2%.

У 34 пацієнтів з фенотиповими ознаками ахондроплазії не виявлено жодної мутації, хоча це не виключає наявності рідкісних мутацій, які викликають ахондроплазію. Як свідчать дані генеалогічних досліджень, у 25 із 27 досліджень випадки нанізму у пробанда були єдиними в родині. В одному випадку виявлено мутацію *c.1138G > A* гена *FGFR3* у матері, яка мала фенотипові ознаки ахондроплазій. Мутацію *c.1138G > C* виявлено у матері, яка, імовірно, успадкована від батька, в якого діагностовано хондродистрофію (помер у віці 41 рік). В інших батьків дітей мутацій не виявлено, що вказує про *de novo* походження виявлених мутацій. Родоводи обстежених родин наведено на рис. 4.

Отримані результати підтверджують діагноз ахондроплазії у пробанда за наявності мутацій *c.1138G > C* або *c.1138G > C* та гіпохондроплазії при виявленні мутації *p.Asn540Lys.*, а також свідчать, що переважно випадки цього домінантного захворювання зумовлені мутаціями, що виникли *de novo.* Таким чином, генетичне тестування мутацій *c.1138G > A, c.1138G > C* та *p.Asn540Lys.* гена *FGFR3* є високоінформативним дослідженням для верифікації діагнозу ахондроплазія та гіпохондроплазія і може використовуватися для диференційної діагностики нанізму у людини.

Висновки

Сформовано реєстр носіїв мутацій *c.1138G > A, c.1138G > C* та *p.Asn540Lys* гена *FGFR3* (27 пробандів) для ефективного прогнозування нових випадків ахондроплазії у родині.

Проведено молекулярно-генетичний аналіз мутацій *c.1138G > A, c.1138G > C* та *p.Asn540Lys* серед 161 особи: 62 дитини з підозрою на ахондроплазію та 99 членів їх родин. Виявлено мутацію *c.1138G > A* в гетерозиготному стані у 21 пробанда, *c.1138G > C* — у 3 дітей та мутацію *p.Asn540Lys* — у 3 осіб. Мутації гена *FGFR3* виявлено у 44% пробандів із різними типами нанізму та дизморфічними ознаками. У 34% випадків верифікації ахондроплазії виявлено мутацію *c.1138G > A* та в 5% мутацію *c.1138G > C* гена *FGFR3.* У 5% випадків підтверджено діагноз гіпохондроплазії наявною мутацією *p.Asn540Lys.*

На основі генеалогічного та молекулярно-генетичного аналізу встановлено, що мутації в гені *FGFR3* в 93% випадків виникають *de novo.*

ЛІТЕРАТУРА

1. Макух Г. В., Гнатейко О. З., Заставна Д. В. Методики молекулярно-генетичного аналізу муковісцидозу, синдрому Ніймеген та фенілкетонурії: методичні рекомендації.— К., 2009.— 28 с.
2. Ахондроплазия — описание, причины, симптомы (признаки), лечение. Gipocrat.ru [Електронний ресурс].— Режим доступу: http://gipocrat.ru/boleznid_id33835.phtml.

3. Трансмембранная передача сигнала с участием RTK рецепторов // База знаний по биологии человека [Електронний ресурс].— Режим доступу: http://humbio.ru/humbio/cell_sign3/0003c36b.htm.
4. Fibroblast growth factor receptor 3; FGFR3 // [Електронний ресурс].— Режим доступу: http://omim.org/entry/134934.
5. Francomano C. A., Ortiz de Luna R. I., Hefferon T. W., Bellus G. A., Turner CE., Taylor E., Meyers D. A., Blanton S. H., Murray JC., McIntosh I. Localization of the achondroplasia gene to the distal 2.5 Mb of human chromosome 4p. // Hum. Mol. Genet.— 1994.— 3.— P. 787–792.
6. Galzie Z., Kinsella A.R, Smith J. A. Fibroblast growth factors and their receptors // Biochem. Cell Biology.— 1997.— 75.— P. 669–685.
7. Keegan K., Rooke L., Hayman M., Spurr N. K. The fibroblast growth factor receptor 3 gene (*FGFR3*) is assigned to human chromosome 4 // Cytogenet. Cell Genet.— 1993.— 62.— P. 172–175.
8. Givol D., Yayon A. Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity // FASEB.— 1992.— 6.— P. 3362–3369.
9. Макух Г. В., Заставна Д. В., Тиркус М. Я., Третяк Б. І., Чорна Л. Б. Спосіб виділення ДНК з лейкоцитів периферійної крові. Пат. 32044 UA, МПК G01N33/49 (2006.01). № u 200801896; заявл. 14.02.2008; опубл. 25.04.2008; Бюл. № 8.
10. Bellus G. A., Macintosh I., Smith E. A., Aylsworth A. S., Kaitila I., Horton W. A., Greenhaw G. A., Hecht J. T., Francomano C. A. A Recurrent Mutation in the Tyrosine Kinase Domain of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Causes Hypochondroplasia // Nature Genetics.— 1995.— N 10.— P. 357–359.
11. Pati S. J., Banerjee M., Phadke S. R., Mittal B. Mutation Analysis in Indian Children with Achondroplasia.— Utility of Molecular Diagnosis // Indian Journal of Pediatrics.— 2009.— 76.— P. 147–149.

DMYTRUK I., MAKUKH H., TURKYS M., MARKEVYCH N., SHUVARSKA V., LIALIUK O.

Institute of Hereditary Pathology of the Ukrainian National Academy of Medical Sciences,
Ukraine, 79000, Lviv, Lysenko str., 31-a, e-mail: irynamdmytruk@gmail.com

MOLECULAR GENETIC TESTING OF *FGFR3* GENE MUTATION IN THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF ACHONDROPLASIA AND HYPOCHONDROPLASIA

Aims. The differential diagnosis of achondroplasia and hypochondroplasia in Ukraine is based on the typical clinical and radiologic features that limits accurate diagnosis and leads to many false-positive diagnoses when checked against a complete mutation search of the FGFR3 gene. Thereby, we outline the necessity of implementation molecular-genetic test of FGFR3 gene mutations. The implementation is necessary to carry out differential and prenatal diagnostic of achondroplasia and hypochondroplasia among Ukrainian population. ***Methods.*** The study included 62 patients with clinical things of achondroplasia or hypochondroplasia and 99 relatives including sibs and parents. The molecular-genetic analysis was performed by PCR (Polymerase Chain Reaction) and RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis. We optimized the time and temperature conditions and chose specific primers for revealing the *c.1138G > A, c.1138G > C* and *p.Asn540Lys* mutations of *FGFR3* gene. ***Results.*** Mutation *c.1138G > A* was found at 21 (34%) individuals aged from 5 months to 40 years old with obvious phenotypical features of achondroplasia of which 25 cases was sporadic. Additionally the mutation *c.1138G > C* was detected at 3 (5%) probands. Major *p.Asn540Lys* mutation of the FGFR3 receptor was identified at 3 (5%) probands which causes hypochondroplasia. ***Conclusions.*** We concluded that 93% of mutations were sporadic because no mutations were found at relatives; meanwhile we found 2 (2%) inheritable *c.1138G > A* and *c.1138G > C* mutations at both mother and son. Due to conducting of molecular-genetic diagnostics of *FGFR3* mutations *c.1138G > A, c.1138G > C* and *p.Asn540Lys* diagnosis achondroplasia and hypochondroplasia were confirmed at 27 (44%) observed patients and extensive gene analysis are required for the other patients to search for rare *FGFR3* rearrangements.

Keywords: hypochondroplasia, achondroplasia, mutation, molecular-genetic diagnostics.

УДК 616.39-053.2/.5:613.952

КОВАЛЬОВА В. І., БУДРЕЙКО О. А., КОСОВЦОВА Г. В.
ДУ «Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМН»,
Україна, 61153, м. Харків, пр. 50-річчя ВЛКСМ, 52-А, e-mail: iozdp@iozdp.org.ua

ВИЗНАЧЕННЯ РОЛІ СПАДКОВИХ ФАКТОРІВ ТА НЕСПРИЯТЛИВИХ ЧИННИКІВ ПЕРИНАТАЛЬНОГО РОЗВИТКУ У ФОРМУВАННІ ОЖИРІННЯ У ДІТЕЙ ТА ПІДЛІТКІВ

Статистичні дані, отримані в Україні, свідчать про те, що майже 1000 нових випадків ожиріння фіксуються щорічно в дітей до 14 років життя [1]. Вважається, що ожиріння, яке почалося в дитячому віці, часто зберігається і у дорослому віці та асоціюється з різними метаболічними порушеннями [2]. Цей стан детермінує формування патогенетичного підґрунтя для канцерогенезу, передчасного атеросклерозу, інсулінорезистентності (ІР), цукрового діабету 2 типу. Звичайно, ожиріння та його ускладнення, як і багато інших захворювань, є результатом тісної взаємодії генетичних факторів і різноманітних зовнішніх чинників [3]. Так, в деяких дослідженнях [4] було показано, що для дітей, у яких хоча б один з батьків страждав на метаболічний синдром (МетС), притаманний більш високий рівень центрального ожиріння та ІР порівняно з дітьми, у яких ніхто з батьків не мав МетС. За деякими даними, мутації в гені *PPARG* спричиняють ожиріння, резистентність до інсуліну та цукровий діабет [5]. Ще раніше було показано, що деякі мутації в мітохондріальній ДНК призводять до розвитку певного підтипу діабету, який успадковується по материнській лінії.

Відомо, що адипонектиновий статус організму особливо важливий при високому глікемічному індексі харчів, що характерно для сучасних умов життя [6]. Адаптація до цього фактора, можливо, відбувається за рахунок удосконалення механізмів утилізації вуглеводів. Гетерозиготи за генетично активними алелями, як відомо, володіють різноманітнішим набором функціонально значущих продуктів. Адаптація популяції до середовища, яка характеризується високим глікемічним індексом харчів, певно, відбувається ще в пренатальний період шляхом елімінації гомозиготних фенотипів. Зиготи, ембріони та плоди, які пройшли через сито відбору, мають вирізнятися високим рівнем гетерозиготності за геном адипонектину. Деякі дослідження [7] показали, що стимуляція TLR-4 (toll like receptor-4) та TLR-2 (toll-like receptor-2) рецепторів призводить в інсулінчутливих тканинах до порушення внутрішньоклітинного сигнального ланцюга інсуліну, тобто до ІР. Слід зазначити, що при переїданні активація TLR-4 адипоцитів та гепатоцитів насиченими жирними кислотами призводить до непередбаченого еволюцією стану, коли енергетичні субстрати, які виділяються, залишаються невикористаними і, як наслідок, накопичуються в жирових та печінкових клітинах. Безумовно, генетичні чинники також сприяють трансформації фізіологічної ІР у патологічну. Останнє робить актуальними рекомендації щодо уникнення надлишку використання калорійних харчів та ведення фізично активного способу життя.

У центрі уваги вчених знаходиться також і дослідження факторів ризику розвитку ожиріння у дитячому віці, зокрема ролі маси тіла при народженні та тривалості грудного вигодовування. Вважається, що як низька, так і велика маса щодо терміну гестації дитини є предиктором формування у неї ІР у подальшому. Встановлено, що грудне вигодовування протягом 6 місяців достовірно знижує виникнення ІР та метаболічного синдрому у старшому віці. Дослідники підкреслюють виключну роль грудного молока у регуляції ліпідного обміну, адже з'ясовано, що грудне вигодовування знижує рівень загального холестерину у сироватці крові [8].

Незважаючи на численні дослідження у вивченні даної патології, остання продовжує неухильно прогресувати. Тому виникла необхідність провести клініко-генеалогічне обстеження дітей з ожирінням, яке дозволить виділити сім'ї зі спадковою обтяженістю щодо ожиріння, розрахувати рекурентний ризик виникнення ожиріння у сім'ях і своєчасно розпочати профілактичні заходи, спрямовані на максимальне зменшення дії чинників середовища, загальне оздоровлення організму дитини, раціональне харчування тощо.

Метою роботи були виявлення спадкової схильності та розробка критеріїв прогнозу щодо формування ожиріння у дітей та підлітків.

© КОВАЛЬОВА В. І., БУДРЕЙКО О. А., КОСОВЦОВА Г. В.

Матеріали і методи

Збір генеалогічного матеріалу проводився за П. Харпером [9]. Клініко-генеалогічний аналіз виконано в 50 сім'ях дітей та підлітків з ожирінням. Статистична обробка результатів проводилася за допомогою пакетів прикладних програм *Excel, SPSS Statistica 17,0.* Кореляція між батьками та дітьми оцінювалась як кореляція якісних ознак у зв'язаних вибірках за таблицею спряженості «2×2» [10].

$$x^2 = \frac{(ad - bc)^2 N}{a+b \quad c+d \quad a+c \quad (b+d)};$$

$$r = \sqrt{\frac{x^2}{N}}$$

де r — коефіцієнт спряженості.

Для розкладу загальної фенотипічної дисперсії на середовищну (E) та генетичну (G) компоненти використовували показник спадковості у вузькому розумінні ($h^2 = G = 2\ r_{or}$; $E = 1 - G_{tot}$), де r_{or}– коефіцієнт кореляції між батьками-дітьми за досліджуваними ознаками.

Для виділення критеріїв прогнозу у формуванні вивченої патології був розроблений прогностичний алгоритм. Застосовано методику послідовної (секвенціальної) процедури Вальда з визначенням інформативності ознак за допомогою критерію Кульбака, який дозволяє кількісно виразити отримані відмінності та оцінити міру їх прогностичної значущості. Використовували загальноприйняту таблицю порогових сум прогностичних коефіцієнтів (ПК), при якій прогностичний поріг досягався сумою балів ПК, рівною ±13 [11]. На основі отриманих даних було складено таблицю прогнозування формування ожиріння у дітей та підлітків.

Результати та обговорення

Клініко-генеалогічний аналіз, проведений у сім'ях дітей з ожирінням, дозволив встановити, що у 98,3 % обстежених мала місце спадкова схильність до основних неінфекційних захворювань.

Аналіз родоводів показав, що у родичів першого ступеня спорідненості (110 осіб) патологія серцево-судинної системи спостерігалась у 23,64 %, ендокринної системи та травного тракту — у 9,09 % та 10,0 % випадках відповідно. Надлишкова маса тіла та ожиріння зустрічалися у 33,64 %. Гінекологічні захворювання становили 5,45 %. Патологія опорно-рухового апарату реєструвалась у 6,36 % випадків. Частота захворювань нервової, дихальної та сечовивідної систем склала 1,82 %, 1,82 % та 2,73 % відповідно.

Серед родичів другого ступеня спорідненості (272 особи) патологія серцево-судинної системи відзначалась у 28,31 % випадків. Аналіз родоводів дозволив встановити також, що ендокринні захворювання зустрічалися у 2,57 %, а 15,81 % хворих дітей мали обтяжений спадковий анамнез за надлишковою масою тіла та ожирінням. Визначення частоти захворювань травного тракту дозволило встановити, що дана патологія відзначалась у 3,68 % випадків. Гінекологічні захворювання становили 1,10 %. Патологія опорно-рухового апарату спостерігалась у 1,09 % випадках. Частота захворювань нервової та дихальної систем склала 1,10 % та 2,57 % відповідно. Злоякісні новоутворення реєструвались у 3,68 % родичів.

У родичів третього ступеня спорідненості (138 осіб) патологія серцево-судинної системи спостерігалась у 24,64 %. Захворювання ендокринної системи та травного тракту становили 8,70 %, 1,45 % відповідно. Надлишкова маса тіла реєструвалась у 4,35 % обстежених. Визначення частоти захворювань опорно-рухового апарату дозволило встановити, що дана патологія реєструвалась у 1,24 % випадках. Захворювання сечовивідної системи становили 1,02 %. Злоякісні новоутворення реєструвалися у 9,42 % родичів. Таким чином, клініко-генеалогічний аналіз, проведений у хворих дітей, дав змогу визначити, що 98,3 % обстежених мають схильність до мультифакторної патології.

Обчислення фенотипічних кореляцій батьки-діти показало наявність відмінностей у величині показника успадкування і, відповідно, генетичної компоненти відносно виявленої патології. Так, кореляція батьки-діти була найбільш низькою для патології серцево-судинної системи (r = 0,137) і найбільш високою для нервово-психічної (r = 0,347), злоякісних новоутворень (r = 0,340) і сечовивідної системи (r = 0,328). Для дихальної, шлунково-кишкової й ендокринної патології кореляції між групою батьки-діти дорівнювали 0,280, 0,272 та 0,200 відповідно (табл. 1).

Визначення фенотипічної кореляції батьки-діти дозволило встановити різницю у значенні коефіцієнта спадковості h^2. Найвищим цей показник був для нервово-психічної сфери —

Таблиця 1

Кореляція батьки-діти та показник спадковості захворювань окремих систем організму

Системи	Статистичний показник	Значення
Серцево-судинна система	r	0,137
	h	0,274
	E	0,726
Ендокринна система	r	0,200
	h	0,400
	E	0,600
Шлунково-кишкова система	r	0,272
	h	0,544
	E	0,456
Нервово-психічна система	r	0,347
	h	0,694
	E	0,306
Сечовивідна система	r	0,328
	h	0,657
	E	0,343
Дихальна система	r	0,280
	h	0,560
	E	0,440
Злоякісні новоутворення	r	0,340
	h	0,680
	E	0,320
Захворювання опорно-рухового апарату	r	0,285
	h	0,570
	E	0,430
Загальна ураженість	r	0,169
	h	0,338
	E	0,662

0,694; трохи меншим — для злоякісних новоутворень — 0,680. Значення коефіцієнта спадковості для сечовивідної системи відповідало 0,657, а для захворювань опорно-рухового апарату — 0,570. Для дихальної системи — 0,560; меншою була величина h^2 для патології шлунково-кишкового тракту (0,544), ендокринної (0,400) та серцево-судинної (0,274) систем.

Отримані результати свідчать про те, що величина внеску генетичної компоненти коливалася від 27 до 68%. Сумарний внесок генетичної компоненти в патологічну ураженість на хронічні неінфекційні захворювання дітей, хворих на ожиріння, становить 34%, на долю середовищної компоненти дісталося 66%.

При аналізі перинатального анамнезу було встановлено, що фізіологічний перебіг вагітності виявлявся у 54% матерів. Загроза переривання вагітності спостерігалася в 28%, ускладнення вагітності гестозом першої та другої половини дорівнювало 12% та 8% відповідно. Фізіологічний перебіг пологів відзначався у 54% випадків, передчасні пологи — у 2%. Медикаментозна стимуляція в пологах використовувалась у 8% випадків, оперативна допомога породіллям — у 28%. За результатами нашого дослідження, малу масу тіла при народженні менше 2500 г виявлено у 2 дітей, масу тіла при народженні, яка перевищувала 4000 г, виявлено в 6 випадках, решта становила (3485,0 ± 440,0) г. Аналіз харчового анамнезу в ранньому віці встановив, що 30% обстежених після народження вигодовувалися грудним молоком, 34% дітей одразу після народження були переведені на штучне вигодовування, 36% знаходилися на змішаному.

При складанні родоводів сімей пробандів із досліджуваною патологією встановлено, що найчастіше у хворих дітей реєструвалася вітряна віспа (66%), друге місце посідав епідемічний па-

Таблиця 2

Критерії прогнозування формування ожиріння у дітей та підлітків

Ознака	Градація ознаки	ПК	Інформативність ознаки
Обтяжена спадковість до ожиріння	є	+13,1	4,7
	немає	–6,1	
Загроза переривання вагітності	є	+4,0	0,4
	немає	–0,9	
Гестоз I половини вагітності	є	+3,4	0,3
	немає	–0,8	
Патологічні пологи	є	+3,3	0,8
	немає	–2,3	
Кесарів розтин	є	+5,8	0,7
	немає	–1,1	
Штучне вигодовування	є	+5,1	0,8
	немає	–1,4	

ротит (1,2 %), третє — вітряна віспа (1 %). Скарлатина і кір відзначалися з частотою 4 % та 2 % відповідно.

Було встановлено, що серед виділених прогностичних показників найбільша інформативність та прогностична цінність відзначалася для таких ознак, як обтяжена спадковість до ожиріння. Досить високою інформативною вагою володіли такі ознаки, як кесарів розтин та штучне вигодовування. Меншу інформативну значущість мали такі показники, як загроза переривання вагітності, гестоз I половини та патологічний перебіг пологів (табл. 2).

На основі проведеного аналізу виділено шість ознак, які є прогностичними у формуванні ожиріння у дітей та підлітків. Використання цих критеріїв дозволить не тільки виявляти осіб підвищеного генетичного «ризику», але й своєчасно проводити комплекс профілактичних заходів щодо підвищення адаптаційних можливостей організму.

Висновки

Проведене дослідження показало, що 98,3 % хворих дітей мають схильність до мультифакторної патології. Обчислення фенотипічної кореляції батьки-діти дало змогу визначити сумарний внесок генетичної компоненти в патологічну ураженість на хронічні неінфекційні захворювання дітей, хворих на ожиріння, величина якої становить 34 %, на долю середовищної компоненти дісталося 66 %. Встановлено, що серед виділених прогностичних показників найбільша інформативність та прогностична цінність відзначалася для таких ознак, як обтяжена спадковість до ожиріння та загроза переривання вагітності.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ткачук Н. І., Тимчук Є. В. Діагностичні маркери надмірної маси тіла та ожиріння у дітей раннього віку // Перинатология и педиатрия.— 2012.— № 49.— С. 64–66.
2. Окороков П. Л., Васюкова О. В., Воронцов А. В., Ильин А. В., Владимирова В. П., Аверкиева Е. В. Уровни адипоцитарного белка — переносчика жирних кислот и адипонектина у подростков с ожирением и их связь с распределением жировой ткани // Проблемы эндокринологии.— 2014.— № 2.— С. 13–19.
3. Тяжка О. В., Мінченко Д. О., Молявко О. С., Давидов В. В., Будрейко О. А., Кулєшова Д. К., Мінченко О. Г. Експресія генів ALDOC, TIGAR, ENO1 та ENO2 у клітинах крові дітей чоловічої статі з ожирінням, ускладненим резистентністю до інсуліну // Современная педиатрия.— 2014.— 62, № 6.— С. 112–115.
4. Майданник В. Г. Клинические рекомендации по диагностике и лечению метаболического синдрома и ожирения у детей и подростков // Международный журнал педиатрии, акушерства и гинекологии.— 2014.— 6, № 2.— С. 39–55.
5. Воронько О. Е., Бодаев Н. В., Арчаков А. И. Использование SNP-маркеров для оценки индивидуальной генетической предрасположенности к сахарному диабету типа 1 и 2 // Биомедицинская химия.— 2007.— 53, вып. 4.— С. 374–384.
6. Атраментова Л. А., Караченцев Ю. И., Горшунская М. Ю., Тыжненко Т. В., Почерняев А. К., Опалейко Ю. А. Однонуклеотидные полиморфизмы + 45 T/G и + 276G/T гена FDIPOQ у больных сахарным диабетом 2 типа и здоровых людей // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / Під ред. В. А. Кунаха [та ін.].— К.: Логос, 2011.— 11.— С. 456–460.
7. Караченцев Ю. И., Горшунская М. Ю., Атраментова Л. А. Кравчун Н. А., Тыжненко Т. В., Лещенко Ж. А., Почерняев А. К., Полторак В. В. Гетерозиготность по SNP +276 G > T гена адипонектина как потенциальный предиктор устойчивости к сахарному диабету 2 типа // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної та медичної генетики.— 2010.— Вип. 19, № 3.— С. 195–199.
8. Павлишин Г. А., Козак К. В. Вплив адипонектину на виникнення метаболічних порушень у дітей з надмірною масою та ожирінням // Неонатологія, хірургія та перинатальна медицина.— 2014.— IV, № 1 (11).— С. 62–66.
9. Харпер П. Практическое медико-генетическое консультирование.— М.: Медицина, 1989.— 302 с.
10. Беневоленская Л. И., Бржезовский М. М. Эпидемиология ревматических болезней.— М.: Медицина, 1988.— 238 с.
11. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях.— Л.: Медицина, 1973.— 141 с.

KOVALYOVA V.I., BUDREYKO O.A., KOSOVTSOVA G.V.

SI «Institute for Children and Adolescents Health Care of the NAMS of Ukraine»,
Ukraine, 61153, Kharkiv, pr. 50-letya VLKSM, 52-A, e-mail: iozdp@iozdp.org.ua

THE ROLE OF HEREDITARY AND UNFAVORABLE FACTORS DURING PERINATAL PERIOD IN THE FORMATION OF OBESITY IN CHILDREN AND ADOLESCENTS

Aims. To establish hereditary predisposition to the formation of obesity and determine prognostic criteria for its development in children and adolescents. ***Methods.*** Collection of genealogical materials was carried out according to P. Harter. Clinico-genealogical analysis was performed in 50 families of children and adolescents with obesity. The child-parent correlation was estimated as relationships of qualitative features in the related samples according to the 2x2 contingency table. A prognostic algorithm was developed to distinguish the predictive criteria for the formation of the pathology under investigation. ***Results.*** Clinico-genealogical analysis made it possible to reveal a hereditary predisposition to the main noncontiguous diseases in 98.3 % of the examined patients. Among the established prognostic parameters most informative and predicative was the hereditary burden of obesity. ***Conclusion.*** Calculation of the child-parent phenotypic correlation enabled the authors to determine a total contribution (34 %) of the genetic component to pathological prevalence of chronic diseases in children with obesity. The share of the environmental component came to 66 %.

Keywords: children, adolescents, obesity, families, bloodline.

УДК 575:616.379-008.64

КОЗАК Н. А.[1], ПОЧЕРНЯЕВ А. К.[2], ЛЫТКИН Д. В.[1], ГОРШУНСКАЯ М. Ю.[3], ПОЧЕРНЯЕВА С. С.[2]

[1] Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Украина, 61022, г. Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: kozaknatasha@mail.ru

[2] ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского НАМН Украины», Украина, 61002, г. Харьков, ул. Артема, 10, e-mail: pochernyaev.ak84@mail.ru

[3] Харьковская медицинская академия последипломного образования, Украина, 61176, г. Харьков, ул. Корчагинцев, 58

ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-6 (*IL-6*) У ЖИТЕЛЕЙ ХАРЬКОВА, БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

В настоящее время для многих мультифакториальных заболеваний, таких как сахарный диабет, ведётся поиск генов-кандидатов. Уже надежно идентифицированы несколько локусов, которые отвечают за развитие сахарного диабета 1 и 2 типов. Но имеются гены, ассоциация которых с сахарным диабетом остаётся под вопросом. Одним из них является ген интерлейкина-6 (*IL-6*) [1].

Повышенный уровень интерлейкина-6 связан не только с сахарным диабетом, но и с нарушенной толерантностью к глюкозе, что указывает на потенциальную роль этого цитокина в этиологии сахарного диабета. Интерлейкин-6 представляет собой макромолекулы, которые продуцируют лимфоциты [4], а также моноциты, макрофаги, $CD4^{+}$Th2-лимфоциты, клетки стромы костного мозга, фибробласты, гепатоциты и ряд других клеток. Эти про- и противовоспалительные цитокины влияют на индукцию В-лимфоцитов, стимулируя их превращение в плазматические клетки, способные вырабатывать антитела [5]. Интерлейкин-6 влияет на клетки-мишени посредством их взаимодействия со специфическими рецепторами на поверхности, чем способен воздействовать на рост костной ткани, ангиогенез, развитие опухолей, расщепление жиров и резистентность миоцитов к инсулину [6].

Предполагается, что концентрация интерлейкина-6 регулируется в основном на уровне транскрипции и трансляции. Таким образом, обнаружение единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP) в промоторной области гена *IL-6* дают возможность рассматривать некоторые его аллели в качестве факторов риска сахарного диабета. Недавнее исследование доказало ассоциацию полиморфизма *rs2069840 C*-174*G* с диабетом у жителей Аугсбурга (Германия) [2], у коренных американцев и у белых испанцев [3].

Ген *IL-6* находится в локусе 7p21, включает пять экзонов [7]. Продукт гена активирует эндотелиальные клетки и обеспечивает сбор лейкоцитов около стенок сосудов. Предполагается, что активность интерлейкина-6 может приводить к постепенному разрушению β-клеток поджелудочной железы [1]. Генетическим маркером гена *IL-6* является полиморфизм, в результате которого происходит замена гуанина (*G*) на цитозин (*C*) в позиции 174 (174*G/C*). Данный полиморфизм влияет на уровень экспрессии гена, изменяя скорость его транскрипции [8].

Целью данного исследования было провести пилотное исследование по изучению связи однонуклеотидного полиморфизма *rs2069840* (174*G/C*) гена интерлейкина-6 у населения Харькова.

Материалы и методы

Исследованы образцы крови 60 больных сахарным диабетом 2 типа (33 мужчины и 27 женщин). Контрольную группу составили 49 человек (26 мужчин и 23 женщины) без диагноза сахарный диабет 2 типа, ишемической болезни и артериальной гипертензии. Все обследованные были жителями Харькова, украинцами и русскими. Образцы крови здоровых людей собраны на Харьковской областной станции переливания крови при условии добровольного информированного согласия.

ДНК выделялось из лейкоцитов с помощью ионообменной смолы Chelex-100 [9]. Определение аллельного состояния гена *IL-6* по однонуклеотидной замене 174*G/C* (*rs2069840*) проводили с помощью полимеразной цепной реакции. Для амплификации фрагмента гена *IL-6*, в котором находится полиморфный сайт 174*G/C,* использовались олигонуклеотидные праймеры — прямой IL6174F: TGACTTCAGCTTTACTCTTTGT и об-

© КОЗАК Н. А., ПОЧЕРНЯЕВ А. К., ЛЫТКИН Д. В., ГОРШУНСКАЯ М. Ю., ПОЧЕРНЯЕВА С. С.

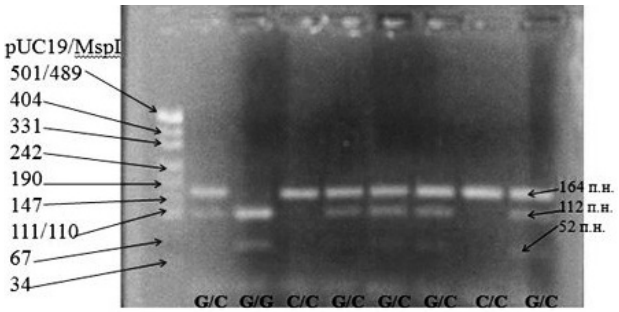


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов рестрикции амплифицированных в ПЦР фрагментов SNP *rs2069840* гена *IL-6*

ратный IL6174R: AATAGGTTTTGAGGGCCATG. Рестрикцию продуктов амплификации осуществляли с помощью эндонуклеазы Hin1II (NlaIII) (MBI Fermentas, Литва). Генотипы исследуемых определяли по виду электрефореграммы (рис. 1). Продукты рестрикции анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле в 1xTBE. В качестве маркера молекулярной массы была использована ДНК pUC19, которая была гидролизирована нуклеазой MspI (MBI Fermentas, Литва). Визуализацию продуктов амплификации и рестрикции проводили путем подкрашивания геля бромистым этидием и фотографированием на трансилюминаторе в ультрафиолетовом свете. Рестриктный фрагмент размером 164 п.н. соответствовал аллелю (*C*), два рестриктных фрагмента размером 112 и 52 п.н.— аллелю (*G*) [10].

Рассчитаны частоты аллелей p_C и q_G. Ассоциацию сахарного диабета 2 типа с изученным локусом оценивали с помощью критерия χ^2. Сравнение долей проведено с помощью φ-трансформации и критерия *F* [11]. Силу и направление ассоциации аллеля с сахарным диабетом оценивали с помощью тетрахорического показателя связи *r* [12]. Рассчитаны показатели отношения шансов (*OR*), чувствительность и специфичность теста, индекс точности теста. Прогностическую ценность положительного и отрицательного результатов вычисляли из расчёта распространённости сахарного диабета среди населения Харьковской области. Проверку статистических гипотез проводили на уровне значимости 0,05.

Результаты и обсуждение

Частоты аллелей и распределение генотипов у мужчин и женщин статистически значимо не различались, поэтому дальнейшие расчёты проводились на общей группе. Проверка распределения генотипов по SNP 174 *G/C* гена *IL-6* у здоровых людей на соответствие равновесию Харди-Вайнберга, показала, что распределение генотипов значимо не отличалось от теоретически ожидаемого (табл. 1).

Частоты аллелей p_C и q_G в контрольной группе равняются 0,5, у больных сахарным диабетом 2 типа $p_C = 0{,}6$ и $q_G = 0{,}4$ ($p > 0{,}05$, табл. 2).

Хотя в распределении генотипов у больных и здоровых людей не выявлено статистически значимой разницы (табл. 3), тем не менее, следует отметить, что частота генотипа *GG* у больных на 20% выше, чем в контрольной группе (30,0 и 24,5%, соответственно). Немного повышена также и частота генотипа *CG* (55 и 51%). Частота генотипа *CC* у больных сахарным диабетом понижена по сравнению с контролем (15,0 и 24,5% соответственно).

На силу и направление ассоциации генотипа *CC* с сахарным диабетом 2 типа указывает тетрахорический показатель связи: $r = 0{,}06$ ($p > 0{,}05$).

Отношение шансов для сахарного диабета 2 типа при каждом из трёх генотипов составляет: $OR_{CC} = 1{,}32$; $OR_{CG} = 1{,}17$; $OR_{GG} = 0{,}54$. Полученные результаты, которые следует рассматривать как предварительные, свидетельствуют, что носительство аллеля *C* в изученном населении является фактором повышенного риска по сахарному диабету 2 типа. В терминах классической генетики аллель *C* в отношении сахарного диабета проявляет эффект полудоминирования. Генотип *GG* можно рассматривать как потенциально протективный в отношении сахарного диабета 2 типа.

Чувствительность данного диагностического метода составила 15%, а его специфичность — 76%. При этом прогностическая ценность положительного результата, которая отражает вероятность быть больным при положительном показателе, не превышает двух процентов. Прогностическая ценность отрицательного результата составляет 97%. Индекс точности равняется 74%. Отношение правдоподобия положительного результата составляет 0,63; отношение правдоподобия отрицательного результата — 1,6. Для статистического доказательства обнаруженных эффектов необходимо повысить мощность критерия до принятого уровня $P = 80\%$, доведя объём каждой из сравниваемых групп до $n = 270$ [13].

В отличие от полученных нами данных, в работах [2, 3, 8] протективные свойства в от-

Таблица 1

Проверка популяционной выборки на соответствие равновесию Харди-Вайнберга по rs2069840 гена *IL-6*

Распределение	Количество людей (*n*) с генотипами		
	CC	*CG*	*GG*
Фактическое	12,0	25,0	12,0
Теоретически ожидаемое	12,3	24,5	12,3
Статистики	$\chi^2 = 0{,}024$; $\chi^2_{0{,}05\,(1)} = 3{,}84$; $p > 0{,}05$		

Примечания: χ^2 — рассчитанный критерий Пирсона; $\chi^2_{0{,}05\,(1)}$ — пороговое значение критерия; *p* — уровень значимости разницы между фактическими данными и теоретически ожидаемыми.

Таблица 2

Частота аллеля G rs2069840 гена *IL-6* у больных сахарным диабетом 2 типа и здоровых людей

Группа	Частота аллеля *G*	
	контроль	сахарный диабет 2 типа
Мужчины	0,48	0,47
Женщины	0,52	0,37
Все	**0,50**	**0,43**

Таблица 3

Соотношение генотипов rs2069840 гена *IL-6* у больных и здоровых

Группа	Генотипы, %		
	GG	*CG*	*CC*
Контроль	24,5	51,0	24,5
Сахарный диабет 2 типа	15,0	55,0	30,0
Статистики	$F_{GG} = 0{,}24$; $F_{CG} = 0{,}09$; $F_{CC} = 0{,}11$; $F_{0{,}05\,(1)} = 4{,}40$; $p > 0{,}05$		

Примечания: F — критерий Фишера, *p* — уровень значимости разницы между долями.

ношении сахарного диабета 2 типа были отмечены у генотипа *CC*. Неоднозначность результатов, полученных в разных исследованиях, статистическая незначимость ряда из них указывают на целесообразность включить данные разных авторов в метаанализ.

Целесообразность дальнейшего набора данных определяется ценностью этого теста, что можно оценить по результатам данного исследования.

Выводы

1. Распределение генотипов SNP *rs2069840* гена интерлейкина-6 в харьковской популяции не отклоняется от равновесия Харди-Вайнберга.

2. По результатам пилотного исследования обнаружено, что генотип *CC* повышает риск развития сахарного диабета 2 типа у жителей Харькова в 1,2 раза.

Авторы выражают благодарность профессору Л. А. Атраментовой за помощь в статистическом анализе и профессору В. В. Полторак за помощь в обсуждении результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Носиков В. В., Серегин Ю. А. Молекулярная генетика сахарного диабета типа 1: достижения и перспективы // Молекулярная биология.— 2008.— 42, № 5.— С. 867–879.
2. Illig T., Bongardt F., Schöpfer A., Müller-Scholze S., Rathmann W., Koenig W., Thorand B., Vollmert C., Holle R., Kolb H., Herder C. Kooperative Gesundheitsforschung im Raum Augsburg. Cooperative Research in the Region of Augsburg. Significant association of the interleukin-6 gene polymorphisms C-174G and A-598G with type 2 diabetes // J. Clin. Endocrinol. Metab.— 2004.— 89.— P. 5053–5058.
3. Vozarova B., Fernández-Real J.M., Knowler W. C., Gallart L., Hanson R. L., Gruber J. D., Ricart W., Vendrell J., Richart C., Tataranni P. A., Wolford J. K. The interleukin-6. (–174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians // Hum Genet 112.— 2003.— P. 409–413.
4. Черешнев В. А., Гусев В. Ю. Иммунология воспаления: роль цитокинов // Медицинская иммунология.— 2001.— 3, № 3.— С. 361–368.
5. Попов Н. Н., Лавров В. Ф., Солошенко Э. Н. Клиническая иммунология и алергология: Учеб. пособие.— М.: ООО Фирма «Релнфор», 2004.— 524 с.

6. Pedersen B., Steensberg A., Schjerling P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects // J. Physiol.— 2001.— 536.— P. 329–337.
7. Yasukawa K., Hirano T., Watanabe Y., Muratani K., Matsuda T., Nakai S., Kishimoto T. Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene // EMBO J.— 1987.— 7, N 10.— P. 2939–2945.
8. Коненков В. И., Шевченко А. В., Прокофьев В. Ф., Климонтов В. В., Королев М. А., Фазуллина О. Н., Лапсина С. А., Королева Е. А. Ассоциации вариантов гена фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) и генов цитокинов (IL-1B, IL-4, IL-6, IL-10, TNFA) с сахарным диабетом 2 типа у женщин // Сахарный диабет.— 2012, № 3.— С. 4–10.
9. Walsh P. S., Metzger D. A., Higuchi R. Chelex 100 as a mediumforextractionof DNA for PCR-basedtyping from forensicmaterial // BioTechniques.— 1991.— 10.— P. 506–513.
10. Fernandez-Real J.M., Broch M., Vendrell J., Richart C., Ricart W. Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects // Clin. Endocrinol. Metab.— 2000.— 85, N 3.— P. 1334–1339.
11. Атраментова Л. А., Утевская О. М. Статистические методы в биологии.— Горловка: ЧП «Видавництво Ліхтар», 2008.— 248 с.
12. Плохинский Н. А. Биометрия.— М.: МГУ, 1970.— С. 367–368.
13. Атраментова Л. А. Дизайн и статистика биологического исследования.— Харьков: Издательство «НТМТ», 2014.— 255 с.

KOZAK N.A.[1], POCHERNYAYEV A.K.[2], LYTKIN D.V.[1], GORSHUNSKA M. Yu.[3], POCHERNYAYEVA S.S.[2]

[1] V.N. Karazin Kharkiv National University,
Ukraine, 61022, Kharkiv, Svobody sq., 8, e-mail: kozaknatasha@mail.ru

[2] State Institution «V. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology Problems of National Academy of Medical Science of Ukraine»,
Ukraine, 61002, Kharkiv, Artema str., 10, e-mail: pochernyaev.ak84@mail.ru

[3] Kharkiv Medical Postgraduate Academy,
Ukraine, 61000, Kharkiv, Korchagintcev str., 58

SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM OF INTERLEUKIN-6 (*IL-6*) IN RESIDENTS OF KHARKIV PATIENTS WITH TUPE 2 DIABETES MELLITUS

Aims. To examine the association between SNP rs2069840 (174G / C) of interleukin-6 gene and type 2 diabetes in the population of Kharkov. Objects were venous blood samples of 60 patients with type 2 diabetes and 49 healthy persons (all residents of Kharkiv, Ukrainian and Russian). ***Methods.*** Genotyping by PCR-RFLP. ***Results.*** The distribution of genotypes for SNP *rs2069840* corresponds to the Hardy-Weinberg equilibrium. Allele frequencies in the control group is 0.5; in the group of patients $p_C = 0.4$, $q_G = 0.6$. The weak non-significant association between *CC* genotype and type 2 diabetes was marked. The odds ratio for genotype *GG* is 0.54. The sensitivity of the test is 15 %, specificity — 76 %. The positive predictive value is equal to 2 %, negative — 97 %, the accuracy of the test is 74 %, positive likelihood ratio result is 0.63, a negative — 1.6. ***Conclusions.*** The distribution of genotypes for SNP *rs2069840* of interleukin-6 in the Kharkov population does not deviate from the Hardy-Weinberg equilibrium. According to the results of a pilot study was founded that the *CC* genotype increases the risk of type 2 diabetes in 1.2 times.

Keywords: type 2 diabetes mellitus, interleukin-6 gene, Kharkov population, allele frequencies.

УДК 575.113.2:616.858-008.6:616.8-056.76

КОЛЯДА А. К.[1], ВАЙСЕРМАН А. М.[1], КРАСНЕНКОВ Д. С.[1], ПЛЕТНЕВА Т. В.[1, 2], КАРАБАНЬ И. Н.[1]

[1] Государственное учреждение «Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарёва НАМН Украины», Украина, 04114, г. Киев, ул. Вышгородская, 67, e-mail: alex.genetic@gmail.com

[2] Частное высшее учебное заведение «Киевский медицинский университет УАНМ», Украина, 01004, г. Киев, ул. Льва Толстого, 9, e-mail: pletneva1706@gmail.com

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА В УКРАИНЕ

Болезнь Паркинсона (БП) является вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием, которое встречается среди людей старше 65 лет [1]. При данной патологии происходит гибель дофаминергических нейронов черной субстанции и накопление в межклеточном пространстве агрегатов α-синуклеина и других характерных белковых комплексов [2]. Фенотипическими проявлениями болезни являются тремор покоя, брадикинезия и постуральные нарушения.

В развитии БП существенную роль играет генетический фактор. Так, семейные формы заболевания составляют около 5–10 % случаев. При этом болезнь характеризуется выраженной генетической гетерогенностью. В настоящее время выявлены 16 генов-кандидатов, полиморфизмы которых ассоциированы с БП [3]. Кроме того, продолжается активный поиск мутаций, которые могут быть связаны с разными звеньями патогенеза заболевания. На молекулярном уровне моногенные формы БП являются генетически опосредованной патологией ряда митохондриальных белков, компонентов убиквитин-протеасомного комплекса или белков, замена конформации которых приводит к необратимым изменениям в клетке с формированием нерастворимых включений, что инициирует реакции окислительного стресса и апоптоза. Также были проведены многочисленные эпидемиологические исследования для выяснения влияния факторов окружающей среды на развитие БП. Выявлено, что риск развития болезни растет при длительном контакте с пестицидами [4]. Однако вопросы соотношения этих факторов, их популяционной специфичности, а также профилактики до настоящего времени разработаны не в полной мере. Целью нашей работы было провести генотипирование пациентов с БП и неврологически здоровых людей по генам, вызывающим БП (*GBA, SNCA, LRRK2*) и повышающим склонность к заболеванию (*APOE*), а также определить длину теломер в клетках буккального эпителия и лейкоцитах периферической крови.

Материалы и методы

Генотипирование проводили методом ПДРФ-ПЦР. Использовали образцы крови 216 пациентов с БП (средний возраст 65,0 ± 0,7 лет, 116 мужчин и 100 женщин) и контрольной группы из 300 человек (средний возраст 67,0 ± 0,4 лет, 200 мужчин и 100 женщин). Выделение ДНК проводили из цельной крови с помощью набора «ДНК-Сорб В» (Россия). Амплификацию изученных локусов осуществляли с использованием сайт-специфических праймеров на амплификаторе «CorbettResearch PCR ThermalCycler» производства компании «Corbett LifeScience». Рестрикцию полученных ампликонов проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя специфических рестриктаз (Fermentas). Результаты амплификации и рестрикции оценивались путем проведения вертикального электрофореза в 3 % агарозном геле.

Определение длины теломер в лизате клеток проводили методом ПЦР с детекцией флуоресценции в реальном времени по методике Cawthon, 2009 [5]. Для амплификации теломерных последовательностей использовали праймеры telg ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTG GGTTTGGGTTAGTGT и telc TGTTAGGTATC CCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAACA, для амплификации однокопийного референсного гена альбумина использовали праймеры albc CG GCGGCGGGCGGCGCGGGCTGGGCGGAAAT GCTGCACAGAATCCTTG и albd GCCCGGCCC GCCGCGCCCGTCCCGCCGGAAAAGCATGGT CGCCTGT.

Относительную длину теломер оценивали по показателю T/S, который рассчитывали как отношение числа копий теломерных повторов к числу копий гена альбумина.

© КОЛЯДА А. К., ВАЙСЕРМАН А. М., КРАСНЕНКОВ Д. С., ПЛЕТНЕВА Т. В., КАРАБАНЬ И. Н.

Математическую обработку результатов проводили с использованием пакетов статистических программ Statistica v.5.5 [StatSoft Inc., USA] и MS Excel 98. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателей отношения шансов (odds ratio, OR). Фактическую (H_e) и теоретическую (H_o) гетерозиготность популяций вычисляли при помощи метода Россета-Раймонда. Панмиктичность популяции рассчитывали по формуле равновесия Харди-Вайнберга. Для определения разницы между частотами аллелей в контрольной и опытной группах использовали критерий χ^2. Статистическую значимость различий величины показателя T/S в контрольной группе и у пациентов с БП определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Проведено генотипирование мутации *g.40734202G > A* в 41-м экзоне гена *LRRK2*, которая приводит к замене остатка глицина на остаток серина в позиции 219 кодируемого геном белка. По результатам генотипирования все участники контрольной группы оказались носителями аллеля A, носителей аллеля G обнаружено не было (табл.). Контрольная группа была представлена носителями только одного генотипа — *g.40734202GG*, а генотипов *g.40734202AA* и *g.40734202AG* не обнаружено. Оценка гетерозиготности по методу Россета-Раймонда не дала результатов, так как в контрольной группе не было носителей AG генотипа.

В группе пациентов с БП обнаружены носители аллеля *g.40734202A* (0,93%). Таким образом, в группе больных присутствовали как гетерозиготы *g.40734202AG* (1,85%), так и гомозиготы по *g.40734202G* аллелю (98,15%). Проверка по критерию χ^2 показала, что различия между контрольной и исследуемой группами являются достоверными ($df = 2$, $p < 0,05$). С помощью формулы равновесия Харди-Вайнберга установлено, что группа является панмиктической и может считаться репрезентативной.

Генотип *g.40734202AA* не был обнаружен ни в контрольной группе, ни среди больных. Сходные результаты получены в исследованиях, проведенных и на других популяциях, что, по-видимому, связано с низкой частотой данного аллеля или летальностью генотипа AA [6]. Данная мутация является наиболее встречающейся мутацией гена *LRRK2*. Ее частота в популяциях Европы составляет до 4,6% у больных спорадической формой БП и 11,5% у больных с семейной формой БП. У евреев ашкенази частота мутации, по некоторым данным, достигает 13,3% у спорадических больных и 29,7% у больных с семейной формой БП. У жителей России она выявляется у 13% пациентов с семейной формой и у 0,5% — при спорадической форме [7]. У арабов Северной Африки частота мутации составляет 40,8% у спорадических больных и 37,0% у больных с семейной формой БП [8, 9]. В то же время эта мутация крайне редко встречается у монголоидов [10].

Таблица

Частоты встречаемости генотипов и аллелей генов в исследуемых группах

Ген	Мутация	Генотип	Контроль	БП	χ^2, p (df = 2)
LRRK2	*g.40734202G > A*	GG	300 (100)	212 (98,15)	25,81, p = 0,0034
		AG	0	4 (1,85)	
		AA	0	0	
		G	100	99,07	
		A	0	0,93	
GBA	*c.1226A > G*	AA	300 (100)	211 (97,69)	26,40, p = 0,008
		AG	0	5 (2,31)	
		GG	0	0	
	Частота аллелей	A	100	98,84	
		G	0	1,16	
GBA	*c.483T > C*	TT	300 (100)	212 (98,15)	25,81, p = 0,0034
		TC	0	4 (1,85)	
		CC	0	0	
		T	100	99,07	
		C	0	0,93	

Также исследован ген *GBA*, кодирующий глюкоцереброзидазу. При недостатке данного фермента лизосомальные макромолекулы накапливаются в различных клетках организма, в особенности в нейронах. Накопление жировых отложений в мозге нарушает его кровоснабжение, что приводит к снижению функциональности и активности структур мозга. Многочисленные данные свидетельствуют о повышенном риске развития БП, ассоциированном с гетерозиготным носительством мутаций в данном гене [11]. Анализ контрольной группы показал, что все исследуемые имеют с.483TT генотип, частота аллеля T составляет 100%. 483C аллеля в контрольной группе обнаружено не было.

В группе пациентов с БП частота встречаемости генотипа с.*483TC* составила 1,83 ± 0,0042%, генотипа с.*483TT* — 98,15 ± 0,0042%. В данной группе выявлено 4 гетерозиготных носителя мутации с.*483T>C*. Частота с.483T аллеля для данной группы составила 0,93. Проверка по формуле равновесия Харди-Вайнберга показала случайное распределение генотипов, что подтверждает репрезентативность группы ($df = 2$, $p < 0,05$). При помощи теста Россета-Раймонда были рассчитаны фактическая (H_e) и теоретическая (H_o) гетерозиготность. Эти показатели составили 0,78 и 0,77% соответственно. Следует отметить, что нами не были выявлены гомозиготы по с.*483C* аллелю. Это может быть связано с летальностью данного генотипа из-за чрезмерного накопления жировых масс еще до рождения [7].

Была также изучена частота встречаемости еще одной мутации гена *GBA* с.*1226A>G (N370S)*. В контрольной группе не было выявлено ни гомозигот, ни гетерозигот по данной мутации. Эти данные совпадают с результатами аналогичных исследований, проведенных в других популяциях [12]. В группе пациентов с БП генотип с.*1226AA* встречался с частотой 97,68%, а генотип с.*1226AG* — 2,32%. Частоты аллелей составили: с.*1226A* — 98,84% и с.*1226G* — 1,16%. Проверка при помощи теста Россета-Раймонда на гетерозиготность показала аналогичные результаты. Различие контрольной группы и группы пациентов с БП достоверно ($df = 2$, $p < 0,05$) и подтверждается малым показателем дивергенции (0,00053%), а также тем, что распределение обеих исследованных групп, рассчитанное по формуле равновесия Харди-Вайнберга, близко к панмиктическому.

Данные по частоте встречаемости различных мутантных вариантов гена к настоящему времени не были получены в популяции Украины, однако подобные исследования активно ведутся в других странах. Так, среди евреев ашкенази гетерозиготные носители данной мутации гена *GBA* составляют 10,7–31,3% пациентов с БП. Частота мутации у больных, принадлежащих к другим этническим группам, составляет 2,3–9,4% [13]. Среди семейных случаев БП у жителей США носителями мутаций были 4,1% по сравнению с 1,1% в группе здоровых людей [14]. Мутации в гене *GBA* найдены у 14,7% пациентов с семейной формой БП среди жителей Японии [15].

Проведено также генотипирование по гену *SNCA*. У пациентов с мутациями в этом гене первые признаки БП проявляются уже в возрасте до 50 лет, болезнь протекает очень быстро и часто характеризуется снижением когнитивных функций [16]. Нами была изучена встречаемость мутации с.*209G>A* (*A53T*) в гене *SNCA* у пациентов с БП и в контроле. В результате исследования мутантных аллелей этого гена в обеих группах обнаружено не было, что, по-видимому, связано с чрезвычайно низкой частотой встречаемости данной мутации или полным ее отсутствием у жителей определенной территории. Подобные результаты были получены и другими исследователями на других популяциях [17]. Так как точечные мутации в данном гене являются достаточно редкими, но в то же время продукт гена вовлечен непосредственно в патогенез заболевания, перспективным, по-видимому, является поиск мутаций в регуляторных участках гена, которые являются пока малоизученными [18].

Также было проведено генотипирование по гену, который, по данным литературы, может повышать риск развития нейродегенеративных заболеваний — аполипопротеин Е, который является лигандом рецепторов липопротеинов очень низкой плотности, а также отвечает за миелинизацию нервных волокон. Синтез этого белка обусловливает экспрессия гена *APOE*. Полиморфизм Е 4/Е 4 данного гена приводит к нарушению нервной проводимости. Частоты генотипов по гену *APOE* контрольной группы составили: 0,715 (Е 3/Е 3), 0,077 (Е 3/Е 4), 0,009 (Е 4/Е 4), 0,167 (Е 2/Е 3), 0,031 (Е 2/Е 4) и 0,000 (Е 2/Е 2). А для группы пациентов с БП — 0,634 (Е 3/Е 3), 0,148 (Е 3/Е 4), 0,032 (Е 4/Е 4), 0,157 (Е 2/Е 3),

0,023 (E 2/E 4) и 0,000 (E 2/E 2). Частота встречаемости генотипа E 3/E 4 была существенно выше в группе пациентов с БП, что, возможно, свидетельствует о связи редкого аллеля E 4 с риском развития БП. Проверка популяции по критерию Россета-Раймонда показала, что гетерозиготность контрольной группы меньше, чем группы пациентов (H_o= 0,2987 ± 0,0291 и H_e= 0,4801 ± 0,0291 соответственно), что дает основания полагать, что гетерозиготность влияет на формирование исследуемого признака. Данные были достоверны по критерию χ^2 (df = 2, p < 0,05).

Исходя из полученных нами результатов, риск возникновения заболевания повышен у носителей аллеля ε2 (OR = 2,35, 95 % CI: 1,23, 3,16; p = 0,0047) и ε4 (OR = 1,97, 95 % CI: 1,23, 3,16; p = 0,0047). Также показано, что у носителей генотипа E 4/E 4 шансы развития заболевания повышены в 3,48 раза (OR = 3,48, 95 % CI: 1,23, 3,16; p = 0,0047).

Нами был изучен еще один показатель — длина теломер. Исследования показали, что в клетках буккального эпителия длина теломер была короче у пациентов с БП, чем в контроле (рис.). В лейкоцитах длина теломер не различалась.

Эти данные свидетельствуют о том, что у пациентов с БП процесс возраст-зависимого укорочения длины теломер в клетках буккального эпителия ускорен. Длина теломер в этих клетках может быть показателем системных нарушений, которые возникают при БП, в том числе окислительного стресса и увеличения количества клеток под действием различных факторов роста. Отсутствие достоверных различий в длине теломер в лейкоцитах можно объяснить гетерогенностью популяции лейкоцитов в периферической крови человека и возможной разнонаправленностью происходящих в них процессов.

Возможную связь ускоренного укорочения теломер и БП можно объяснить несколькими факторами. Во-первых, теломеры укорачиваются при старении и короткая длина теломер в лейкоцитах наблюдается у пациентов с нейродегенеративными расстройствами, в частности с БП [19]. Во-вторых, ряд работ показывает связь воспаления (которое, как известно, сопровождает процессы нейродегенерации при БП) с длиной теломер [20]. В-третьих, показано, что оксидативный стресс, который играет важнейшую роль в нейродегенерации, приводит к укорочению длины теломер *in vitro* [21].

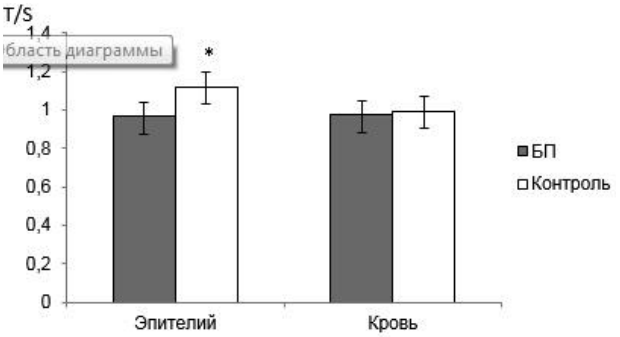


Рис. Относительная длина теломер (T/S) у пациентов с БП и в контрольной группе. * — $p < 0,05$

Результаты исследования позволяют предположить, что более короткие теломеры в клетках буккального эпителия могут быть следствием оксидативного стресса и, следовательно, могут использоваться в качестве маркера БП на ранних этапах заболевания. При этом длина теломер в клетках крови непригодна для использования в качестве маркера БП.

Выводы

1. Среди пациентов с БП обнаружены носители мутаций по генам *LRRK2* и *GBA*.

2. В группе пациентов с БП частота встречаемости мутации *g.40734202G>A* в гене *LRRK2* составила 1,85 %, мутаций гена *GBA* с.*1226A*>G — 2,31 % и *c.483T>C* — 1,85 %. В контрольной группе аналогичные мутации не выявлены.

3. В гене *SNCA* не выявлены мутации с.*209G*>A ни у людей с БП, ни в контрольной группе.

4. В группе пациентов повышена частота встречаемости аллеля ε4 гена *APOE* по сравнению с контрольной группой.

5. Длина теломер в клетках буккального эпителия короче у пациентов с БП, чем в контроле. В лейкоцитах длина теломер не различалась.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dawson T. M., Dawson V. L. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease // Science.— 2003.— 302.— P. 819–822.

2. Floris G., Cannas A., Solla P., Murru M. R., Tranquilli S., Corongiu D., Rolesu M., Cuccu S., Sardu C., Marrosu F. Genetic analysis for five LRRK2 mutations in a Sardinian parkinsonian population: Importance of G2019S and R1441C mutations in sporadic Parkinson's disease patients // Parkinsonism Relat. Disord.— 2008.— 47.— P. 160–164.
3. Багыева Г. Х. Клинико-генетический и биохимический анализ болезни Паркинсона: механизмы предрасположенности, экспериментальные модели, подходы к терапии: дис. … канд. биол. наук.— М., 2009.— 230 с.
4. Punia S., Das M., Behari M., Dihana M., Govindappa S. T., Muthane U., Thelma B., Juyal R. Leads from xenobiotic metabolism genes for Parkinson's disease among north Indians // Pharmacogenet. Genomics.— 2011.— 21, N 12.— P. 790–797.
5. Cawthon R. M. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method // Nucl. Acids Res.— 2009.— 37.— P. 21.
6. Lesage S., Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors // Human Molecular Genetics.— 2009.— 18.— P. 48–59.
7. Illarioshkin S. N., Shadrina M. I., Slominsky P. A., Bespalova E. V., Zagorovskaya T. B., Bagyeva G. K., Markova E. D., Limborska S. A., Ivanova-Smolenskaya I. A. A common leucine-rich repeat kinase 2 gene mutation in familial and sporadic Parkinson's disease in Russia // Europ. J. Neurol.— 2007.— 14.— P. 413–417.
8. Lesage S., Dürr A., Tazir M., Lohmann E., Leutenegger A. L., Janin S., Pollak P., Brice A. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs // New Engl. J. Med.— 2006.— 354.— P. 422–423.
9. Ozelius L. J., Senthil G., Saunders-Pullman R., Ohmann E., Deligtisch A., Tagliati M., Hunt A. L., Klein C., Henick B., Hailpern S. M., Lipton R. B., Soto-Valencia J., Risch N., Bressman S. B. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jewish // New Engl. J. Med.— 2006.— 354.— P. 424–425.
10. Tammachote R., Tongkobpetch S., Srichomthong C., Phipatthanananti K., Pungkanon S., Wattanasirichaigoon D., Suphapeetiporn K., Shotelersuk V. A common and two novel GBA mutations in Thai patients with Gaucher disease // Hum. Genet.— 2013.— 58, № 5.— P. 594–599.
11. Kathleen S. Hruska, LaMarca M.E., Scott C. R., Sidransky E. Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene // Human mutation.— 2008.— 29, N 5.— P. 567–583.
12. Asselta R., Rimoldi V., Siri C., Cilia R., Guella I., Tesei S., Soldà G., Pezzoli G., Duga S., Goldwurm S. Glucocerebrosidase mutations in primary parkinsonism // Parkinsonism and related disorders.— 2014.— 20.— P. 1215–1220.
13. Gan-Or Z., Giladi N., Rozovski U., Shifrin C., Rosner S., Gurevich T., Bar-Shira A., Orr-Urtreger A. Genotype-phenotype correlations between GBA mutations and Parkinson disease risk and onset // Neurology.— 2008.— 7.— P. 2277–2283.
14. Nichols W.C., Pankratz N., Marek D.K., Pauciulo M.W., Elsaesser V. E., Halter C. A., Rudolph A., Wojcieszek J., Pfeiffer R. F., Foroud T. Mutations in GBA are associated with familial Parkinson disease susceptibility and age at onset // Neurology.— 2009.— 72.— P. 310–316.
15. Mitsui J., Mizuta I., Toyoda A., Ashida R., Takahashi Y., Goto J., Fukuda Y., Date H., Iwata A., Yamamoto M., Hattori N., Murata M., Toda T., Tsuji S. Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease // Arch. Neurol.— 2009.— 66.— P. 571–576.
16. Satake W., Nakabayashi Y., Mizuta I., Hirota Y., Ito C., Kubo M., Kawaguchi T., Tsunoda T., Watanabe M., Takeda A., Tomiyama H., Nakashima K., Hasegawa K., Obata F., Yoshikawa T., Kawakami H., Sakoda S., Yamamoto M., Hattori N., Murata M., Nakamura Y., Toda T. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease // Nature Genetics.— 2009.— 41, N 12.— P. 1303–1308.
17. Illarioshkin S. N., Ivanova-Smolenskaya I. A., Markova E. D., Zagorovskaya T. B., Brice A. Lack of alpha-synuclein gene mutations in families with autosomal dominant Parkinson's disease in Russia // J. Neurol.— 2000.— 247.— P. 968–969.
18. Brighina L., Frigerio R., Schneider N. K., Lesnick T. G., de Andrade M., Cunningham J. M., Farrer M. J., Lincoln S. J., Checkoway H., Rocca W. A., Maraganore D. M. Alpha-synuclein, pesticides, and Parkinson disease: a case-control study // Neurology.— 2008.— 70, N 16.— P. 1461–1469.
19. Thomas P., O'Callaghan N.J., Fenech M. Telomere length in white blood cells, buccal cells and brain tissue and its variation with ageing and Alzheimer's disease. Mech. Ageing Dev.— 2008.— 129.— P. 183–190.
20. Cipriano C., Tesei S., Malavolta M., Giacconi R., Muti E., Costarelli L., Piacenza F., Pierpaoli S., Galeazzi R., Blasco M., Vera E., Canela A., Lattanzio F., Mocchegiani E. Accumulation of cells with short telomeres is associated with impaired zinc homeostasis and inflammation in old hypertensive participants // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.— 2009.— 64.— P. 745–751.
21. Koliada A., Krasnenkov D., Vaiserman A. Telomeric aging: mitotic clock or stress indicator? // Front. Genet.— 2015.— 6.— P. 82. Doi: 10.3389/fgene.2015.00082.

KOLIADA A.K.[1], VAISERMAN A.M.[1], KRASNENKOV D.S.[1], PLETNEVA T.V.[1, 2], KARABAN I.N.[1]

[1] D.F. Chebotarev State Institute of Gerontology NAMS of Ukraine,
Ukraine, 04114, Kyiv, Vyshgorodskaya str., 67, e-mail: alex.genetic@gmail.com

[2] Private Higher Educational Establishment «Kyiv Medical University of UAFM»,
Ukraine, 01004, Kyiv, Lva Tolstogo str., 9, e-mail: pletneva1706@gmail.com

STUDY OF MOLECULAR AND GENETIC MARKERS OF PARKINSON'S DISEASE IN UKRAINIAN POPULATION

Aims. Genetic factors play a major role in the development of Parkinson's disease (PD). The study was conducted to examine frequency of mutations in several genes associated with PD and assess telomeres length in control group and in patients. ***Methods.*** Genotyping was performed by methods based on real-time PCR. Mutations in the genes *GBA*, *LRRK2*, *SNCA* and *APOE* were genotyped. ***Results.*** Mutation g.40734202G>A in the *LRRK2* gene was found only in patients with PD. Two mutations in the *GBA* gene were studied. Among patients heterozygous s.483T>C carriers were revealed. Mutation c.1226A>G was not detected in controls. While in the group of patients heterozygous carriers were found. Mutation c.209G>A in the *SNCA* gene was not detected neither in patients nor in controls. The study of *APOE* polymorphism was revealed significantly higher frequency of E3/E4 genotype in patients. Telomere length in buccal cells was shorter in patients with PD. ***Conclusions.*** Mutations in the genes *GBA*, *LRRK2* and *APOE* can be used for diagnosis of PD.

Keywords: Parkinson's disease, genes *LRRK2*, *GBA*, *SNCA*, *APOE*.

УДК 575.113:611.018.1712.4

КУШНІРУК В. О.[1], АКОПЯН Г. Р.[2], МИКИТЕНКО Д. О.[3], ГУЛЕЮК Н. Л.[2], ЗУКІН В. Д.[3], ЛУКАШ Л. Л.[1]

[1] Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, e-mail: kushniruk_v_o@ukr.net
[2] ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»,
Україна, 79000, м. Львів, МСП 169, вул. Лисенка, 31а, e-mail: akopyan.h@ihp.lviv.ua
[3] Клініка репродуктивної медицини «Надія»,
Україна, 03037, м. Київ, вул. М. Кривоноса, 19А

ДИНАМІКА УЛЬТРАСТРУКТУРНИХ АБЕРАЦІЙ КАРІОТИПУ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ ЛІНІЇ 4BL, ВИЯВЛЕНИХ ЗА ДОПОМОГОЮ ARRAY CGH

Сучасна біотехнологія активно використовує клітинні лінії різного походження: це виробництво антибіотиків, ферментів, ліків з використанням звичайних та трансгенних мікроорганізмів [1], синтез калусними культурами рослин цінних алкалоїдів [2], використання тваринних та людських клітинних ліній для розробки та тестування вакцин, хіміопрепаратів; застосування стовбурових клітин (СК) в терапії захворювань різноманітної етіології [3, 4]. Існує величезна проблема пошуку донорського матеріалу, оскільки аутологічний матеріал не завжди придатний до використання, а клітинні банки не можуть забезпечити потреби всіх хворих у клітинному матеріалі. У 2006 році лабораторією Яманака показано можливість перепрограмування геному диференційованих фібробластів шкіри у стовбурові клітини за допомогою ведення векторних конструкцій, що містили гени Oct3/4, Sox2, c-Myc і Klf4 [5], нині існують й інші підходи [6].

Нами було отримано нову стовбурову клітинну лінію 4BL, одержану із периферійної крові дорослого здорового донора. Початково вона вирощувалася на фідері мітотично інактивованих фібробластів з додаванням рекомбінатних цитокінів LIF, SCF, IL-3 (SIGMA) та 30% середовища, кондиціонованого ембріональними гермінативними клітинами [7]. Клітинна лінія 4BL підтримується понад 220 пасажів (більше 7 років) без ознак кризи росту та старіння, що дає підстави вважати її потенційно імморталізованою. Доведена здатність даної лінії диференціюватися в адипогенному напрямі, а також у м'язову тканину, що підтверджує її стовбуровий потенціал. Морфологію та ростові властивості клітинної лінії 4BL описано в роботі [8]. За допомогою рутинного та диференційного забарвлення досліджено каріотип клітинної лінії 4BL в динаміці. Незважаючи на величезний термін культивування, вона зберігає білядиплоїдний модальний клас з найбільш вірогідним каріотипом 43 хромосоми. Визначено основні структурні аберації хромосом: t (1,11) — 63%, der 2–46%, t (5,15) — 23%, t (12,15) — 10%, t (16, 21) — 5% метафазних пластинок та шість маркерних хромосом, для уточнення природи яких застосували FISH-аналіз [9, 10]. Разом із накопиченням клітинами хромосомних аберацій відбувається зміна дози генів, у тому числі онкогенів та онкосупресорів, генів репарації, регуляції клітинного циклу та правильного проходження мітозу, генів апоптозу, величезна кількість транскрипційних факторів тощо. Виявити ці ультраструктурні зміни можливо за допомогою сучасного методу array CGH (матрична порівняльна геномна гібридизація), що дозволяє провести одночасний скринінг всього геному та має значно більшу роздільну здатність, ніж G-banding та FISH. Метою цієї роботи є порівняльний аналіз ультраструктурних патологій каріотипу лінії 4BL, виявлених за допомогою array CGH в динаміці на 120-му, 160-му та 205-му пасажах культивування.

Матеріали і методи

Клітинна лінія 4BL культивується як моношарова культура в середовищі DMEM з додаванням 10% ембріональної сироватки теляти та 100 ОД/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину.

ДНК-діагностику мікроструктурних хромосомних аномалій було здійснено методом порівняльної геномної гібридизації (arrCGH) з використанням CytoSure Aneuploidy array 15k (Oxford Gene Technology, Product code 020024) на базі клініки репродуктивної медицини «Надія». Для порівняння були взяті клітини на різних термінах культивування: 120-й, 160-й та 205-й пасажі.

© КУШНІРУК В. О., АКОПЯН Г. Р., МИКИТЕНКО Д. О., ГУЛЕЮК Н. Л., ЗУКІН В. Д., ЛУКАШ Л. Л.

З клітин було виділено ДНК за допомогою набору QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, кат № 51106) та очищено QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, кат № 28104). Отриманий біологічний матеріал у кількості 1 мкг проаналізовано відповідно до рекомендацій Oxford Gene Technology на приладі Innopsys Innoscan 710, обладнаного програмним забезпеченням OGT CytoSure Interpret Software 3.3.2.

Результати та обговорення

Відомо, що в процесі каріотипічної еволюції клітини проходять два етапи: стадію становлення, що характеризується значними хромосомними змінами і генетичною нестабільністю, та стадію стабілізації. В цій роботі проведено порівняльний аналіз 205-го пасажу, на якому клітинна лінія 4BL вже знаходиться на стадії стабілізації, та більш ранніх 120-го і 160-го пасажів. Відзначена при каріотипуванні анеуплоїдія хромосом 4, 10, 13, 17 була підтверджена методом arrCGH на рівні ідентифікації часткових моносомій (рис. 1).

Порівнюючи структуру хромосомних аберацій на пізньому 205-му та більш ранніх 120-му і 160-му пасажах, можна зауважити, що більшість виявлених перебудов з'явилися вже на 120-му пасажі (рис. 2).

При порівнянні 120-го та 160-го пасажів спостерігається однакова картина аберацій за 4, 10, 12, 13, 16 і 19 хромосомами (рис. 2, 3). При цьому на 160-му пасажі виявлено нові дуплікації 1, 3, 6 і 8 хромосом (1p32.3, 3p22.3і 3p21.33-p21.31, 6q13-q14.1, 6q25.2-q25.3, 8p11.21-p11.1) та делецію Xp22.32-p22.31, але всі вони не виявлені на момент досягнення культурою 205-го пасажу. Таким чином, можна спостерігати унікальне явище каріотипічної еволюції в динаміці, коли зберігаються основні значні перебудови, а деякі нові, що виникають при культивуванні, в подальшому елімінуються. Звертає на себе увагу той факт, що більшість новоутворених перебудов є дупліка-

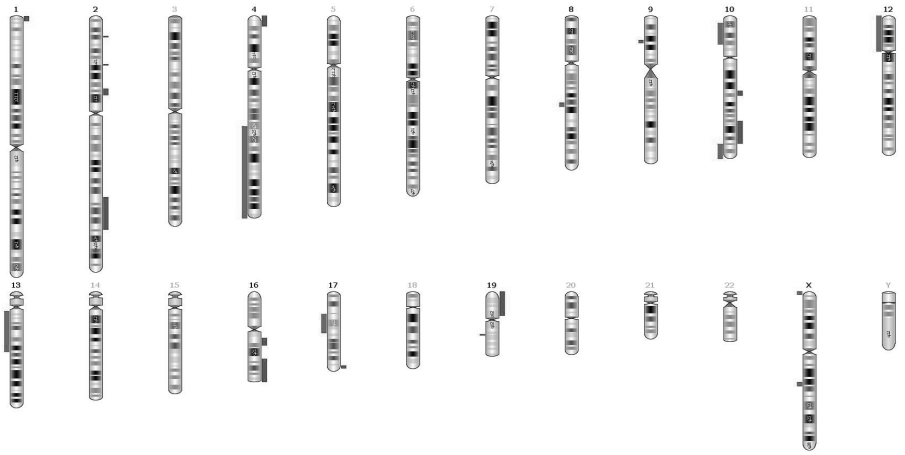


Рис. 1. Ідіограма профайлу array CGH клітин лінії 4BL на 205-му пасажі

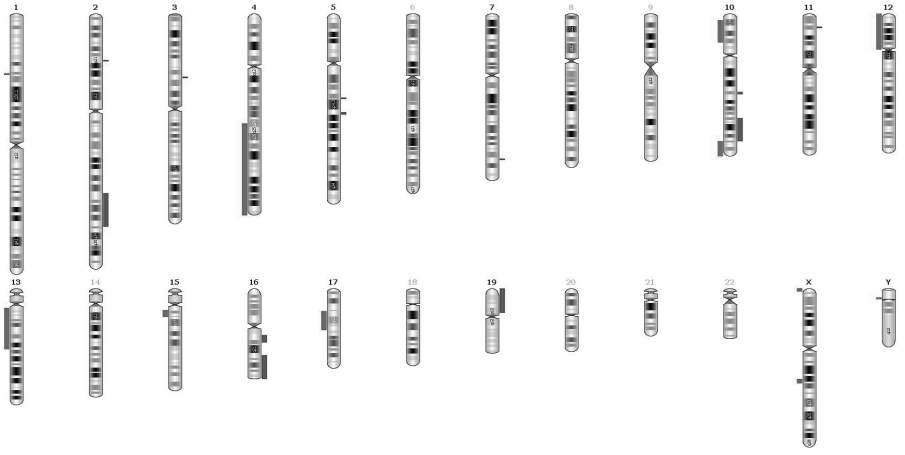


Рис. 2. Ідіограма профайлу array CGH клітин лінії 4BL на 120-му пасажі

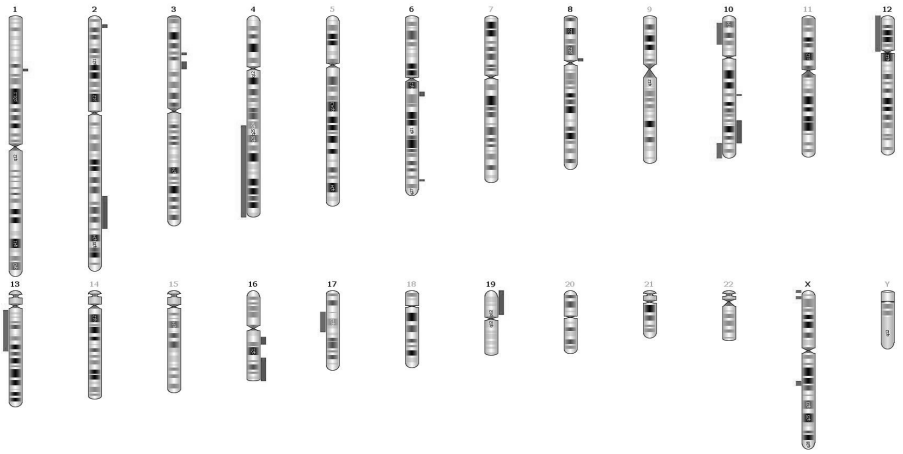


Рис. 3. Ідіограма профайлу array CGH клітин лінії 4BL на 160-му пасажі

ціями, з точки зору генетичної стабільності «гра» з подвоєнням генетичного матеріалу є більш безпечною, ніж його делеції.

Варто відзначити, що більшість виявлених хромосомних аномалій на всіх досліджуваних пасажах є мозаїчними, що свідчить про існування в популяції лінії 4BL гетерогенних клонів клітин. Оскільки ДНК-аналіз передбачає дослідження сумарної фракції ДНК, отриманої з культивованих клітин, а не генетичного матеріалу окремих клітин, то явище культурального мозаїцизму має бути враховане при інтерпретації даних. Однак можливості порівняльної геномної гібридизації не дозволяють провести абсолютну оцінку величини цього явища. Підтверджено, що аберації, які виявляються на 160-му пасажі *de novo*, зникають в подальшому. Ймовірно, це мутантні клони клітин, які не дають переваг при культивуванні і тому елімінуються до 205-го пасажу.

На основі отриманих даних можна зробити висновок, що основні перебудови генетичного матеріалу відбулися до 120-го пасажу, що свідчить про те, що клітинна лінія 4BL пройшла етап становлення до цього часу та досягнула стабілізованого генетичного стану. Проте це не значить, що еволюція каріотипу зупинилася: зміни відбуваються і далі, але вони не настільки значні. Так, на 205-му пасажі з'являються нові аберації, не притаманні для попередніх етапів трансформації клітинної лінії 4 BL, а саме: дуплікації окремих ділянок 1, 4, 17 хромосом та делеції по 8, 9 та 19 хромосомах (розмір найбільшої трохи перевищує 4 Mb). Спостерігали цікаву ситуацію по 2 хромосомі: в усіх трьох проаналізованих пасажах виявили найбільшу з дуплікацій — 2q31.1-q33.1; а на 120-му та 205-му пасажах детектували dup2p21, яка не визначалася на 160-му пасажі. Ми припускаємо, що у такий спосіб відбирається оптимальна комбінація генів, локалізованих у даній хромосомі: залишається значна дуплікація та відбувається селекція більш малих. Також це може бути свідченням складних еволюційних процесів, що відбулися в другій хромосомі, внаслідок чого частина набутого генетичного матеріалу опинилася у складі деривату, а решта, вірогідно, увійшла до складу інших маркерних хромосом. Ознаками стадії стабільності клітинної лінії 4 BL безумовно можна вважати перебудови, які спостерігалися від 120-го і до 205-го пасажу, а саме: дуплікації хромосом 2, 10, 16 і 19 та делеції 4, 10, 12, 13, 17 і X.

У ділянці дуплікації 2q31.1-q33.1 міститься багато генів, пов'язаних із структурно-функціональною організацією хроматину та перебігом мітозу, а це дозволяє оптимізувати клітинний поділ. У цій ділянці розташовані ключові гени апоптозу (CASP8, CASP10) для елімінації мутантних клонів та ген білка SDPR, що допомагає клітинам вижити при зниженій концентрації сироватки в середовищі. У ділянці делеції 4q24-q35.2 містяться гени апоптозу CASP3 і CASP6, ген цикліну A2 та CENPU50, які створюють платформу для асоціації кінетохорів під час мітозу. Інший ген, локалізований в даній ділянці, — MAD2L1 — запобігає початку анафази до моменту фіксації на веретені всіх хромосом набору. Подібну функцію виконує ген BUB3 (міститься в ділянці del 10q26.11qter), а оскільки обидва гени локалізовані в ділянках делецій, це може бути причиною аберантного перебігу мітозу у клітинах 4BL.

Аналізуючи зміни 10 хромосоми, можна очікувати зниження експресії супресора RSU1

та генів репарації DCLRE1C і MGMT. При цьому у подвійних копіях присутні гени апоптозу AIFM2 і CASP7, ген циклін М1, онкоген WNT8B та онкосупресор MXI1, який негативно регулює експресію МУС. У зв'язку з делецією 12p13.33-p11.1 в одиничній копії присутні численні онкогени та онкосупресори, фактори плюрипотентності DPPA3 і NANOG із типовою експресією в ембріональних СК і пухлинах, а також ген циклін D2. Хромосома Х не втратила разом із делеціями життєво важливі гени. Х моносомія виявилася типовою ознакою клітинної лінії 4BL на 205-му пасажі і, за даними arrayCGH, мала місце у понад 80% досліджених клітин (mos 45, X [>80%] / 46, XX [<20%]). Не виключено, що з втратою Х хромосоми клітинна лінія позбавляється «зайвого» генетичного матеріалу [11].

У ділянці делеції 13 q12.11-q 21.2 міститься три онкогени та десять генів-онкосупресорів, з них: LATS2 для формування веретена поділу; RGCC, що індукується p53 у відповідь на пошкодження ДНК, та відомі онкосупресори BRCA2 і RB1. Отже, без сумніву, саме делеція по 13-й хромосомі є ключовою в порушенні генетичної стабільності. Дуплікації 16 хромосоми в ділянках q12.1q12.2 і q22.1-q24.3 є, навпаки, корисними для підтримки генетичної стабільності. Тут містяться гени, експресія яких змінюється у відповідь на гіпоксію (SIAH1) та оксидативний стрес (OSGIN1) та які є індукторами апоптозу. Підвищена копійність гена ACD, що захищає теломери, NKD1– негативного регулятора Wnt і β-катенінового сигнального шляху та IL17C, що стимулює вивільнення фактора некрозу пухлин α і IL1β. Делецію за 17 хромосомою можна назвати умовно нейтральною, оскільки делетовано приблизно рівну кількість онкогенів та онкосупресорів. У ділянці дуплікації 19 p13.3-p12, незважаючи на малий розмір хромосоми, розташована величезна кількість генів: відомий онкоген JUND та онкосупресори APC2 і GADD45B, ген апоптозу CASP14. Тут локалізовано велику кількість генів, що відповідають за правильну організацію й функціонування веретена поділу: MISP, SYCE2, HAUS8, MAU2, MAST1; мітоген-активуючі кінази MAP2K2 і 7 та активатор цитокінезу DOCK6. У ділянці дуплікації 19 p13.3-p12 міститься ген встановлення і регуляції тканиноспецифічного метилування цитозинових залишків DNMT1. Збільшено дозу генів, пов'язаних з внутрішньоклітинним метаболізмом: гени регуляції екзо- і ендоцитозних шляхів, гени білків родини цитохромів Р450 та дихального ланцюга, ген найбільшої субодиниці РНК-полімерази II POLR2E, ген ініціації трансляції EIF3G та ген PIN1, що відповідає за правильне згортання білків. Очевидним є те, що дуплікація по 19 хромосомі є «робочим коником»: вона забезпечує клітинний метаболізм на високому рівні, тут міститься значна кількість генів організації структури хроматину, процесів транскрипції, активації проліферації, що надає селективну перевагу клітинам, які її містять. До речі, саме по dup19 p13.3-p12 спостерігається тетрасомія, більшість інших виявлених дуплікацій є частковими, неповними.

Клітинна лінія 4BL адаптувалася до виживання в умовах *in vitro* тривалий час з притаманними їй перебудовами, і дія стабілізуючого добору в стандартних умовах культивування спрямована на їх підтримання. При зміні умов середовища на клітини діятиме рушійний добір і виживатимуть ті клони клітин, що виявляються найбільш адаптованими до нових умов існування. Таке явище було виразно продемонстровано нами у роботі [12], де на етапі стабілізації під впливом стрес-чинника (культивування протягом доби в середовищі з високою йонною силою) повторно індукується перехід клітинної популяції в стан структурної нестабільності, характерний для етапу становлення.

Висновки

Основні перебудови генетичного матеріалу клітинної лінії 4BL відбулися до 120-го пасажу, що засвідчує її перебування на стадії стабілізації на момент 120-го, 160-го і 205-го пасажів. Більшість виявлених аберацій є мозаїчними, що підтверджує існування гетерогенних клонів у популяції клітинної лінії 4BL. Ознаками стабільності клітинної лінії 4 BL можна вважати значні перебудови, що зберігаються у клітинах від 120-го до 205-го пасажу (дуплікації хромосом 2, 10, 16 і 19 та делеції хромосом 4, 10, 12, 13, 17 і Х), тоді як незначні за розміром нові аберації елімінуються на наступному дослідженому пасажі. Селективна перевага збережених хромосомних перебудов асоціюється з підвищенням дози генів мітотичних сигнальних каскадів (dup19p13.3-p12) на фоні зниження копійності супресорів пухлинного росту (del 13q12.11-q21.2). Результативна здатність клітин до підвищення проліферативного потенціалу супроводжується збільшенням

дози генів-індукторів апоптозу (dup2q31.1-q33.1, dup16q12.1q12.2, dup16q22.1-q24.3). Все це відображає еволюцію каріотипу клітинної лінії 4 BL протягом тривалого культивування та засвідчує ефект регулярних хромосомних перебудов при досягненні етапу стабілізації.

ЛІТЕРАТУРА

1. Stryjewska A., Kiepura K., Librowski T., Lochyński S. Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins // Pharmacol. Rep.— 2013.— 65, N 5.— P. 1075–1085.
2. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи.— К.: Логос, 2005.— 730 с.
3. Nam H., Lee K. H., Nam D. H., Joo K. M. Adult human neural stem cell therapeutics: Current developmental status and prospect // World. J. Stem Cells.— 2015.— 7, N 1.— P. 126–136.
4. Jackman C. P., Shadrin I. Y., Carlson A. L., Bursac N. Human Cardiac Tissue Engineering: From Pluripotent Stem Cells to Heart Repair // Curr. Opin. Chem. Eng.— 2015.— 7.— P. 57–64.
5. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell.— 2006.— 126, N 4.— P. 663–676.
6. Hayes M., Zavazava N. Strategies to generate induced pluripotent stem cells // Methods Mol. Biol.— 2013.— 1029.— P. 77–92.
7. Лукаш Л. Л., Яцишина А. П., Кушнирук В. О., Пидпала О. В. Репрограммирование соматических клеток взрослого человека // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / Під ред. В. А. Кунаха [та ін.].— К.: Логос, 2011.— 11.— С. 493–498.
8. Кушнірук В. О., Рубан Т. П., Лукаш Л. Л. Морфологічні та ростові особливості нової лінії клітин людини 4BL // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / Під ред. В. А. Кунаха [та ін.].— К.: Логос, 2013.— 13.— С. 315–319.
9. Кушнірук В. О., Кочубей Т. П., Мацевич Л. Л., Рубан Т. П., Лукаш Л. Л. Дослідження каріотипу нової лінії клітин людини 4BL при тривалому культивуванні *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / Під ред. В. А. Кунаха [та ін.].— К.: Логос, 2012.— 3.— С. 313–318.
10. Акопян Г. Р., Гулеюк Н. Л., Кушнірук В. О., Микитенко Д. М., Яцишина А. П., Лукаш Л. Л. Порівняльний аналіз каріотипу нової лінії клітин людини 4BL в умовах тривалого культивування. І. Плоїдність хромосомного набору // Цитологія і генетика.— 2013.— 47, № 5.— С. 55–69.
11. Mamaeva S. E. Karyotypic evolution of cells in culture: a new concept // Int. Rev. Cytol.— 1998.— 178.— P. 1–40.
12. Macewicz L. L., Kushniruk V. O., Iatsyshyna A. P., Kotsarenko K. V., Lylo V. V., Akopyan G. R., Huleuk N. L., Mykytenko D. M., Lukash L. L. Correlation the level of mutagenesis with expression of reparative enzyme O6-metylhuanin DNA methyltransferase (MGMT) during establishment of cell lines in vitro // Biopolymers and cell.— 2013.— 29, N 6.— P. 485–492.

KUSHNIRUK V.O.[1], AKOPYAN H.R.[2], MYKYTENKO D.O.[3], HULEYUK N.L.[2], ZUKIN V.D.[3], LUKASH L.L.[1]

[1] Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine,
Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 150, e-mail: kushniruk_v_o@ukr.net

[2] Institute of Hereditary Pathology of NAMS of Ukraine,
Ukraine, 79000, Lviv, Lysenka str., 31a, e-mail: akopyan.h@ihp.lviv.ua

[3] Clinic of reproductive medicine «Nadiya»,
Ukraine, 03037, Kyiv, M. Krivonosa str., 19A

THE DYNAMIC OF KARYOTYPE ULTRASTRUCTURAL ABERRRATIONS OF NEW HUMAN STEM CELL LINE 4BL REVEALED BY ARRAY CGH

The ***aim*** of this research was to conduct the comparative analysis of the karyotype of new human stem cell line 4BL at different stages of cultivation *in vitro*. ***Methods.*** The array CGH Oxford Gene Technology was used. ***Results.*** At the 120, 160 and 205 passages such the same aberrations were revealed: duplications of 2q31.1-q33.1, 10 q22.1-q22.2 and q24.2-q26.11, 16 q12.1-q12.2 and q22.1-q24.3, 19 p13.3-p12 and deletions of 4 q24-q35.2, 10 p14-p12.1 and q26.11-q26.3, 12 p13.33-p11.1, 13 q12.11-q21.2, 17 q11.1-q21.31, X p22.33 and q21.31-q21.32. Also at each passage some minor aberrations appears, which further were removed at the next stage, and so on. ***Conclusions.*** Obviously main genome rearrangements occurred until 120th passage, so stem cell line 4BL passed the establishment stage until this time and now is at the stabilization stage.

Keywords: stem cell line, array CGH, karyotypic evolution, deletion/duplication.

УДК 575:572:155.9

ЛУЧКО Е. Н., АТРАМЕНТОВА Л. А.
Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина,
Украина, 61022, г. Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: ekaterina_luchko@mail.ru

ВЫРАЖЕННОСТЬ АГРЕССИВНОСТИ И ЭМПАТИИ НЕ СВЯЗАНА СО СТЕПЕНЬЮ МЕТИСАЦИИ ЖИТЕЛЕЙ УКРАИНСКОГО ГОРОДА

Существует мнение, что понятие «темперамент» применимо не только к отдельным личностям, но и к нации в целом [1]. Под национальным характером понимают особый психогенетический склад народа, возникающий на основе всего его исторического и социокультурного опыта, всей совокупности традиций, идей, ценностей, стереотипов, идеалов и интересов, распространённых в данной этнической общности [2]. Под поведением, то есть темпераментом личности в целом, понимают совокупность базовых психологических черт, которые сформировались под действием устойчивых индивидуальных биологических детерминант [3]. Большинство черт темперамента, в том числе агрессивность и эмпатия, являются сложными количественными признаками, на развитие которых влияет множество генов и средовых факторов. В настоящее время в мировом банке данных уже имеется информация о генах, которые принимают участие в развитии агрессивности (гены *MAOA* и *MAOB*, *DDC*, *TPH-1* и *TPH-2*, *5-HTT*, *DRD4* и *DRD5* и др.) [4–6] и эмпатии (*OXTR*) [7].

В последние десятилетия в Украине в связи с миграциями меняется популяционная структура населения, увеличивается количество межэтнических браков [8–11]. В популяционной генетике считается, что признак, который находится под генетическим контролем, чувствителен к системе скрещиваний [12]. Исследования по этногеномике показали, что в генофондах даже у таких близких славянских народов, как украинцы и русские, имеются различия [13, 14]. Для современных мегаполисов характерна высокая степень метисации населения за счёт широко распространённых межэтнических браков, что обусловливает генетическое смешение за счёт потоков генов между этническими группами [11]. В мировом банке данных имеются лишь единичные данные о влияния метисации на поведенческие признаки у человека [15]. В частности, показано, что академический интеллект, измеряемый в баллах IQ, выше у потомков межрасовых браков [16]. Отечественными учёными было показано, что у потомков экзогамных браков более высокие коммуникативные способности по признаку «компетентность (раздражительность) в общении» и больший страх принятия ответственных решений и др. [17].

Научный и практический интерес к таким чертам темперамента, как агрессивность и эмпатия, объясняется тем, что, выходя за рамки адаптивной нормы, эти характеристики могут свидетельствовать о серьёзных психических и соматических нарушениях в организме, снижать адаптивность индивида, нести угрозу не только отдельным личностям, но и членам общества в целом. В наших предыдущих исследованиях, выполненных на населении г. Харькова, были получены базовые характеристики распределения агрессивности и эмпатии, выявлены межиндивидуальные и половые различия, связь с возрастом, миграциями и другие ассоциации [18–20]. Для понимания причин межиндивидуальных различий по этим чертам темперамента нами использован популяционно-генетический подход, основанный на рассмотрении агрессивности и эмпатии как количественных признаков с генетической компонентой.

Цель данного исследования — выяснить, имеется ли связь выраженности агрессивности и эмпатии со степенью метисации жителей современного мегаполиса.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие постоянные жители города Харькова, обозначенные как пробанды. Среди 1493 обследованных было 637 мужчин и 856 женщин в возрасте от 45 до 65 лет. Все обследованные дали письменное информированное согласие на анкетирование и тестирование при условии конфиденциальности.

Оценку уровня агрессивности проводили, используя опросник Ассингера, для оценки уровня эмпатии использовали опросник Меграбяна-Эпштейна [21]. Ответы испытуемых переведены в баллы, которые выражали уровень агрессивности (от 27 до 49) и эмпатии (от 1

© ЛУЧКО Е. Н., АТРАМЕНТОВА Л. А.

до 10). Баллы представляли собой целые положительные числа и прямо отражали выраженность признака.

Национальность пробандов и их прародителей (членов третьего поколения) устанавливали по самоопределению. Степень метисации каждого обследованного оценивали по национальности прародителей. В соответствии с этим пробанды были распределены по группам. В первую группу отнесены индивиды, чьи деды и бабки были украинцами. Вторую группу составили лица, у которых в третьем поколении кроме украинцев были также представители других славянских национальностей, как правило, русские. В третью группу отнесены индивиды, у которых в третьем поколении кроме украинцев были представители не славянских национальностей. Четвёртую группу составили индивиды, среди членов третьего поколения которых не было украинцев, но были представители разных этнических групп, как славянских, так и не славянских.

База данных сформирована в программе Microsoft Excel. Расчёты выполнены в программе Statistica. Проверка распределения данных на соответствие закону Гаусса проведена методом Колмогорова-Смирнова. Распределения показателей агрессивности и эмпатии значимо не отличались от нормального, поэтому для дальнейшего анализа использованы параметрические методы статистики.

Между возрастом в обозначенном интервале (45–65 лет) и выраженностью агрессивности и эмпатии не было обнаружено статистически значимой корреляционной связи [18], поэтому возраст пробандов в данном статистическом анализе не учитывался, при этом сформированные для сравнения группы значимо не различались по среднему возрасту и его дисперсии.

Результаты расчётов представлены в виде средних арифметических, стандартных отклонений, 95%-ных доверительных интервалов. Сравнение средних арифметических проведено с помощью непарного двустороннего *t*-критерия Стьюдента. Сравнение долей проведено с использованием критерия χ^2. Проверка нулевых статистических гипотез выполнена на уровне значимости 0,05 [22].

Результаты и обсуждение

Как свидетельствуют данные, приведённые в табл. 1, 2, только 124 мужчины (20%) смогли указать национальность своих прародителей. Женщины более информированы в генеалогии: 408 из них (48%) знали этническое происхождение всех своих прародителей ($p<0,001$). Только у четверти обследованных (26% мужчин и 27% женщин) все четверо прародителей были этническими украинцами. Наиболее многочисленная группа включает потомков от смешанных русско-украинских браков (44% мужчин и 49% женщин). Потомки браков украинцев с представителями не славянских национальностей формируют самую малочисленную группу (8%). У 22% мужчин и у 16% женщин в третьем поколении украинцев не было вообще. Их прародителями были русские и представители более редких для Харькова национальностей: белорусы, поляки, армяне, евреи, азербайджанцы, евреи, греки и др.

Средний уровень агрессивности у мужчин варьирует от 39,1 до 40,3 баллов (табл. 1). Минимальная дисперсия этого признака от-

Таблица 1

Уровень агрессивности

Пол	Группа	*n* (%)	$\bar{x}$	*s*	95% ДИ
Мужской	1	32 (25,8)	39,1	4,3	37,5–40,7
	2	55 (44,3)	40,3	4,0	39,3–41,3
	3	10 (8,1)	39,2	4,9	36,0–39,4
	4	27 (21,8)	40,3	3,6	38,9–41,7
Женский	1	111 (27,2)	38,4	3,1	37,8–39,0
	2	200 (49,0)	38,4	3,6	37,8–39,0
	3	33 (8,1)	39,2	4,0	37,8–40,6
	4	64 (15,7)	38,5	3,3	37,7–39,3

Примечания: 1 — прародители украинцы, 2 — прародители украинцы и другие славяне, 3 — прародители украинцы и не славяне, 4 — прародители не украинцы, *n* — число пробандов, $\bar{x}$ — среднее арифметическое, *s* — стандартное отклонение, 95% ДИ — 95% доверительный интервал.

Таблица 2

Уровень эмпатии

Пол	Группа	*n* (%)	$\bar{x}$	*s*	95% ДИ
Мужской	1	32 (25,8)	5,2	1,6	4,3–6,1
	2	55 (44,3)	5,0	1,9	4,1–5,9
	3	10 (8,1)	5,4	2,8	3,6–7,2
	4	27 (21,8)	5,5	2,1	4,7–6,3
Женский	1	111 (27,2)	5,0	2,3	4,6–5,4
	2	200 (49,0)	5,0	2,2	4,6–5,5
	3	33 (8,1)	5,0	2,1	4,2–5,8
	4	64 (15,7)	5,0	2,2	4,6–5,8

Примечания: как в табл. 1.

мечена в четвёртой группе (3,6), максимальная — в третьей (4,9). Доверительные интервалы средних арифметических всех четырёх групп перекрываются, что свидетельствует об отсутствии значимых различий между ними.

Средние уровни агрессивности у женщин (38,4–39,2), а также показатели дисперсии (3,1–4,0) ниже, чем у мужчин, причём разница во всех группах сравнения имеет одну и ту же направленность. Минимальная дисперсия агрессивности у женщин отмечена в первой группе, максимальная — как и у мужчин, в третьей. Доверительные интервалы средних арифметических всех четырёх групп женщин перекрываются, что также свидетельствует об отсутствии значимых различий между группами.

Средний уровень эмпатии у мужчин варьирует от 5,0 до 5,4 баллов (табл. 2). Минимальная дисперсия этого признака отмечена в первой группе (1,6), максимальная — в третьей (2,8). Средний уровень эмпатии у женщин во всех четырёх группах составил 5,0 баллов. Минимальная дисперсия эмпатии у женщин отмечена в третьей группе (2,1), максимальная — в первой (2,3). Перекрывание доверительных интервалов у мужчин и женщин указывает на отсутствие значимых различий по средней выраженности эмпатии в группах метисации.

Всё изложенное даёт основание сделать вывод, что уровень метисации жителей современного украинского города, как мужчин так и женщин, не связан с такими показателями темперамента, как агрессивность и эмпатия.

Исследователи выделяют среди этносов преобладание не каких-то конкретных черт темперамента, а типы темперамента в целом, поскольку считают, что каждая черта темперамента в той или иной степени присуща каждой этнической группе [23]. Черты темперамента любого этноса — это психофизиологические и биологические особенности функционирования человеческих организмов, которые зависят, прежде всего, от климато-географических условий, то есть являются психическим отражением той общности климатической зоны, на которой проживает данная этническая группа (так называемый «адаптивный характер») [23]. В свою очередь, с развитием крупных мегаполисов (усложнением социальной жизни людей) и распространением метисации происходит формирование групп со средними значениями признаков, что неоднократно показывали антропологи в своих исследованиях [15].

Вывод

Уровень метисации жителей современного украинского города, как мужчин так и женщин, не связан с такими показателями темперамента, как агрессивность и эмпатия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Платонов Ю. П. Этническая психология. — СПб: Речь, 2001. — 313 с.
2. Смирнов П. Социология личности. — СПб: СПбГИПРС, 2001. — 472 с.
3. Небылицин В. Д. Темперамент / Психология индивидуальных отличий. Тексты / Ред. Ю. Б. Гиппенрейтер, В. Я. Романова. — М.: Издательство МГУ, 1982. — С. 153–159.
4. Hess C.A, Reif A., Strobel A., Boreatti-Hummer A., Heine M., Lesch K. P., Jacob C. P. Functional dopamine-beta-hydroxylase gene promoter polymorphism is associated with impulsive personality // Human Genetics. — 2009. — 126. — P. 101–113.

5. Prom-Wormley E.C., Eaves L.J., Foley D.L., Gardner C.O., Archer K.J., Maes H.H., Silberg J.L. Monoamine oxidase A and childhood adversity as risk factors for conduct disorder in females // Psychological Medicine.— 2009.— 39.— P. 579–590.
6. Ronald L., Man K.L., Steven R., Brody H., Philibert R.A., Gibbons F.X. Social environment, genes and aggression // American Sociological Review.— 2011.— 76 (6).— P. 883–912.
7. Kogan A., Saslow L.R., Impett E.A., Oveis C., Keltner D. Thin-slicing study of the oxytocin receptor (OXTR) gene and the evaluation and expression of the prosocial disposition // Proc. Natl. Academy Sciene USA.— 2011.— 108 (48).— P. 19189–19192.
8. Атраментова Л.А., Мухин В.Н., Филипцова О.В. Генетико-демографические процессы в городских популяциях Украины в 90-х годах. Брачная структура донецкой популяции // Генетика.— 2000.— 36, № 1.— С. 93–99.
9. Атраментова Л.А., Филипцова О.В. Генетико-демографические процессы в городских популяциях Украины в 90-х годах. Брачная структура харьковской популяции // Генетика.— 1998.— 34, № 8.— С. 1120–1126.
10. Атраментова Л.А., Филипцова О.В. Генетико-демографические процессы в городских популяциях Украины в 90-х годах. Брачная структура полтавской популяции // Генетика.— 1999.— 35, № 12.— С. 1699–1705.
11. Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю., Веремейчик В.М., Прудникова А.С., Атраментова Л.А, Цыбовский И.С., Удина И.Г. Особенности генетико-демографических процессов в населении трёх мегаполисов // Генетика.— 2013.— 49, № 4.— С. 513–522.
12. Ли Ч. Введение в популяционную генетику.— М.: Мир, 1978.— 557 с.
13. Кравченко С.А., Лимборська С.А., Лівщиць Л.А. Дослідження мікросателітних локусів Y-хромосоми серед населення слов'янського походження з України та Росії // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: зб. наук. пр.— 2007.— С. 460–462.
14. Пшеничнов А.С., Балановский О.П., Атраментова Л.А. Украинцы, русские и белорусы среди их соседей по Европе: свидетельства мтДНК и Y-хромосомы // VII Конгресс этнографов и антропологов России.— 2007.— С. 275–280.
15. Jensen A.R. Psychological research on race differences // American Psychologist.— 1995.— 50.— P. 41–42.
16. Phinney J.S, Alipuria L.L. At the interface of cultures: multiethnic/multiracial high school and college students // Soc. Psychol.— 1996.— 136 (2).— P. 139–158.
17. Филипцова О.В. Популяционно-генетический анализ поведенческих признаков: опыт изучения населения Украины: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.15 «Генетика».— К., 2009.— 24 с.
18. Лучко Е.Н. Половые различия в проявлении агрессивности и эмпатии у жителей украинского мегаполиса // Факторы экспериментальной эволюции организмов: зб. наук. пр. / Під ред. В.А. Кунаха [та ін.].— 2014.— 14.— С. 158–163.
19. Лучко Е.Н., Атраментова Л.А. Половые особенности распределения агрессивности и эмпатии у жителей украинского мегаполиса // Збірник наукових праць «Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики».— 2012.— С. 430–436.
20. Атраментова Л.А., Лучко Е.Н. Уровень агрессивности и эмпатии в зависимости от демографического статуса пробандов и их родителей // Вестник Харьковского национального университета. Серия «Биология».— 2014 (в печати).
21. Психологические тесты: в 2 т. / [ред. А.А. Карелин].— М.: Гуманит. изд. центр ВЛАДОС, 2002.— 1.— 312 с.
22. Armitage P., Berry G. Statistical Methods in Medical Research. 3rd ed. Blackwell Scientific Publications.— London, 1994.— 620 p.
23. Ольшанский Д. Основы политической психологии.— Екатеринбург: Деловая книга, 2001.— 496 с.

LUCHKO E.N., ATRAMENTOVA L.A.

V.N. Kharkiv National University,
Ukraine, 61022, Kharkiv, Svobody str., 4, e-mail: ekaterina_luchko@mail.ru

THE EXPRESSIVENESS OF AGGRESSION AND EMPATHY ARE NOT RELATED WITH THE DEGREE OF CROSS-BREEDING UKRAINIAN CITY CITIZENS

Aims. Modern megacities characterized by a high degree cross-breeding population. There are only a few information about the effect of cross-breeding on the behavioral traits in the world data bank. Understanding that there is a genetic component in the level of aggression and empathy aims the research to detailed study of those personal characteristics. ***Methods.*** 637 men and 856 women (Kharkov citizens) aged 45–65 took part in the research. Assinger's questionary was used for the study of aggression and Magrabyan-Apstein's questionary was used for the study of empathy. All the participants gave their informed agreement on questionnaire providing their privacy. ***Results.*** The research has shown that the level of cross-breeding of inhabitants of modern Ukrainian city both men and women is not associated with indicators of aggression and empathy. ***Conclusions.*** The level of cross-breeding of inhabitants of modern Ukrainian city is not associated with indicators of aggression and empathy.

Keywords: empathy, aggression, cross-breeding.

УДК 576.52

ПАЛЬЧЕВСЬКА О. Л., БАЛАЦЬКИЙ В. В., МАЦЕВИЧ Л. Л., ПІВЕНЬ О. О., ЛУКАШ Л. Л.
Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, e-mail: o.o.piven@imbg.org.ua

СИГНАЛЬНА ФУНКЦІЯ β-КАТЕНІНУ ПРИ АДАПТАЦІЇ ДОРОСЛОГО МІОКАРДА ССАВЦІВ ДО ФІЗИЧНИХ НАВАНТАЖЕНЬ

Дослідження сигнально-регуляторних механізмів, залучених до контролю роботи дорослого серця та адаптацій міокарда до стресових факторів, є надзвичайно актуальним, зважаючи на загальну статистику розповсюдження і смертності від захворювань серця. Щороку у світі від серцево-судинних захворювань помирає близько 9,4 мільйона людей. Серед них 51 % людей гине від інсульту та 45 % — від ішемічної хвороби серця [1]. Цілком очевидно, що розуміння основних рушійних сил, які контролюють реорганізацію міокарда та його регенерацію, має не лише фундаментальне загальнобіологічне значення, а й є підґрунтям для розвитку нових підходів до лікування хвороб серця. Суттєві реконструкції міокарда під час розвитку адаптивних змін серця при фізичних навантаженнях, старінні та відновленні відбуваються загалом за рахунок активації внутрішньоклітинних сигнально-регуляторних шляхів, до яких належить і канонічний Wnt-сигналінг [2]. Цей сигнально-регуляторний шлях відіграє важливу роль у кардіогенезі та формуванні фетального серця, однак після народження його сигнальна активність пригнічується до базального рівня і залишається такою в умовно здоровому серці. Основним медіатором канонічного Wnt-сигнального шляху є білок β-катенін, стабілізована форма якого, потрапляючи в ядро клітин, зв'язується з транскрипційними факторами TCF/LEF і активує гени-мішені. Серед генів-мішеней цього сигнального шляху є такі, які відіграють важливу роль у функціонуванні дорослого міокарда (гени гіпертрофічної відповіді, кадгерин, конексин 43, деякі протоонкогени та ін.) [2, 3].

Раніше нами показано, що повна втрата гена β-катеніну в ембріональному серці є летальною у пізньому ембріогенезі або ранньому післянатальному періоді розвитку [4]. Оскільки структурна функція β-катеніну була функціонально компенсована плакоглобіном, то ми припускаємо, що саме сигнальна функція досліджуваного нами білка є важливою на пізніх стадіях кардіогенезу та у новонародженому міокарді. Ціла низка експериментальних робіт також свідчить про важливість сигнальної функції β-катеніну при розвитку деяких патологій дорослого серця та при адаптації міокарда до стресових факторів [5, 6]. Відомо, що активація Wnt/β-катенінового сигнального шляху необхідна для регенерації міокарда після інфаркту [7–10], а також при адаптації дорослого серця до гемодинамічного стресу [5, 6, 11–13]. Однак не існує одностайної думки вчених щодо участі канонічного Wnt-сигнального шляху та β-катеніну у цих процесах, оскільки дані, отримані різними групами авторів, є досить суперечливими. Так, показано, що для ефективної регенерації міокарда необхідною умовою є саме пригнічення сигнальної функції β-катеніну [7, 14]. Не існує одностайної думки і стосовно ролі сигнальної функції β-катеніну в розвитку гіпертрофічної відповіді. Експериментально було показано, що саме інгібування цього сигналінгу спричиняє розвиток патології [15].

Отже, сигнальна функція канонічного Wnt-шляху загалом та β-катеніну зокрема при адаптаціях дорослого міокарда до фізичних навантажень та/або інших стресових факторів потребує детальнішого вивчення. Саме тому у своїй роботі ми зосередили увагу на дослідженні динаміки активності канонічного Wnt-шляху та β-катеніну при адаптивних змінах дорослого серця, пов'язаних із фізичними навантаженнями. Ми дослідили зміни експресії генів гіпетрофічної відповіді та генів, що залучені до реалізації канонічного Wnt-сигналінгу, за умов індукованого дефіциту гена β-катеніну та у нормі при тривалому фізичному навантаженні. Для досягнення мети ми індукували ембріональну кардіоспецифічну делецію одного алеля гена β-катеніну з використанням умовно нокаутних та трансгенних тварин.

Матеріали і методи

Для отримання кардіоспецифічної делеції гена-мішені (β-катеніну) схрещували мишей, що експресують бактеріальну Cre-рекоміназу під

© ПАЛЬЧЕВСЬКА О. Л., БАЛАЦЬКИЙ В. В., МАЦЕВИЧ Л. Л., ПІВЕНЬ О. О., ЛУКАШ Л. Л.

контролем промотора важкого ланцюга α-міозину ((αMHC)-Cre) і гетерозиготних за умовним нокаутом β-катеніну ((αMHC)-Cre; β-cat$^{flox/wt}$) із тваринами гомозиготними за умовним нокаутом β-катеніну (β-cat$^{flox/flox}$) [16]. Новонароджених тварин генотипували у віці 5–6 діб згідно зі стандартними протоколами.

Сигнальну функцію β-катеніну при адаптаціях тварин до фізичного навантаження досліджували із використанням самців мишей віком три місяці. Фізичне навантаження тварин моделювали із застосуванням плавального тесту за описаною та адаптованою методикою [17]. Для оцінки гіпертрофічної відповіді використовували індекс співвідношення маси серця до маси тіла (МС/МТ). Сигнальну функцію β-катеніну при фізичному навантаженні міокарда досліджували у тварин із кардіоспецифічною делецією одного алеля гена β-катеніну та у дикотипних тварин.

Трансгенні тварини були люб'язно надані доктором Міхаелєм Шнайдером (Медичний коледж, Байлор, США). Тварини, гомозиготні за умовним нокаутом β-катеніну (β-catenin$^{flox/flox}$), були отримані із Джексон лабораторії (Jackson Laboratories, USA).

Генотипування, виділення ДНК, виділення тотальної РНК, синтез кДНК, полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі проводили згідно зі стандартними протоколами [18]. Для аналізу експресії генів із тканини ізольованого міокарда без передсердь виділяли тотальну РНК за допомогою UltraClean®Tissue & Cells RNA Isolation Kit (MO BIO) згідно з рекомендаціями виробника. Отриману РНК обробляли ДНКазою I та використовували для синтезу кДНК. Синтез кДНК здійснювали за допомогою First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) згідно з рекомендаціями виробника. Реакцію ПЛР у реальному часі проводили з використанням суміші Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR MasterMix (Thermo Scientific) на приладі iCycler single-color real-time PCR detection system (IQ5, BioRad). Аналізували зміни рівня експресії таких генів: *ANP*, *BNP*, *β-MHC*, *TCF-4* та *cMyc* [19].

Експресію генів представляли як ΔC_T, нормалізовану відносно референтного гена GAPDH. $\Delta\Delta C_T$ кожного цільового гена вираховували з середнього значення ΔC_T контрольної групи. Різницю в кількості між дослідом і контролем розраховували, використовуючи формулу $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Статистичну обробку даних проводили з використанням пакету STATISTICA 8.0.

Результати та обговорення

Для дослідження сигнальної функції гена β-катеніну при адаптаціях дорослого міокарда до фізичних навантажень ми використали стандартний плавальний тест [17]. Самці мишей контрольної та дослідної (з делецією одного алеля гена β-катеніну) груп тварин отримували фізичні навантаження протягом 6 тижнів. Тривалість таких навантажень починалась із 5 хвилин плавання та поступово збільшувалася на 1,5 хвилини щоденно до досягнення 1 години тренування. Застосування такого методу дозволяло моделювати тривале фізичне навантаження, що призводило до розвитку фізіологічної гіпертрофії міокарда або атлетичного міокарда. Аналіз індексу співвідношення маси серця до маси тіла (МС/МТ) тварин контрольної та дослідної груп, що отримували тривале тренування, та тварин, що не отримували фізичного навантаження, виявив достовірне збільшення індексу МС/МТ у обох груп мишей за умов фізичного тренування (рис. 1).

Про розвиток гіпертрофічної відповіді у тварин під впливом фізичних навантажень свідчить і аналіз зміни рівня експресії деяких генів — маркерів гапертрофії (рис. 2).

Однак варто зауважити, що у тварин дослідної групи з дефіцитом гена β-катеніну навіть за умов відсутності фізичного навантаження спо-

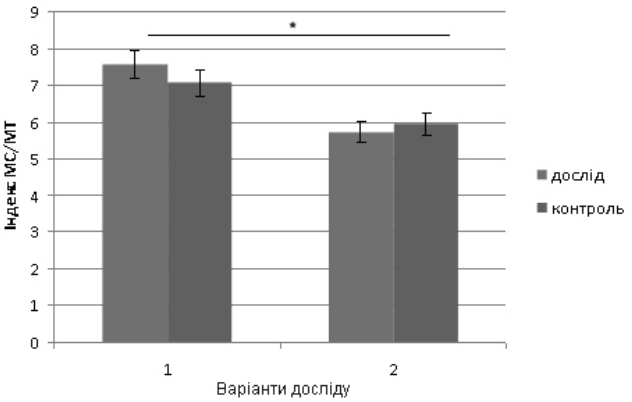


Рис. 1. Аналіз індексу співвідношення маси серця до маси тіла у тварин, що отримували тривале фізичне навантаження (1), у порівнянні з тваринами, що не перебували під впливом фізичного стресу (2). Підвищення індексу МС/МТ свідчить про збільшення маси серця у тварин, що перебували під впливом фізичного стресу. Кількість тварин у групах — 7–18.
*p = 0,07

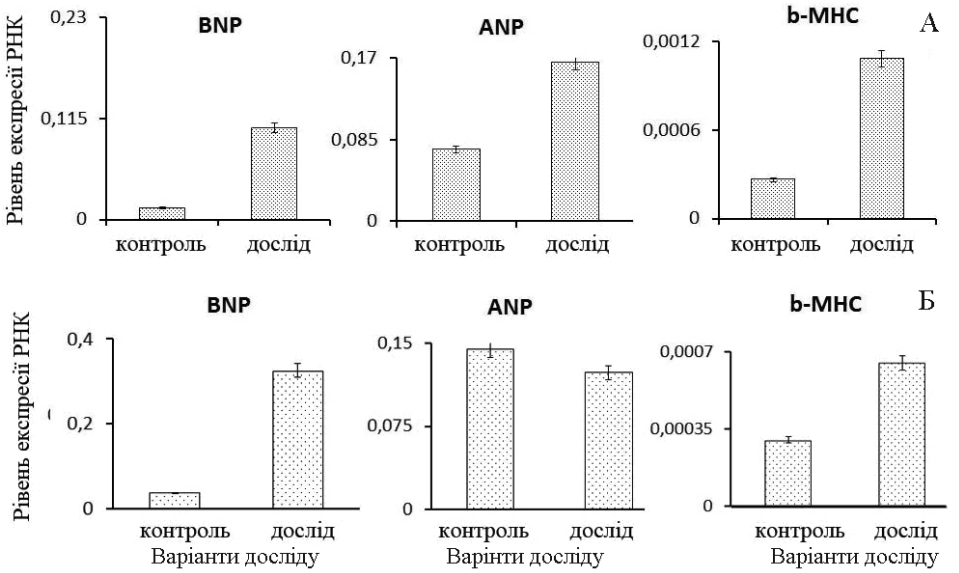


Рис. 2. Дослідження рівня експресії генів гіпертрофічної відповіді при тривалому фізичному навантаженні. Контроль — дикотипні самці; дослід — група тварин з ембріональною кардіоспецифічною делецією одного алеля гена β-катеніну. Кількість тварин у групах — 2–3

стерігалося підвищення рівня експресії нутріуретичних пептидів А- та В-типів та міозину ембріонального серця *β-MHC* (рис. 2, А). Ймовірно, дефіцит гена β-катеніну у тканині міокарда призводить до порушення експресії фетальних або гіпертрофічних генів навіть за нормальних умов утримання тварин (без впливу стресових факторів або навантажень). Цікаво також, що за умов тривалого фізичного стресу достовірно підвищувалась експресія гена *ANP* як у тварин контрольної групи, так і у тварин із дефіцитом гена β-катеніну у тканині міокарда. Ймовірно, саме нутріуретичний пептид типу А залучений до фізіологічної гіпертрофії більшою мірою, аніж *BNP*.

Для з'ясування участі канонічного Wnt-сигналінгу та β-катеніну в адаптаціях дорослого міокарда до фізичних навантажень ми проаналізували зміни рівня експресіїї гена *TCF-4* — транскрипційного ко-активатора канонічного Wnt-сигналінгу та одного з генів-мішеней β-катеніну — *c-myc*. Результати аналізу виявили, що при тривалому фізичному навантаженні у дослідних тварин спостерігали підвищення рівня експресії генів *TCF-4* та *c-myc* у тканині міокарда (рис. 3).

Відомо, що адаптація дорослого міокарда до фізичних навантажень та інших стресових чинників відбувається за рахунок гіпертрофічного росту кардіоміоцитів. Отримані нами дані свідчать про те, що сигнальна функція β-катеніну є важливою умовою ефективної адаптації дорослого серця до тривалих фізичних навантажень. Цікаво, що у дослідної групи тварин з дефіцитом гена β-катеніну спостерігалася вища активність канонічного Wnt/β-катенінового сигналінгу. Тож сигнальна функція β-катеніну в адаптивних змінах дорослого міокарда потребує детальнішого дослідження.

Висновки

У результаті проведеної роботи було показано, що дефіцит гена β-катеніну призводить до порушення експресії фетальних (гіпертрофіч-

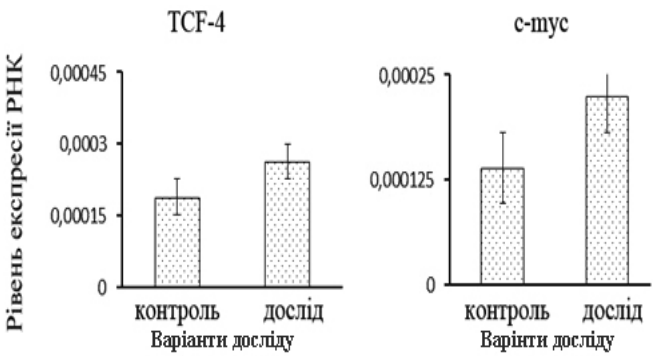


Рис. 3. Дослідження рівня активності канонічного Wnt-сигналінгу при тривалому фізичному навантаженні: контроль — дикотипні самці; дослід — група тварин з ембріональною кардіоспецифічною делецією одного алеля гена β-катеніну. Кількість тварин в групах — 2–3

них) генів навіть за умов відсутності стресу. Було виявлено активацію канонічного Wnt-сигналінгу при адаптації дорослого міокарда до тривалого фізичного навантаження, що свідчить про важливість сигнальної функції β-катеніну при адаптації дорослого міокарда до стресових чинників.

ЛІТЕРАТУРА

1. Сердечно-сосудистые заболевания [Електронний ресурс]. — Режим доступу: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/ru/.
2. Deb A. Cell-cell interaction in the heart via Wnt/β-catenin pathway after cardiac injury // Cardiovasc. Res. — 2014. — N 102. — P. 214–223.
3. Clevers H. Wnt/β-catenin signaling in development and disease // Cell. — 2006. — 127, N 3. — P. 470–480.
4. Piven O., Kostetskii I., Macewicz L., Kolomijec Y., Radice G., Lukash L. Requirement for N-cadherin-catenin complex in heart development // Exp. Biol. Med. — 2011. — N 6. — P. 1–7.
5. Malekar P., Hagenmueller M., Anyanwu A., Buss S., Streit M. R., Weiss C. S., Wolf D., Riffel J., Bauer A., Katus H. A., Hardt S. E. Wnt signaling is critical for maladaptive cardiac hypertrophy and accelerates myocardial temodeling // Hypertension. — 2010. — N 55. — P. 939–945.
6. Brade T., Manner J., Kuhl M. The role of Wnt signalling in cardiac development and tissue remodeling un the mature heart // Cardiovasc. Res. — 2006. — N 2006. — P. 198–209.
7. Barandon L., Couffinhal T., Ezan J., Dufourcq P., Costet P., Alzieu P., Leroux L., Moreau C., Dare D., Duplaa C. Reduction of infarct size and prevention of cardiac rupture in transgenic mice overexpressing FrzA // Circulation. — 2003. — 108, N 18. — P. 2282–2289.
8. Hahn J. Y., Cho H. J., Bae J. W., Yuk H. S., Kim K. I., Park K. W., Koo B. K., Chae I. H., Shin C. S., Oh B. H., Choi Y. S., Park Y. B., Kim H. S. β-Catenin overexpression reduces myocardial infarct size through differential effects on cardiomyocytes and cardiac fibroblasts // J. Bio. Chem. — 2006. — 281, N 41. — P. 30979–30989.
9. Duan J., Gherghe C., Liu D., Hamlett E., Srikantha L., Rodgers L., Regan J. N., Rojas M., Willis M., Leask A., Majesky M., Deb A. Wnt1/βcatenin injury response activates the epicardium and cardiac fibroblasts to promote cardiac repair // EMBO J. — 2011. — 31, N 2. — P. 429–442.
10. Oerlemans M. I., Goumans.J., van Middelaar B., Clevers H., Doevendans P. A., Sluijter J. P. Active Wnt signaling in response to cardiac injury // Bsic. Res. Cardiol. — 2010. — 105, N 5 — P. 631–641.
11. Sugden P. H., Fuller S. J., Weiss S. C., Clerk A. Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the heart: a point of integration in hypertrophic signaling and a therapeutic target? A critical analysis // Brit. J. Pharmac. — 2008. — N 153. — P. 137–153.
12. Chen X., Shevtsov S. P., Hsich E., Cui L., Haq S., Aronovitz M., Kerkela R., Molkentin J. D., Liao R., Salomon R. N., Petten R., Force T. The β-catenin/T-cell factor/lymphocyte enhancer factor signaling pathway is required for normal and stress induced cardiac hypertrophy // Mol. Cell. Biol. — 2006. — 26, N 12. — P. 4462–4473.
13. Qu J., Zhou J., Yi X. P., Dong B., Zheng H., Miller L. M., Wang X., Schneider M. D., Li F. Cardiac-specific haploinsufficiency of β-catenin attenuates cardiac hypertrophy but enhances fetal gene expression in response to aortic constriction // J. Mol. Cell. Cardiol. — 2007. — 43, N 3. — P. 319–326.
14. Zelarayan L. C., Noack C., Sekkali B., Kmecova J., Gehrke C., Renger A., Zafiriou M. P., van der Nagel R., Dietz R., de Windt L. J., Balligand J. L., Bergmann M. W. β-Catenin downregulation attenuates ischemic cardiac remodeling through enhanced resident precursor cell differentiation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2008. — 105, N 50. — P. 19762–19767.
15. Baurand A., Zelarayan L., Betney R., Gehrke C., Dunger S., Noack C., Busjahn A., Huelsken J., Taketo M. M., Birchmeier W., Dietz R., Bergmann M. W. β-Catenin downregulation is required for adaptive cardiac remodeling // Circ. Res. — 2007. — 100, N 9. — P. 1353–1362.
16. Agah R., Frenkel P. A., French B. A., Michael L. H., Overbeek P. A., Schneider M. D. Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle *in vivo* // J. Clin. Invest. — 1997. — 100. — P. 169–179.
17. Evangelista F. S., Brum P. C., Krieger J. E. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice // Braz. J. Med. Biol. Res. — 2003. — 36, N 12. — P. 1751–1759.
18. Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., Behringer R. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.
19. Li J., Swope D., Raess N., Cheng L., Muller E. J., Radice G. L. Cardiac tissue-restricted deletion of plakoglobin results in progressive cardiomyopathy and activation of {beta}-catenin signaling // Mol. Cell. Biol. — 2011. — 31, N 6. — P. 134–144.

PALCHEVSKA O.L., BALATSKYY V.V., MACEWICZ L.L., PIVEN O.O., LUKASH L.L.

Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 150, e-mail: o.o.piven@imbg.org.ua

SIGNALING FUNCTION OF β-CATENIN DURING ADULT MYOCARDIUM ADAPTATION TO PHYSICAL TRAINING

Aims. Our current work is devoted to the adaptation of the myocardium of wild-type and animals with embryonic cardiospecific haploinsufficiency of β-catenin to physical training, namely smimming. ***Methods.*** Trangenic and wild-type animals were subjected to swimming test. The qPCR analysis of hypertrohic (*ANP*, *BNP*, *β-MHC* and *α-MHC*) and Wnt/β-catenin pathway target genes (*TCF4* and *c-myc*) was performed for control and trained mice. The HW/BW index was calculated to estimate myocardium hypertrophy development. ***Results.*** The increase of HW/BW index for trained animals was shown. The increase of hypertrophic genes (*ANP*, *BNP*, *β-MHC*, and *α-MHC*) were detected in both trained and control animals with β-catenin gene haploinsufficiency. It is also important to note that Wnt target genes were upregulated only in the β-catenin haploinsufficient stressed animals. ***Conclusions.*** The results show that β-catenin gene deficiency leads to fetal (hypertrophic) genes violation even for unstressed animals. The activation of Wnt-signaling pathway was detected during adult myocardium adaptation to physical stress. These observations point to the conclusion that β-catenin gene function plays important role in the heart adaptation and remodeling during stress.

Keywords: physiological cardiac hypertrophy, β-catenin haploinsufficiency, canonical Wnt signaling, heart adaptation, physical training.

УДК 575.21+577.2

ПІДПАЛА О. В., ЛУКАШ Л. Л.
Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, e-mail: pidpala@ukr.net

МОТИВИ РЕГУЛЯТОРНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ У ПРОМОТОРНИХ ДІЛЯНКАХ ГЕНА *MGMT* ЛЮДИНИ В МЕЖАХ МОБІЛЬНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ЕЛЕМЕНТІВ

Дослідження останніх років спростовують уявлення про мобільні генетичні елементи (МГЕ) як про нефункціональний баласт геному [1–4]. Вклад МГЕ як одного з основних чинників еволюційних надбань і учасника нових регуляційних новацій клітини неоціненний [5, 6]. Тому в нашому дослідженні ми ставимо акцент на вивченні можливого залучення МГЕ до регуляції репаративного гена *MGMT* людини, який кодує фермент O^6-метилгуанін-ДНК метилтрансферазу і видаляє алкільні групи з O^6-позиції гуаніну у ДНК, захищаючи клітини від їхнього токсичного та мутагенного впливів [7, 8].

У попередніх своїх дослідженнях ми вивчали розподіл МГЕ у гені *MGMT* людини і показали, що вони присутні в інтронних послідовностях із перевагою *LINE*-елементів [9]. У двох інтронах (інтроні 2 та інтроні 3) МГЕ утворюють композиційні кластерні структури, до складу яких входять фрагменти *LINE1*-елементів самостійно чи у поєднанні з представниками інших класів МГЕ. Показано, що композиційні кластерні структури МГЕ збагачені промотороспецифічними елементами і мають потенціал для формування альтернативних промоторів [10].

Метою цього дослідження було дослідити промоторні ділянки гена *MGMT* людини на наявність МГЕ та виявити у їхньому складі мотиви пізнавання транскрипційних факторів.

Матеріали і методи

Дані про промоторні ділянки гена репаративного ферменту O^6-метилгуанін-ДНК метилтрансферази (*MGMT*) одержано з GeneBank (X61657) та з бази даних Transcriptional Regulatory Element Database, TRED (Accession Number 5071) (http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED). Результати пошуку та ідентифікації МГЕ здійснено за допомогою програми CENSOR (http://www.girinst.org). Функціональні сайти визначено програмою TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites (ver 1.3) (http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html).

Результати та обговорення

Фрагменти мобільних генетичних елементів у промоторних ділянках гена MGMT людини. Ген *MGMT* людини локалізований на теломерній ділянці хромосоми 10 у положенні 10q26 і складається з одного некодуючого і чотирьох кодуючих екзонів та чотирьох інтронів. Реферований промотор досліджуваного гена (X61657) має довжину 1157 п. н. і охоплює екзон 1 і частину інтрону 1. Він позбавлений TATA або CAAT послідовностей, містить CG-багаті ділянки і за структурою нагадує гени домашнього господарства. Також він містить Sp1, AP-1 і AP-2, NFkB сайти, два елементи, що зв'язують глюкокортикоїдний рецептор (GRE) і елемент розміром 59 п. н., який розташований на першому екзон-інтронному кордоні і необхідний для ефективної транскрипції репортерних конструкцій [11, 12].

Аналізуючи реферовану промоторну ділянку гена *MGMT* людини (hO^6P1), виявили послідовності двох фрагментів *LTR*-повторів ретровірусів ссавців, а саме *LTR*-повтор ретровірусоподібного елементу MaLR (*MLT1C*) і *LTR*-повтор ендогенного ретровірусу ERV3 (*MLT1C2*) та фрагмент послідовності, який гомологічний Mutator-подібному неавтономному ДНК-транспозону рослин *SETARIA1* (табл.). Два *LTR*-повтори розташовані у дистальній частині промоторної послідовності. Варто зазначити, що описані елементи відгуку на глюкокортикоїдні гормони (GRE) із координатами 28–42 і 63–77 [11] локалізуються у межах одного з фрагментів *LTR*-повтору, а саме *MLT1C2*. Цікаво також, що мінімальний промотор (886–955) і послідовність SP1 сайту (862–867) [11] знаходяться у межах послідовності *SETARIA1*.

Проаналізували також нуклеотидну послідовність, яку у базі даних TRED подано як послідовність промоторної ділянки досліджуваного гена. Вона починається в інтроні 1, охоплює екзон 2 і частково інтрон 2. Аналізуючи дану послідовність (hO^6P2), виявили у дистальній частині частково делетований фрагмент *AluJr*-повтору (табл.).

© ПІДПАЛА О. В., ЛУКАШ Л. Л.

Таблиця

Фрагменти мобільних генетичних елементів у промоторних ділянках гена репаративного ферменту *MGMT* людини

Умовне позначення промотору	Дані про мобільні генетичні елементи				
	елемент	клас	довжина	напрямок	координати у межах промотору
hO^{6}P1	*MLT1C2*	ERV/ERV3	117	c	–949/–839
	MLT1C	ERV/ERV3	147	c	–813/–667
	SETARIA1	DNA	341	d	–265/+76
hO^{6}P2	*AluJr*	Non-LTR/SINE	180	c	–768/–589

Примітки: c — комплементарний, d — прямий.

Виявлено, що до 24% генів містять МГЕ у промоторних ділянках [13]. Особливо збагачені МГЕ гени, які пов'язані з метаболічними процесами [14]. Для генів *DNAseII* і *CAML* людини показано, що наявність *Alu*-повторів у складі їхніх промоторів може впливати на експресію цих генів [15]. Відомо, що ген людини *MSLN* (*Mesothelin*, мегакаріоцит-потенціювальний фактор) має два промотори, один із яких утворений послідовністю *LTR*, а інший — *MIR* елементом (тРНК-подібний SINE) [16]. Єдиним на даний момент відомим промотором гена *BAAT*, що специфічно експресується у печінці і задіяний у розвитку спадкового захворювання, пов'язаного з метаболізмом жовчі, також є послідовність *LTR*-повтору [17]. Цікавим є випадок регуляції транскрипції гена *NAIP*, що кодує один із інгібіторів апоптозу. Показано, що промоторні ділянки даного гена людини і гризунів не мають гомології, проте і в одному, і в іншому випадку *LTR* є альтернативними промоторами [18]. У людини інтеграція *LTR* призвела до утворення тканиноспецифічного промотору, активного переважно в яєчках, у той час як у гризунів описано два *LTR*, які здатні ініціювати транскрипцію. Один із них є основним, конститутивним промотором, активним у всіх гризунів, а інший — альтернативним, знайденим лише у миші. Важливо зазначити, що *LTR* людини і гризунів, які знаходяться у промоторній ділянці гена *NAIP*, не є спорідненими. Цей випадок є прикладом незалежного залучення *LTR* до регуляції транскрипції ортологічних генів [18].

Потенційні цис-елементи у межах фрагментів мобільних генетичних елементів у промоторних ділянках досліджуваного гена. У межах *LTR*-повторів нами виявлено нові потенційні цис-регуляторні послідовності: елемент відгуку на білки теплового шоку HSF2, сайти зв'язування для кількох представників родини GATA-білків (важливі регулятори специфікації та диференціювання різних тканин), MZF1 (залучений до контролю клітинної проліферації і канцерогенезу), NF-kap (участь в активації транскрипції численних цитокінових та імунорегуляторних генів), AML-1 (регуляція гемопоезу, ангіогенезу і нейрогенезу), C/EBP (контроль диференціювання різних типів клітин і ключова роль у регулюванні клітинної проліферації через взаємодію з білками клітинного циклу), CRE-BP (важлива роль у розвитку та функціонуванні нервової системи), Nkx-2.5 (регуляція експресії тканиноспецифічних генів, розвитку серця, часової та просторової моделей розвитку), CDP (регулює експресію генів, морфогенез і диференціацію, відіграє певну роль у прогресії клітинного циклу, особливо в S-фазі) і потенційний гормон-асоційований елемент для ретиноїдного орфанового рецептора RORalpha1 (orphan hormone nuclear receptor) (рис. 1, *а, б*).

У складі послідовності фрагмента ДНК-транспозону *SETARIA1* (рис. 1, *в*), крім численних потенційних сайтів зв'язування для фактора Sp1 (один із основних факторів транскрипції, бере участь у регуляції клітинного циклу, зміні структури хроматину і регуляції метилування ДНК), виявили мотиви пізнавання для транскрипційних факторів GATA-2 (гематопоетичний транскрипційний фактор), c-Rel (участь в імунних і запальних реакціях, процесах розвитку, росту клітин і апоптозу) і USF (один із ключових регуляторних елементів експресії генів).

AluJr-повтор, ідентифікований у відомій послідовності промоторної ділянки досліджуваного гена (hO^{6}P2), як видно із результатів, наведених на рис. 2, виявляє гомологію із сайтами зв'язування для семи транскрипційних факторів: Elk-1 (ключовий регулятор індуцибельної транскрипції протоонкогена c-fos); SREBP (ключовий регулятор експресії генів ліпідного метаболізму); Sp1, функції якого наведені вище; GATA-2 (ге-

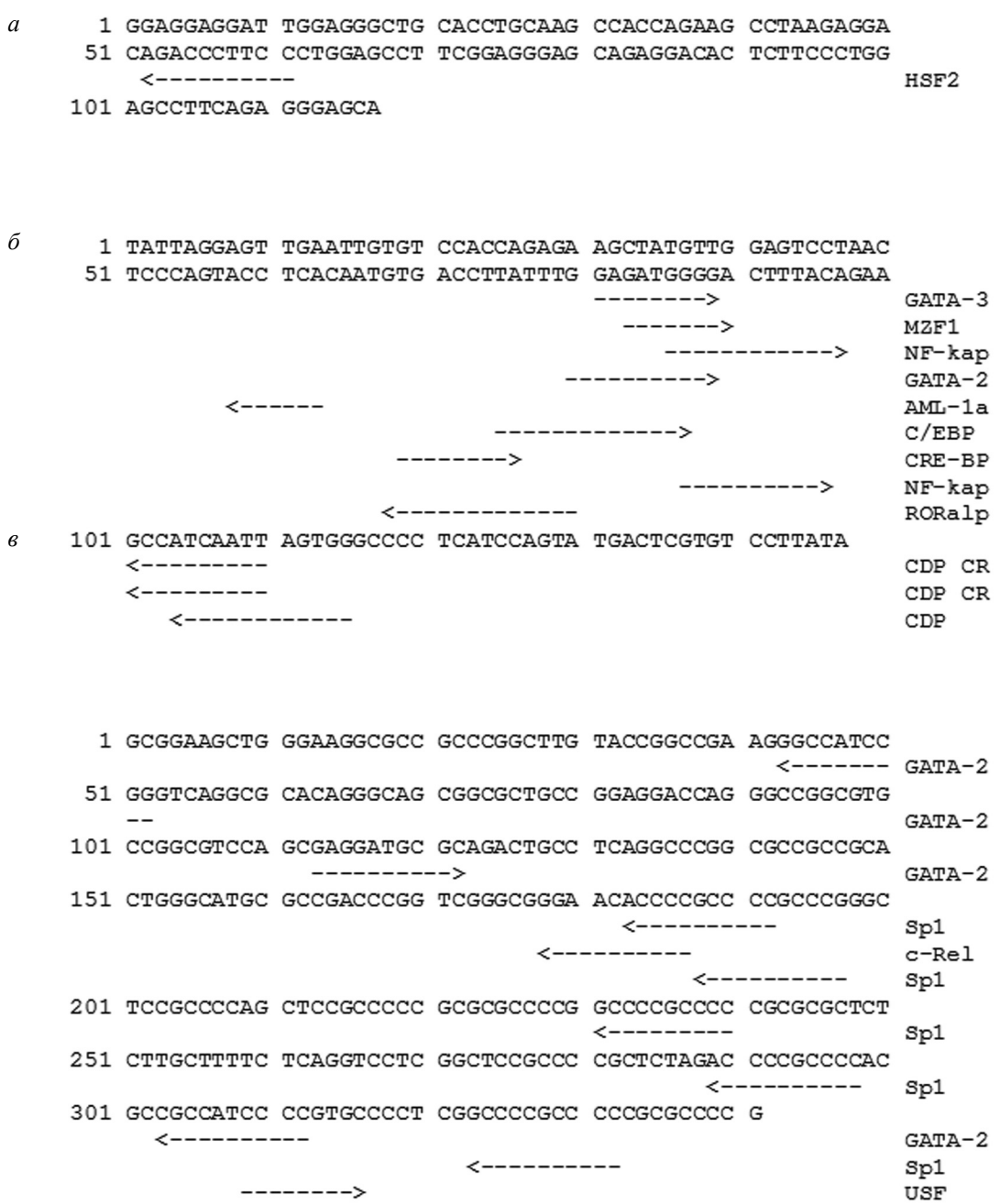


Рис. 1. Потенційні цис-регуляторні елементи у послідовностях, гомологічних фрагментам МГЕ, що ідентифіковані у межах послідовності реферованого промотору (hO^{6}P1) гена *MGMT* людини: *а — MLT1C2*; *б — MLT1C*; *в — SETARIA1*

матопоетичний транскрипційний фактор); Tst-1 (транскрипційний регулятор у кератиноцитів, гліальних клітин і нейронів); E2F (ключова роль у регуляції клітинного циклу) та Oct-1 (відіграє важливу роль у розвитку і функціонуванні нервової системи).

Останнім часом не тільки для *LTR* елементів, які називають «пакетами регуляторної інформації» [19], але і для інших МГЕ показана наявність у їхній структурі численних регуляторних послідовностей. Інтегруючи у промоторні ділянки генів, МГЕ можуть бути джерелом цис-регуляторних модулів, які є кластерами сайтів зв'язування транскрипційних факторів [13, 14, 20]. Зокрема, у консенсусній послідовності *Alu*-повторів виявлено наявність сайтів зв'язування для 20-ти транскрипційних факторів, функціональну активність більшості з яких доведено експериментально [14]. Крім того, у *Alu*-повторах ідентифіковано функціональні сайти зв'язування

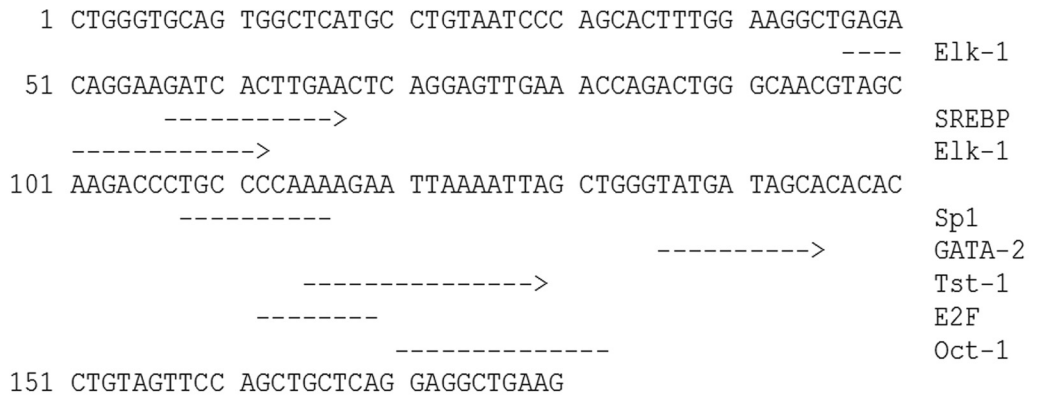


Рис. 2. Потенційні сайти зв'язування для транскрипційних факторів у межах фрагмента *AluJr*-повтору у промоторній ділянці (hO^{6}P2) гена *MGMT* людини

для рецепторів ретиноїдної кислоти [21, 22] і гормоно-акцепторні елементи [23, 24]. Основна частина (більш ніж 70%) потенційних гормон-асоційованих елементів для тиреоїдного гормону, ретиноїдної кислоти й естрогенів розташована саме в *Alu*-повторах. У клітинах CV-1 показано, що зв'язуючись із ядерними рецепторами, *Alu*-асоційований елемент DR-4 може регулювати транскрипційну активність залежно від присутності гормону щитоподібної залози [25]. Білки великої родини ядерних гормональних рецепторів можуть зв'язуватися не лише з AGGTCA-блоком, але і з різними варіантами, що виникають внаслідок його дуплікації [26, 27]. Висловлено припущення, що *Alu*-повтори є «контейнерами», які містять набори потенційних послідовностей для зв'язування різноманітних транскрипційних факторів. Безпосередню участь *Alu*-повторів у регуляції експресії показано для генів, які пов'язані з диференціюванням і розвитком, а саме для генів *PTH, FcεRI-γ, CD8α, CHRNA3, BRCA-1* і *PLOD-1* [28]. Також в *Alu*-повторах виявлено сайти зв'язування транскрипційних факторів, які задіяні у гемопоезі, Т-клітинній диференціації і при розвитку різних органів (очей, зубів, серця, легень, мозку) [14], що є ще одним доказом на користь участі *Alu*-повторів в онтогенезі.

Отже, у реферованому промоторі гена *MGMT* людини (hO^{6}P1) ідентифіковано три послідовності, які гомологічні фрагментам МГЕ, а саме два *LTR*-повтори і фрагмент ДНК-транспозону. Той факт, що один із *LTR*-повторів містить описані раніше елементи відгуку на глюкокортикоїдні гормони (GRE), і те, що відомий мінімальний промотор і послідовність SP1 сайту розташовані у межах фрагмента ДНК-транспозону, підтверджують важливу роль МГЕ у генній регуляції. Показано, що послідовність фрагмента *AluJr*-повтору у межах відомого промотору (hO^{6}P2) досліджуваного гена *MGMT* має гомологію із сайтами зв'язування для семи транскрипційних факторів. Виявлені у цій роботі потенційні цис-регуляторні послідовності у МГЕ, можливо, окреслять нові шляхи у розгалудженій сигнальній мережі досліджуваного гена.

Висновок

Ідентифіковані фрагменти МГЕ у промоторних ділянках гена *MGMT* людини збагачені потенційними цис-регуляторними послідовностями, які можуть бути задіяні у регуляції даного гена.

ЛІТЕРАТУРА

1. Gbadegesin M.A. Transposable elements in the genomes: parasites, junks or drivers of evolution? // Afr. J. Med. Med. Sci.— 2012.— 41, N l.— P. 13–25.
2. Casacuberta E., González J. The impact of transposable elements in environmental adaptation // J. Mol.Ecol.— 2013.— 22, N 6.— P. 1503–1517.
3. Bonchev G., Parisod C. Transposable elements and microevolutionary changes in natural populations // Mol. Ecol. Resour.— 2013.— 13, N 5.— P. 765–775.
4. Vitte C., Fustier M.A., Alix K., Tenaillon M.I. The bright side of transposons in crop evolution // Brief Funct. Genomics.— 2014.— 13, № 4.— P. 276–295.

5. Rebollo R., Romanish M. T., Mager D. L. Transposable elements: an abundant and natural source of regulatory sequences for host genes // Annu. Rev. Genet.— 2012.— 46.— P. 21–42.
6. de Souza F. S., Franchini L. F., Rubinstein M. Exaptation of transposable elements into novel cis-regulatory elements: is the evidence always strong? // Mol. Biol. Evol.— 2013.— 30, N 6.— P. 1239–1251.
7. Pegg A. E. Repair of O^6-alkylguanine by alkyltransferases // Mutat. Res.— 2000.— 262, N 2–3.— P. 83–100.
8. Kaina B., Christmann M., Naumann S., Roos W. P. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents // DNA Repair (Amst).— 2007.— 8.— P. 1079–1099.
9. Підпала О. В., Лукаш Л. Л. Розподіл мобільних генетичних елементів у гені О(6)-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза людини // Актуальні проблеми сучасної біології та здоров'я людини.— 2012.— 12.— С. 150–154.
10. Підпала О. В., Лукаш Л. Л. Композиційні кластерні структури мобільних генетичних елементів у інтронах гена MGMT як джерело регуляторних послідовностей // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / Під ред. В. А. Кунаха [та ін.].— 2014.— 14.— С. 220–224.
11. Harris L. C., Potter P. M., Tano K., Shiota S., Mitra S., Brent T. P. Characterization of the promoter region of the human O^6-methylguanine-DNA methyltransferase gene // Nucleic Acids Res.— 1991.— 19, N 22.— P. 6163–6167.
12. Harris L. C., Remack J. S., Brent T. P. Identification of a 59 bp enhancer located at the first exon/intron boundary of the human O^6-methylguanine-DNA methyltransferase gene // Nucleic Acids Res.— 1994.— 22, N 22.— P. 4614–4619.
13. Jordan I. K., Rogozin I. B., Glazko G. V., Koonin E. V. Origin of a substantial fraction of human regulatory sequences from transposable elements // Trends Genet.— 2003.— 19, N 2.— P. 68–72.
14. Polak P., Domany E. Alu elements contain many binding sites for transcription factors and may play a role in regulation of developmental processes // BMC Genomics.— 2006.— 7.— P. 133.
15. Усманова Н. М., Казаков В. И., Томилин Н. В. Ретротранспозоны Alu-семейства из цис-регуляторных модулей промоторов генов DNAseII и CAML влияют на генную экспрессию в клетках A549 и HEK293 // Цитология.— 2008.— 50, N 3.— С. 249–255.
16. van de Lagemaat L. N., Landry J. R., Mager D. L., Medstrand P. Transposable elements in mammals promote regulatory variation and diversification of genes with specialized functions // Trends Genet.— 2003.— 19, N 105.— P. 530–536.
17. Bannert N., Kurth R. Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2004.— 101, N l 2.— P. 14572–14579.
18. Romanish M. T., Lock W. M., de Lagemaat L. N., Dunn C. A., Mager D. L. Repeated Recruitment of LTR Retrotransposons as Promoters by the Anti-Apoptotic Locus NAIP during Mammalian Evolution // PLoS Genet.— 2007.— 3, N 1.— e10.
19. Sverdlov E. D. Perpetually mobile footprints of ancient infections in human genome // FEBS Lett.— 1998.— 428, N 1–2.— P. 1–6.
20. Shankar R., Grover D., Brahmachari S. K., Mukerji M. Evolution and distribution of RNA polymerase II regulatory sites from RNA polymerase III dependant mobile Alu elements // BMC Evol. Biol.— 2004.— 4, N 1.— P. 37.
21. Vansant G., Reynolds W. F. The consensus sequence of a major Alu subfamily contains a functional retinoic acid response element // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1995.— 92, N 18.— P. 8229–8233.
22. Laperriere D., Wang T. T., White J. H., Mader S. Widespread Alu repeat-driven expansion of consensus DR2 retinoic acid response elements during primate evolution // BMC Genomics.— 2007.— 8.— P. 23.
23. Babich V., Aksenov N., Alexeenko V., Oei S. L., Buchlow G., Tomilin N. Association of some potential hormone response elements in human genes with the Alu family repeats // Gene.— 1999.— 239, N 2.— P. 341–349.
24. Piedrafita F. J., Molander R. B., Vansant G., Orlova E. A., Pfahl M., Reynolds W. F. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element // J. Biol. Chem.— 1996.— 271, N 24.— P. 4412–4420.
25. Oei S., Babich V. S., Kazakov V. I., Usmanova N. M., Kropotov A. V., Tomilin N. V. Clusters of regulatory signals for RNA polymerase II transcription associated with Alu family repeats and CpG islands in human promoters // Genomics.— 2004.— 83, N 5.— P. 873–882.
26. Umesono K., Murakami K. K., Thompson C. C., Evans R. M. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors // Cell.— 1991.— 65, N 7.— P. 1255–1266.
27. Mangelsdorf D. J., Evans R. M. The RXR heterodimers and orphan receptors // Cell.— 1995.— 83, N 6.— P. 841–850.
28. Hamdi H. K., Nishio H., Tavis J., Zielinski R., Dugaiczyk A. Alu-mediated phylogenetic novelties in gene regulation and development // J. Mol. Biol.— 2000.— 299, N 4.— P. 931–939.

PIDPALA O.V., LUKASH L.L.

Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 150, e-mail: pidpala@ukr.net

MOTIVES OF THE REGULATORY SEQUENCES IN PROMOTERS OF HUMAN *MGMT* GENE WITHIN THE TRANSPOSABLE ELEMENTS

***Aims*.** It has been carried out analysis of the MGEs in promoters of human *MGMT* gene for the sequences homologous to binding sites of the transcription factors. ***Methods*.** Searching and identifying MGEs were realised by using CENSOR (http://www.girinst.org). The functional sites were defined by the program TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites (ver 1.3) (http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html). ***Results*.** Two LTR repeats and the fragment of the DNA transposon were identified in promoter reference sequence of human *MGMT* gene. In addition to new potential cis-regulatory sequences one LTR repeat containing known hormone response element (GRE) and minimal promoter sequence and SP1 site were localized within the transposon DNA fragment. It has been shown that the AluJr repeat in known promoter has certain homology with seven binding sites for the transcription factors. ***Conclusions*.** The obtained results allow considering MGE identified in promoter of *MGMT* gene as a carrier for the potential cis-regulatory elements.

Keywords: human O^6-methylguanin-DNA methyltransferase (*MGMT)* gene, mobile genetic elements (MGEs), binding sites for transcription factors, cis-regulatory element.

УДК 575:572:155.9

ТИМОШИНА И. А., ПАВИЧЕНКО О. В., ФИЛИПЦОВА О. В.
Национальный фармацевтический университет,
Украина, 61002, г. Харьков, ул. Пушкинская, 53, e-mail: philiptsova@yahoo.com

ПОПУЛЯЦИОННЫЙ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПИЩЕВЫХ ПРЕДПОЧТЕНИЙ СРЕДИ ЖИТЕЛЕЙ УКРАИНЫ

Пищевое поведение человека относится к сложным признакам, обусловленным генетическими и средовыми факторами. Исследования пищевых предпочтений проводятся в самых разных популяциях мира в связи с возможными ассоциациями пищевого поведения и болезней человека. Хорошо известно, что особенности питания могут провоцировать симптоматику генных заболеваний, например фавизма, фенилкетонурии, болезни Коновалова-Вильсона и др., и предрасполагать к проявлению мультифакториальных болезней, например сахарного диабета, ожирения, сердечно-сосудистых заболеваний, хронических дегенеративных заболеваний, рака и др. [3, 6, 7, 10, 11].

Традиционным способом изучения пищевых предпочтений является метод интервьюирования на основе опросников, которые разрабатываются с учетом особенностей питания локального населения. Набор возможных пищевых предпочтений может зависеть от конкретных целей исследования. В частности, возможно включение таких условных пищевых групп, как соленое — жирное, сладкое — жирное, фрукты и овощи, рыба и др. [9].

В популяциях мира проводятся исследования наследуемости пищевых предпочтений на основе анализа родственников с фиксированной степенью родства. В большинстве исследований используют информацию о близнецах, родителях — потомках, сибсах и др. Определенную ценность представляют также данные о приемных и биологических детях и их усыновителях и биологических родителях. Коэффициент наследуемости показывает долю генетического вклада в наблюдаемую фенотипическую дисперсию признака и варьирует от 0 до 1 (или от 0 до 100%). Чем меньше значение коэффициента наследуемости, тем в меньшей степени фенотипическая дисперсия зависит от генетических различий между индивидами и, соответственно, в большей — от условий среды, в которых происходит развитие признака, и наоборот. Вычисление коэффициента наследуемости проводят на основании коэффициентов корреляции между родственниками с фиксированной степенью родства [4].

Поскольку пищевое поведение лишь частично обусловлено генетическими факторами, а средовые факторы могут со временем изменяться, важно проводить мониторинг пищевых предпочтений и осуществлять уточняющие оценки наследуемости пищевого поведения. Поскольку коэффициент наследуемости является популяционной характеристикой, его величина зависит от структуры конкретной популяции. Такие данные важны для понимания возможности коррекции пищевого поведения в локальном населении в определенные периоды времени. Ранее нами было проведено пилотное исследование пищевых предпочтений в небольшой выборке жителей Украины, которое показало ряд половых и возрастных особенностей. Также были установлены некоторые ассоциации пищевых предпочтений и других поведенческих признаков человека [1]. В настоящем исследовании популяционный анализ пищевых предпочтений был ограничен относительно однородной, но расширенной выборкой жителей Украины, представленной людьми молодого возраста. Также целью настоящей работы был генетический анализ пищевых предпочтений, включающий оценку их наследуемости на основании подхода Фальконера. Результаты подобных исследований представляют интерес не только для генетиков, но имеют практическую ценность и для других специалистов, в частности диетологов, психологов, фитнес-инструкторов и др.

Материалы и методы

Для популяционной оценки пищевых предпочтений использовали информацию о 581 жителе Украины (489 женщин и 92 мужчины) в возрасте от 16 до 25 лет. Сбор этого материала проводился в 2014 г. Информация, не подлежащая расшифровке, выбраковывалась. Для оценки связи между качественными признаками использовали критерий χ^2 [12], различия считали значимыми на уровне $p<0,05$.

© ТИМОШИНА И. А., ПАВИЧЕНКО О. В., ФИЛИПЦОВА О. В.

Все участники исследования были жителями Украины. По месту рождения среди женщин было 150 коренных жительниц г. Харькова (31,65%), 315 женщин (66,46%) родились в других населенных пунктах Украины и 9 женщин (1,90%) — за пределами Украины. Среди мужчин 19 были коренными жителями г. Харькова (22,09%), 65 мужчин (75,58%) — уроженцами других населенных пунктов Украины и 2 мужчин (2,33%) родились за пределами Украины. В целом, статистически значимые половые различия по месту рождения отсутствовали ($\chi^2 = 3,32$, $p > 0,05$, $df = 2$). В отношении заявленной национальности среди женщин было 434 (89,48%) этнических украинок, 35 (7,22%) этнических русских и 16 (3,30%) представительниц других национальностей. Среди мужчин этнических украинцев было 75 (83,33%), этнических русских — 12 (13,33%) и представителей других национальностей — 3 (3,33%) человека. Статистически значимые половые различия по этнической принадлежности также отсутствовали ($\chi^2 = 3,35$, $p > 0,05$, $df = 2$).

Для оценки наследуемости использовали информацию о пищевых предпочтениях, полученную от 291 пары «родитель — потомок» в отношении ряда пищевых предпочтений (включая 19 пар «отец — сын», 54 пары «мать — сын», 34 пары «отец — дочь» и 184 пары «мать — дочь»), 84 сибсовых пар (включая 7 пар братьев, 36 пар сестёр и 41 пару «брат — сестра») и 70 брачных пар.

Материал был собран в соответствии с этическими требованиями при работе с человеком согласно Хельсинской декларации (*World Medical Association Declaration of Helsinki, Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects*).

Пищевые предпочтения изучались методом специального интервьюирования при установке исследуемых на равную доступность пищи, отсутствие голода и возможность выбора нескольких пищевых категорий. В качестве пищевых групп, по отношению к которым изучались предпочтения, были выбраны семь следующих: сладкое — мороженое, пирожное, шоколад (высококалорийная углеводная группа), мясо — бутерброд (белковая группа), фрукты — апельсин (клетчатка и витамины), солёная пища — солёный огурец (источник NaCl), первые овощные блюда — борщ (клетчатка и витамины, «здоровая» пища), фастфуд — чипсы («вредная» пища, содержащая пищевые добавки, красители, консерванты), жирное — семечки (источник жирных кислот, в том числе незаменимых, высококалорийная пища).

Генетический анализ проводился на основе предварительного корреляционного анализа с помощью вычисления непараметрических коэффициентов корреляции Спирмена ρ. Генетический анализ проводили с учётом коэффициентов корреляции для пар «родитель — потомок» (ρ_p) («мать — дочь», «мать — сын», «отец — дочь», «отец — сын»), «сибс — сибс» (ρ_s) («брат — брат», «сестра — сестра», «брат — сестра») и «муж — жена» (ρ_{hw}). Коэффициенты корреляции между родственниками корректировали с учётом коэффициента корреляции между супругами [4]:

$$\rho' = \frac{\rho}{1 + \rho_{hw}},$$

где ρ' — скорректированный коэффициент корреляции, ρ — коэффициент корреляции между родственниками, ρ_{hw} — коэффициент корреляции между супругами. Скорректированные коэффициенты корреляции между родственниками использовали для компонентного разложения общей фенотипической дисперсии по формулам:

$$G_a = 2\,\rho_p;\ G_d = 4\,(\rho_s - \rho_p);\ G = G_a + G_d;\ E = 1 - G,$$

где G — общая генетическая компонента, G_a — её аддитивная и G_d — доминантная составляющие, E — средовая компонента.

Результаты и обсуждение

Результаты популяционного исследования показали наличие половых различий по четырём пищевым предпочтениям, в частности к сладкому, мясным блюдам, фруктам и первым овощным блюдам. Предпочтения к сладкой пище (51,47%) и фруктам (47,51%) наблюдаются примерно у половины обследованных женщин. Примерно треть женщин (31,15%) выразили предпочтения к мясным продуктам. У мужчин самыми предпочтительными продуктами питания были мясные блюда (45,68%), в то время как распределение предпочтений к сладкому (35,80%), первым овощным блюдам (34,57%) и фруктам (30,86%) было примерно одинаковым и наблюдалось примерно у трети мужчин (табл. 1).

Таблица 1

Популяционное распределение пищевых предпочтений у лиц разного пола

Пищевые предпочтения	Женщины	Мужчины	Статистики
Сладкое	51,47%	35,80%	$\chi^2 = 6,72$, df = 1, p<0,01
Мясо	31,15%	45,68%	$\chi^2 = 6,50$, df = 1, p<0,01
Фрукты	47,51%	30,86%	$\chi^2 = 7,67$, df = 1, p<0,01
Солёная пища	10,61%	8,75%	$\chi^2 = 0,25$, df = 1, p>0,05
Первые овощные блюда	16,25%	34,57%	$\chi^2 = 14,87$, df = 1, p<0,001
Фастфуд	6,09%	9,88%	$\chi^2 = 1,57$, df = 1, p>0,05
Жирное	8,13%	11,11%	$\chi^2 = 0,77$, df = 1, p>0,05

Результаты более раннего пилотного исследования, сбор материала для которого проводился 10 лет назад, показали половые различия лишь для двух пищевых предпочтений. Ранее при анализе пищевых предпочтений у мужчин и женщин были обнаружены статистически значимые различия по предпочтению фруктов и первых овощных блюд. Так, каждый пятый мужчина и всего лишь каждая пятнадцатая женщина предпочитали в отсутствие ощутимого голода первые овощные блюда, отнесенные нами в категорию «здоровой» пищи. Данную тенденцию мы объясняли особенностями культуры (национальной потребностью мужчин в традиционном украинском борще) и изменением ролевых установок женщин в современном обществе (отсутствие времени на кулинарные «изыскания» и ориентацию на пищу быстрого приготовления). В то же время в отношении фруктов половые различия свидетельствовали о том, что половина женщин и всего треть мужчин предпочитали данную категорию пищи [1].

В сравнительном аспекте можно отметить, что за 10-летний период наметились как отрицательные, так и положительные тенденции в пищевых предпочтениях жителей Украины. В частности, несколько меньше женщин выразили предпочтения к фруктам. Возможно, это является отражением средовой динамики, связанной с ухудшением экономической ситуации в стране, и меньшей доступностью «здоровой» пищи для населения, а, следовательно, и возможным снижением пищевых предпочтений к ней. В то же время, гораздо меньше населения выразило пищевые предпочтения к фастфуду, что может объясняться также как экономическим фактором, так и большей ориентацией на здоровую пищу. За указанный период времени произошло снижение предпочтений у мужчин к сладкой пище и повышение — к мясным блюдам.

Результаты корреляционного анализа в родственных парах представлены в табл. 2, 3. Как видно из табл. 2, большинство статистически значимых коэффициентов корреляции зафиксировано в парах «мать — дочь». Так, невысокие, но значимые коэффициенты корреляции наблюдаются по предпочтению мяса (0,28), фруктов (0,17), солёной пищи (0,19) и первых овощных блюд (0,25). В парах «мать — сын» значимый коэффициент корреляции наблюдался только по фруктам (0,39), а в парах «отец — дочь» — только по солёному (0,36).

У сибсов (табл. 3) значимые коэффициенты корреляции по 5 видам пищевых предпочтений были примерно одинаковыми — 0,33–0,37 (усредненные значения). У разнополых сибсов и в парах «сестра — сестра» наблюдалась положительная корреляция по предпочтению к сладкому, в то время как в парах «родитель — потомок», несмотря на одинаковую степень родства, сходства по сладкому обнаружено не было. Единственным видом пищевых предпочтений, по которому отсутствовала связь между всеми родственниками, была жирная пища.

В связи с тем, что не был исключён эффект положительной брачной ассортативности по пищевым предпочтениям, который может искусственно завышать коэффициенты наследуемости, помимо родственников корректным является включение в генетический анализ супружеских пар. В данном случае положительная брачная ассортативность может быть обусловлена как общей средой, так и общностью вариантов генов, ответственных за выбор той или иной пищи. Корреляционный анализ в супружеских парах показал, что только по сладкой пище у супругов были выявлены отрицательные коэффициенты корреляции ($\rho = 0,25$), поэтому при оценке наследуемости эффект брачной ассортативности не учитывался.

Таблица 2

Коэффициенты корреляции Спирмена (ρ) по пищевым предпочтениям в парах «родитель — потомок»

Предпочтения	Категории родственников				
	отец — сын (n = 19)	мать — сын (n = 54)	отец — дочь (n = 34)	мать — дочь (n = 184)	среднее по всей группе (n = 291)
Сладкое	0,07	0,03	–0,02	–0,12	–
Мясо	0,20	0,12	0,16	0,28***	0,28
Фрукты	–0,35	0,39**	–0,24	0,17*	0,28
Солёное	0,00	–0,04	0,36*	0,19*	0,28
Первые овощные блюда	0,00	0,05	–0,05	0,25***	0,25
Фастфуд	–0,10	0,04	–0,17	0,12	—
Жирное	–0,12	–0,14	–0,21	0,06	—

Таблица 3

Коэффициенты корреляции Спирмена (ρ) по пищевым предпочтениям в сибсовых парах

Предпочтения	Категории родственников			
	брат — брат (n = 7)	сестра — брат (n = 41)	сестра — сестра (n = 36)	среднее по всей группе (n = 84)
Сладкое	0,42	0,36*	0,36*	0,36
Мясо	–0,17	0,19	0,36*	0,36
Фрукты	0,42	0,12	0,37*	0,37
Солёное	–0,17	0,33*	0,32	0,33
Первые овощные блюда	0,00	0,17	–0,05	—
Фастфуд	0,09	0,34*	–0,01	0,34
Жирное	–0,55	0,07	0,07	—

Результаты оценки наследуемости пищевых предпочтений (учитывались статистически значимые коэффициенты корреляции) показали, что для предпочтений к первым овощным блюдам наблюдался умеренный коэффициент наследуемости (50%). Высокие коэффициенты наследуемости отмечены по пищевым предпочтениям к мясу (88%), солёному (76%) и фруктам (88%). По двум предпочтениям (сладкое и фастфуд) представлены максимально возможные коэффициенты наследуемости (100%).

Полученные нами результаты наследуемости пищевых предпочтений можно сравнить с некоторыми результатами других исследований. Например, в одном из близнецовых исследований детей 4–5 лет показали высокую наследуемость предпочтений к мясу/рыбе, умеренную — к десертам и низкую — к овощам и фруктам [2]. В другом близнецовом исследовании детей было показано, что пищевые предпочтения по своей генетической обусловленности распределились следующим образом в порядке убывания: овощи, фрукты, белковая пища, углеводная пища, легкие закуски и молочные продукты [5]. Результаты еще одного близнецового исследования указывали на преимущественную роль среды и минимальную роль генов в выборе той или иной пищи. Исключение составил такой показатель, как степень остроты пищи, обусловленный присутствием чилийского перца [8].

Таким образом, настоящее исследование показало наличие половых различий по 4 видам пищевых предпочтений в выборке населения Украины — к сладкому, мясным блюдам, фруктам и первым овощным блюдам. В изученном населении в отношении пищевых предпочтений были изучены родственные/брачные пары и рассчитан примерный вклад генетических факторов в фенотипическую дисперсию. Показана умеренная наследуемость пищевых предпочтений к здоровой пище (первые овощные блюда) и высокая наследуемость к белковой пище (мясо), фруктам, солёному, сладкому и фастфуду.

Выводы

1. Популяционный анализ молодого населения в выборке Украины показал половые различия в пищевых предпочтениях к сладкому, мясной пище, фруктам и первым овощным блюдам. В убывающем порядке среди женщин пищевые предпочтения расположились в следующий ряд: сладкое (51,47%), фрукты (47,51%), мясные блюда (31,15%), первые овощные блюда (16,25%),

солёная пища (10,61 %), жирное (8,13 %) и фастфуд (6,09 %). Среди мужчин пищевые предпочтения по убыванию расположились следующим образом: мясные блюда (45,68 %), сладкое (35,80 %), первые овощные блюда (34,57 %), фрукты (30,86 %), жирное (11,11 %), фастфуд (9,88 %) и солёная пища (8,75 %).

2. Генетический анализ на основе подхода Фальконера показал умеренную наследуемость пищевых предпочтений к здоровой пище (первые овощные блюда) — 50 % и высокую наследуемость к белковой пище (мясо) — 88 %, фруктам — 92 %, солёному — 76 %, а также сладкому и фастфуду — около 100 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. Филипцова О. В. Половые и возрастные особенности пищевых предпочтений и их связь с личностными и когнитивными свойствами // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: Біологія.— 2006.— № 748, вип. 4.— С. 79–86.
2. Breen F. M., Plomin R., Wardle J. Heritability of food preferences in young children [Електронний ресурс] // Physiology & Behavior.— 2006.— 88, Is. 5.— P. 443–447.— Режим доступу: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938406001752-aff1.
3. Caramia G. Childhood feeding, chronic-degenerative disease in adults, and nutrigenomics // Pediatr Med Chir.— 2007.— 29, N 6.— P. 309–320.
4. Falconer D. S., Mackay T. F. Introduction to Quantitative Genetics.— Harlow, UK, Longman, 1996.— 480 p.
5. Fildes A., van Jaarsveld C. H., Llewellyn C. H., Fisher A., Cooke L., Wardle J. Nature and nurture in children's food preferences // Am J Clin Nutr.— 2014.— 99, N 4.— P. 911–917.
6. Kaput J., Noble J., Hatipoglu B., Kohrs K., Dawson K., Bartholomew A. Application of nutrigenomic concepts to Type 2 diabetes mellitus // Nutr Metab Cardiovasc Dis.— 2007.— 17, N 2.— P. 89–103.
7. Phillips C. Nutrigenetics and Metabolic Disease: Current Status and Implications for Personalised Nutrition // Nutrients.— 2013.— 5, N 1.— P. 32–57.
8. Rozin P., Millman L. Family environment, not heredity, accounts for family resemblances in food preferences and attitudes: A twin study // Appetite.— 1987.— 8, N 2.— P. 125–134.
9. Törnwall O., Silventoinen K., Hiekkalinna T., Perola M., Tuorila H., Kaprio J. Identifying flavor preference subgroups. Genetic basis and related eating behavior traits // Appetite.— 2014.— 75.— P. 1–10.
10. Weinmann S., Siscovick D. S., Raghunathan T. E., Arbogast P., Smith H., Bovbjerg V. E., Cobb L. A., Psaty B. M. Caffeine intake in relation to the risk of primary cardiac arrest // Epidemiology.— 1997.— 8, N 5.— P. 505–508.
11. Yahia N., Achkar A., Abdallah A., Rizk S. Eating habits and obesity among Lebanese university students // Nutr J.— 2008.— 7, N 32.
12. Zar J. H. Biostatistical analysis. 4th edition.— Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 1999.— 929 p.

TIMOSHYNA I.A., PAVICHENKO O.V., FILIPTSOVA O.V.

National University of Pharmacy,
Ukraine, 61002, Kharkov, Pushkinskaya str., 53, e-mail: philiptsova@yahoo.com

POPULATION AND GENETIC ANALYSIS OF FOOD PREFERENCES AMONG THE INHABITANTS OF UKRAINE

Aims. The aim of the study was to perform population analysis of food preferences for sweets, meat, fruit, salty food, the first vegetable dishes, fastfood and fatty food among young people in a sample of Ukraine as well as to evaluate heritability of food preferences. ***Methods.*** Genetic analysis was performed taking into account the correlation coefficients for pairs of parent-child (n = 291), siblings (n = 84) and spouses (n = 70). ***Results.*** In descending order food preferences of females were located in the following order: sweet, fruits, meat dishes, first vegetable dishes, salty food, fat and fast food. Among males, food preferences in descending order were located as follows: meat dishes, sweet, first vegetable dishes, fruits, fat, fast food and salty food. Genetic analysis showed heritability for first vegetable dishes — 50 %, and heritability for meat — 88 %, fruits — 92 %, salty food — 76 %, sweet and fast food — about 100 %. ***Conclusions.*** Sex differences in preferences for sweets, meat, fruit and first vegetable dishes were shown. Genetic analysis showed moderate heritability of food preferences for first vegetable dishes, and high heritability for the rest of food.

Keywords: food preferences, population, heritability, Ukraine.

УДК 616.37-008.6-056.7-053.2:575.224.2

ТИРКУС М. Я.[1], МАКУХ Г. В.[1], БОБЕР Л. Й.[2], РОГОВИК Н. В.[2], ГНАТЕЙКО О. З.[1]

[1] ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»,
Україна, 79000, м. Львів, вул. Лисенка, 31-а, e-mail: tyrkus.m@ihp.lviv.ua
[2] Західноукраїнський спеціалізований дитячий медичний центр,
Україна, 79000, м. Львів, вул. Дністерська, 27

РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ГЕНЕТИЧНО ДЕТЕРМІНОВАНОЇ ГІПОЛАКТАЗІЇ ДОРОСЛОГО ТИПУ У ХВОРИХ НА МУКОВІСЦИДОЗ, ГОМОЗИГОТ ЗА МУТАЦІЄЮ p.Phe508del

Лактаза — єдиний в організмі людини фермент, який розщеплює лактозу на глюкозу та галактозу, знаходиться на апікальній поверхні щіткової кайми ентероциту, зафіксований на його клітинній мембрані. Лактазна недостатність (ЛН) — вроджений чи набутий стан, що характеризується непереносимістю молока через відсутність або знижену активність ферменту лактази [1].

Гіполактазія дорослого типу (ГДТ) — це найбільш поширена та генетично детермінована причина непереносимості молока у дітей, підлітків та дорослих, що спричинена дефіцитом ферменту лактаза-флоризингідролази. [2]. ГДТ успадковується аутосомно-рецесивним шляхом та веде до пригнічення активності лактази на ворсинах кишківника. При гіполактазії вживання молочних продуктів призводить до здуття кишківника, порушення перистальтики, зригування, кишкових кольок, дисбактеріозу, діареї, розвитку симптомів дегідратації і недостатньої прибавки маси тіла. Поширеність ГДТ дуже різноманітна і коливається від 4% в Ірландії до майже 100% в деяких азіатських популяціях [3].

Фермент лактаза-флоризингідролаза кодується єдиним геном *LCT*, що локалізується на 2 хромосомі [4–6]. ГДТ і, відповідно, здатність утилізовувати лактозу повністю корелює з поліморфізмом C>T у позиції 13910 (rs4988235) гена лактази *LCT*. Генотип C/C-13910 відповідає практично повній відсутності лактази. Генотип C/T-13910 асоціюється зі зниженим рівнем лактази, але достатнім для нормальної дигестії. Генотип T/T-13190 свідчить про високу активність даного ферменту [7, 8].

Муковісцидоз (МВ) — найпоширеніше моногенне автосомно-рецесивне захворювання осіб білої раси. За даними Modiano та ін., існує взаємозв'язок між мутаціями гена ТРБМ та розвитком лактазної недостатності [9]. Низька тривалість життя хворих на МВ стимулює до пошуку модифікуючих факторів, які можуть впливати на покращення клінічного стану хворих. Більшість пацієнтів з МВ вимагають високої енергетичної дієти. Молочні продукти є потенційно важливим джерелом поживних речовин для цих осіб. Враховуючи зростання кількості випадків гіполактазії у дітей з муковісцидозом і можливий вплив молочних продуктів харчування на стан роботи кишково-шлункового тракту, актуальним видавалось оцінити генетичну схильність до ГДТ дітей з МВ.

Тому метою цієї роботи було встановлення частоти генотипів поліморфізму LCT — 13910C>T гена *LCT* у дітей, хворих на муковісцидоз, гомозигот за мутацією F508del гена ТРБМ, і їх схильності до розвитку ГДТ.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугувала ДНК 43 дітей з підтвердженим діагнозом МВ, гомозигот за мутацією F508del гена ТРБМ, які проходили обстеження в ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України» та перебували на стаціонарному лікуванні в Західноукраїнському спеціалізованому дитячому медичному центрі; 25 дітей з клінічними ознаками лактазної недостатності та 28 осіб контрольної групи.

Проводили виділення та очищення ДНК з лейкоцитів периферійної крові методом висолювання [8]. Ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro* проводили, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції [9]. ПЛР проводили в автоматичному режимі на термоциклері «Терцик» (ДНК-технологія, Росія). Для ідентифікації генотипів поліморфного локусу LCT-13910C>T гена *LCT* застосовували метод рестрикційного аналізу продуктів ПЛР відповідних послідовностей. У роботі використовували ендонуклеазу рестрикції Hinf I виробництва фірми НВО «СибЭнзим» (Росія). Продукти ампліфікації візуалізували шляхом проведення електрофорезу в 2% агарозному гелі, який містив бромистий етидій,

© ТИРКУС М. Я., МАКУХ Г. В., БОБЕР Л. Й., РОГОВИК Н. В., ГНАТЕЙКО О. З.

та сканували на ультрафіолетовому трансілюмінаторі «ECX-15.M» (VILBER LOURMAT, Франція). Отримані сигнали порівнювали з маркерами довжин і на основі цього детектували розміри отриманих фрагментів. Результати сканування агарозних гелів знімали цифровою камерою «Gel Imager» (HELICON, Росія). Обробку зображень здійснювали на комп'ютері за допомогою програм Adobe Photoshop CS та Gel Explorer 2.0.

Результати та обговорення

Досліджувану групу склало 43 дитини з діагнозом муковісцидоз. У цих дітей проведено двократне вимірювання концентрації іонів хлору у поті. У всіх випадках рівень хлоридів був більше 60 мекв/л (підвищений). За допомогою молекулярно-генетичної діагностики мутацій гена ТРБМ ідентифіковано мутації гена ТРБМ та підтверджено діагноз муковісцидоз. Усі особи досліджуваної групи були гомозиготами за мутацією c.1521_1523delCTT, p.Phe508del (традиційна назва — F508del) гена ТРБМ. Усім особам досліджуваних груп з лейкоцитів периферійної крові проводили виділення та очищення ДНК для подальших молекулярно-генетичних досліджень.

Проведено молекулярно-генетичне дослідження поліморфного локусу LCT-13910C>T гена лактази *LCT* (номер поліморфізму в базі даних NCBI — rs49882359). В результаті ПЛР реакції синтезуються Т-397С генотипи: СС-генотип 201 п.н., СТ-генотип 201 п.н. та 177 п.н., ТТ-генотип 177 п.н. відповідно. Електрофореграму молекулярно-генетичного дослідження поліморфного локусу LCT — 13910C>T гена *LCT* наведено на рис. 1.

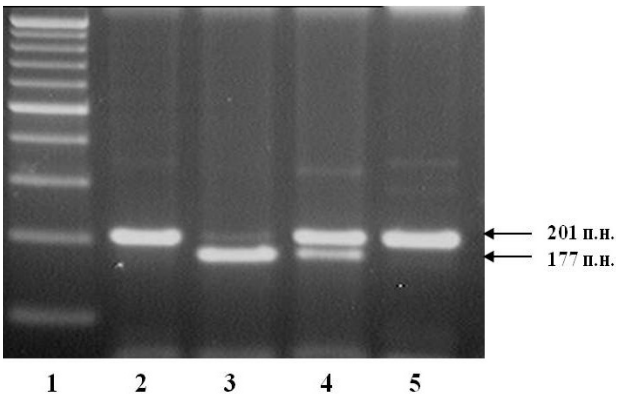


Рис. 1. Електрофореграма рестрикційного аналізу поліморфного локусу LCT — 13910C>T гена *LCT* (2% агарозний гель): 1 — маркери молекулярної ваги (Ladder 100 bp); 2, 5 — генотип LCT — 13910 CC; 3 — генотип LCT — 13910 TT; 4 — генотип LCT — 13910 CT

У результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу ДНК у 43 дітей з діагнозом муковісцидоз встановлено генотип щодо поліморфного локусу LCT — 13910C>T гена *LCT*. Можливі генотипи були: HH, Hh, hh для Hinf I, де H позначає відсутність, а h — присутність сайту рестрикції. Результати молекулярно-генетичного аналізу локусу LCT — 13910C>T гена *LCT* у дітей з муковісцидозом наведено у табл. 1.

Як свідчать результати, наведені в табл. 1, генотип C/C-13910 встановлено у 15 осіб, що становить 34,9%. Цей генотип відповідає практично повній відсутності лактази. Генотип C/T-13910 встановлено у 24 осіб, що становить 55,8%. Цей генотип асоціюється зі зниженим рівнем лактази. Генотип T/T-13910 встановлено у 4 осіб (9,3%), що свідчить про високу активність даного ферменту (табл. 1).

За аналізом клінічного фенотипу особи дослідницької групи було розділено на дві підгрупи за важкістю перебігу муковісцидозу. Користуючись шкалою Швахмана-Кульчицького, до першої підгрупи «важкий перебіг» віднесено 22 особи, до другої підгрупи «легкий перебіг» — 21 особу.

Встановлено розподіл генотипів/алелів за поліморфним варіантом 13910C>T гена *LCT* у підгрупі дітей з важким перебігом муковісцидозу та підгрупі дітей з легким перебігом муковісцидозу. Результати молекулярно-генетичного аналізу локусу 13910C>T гена *LCT* у досліджуваних підгрупах дітей наведено у табл. 2.

У результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу за поліморфним варіантом 13910C>T гена *LCT* та подальших статистичних обрахунків встановлено, що відмінності у співвідношенні генотипів та алелів гена *LCT* між підгрупами дітей з важким перебігом муковісцидозу

Таблиця 1

Розподіл генотипів поліморфного локусу 13910C>T гена *LCT* у загальній групі дітей з муковісцидозом

Генотипи/алелі *LCT* 13910C>T (Hinf I)	Кількість випадків, *n*	Частота, %
CC (HH)	15	34,9
TC (Hh)	24	55,8
TT (hh)	4	9,3
C (H)	54	62,8
T (h)	32	37,2

Таблиця 2

Частота генотипів поліморфного локусу 13910C>T гена *LCT* у досліджуваних підгрупах дітей з МВ

Генотипи/алелі *LCT* 13910C>T (Hinf I)	Частота, %		χ^2	*p*	OR	
	дослідна підгрупа «легкий перебіг», *n* = 21	дослідна підгрупа «важкий перебіг», *n* = 22			знач.	95% CI
CC (HH)	28,6	40,9	2,24	0,33	0,58	0,16–2,06
TC (Hh)	66,7	45,5			2,40	0,70–8,26
TT (hh)	4,8	13,6			0,32	0,03–3,32
C (H)	61,9	63,6	0,03	0,87	0,93	0,39–2,23
T (h)	38,1	63,6			1,08	0,45–2,58

Примітки: *n* — кількість осіб, *p* — значимість відмінностей між контрольною і дослідною групами, OR (odds ratio) — коефіцієнт відношення шансів.

Таблиця 3

Частота генотипів поліморфного локусу 13910C>T гена *LCT* у досліджуваних групах

Досліджувані групи	Генотипи *LCT* 13910C>T (Hinf I), %			Алелі *LCT* 13910C>T (Hinf I), %	
	CC	CT	TT	C	T
МВ (загальна група)	34,9	55,8	9,3	62,8	37,2*
МВ «легкий перебіг»	28,6	66,7	4,8	61,9	38,1**
МВ «важкий перебіг»	40,9	45,5	13,6	63,6	63,6***
Лактазна недостатність	48,0	48,0	4,0	50,0	50,0****
МВ (E. Mądry et al.)	36,7	42,2	21,1	57,8	42,2
Контрольна група	28,6	64,3	7,1	60,7	39,3

Примітки: P — значимість відмінностей між дослідною і контрольною групами: * — 0,8, ** — 0,9, *** — 0,77, **** — 0,22.

та легким перебігом муковісцидозу не досягнули статистично вірогідних значень (p > 0,05), як і показники відношення шансів OR.

Згідно з даними, наведеними у табл. 2, генотип C/C-13910, який відповідає практично повній відсутності лактази, виявлено у 40,9% дітей з важким перебігом МВ при 28,6% у групі дітей з легким перебігом МВ. Генотип C/T-13910, який асоціюється зі зниженим рівнем лактази, навпаки, виявлено у 66,7% дітей з легким перебігом МВ при 45,5% у групі дітей з важким перебігом МВ.

Актуальним видавалося порівняти розподіл генотипів поліморфного локусу 13910C>T гена *LCT* у дітей з муковісцидозом та осіб інших вибірок, а саме групою дітей з клінічними ознаками лактазної недостатності та контрольною групою. Результати молекулярно-генетичного аналізу поліморфного локусу 13910C>T гена *LCT* у досліджуваних групах наведено у табл. 3.

У результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу поліморфного локусу 13910C>T гена *LCT* та подальших статистичних обрахунків встановлено, що відмінності у співвідношенні генотипів гена *LCT* між групою дітей з муковісцидозом та іншими досліджуваними групами не досягнули статистично вірогідних значень (p>0,05). Згідно з даними, наведеними у табл. 3, генотип C/C-13910, що відповідає практично повній відсутності лактази, виявлено у 34,9% осіб загальної групи з МВ. Частота генотипу C/C-13910 дітей загальної групи з муковісцидозом є співмірною з частотою, встановленою E. Mądry et al. [12] в осіб з МВ польської популяції (36,7%), дещо вища, ніж у контрольній групі (28,6%), та нижча, ніж у групі дітей з клінічними ознаками лактазної недостатності (48%).

При порівнянні розподілу генотипу C/C-13910 у підгрупах з важким та легким перебігом муковісцидозу (табл. 3) встановлено, що даний генотип у підгрупі дітей з легким перебігом МВ виявлено у 28,6% осіб, що є ідентичним виявленому генотипу у контрольній групі (28,6%). Генотип C/C-13910 виявлено у 40,9% дітей з важким перебігом МВ при 48% у групі дітей з клінічними ознаками лактазної недостатності та вищою, ніж у контрольній групі. Звідси випливає, що особи з важким перебігом муковісцидозу мають більш високу генетичну схильність до розвитку гіполактазії дорослого типу (ГДТ), ніж особи з легким перебігом МВ. При генотипі C/C-13910, який відповідає практично повній відсутності лактази, вплив молочних продуктів

харчування може суттєво впливати на стан роботи кишково-шлункового тракту осіб з муковісцидозом. Тому молекулярно-генетичні дослідження поліморфного варіанту 13910C>T гена *LCT* у дітей з МВ є актуальними і необхідними, особливо з метою вибору високоенергетичної дієти у цій когорті осіб.

Отже, у результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу за поліморфним варіантом 13910C>T гена *LCT* встановлено розподіл генотипів поліморфізму 13910C>T гена *LCT* у дітей з діагнозом МВ гомозигот за мутацією F508del. Генотип C/C-13910 встановлено у 34,9% осіб. Цей генотип відповідає практично повній відсутності лактази. Генотип C/T-13910 встановлено у 55,8% осіб, що асоціюється зі зниженим рівнем лактази. Генотип T/T-13910 встановлено у 9,3% хворих на МВ, що характеризується високою активністю даного ферменту. У групі дітей з важким перебігом муковісцидозу та групі дітей з легким перебігом муковісцидозу не виявлено вірогідних відмінностей у розподілі генотипів поліморфним варіантом 13910C>T гена *LCT*. Генотип C/C-13910 у підгрупі дітей з легким перебігом МВ виявлено у 28,6% осіб, що є ідентичним виявленому генотипу у контрольній групі (28,6%). Генотип C/C-13910 виявлено у 40,9% дітей з важким перебігом МВ при 48% у групі дітей з клінічними ознаками лактазної недостатності, що є вищим, ніж у контрольній групі. Тому особи з важким перебігом муковісцидозу мають більш високу генетичну схильність до розвитку гіполактазії дорослого типу (ГДТ), ніж особи з легким перебігом МВ. Припускаємо, що важкість захворювання може бути зумовлена у них в тому числі й присутністю генотипу C/C-13910, який зумовлює порушення засвоєння молочних продуктів, зниження нутрітивного статусу, який у свою чергу є одним із визначальних показників перебігу МВ.

Висновки

1. Встановлено розподіл генотипів поліморфізму 13910C>T гена *LCT* у дітей з муковісцидозом гомозигот за мутацією c.1521_1523delCTT (p.Phe508del).

2. У досліджуваній групі генотип C/C-13910, який відповідає практично повній відсутності лактази, встановлено у 34,9% осіб; генотип C/T-13910 — у 55,8% осіб, генотип T/T-13910, який характеризується високою активністю даного ферменту, — у 9,3%.

3. У результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу за поліморфним варіантом 13910C>T гена *LCT* у групі дітей з важким перебігом муковісцидозу встановлено тенденцію до зростання частоти гіполактазії дорослого типу (ГДТ) у порівнянні з групою дітей з легким перебігом муковісцидозу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Basso M. S., Luciano R., Ferretti F., Muraca M., Panetta F., Bracci F., Ottino S., Diamanti A. Association between celiac disease and primary lactase deficiency // Eur J Clin Nutr.— 2012.— 66, N 12.— P. 1365.
2. Semenza G., Auricchio S., Mantei N. Small-intestinal disaccharidases; in Scriver CR (eds): The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease // McGraw-Hill: New York.— 2001.— P. 1623–1650.
3. Itan Y., Jones B. L., Ingram C. J., Swallow ED.M., Thomas M. G. A worldwide correlation of lactase persistence phenotype and genotypes // BMC Evol Biol.— 2010.— 9.— P. 10–36.
4. Heyman M. B. Lactose intolerance in infants, children and adolescents // Pediatrics.— 2006.— 118, N 3.— P. 1279–1286.
5. Usai-Satta P., Scarpa M., Oppia F., Cabras F. Lactose malabsorption and intolerance: What should be the best clinical management? // World J Gastrointest Pharmacol Ther.— 2012.— 6, N 3.— P. 29–33.
6. Mascarenhas J. D., Leite J. P., Lima J. C., Heinemann M. B., Oliveira D. S., Araújo I. T., Soares L. S., Gusmão H. P., Gabbay Y. B., Linhares A. C. Detection of a neonatal human rotavirus strain with VP4 and NSP4 genes of porcine origin // J. Med. Microbiol.— 2007.— 56, N 4.— P. 524–532.
7. Делягин В. М., Каграманова К. Г., Шугурина Е. Г., Сичинава И. В., Соколова М. В., Боринская С. А., Янковский Н. К. Полиморфизм гена лактазы у детей с атопическими заболеваниями // Педиатрия.— 2008.— 87, № 4.— С. 15–18.
8. Соколова М. В., Васильев Е. В., Козлов А. И. Полиморфизм C/T 13910 регуляторного участка гена лактазы LCT и распространенность гиполактазии в популяциях Евразии // Экологическая генетика.— 2002.— 4, № 3.— С. 25–34.
9. Modiano G., Ciminelli B. M., Pignatti P. F. Cystic fibrosis and lactase persistence: a possible correlation // Eur J Hum Genet.— 2007.— 15.— P. 255–259.

10. Макух Г. В., Заставна Д. В., Тиркус М. Я., Третяк Б. І., Чорна Л. Б. Спосіб виділення ДНК з лейкоцитів периферійної крові. Патент № u200801896 від 14.02.2008. Бюл. № 8.
11. Mc. Pherson M. J., Quirke P., Taylor G. R. PCR a Practical Approash. Oxford University press.— New York: *Oxford* University *press,* 1993.— 253 p.
12. Mądry E., Fidler E., Sobczyńska-Tomaszewska A., Lisowska A., Krzyżanowska P., Pogorzelski A., Minarowsk L., Oralewska B., Mojs E., Sapiejka E., Marciniak R., Sands D., Korzon-Burakowska A., Kwiecień J., Walkowiak J. Mild *CFTR* mutations and genetic predisposition to lactase persistence in cystic fibrosis // European Journal of Human Genetics.— 2011.— 19.— P. 748–752.

TYRKUS M.[1], MAKUKH H.[1], BOBER L.[2], ROHOVYK N.[2], HNATEYKO O.[1]

[1] Institute of Hereditary Pathology of the Ukrainian National Academy of Medical Sciences, Ukraine, 79000, Lviv, Lysenko str., 31-a, e-mail: tyrkus.m@ihp.lviv.ua

[2] Western Ukrainian Specialized Children's Medical Centre, Ukraine, Lviv, Dnisterska str., 27

THE FREQUENCY GENETICALLY DETERMINED ADULT-TYPE HYPOLACTASIA IN CYSTIC FIBROSIS PATIENTS HOMOZYGOTES FOR P.PHE508DEL

Aims. Adult-type hypolactasia (ATH) is the genetically determined most common cause of milk intolerance in children, adolescents and adults and the most common enzyme deficiency in humans. Adult-type hypolactasia is associated with the LCT-13910C/T polymorphism. Estimation of genetic predisposion to ATH of children with CF is primarily question. ***Methods.*** DNA from probands blood samples was isolated using a modified salting out method. The PCR products were digested with the restriction enzyme Hinf I and analysed by electrophoresis in a 2% agarose gel. ***Results.*** It was carried out the distribution of 13910C>T of LCT gene in children who were diagnosed CF, homozygous for p.Phe508del. Genotype C/C-13910 is found at 34.9% of individuals. This genotype cause the complete absence of lactase. Genotype C/T-13910 was indentificated at 55.8% of people and is associated with low levels of lactase. Genotype T/T-13910 characterized of high activity of the enzyme was delected in 9.3% of patients. ***Conclusions.*** The frequency of adult-type hypolactasia (ATH) associated with polymorphic variant 13910C>T of LCT gene in the group of children with severe cystic fibrosis tends to increase compared with the group of children with mild cystic fibrosis.

Keywords: adult-type hypolactasia, cystic fibrosis, genotype, primary lactase deficiency.

УДК 618.39-021.3:576.316]:616-076.5

ТКАЧ І. Р.[1], ГУЛЕЮК Н. Л.[1], ГЕЛЬНЕР Н. В.[1], БЕЗКОРОВАЙНА Г. М.[1], ВАЙСЕ А.[2], КОСЯКОВА Н.[2], ЛІР Т.[2], ФЕДИШИН Т. В.[3]

[1] ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»,
Україна, 79008, м. Львів, вул. Лисенка, 31а, e-mail: tkach.iryna.ihp@gmail.com
[2] Госпіталь університету Йени, Університет Фрідріха Шіллера, Інститут генетики людини,
Німеччина, D-07743, Йена, Колегінгассе, 10
[3] ДВНЗ «Ужгородський національний університет»,
Україна, 88000, Закарпатська обл., м. Ужгород, пл. Народна, 3

СПЕКТР ТА ЧАСТОТА ЧИСЛЕННИХ ХРОМОСОМНИХ АНОМАЛІЙ В МАТЕРІАЛІ РАННІХ РЕПРОДУКТИВНИХ ВТРАТ

Цитогенетичне дослідження є важливою складовою у встановленні етіології ранніх репродуктивних втрат (РРВ) у людини. Відомо, що серед причин мимовільного переривання вагітності, особливо в першому триместрі, перше місце посідають аномалії каріотипу — 60–80 %: поліплоїдія, анеуплоїдія по аутосомах та статевих хромосомах та ін. Вважається, що частота хромосомних аномалій обернено пропорційна вагітностям, що розвиваються [1, 2]. Така велика кількість запліднень із хромосомним дисбалансом обумовлена високою частотою численних хромосомних аномалій у статевих клітинах людини: 1–2 % в сперматозоїдах, в ооцитах — біля 20 % [3, 4]. Частота анеуплоїдій у матеріалі мимовільних викиднів знижується із зростанням терміну вагітності, а серед мертвонароджених плодів складає 4 %, серед живонароджених — лише 0,3 % [5].

Структура порушень каріотипу при репродуктивних втратах стабільна, а спектр хромосомних аномалій (ХА) у спонтанних викиднів (СВ) істотно відрізняється від спектру у новонароджених. Найвищий відсоток ХА у матеріалі СВ становлять трисомії (50–60 %, згідно з даними деяких авторів — до 96 %), з них трисомія 16–15–20 %, поліплоїдії — 20–25 %, моносомії — 10–15 %, структурні аномалії — 5–6 % [6, 7]. Найчастіше у мимовільних викиднів спостерігають трисомії хромосом 16, 22, 21, 15, 13, 18, зазначених в порядку спадання [8]. Серед хромосом групи С найвищий відсоток трисомій 7, 8, 9, які зустрічаються виключно у матеріалі РРВ. Це свідчить про сублетальний ефект надлишку цього генетичного матеріалу. На післяімплантаційних стадіях розвитку не реєструють випадків трисомій хромосом 1 і 19 [9, 10]. У матеріалі вагітностей, втрачених до 10-го тижня розвитку, достатньо висока частота подвійних і потрійних трисомій. Такі трисомії, незалежно від задіяних хромосом, у більшості випадків є летальними.

Єдина форма повної моносомії, яка сумісна з внутрішньоутробним та постнатальним розвитком, — моносомія Х. Ця хромосомна патологія найчастіше зустрічається у матеріалі РРВ — у 10–15 % випадків. Походження гоносомної моносомії є предметом дискусії, оскільки у певних дослідженнях її виникнення пов'язують із віком жінки > 38 років, в інших — з помилками під час мейотичного поділу у статевих клітинах батька [2, 11].

Поліплоїдія сумісна з внутрішньоутробним розвитком у людини лише у вигляді триплоїдії 69, XXX і 69, XXY, що зустрічаються у 5,7 %, та тетраплоїдії — 2,39 %. Майже кожен 10-й самовільний абортус є триплоїдним [12].

Значна частина зачать з анеуплоїдіями, які зустрічаються у народжених дітей, гине ще в антенатальному періоді (до 99 % при гоносомній моносомії, 30–70 % при трисоміях 13, 18 і 21). Згідно з міжнародними зведеннями, в період від 10-го тижня вагітності до пологів елімінується приблизно половина зачать з трисомією 21 (синдром Дауна), більше 80 % з трисомією 18 (синром Едвардса), більше 60 % з трисомією 13 (синдром Патау) і приблизно 30 % плодів з моносомією Х (синдром Шерешевського-Тернера) [12]. Вважають, що на життєздатність плоду впливає форма хромосомного дисбалансу. Існує гіпотеза, що анеуплоїдія у всіх клітинах зародка провокує антенатальну загибель, а наявність мозаїчного каріотипу з клоном клітин із нормальним набором хромосом підвищує шанс народження дитини [19]. Непрямим підтвердженням цього припущення є підвищена частота мозаїків Х/XX і Х/XY серед новонароджених порівняно з частотою серед мимовільних викиднів [11, 13, 14]. Разом з тим, мозаїчна форма гетероплоїдії, виявлена

© ТКАЧ І. Р., ГУЛЕЮК Н. Л., ГЕЛЬНЕР Н. В., БЕЗКОРОВАЙНА Г. М., ВАЙСЕ А., КОСЯКОВА Н., ЛІР Т., ФЕДИШИН Т. В.

тільки в плаценті, може бути причиною втрати вагітності [12].

Отже, хромосомні порушення є вагомою причиною мимовільного переривання вагітності, особливо у ранньому терміні. Тому цитогенетичний аналіз матеріалу ранніх репродуктивних втрат із акцентом на структуру порушень каріотипу залежно від терміну загибелі ембріона чи плоду дуже актуальний і є метою цього дослідження.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень слугували ворсини хоріону (ВХ), отримані внаслідок раннього мимовільного переривання вагітності (до 14 тижнів гестаційного розвитку). Ворсини відбирали під бінокулярною лупою із збільшенням х40. ВХ відмивали розчином HBSS або PBS та проводили подальшу обробку залежно від методу дослідження — стандартного цитогенетичного чи молекулярно-цитогенетичного. Приготування препаратів хромосом з ворсин хоріону виконували «прямим» методом [15] з деякими модифікаціями. Мацерацію ворсин проводили в 60% оцтовій кислоті. Для виконання стандартного цитогенетичного аналізу препарати витримували до наступного дня в термостаті при +65ºС та забарвлювали GTG- або CBG-методами. За допомогою світлового мікроскопа (Zeiss, Axioscope; Jena, Germany) аналізували мінімум 10 метафазних пластин задовільної якості при збільшенні х1000.

Молекулярно-цитогенетичні дослідження із застосуванням інтерфазного FISH (iFISH) забарвлення [16] виконували із застосуванням таких наборів центромерних зондів:

набір 1: центромерні проби для 13p11.1-q11 і 21p11.1-q11.1 (D13/21Z1, помічений SpectrumGreen = SG), 15q11 (D15Z3 помічений Texasred = TR) і 18p11.1-q11.1 (D18Z1 помічений — Diethylaminocoumarin = DEAC);

набір 2: центромерні проби для 14p11.1-q11.1 і 22p11.1-q11.1 (D14/22Z1 помічений SpectrumGreen = SG) і 16p11.1-q11.1 (D16Z2 помічений TR);

набір 3: центромерні проби для 17p11.1-q11.1 (D17Z1 помічений SepctrumOrange = SO), Xp11.1-q11.1 (DXZ1 помічений DEAC) і Yq12 (DYZ1 помічений SG).

Отримані препарати вивчали за допомогою мікроскопа Axioplan II (Carl Zeiss Jena GmbH) з набором флюоросцентних фільтрів DAPI, FITC, TR, Cy3 і Cy5. Зображення 100 і більше інтерфазних ядер на один зразок аналізували з використанням програмного забезпечення Isis DGTSa, BGR-I і DGSoSa (MetaSystems Hard & Software GmbH, Altlussheim, Germany).

Результати та обговорення

Усього обстежили 218 зразків ВХ, отриманих внаслідок раннього переривання вагітності. Спочатку всі зразки аналізували стандартним цитогенетичним методом. За відсутності метафазних пластин, що унеможливлювало отримання результату за допомогою цього методу, матеріал готували для проведення молекулярно-генетичного дослідження. Для iFISH відібрали мітки по хромосомах, анеуплоїдії по яких, згідно з літературними джерелами, найчастіше зустрічаються при ранніх репродуктивних втратах. Враховували численні геномні зміни — триплоїдії та тетраплоїдії — і хромосомні анеуплоїдії — триплоїдії та моносомії. За нормальний вважали каріотип, у якому не фіксували патологій за допомогою стандартного цитогенетичного аналізу, а при молекулярно-цитогенетичному дослідженні були відсутні анеуплоїдії по хромосомах 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X, Y.

Серед проаналізованих 218 зразків нормальний каріотип зафіксували у 148 (67,9%), геномні та численні хромосомні зміни — у 75 (32,1%). Серед цитогенетичних відхилень спостерігали поліплоїдії (триплоїдії та тетраплоїдії) — 12,4% випадків, гоносомні анеуплоїдії (моносомія X, трисомія X, мозаїцизм) — 6,4%, аутосомні анеуплоїдії — 13,3%. Серед поліплоїдій переважала триплоїдія (11,9%), серед гоносомних анеуплоїдій — моносомія X (4,6%), аутосомних анеуплоїдій — трисомія 16 (6,4%). Отримані результати співзвучні з даними багаточисленних досліджень [2, 6–8, 12].

Залежно від терміну втрати вагітності дані цитогенетичних досліджень розподілили на три групи — до 6-ти тижнів гестаційного терміну (перша група), 6–10 тижнів (друга група), більше 11-ти тижнів (третя група) (табл., рис.). Найвищий відсоток хромосомної патології — 37% — зафіксували у другій групі, найнижчий — у третій — 21%. Поліплоїдію спостерігали у всіх групах, але з різною частотою — від 17% у третій групі до 14% у першій та 11% у другій (рис.). У другій та третій групах поліплоїдію фіксували

Таблиця

Розподіл результатів цитогенетичних досліджень залежно від терміну мимовільного переривання вагітності

Менше 6 тижнів		6–10 тижнів		Більше 11 тижнів		Всього випадків, *n*
каріотип	*n*	каріотип	*n*	каріотип	*n*	
триплоїдія	5	триплоїдія	17	триплоїдія	4	26
тетраплоїдія	1	—		—		1
трисомія 16	5	трисомія 16	8	трисомія 16	1	14
—		моносомія X	10	—		10
—		трисомія X	1	—		1
моносомія X [40]/трисомія X [60]	1	—		—		1
—		дисомія X [23]/моносомія X [77]	1	—		1
—		дисомія X [4]/моносомія X [96]	1	—		1
47, XXY	1	—		—		1
—		трисомія 3	1	—		1
—		трисомія 14	1	—		1
—		трисомія 15	4	—		4
—		моносомія 15 [61]/дисомія 15 [39]	1	—		1
—		трисомія 18	2	—		2
—		трисомія 20	2	—		2
—		трисомія 21	4	—		4
трисомія 22	1	трисомія 22	2	—		3
		моносомія 22 [26]/дисомія 22 [23]/трисомія 22 [51]	1			1
Всього патологій, *n*	14		56		5	75
Каріотип без змін, *n*	30		95		18	143
Всього випадків, *n*	44		151		23	218

Примітка: n — абсолютні числа.

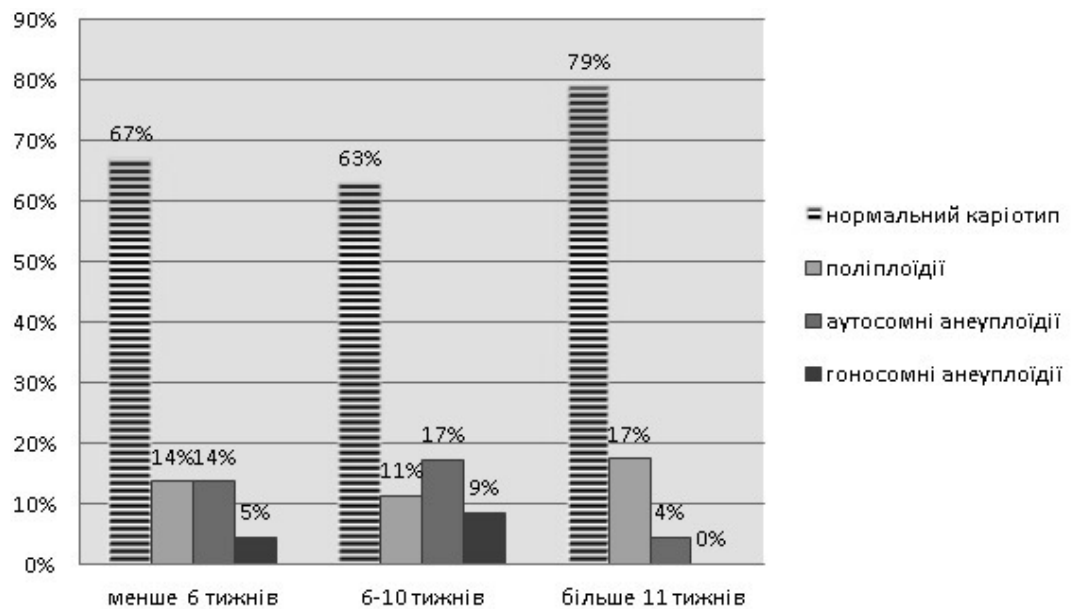


Рис. Розподіл хромосомних аномалій матеріалу репродуктивних втрат залежно від терміну мимовільного переривання вагітності

виключно у вигляді триплоїдії. Єдиний випадок тетраплоїдії виявили у матеріалі вагітності, яка перервалась у терміні до 6-ти тижнів. Це збігається із висновком інших досліджень, що поліплоїдія сумісна виключно з внутрішньоутробним розвитком і тільки у вигляді три- та тетраплоїдії [12].

Гоносомні анеуплоїдії зафіксували тільки у другій — 9% та першій — 5% групах, причому переважала моносомія X у чистій та мозаїчній формах.

Для другої групи притаманний вищий відсоток аутосомних змін — 17%, порівняно із 14% у першій групі та 4% у третій, та ширший спектр порушень, а саме наявність трисомій хромосом 3, 14, 15, 18, 20 та 21, які не зустрічалися в інших групах (табл.).

Отже, цитогенетичні дослідження є важливим елементом встановлення причини ранніх репродуктивних втрат. Частота та спектр геномних та хромосомних порушень змінюється залежно від гестаційного терміну втраченої вагітності.

Висновки

1. Відсоток геномних та численних хромосомних змін у матеріалі РРВ є значним — 32,1%, структура яких складається з поліплоїдії — 12,4%, гоносомні анеуплоїдії — 6,4% та аутосомні анеуплоїдії — 13,3%.

2. Найвищий відсоток хромосомної патології — 37% — зафіксували у матеріалі вагітностей, втрачених протягом 6–10 тижнів гестаційного розвитку, найнижчий — 21% — більше 11-ти тижнів.

3. Аутосомні порушення складають основну частину структури хромосомних аномалій у матеріалі РРВ в терміні 6–10 тижнів гестаційного розвитку.

Робота частково профінансована West-Ukrainian BioMedical Research Center grant (17-th WUBMRC (2013–2014)).

Автори публікації висловлюють подяку колективу молекулярно-цитогенетичної лабораторії Institute of Human Genetics, University Hospital, Friedrich Schiller University, Germany, Jena у сприянні проведенню досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Stephenson M., Kutteh W. Evaluation and management of recurrent early pregnancy loss // Clin Obstet Gynecol.— 2007.— 50, N 1.— P. 132–145.
2. Simpson J.L. Causes of fetal wastage // Clin Obstet Gynecol.— 2007.— 50, N 1.— P. 10–30.
3. Nagaishi M., Yamamoto T., Iinuma K., Shimomura K., Berend S.A., Knops J. Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan // J Obstet Gynaecol Res.— 2004.— 30.— P. 237–241.
4. Rai R., Regan L. Recurrent miscarriage // Lancet.— 2006.— 368, № 9535.— P. 601–611.
5. Hassold T., Hunt P. To err (meiotically) is human: the genetics of human aneuploidy // Nat. Rev. Genet.— 2001.— 2.— P. 280–291.
6. Goddijn M.M, Leschot N.J. Genetic aspects of miscarriage // Clinical Obstetrics and Gynaecology.— 2000.— 14.— P. 855–865.
7. Бочков Н.П. Клиническая генетика.— М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002.— 448 с.
8. Yurov Y.B, Vorsanova S.G., Soloviev I.V., Demidova I.A., Alexandrov I.A., Sharonin V.O., Beresheva A.K. Original collection of DNA probes for preimplantational, fetal prenatal and postnatal diagnosis of chromosomal analysis by FISH // In *Early Prenatal Diagnosis, Fetal Cells and DNA in Mother. Present State and Perspectives*. Edited by: Macek M Sr, Bianchi D, Cuckle H.— Prague: The Karolinum Press.— 2002.— P. 275–283.
9. Philipp T., Kalousek D.K. Transcervical embrioscopy in missed abortion // Jornal of assisted reprodaction and genetics.— 2001–18, N 5.— P. 285–289.
10. Philipp T., Philipp K., Reiner A., Beer F., Kalousek D.K. Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies // Hum. Reprod.— 2003.— 18, N 8.— P. 1724–1732.
11. Werner M., Reh A., Grifo J., Perle M.A. Characteristics of chromosomal abnormalities diagnosed after spontaneous abortions in an infertile population // J Assist Reprod Genet.— Aug 2012.— 29, N 8.— P. 817–820.
12. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития человека.— С-П.: Н-Л, 2007.— 640 с.
13. Held K.R., Kerber S., Kaminsky E., Singh S., Goetz P., Seemanova E., Goedde H.W. Mosaicism in 45, X Turner syndrome does survival in early pregnancy depends on the two sex chromosomes? // Hum. Genet.— 1992.— 88, N 3.— P. 288–294.
14. Vorsanova S.G., Kolotii A.D., Iourov I.Y., Monakhov V.V., Kirillova E.A., Soloviev I.V., Yurov Y.B. Evidence for High Frequency of Chromosomal Mosaicism in Spontaneous Abortions Revealed by Interphase FISH Analysis // J. Histochem Cytochem.— 2005.— 53.— P. 375–380.

15. Баранов В. С. Метод стряхивания-отпечатывания — простой и надежный способ приготовления прямых хромосомных препаратов из хориона // Цитология.— 1989.— 31, № 2.— С. 251–253.
16. Liehr T., Pellestor F. Molecular cytogenetics: the standard FISH and PRINS procedure.— Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) — Application Guide. Liehr T, editor. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2009.— P. 23–34.

TKACH I.R.[1], HULEYUK N.L.[1], HELNER N.V.[1], BEZKOROVAINA H.M.[1], WEISE A.[2], KOSYAKOVA N.[2], LIEHR T.[2], FEDYSHYN T.V.[3]

[1] State Institution «Institute of Hereditary Pathology NAMS of Ukraine», Ukraine, 79008, Lviv, M. Lysenko str., 31a

[2] Jena University Hospital, Friedrich Schiller University, Institute of Human Genetics, Germany, D-07743, Jena, Kollegiengasse, 10

[3] State University «Uzhhorod National University», Faculty of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Ukraine, 88000, Transcarpathian region, Uzhhorod, Narodna Square, 3

SPECTRUM AND FREQUENCY OF NUMERICAL CHROMOSOMAL ABNORMALITIES IN MATERIAL OF EARLY REPRODUCTIVE LOSS

Aim. The determination spectrum and freqency of chromosomal abnormalities in samples from early reproductive losses depending on term of gestation. ***Methods.*** Banding cytogenetic and interphase mFISH analysis. ***Results.*** Cytogenetic and molecular-cytogenetic investigations was perfomed on 218 samples of early reproductive loss. Normal karyotype detected in 148 cases (67.9 %), abnormal karyotype in 75 cases (32.1 %). The highest percentage of chromosomal abnormalities — 37 % — recorded in the material pregnancies lost for 6–10 weeks of gestation. ***Conclusion.*** Cytogenetic studies are an important element of determine the cause of early reproductive losses. The frequency and spectrum of genomic and chromosomal abnormalities varies depending on the gestational term of the lost pregnancy.

Keywords: early reproductive loss, chromosome abnormalities, cytogenetics, mFISH.

УДК 616.831.71-009.26-056.7+616.16-007.64:575.224.2

ТРЕТЯК Б. І.[1], МАКУХ Г. В.[1], КІЦЕРА Н. І.[1], КОСТЮЧЕНКО Л. В.[2], АКОПЯН Г. Р.[1]

[1] ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»,
Україна, 79000, м. Львів, вул. Лисенка, 31-а, e-mail: irynej@ukr.net
[2] КЗ ЛОДА «Західноукраїнський дитячий спеціалізований медичний центр»,
Україна, 79000, м. Львів, вул. Дністерська, 27

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПОШИРЕНИХ МУТАЦІЙ ГЕНА *ATM* У ПАЦІЄНТІВ З ПІДОЗРОЮ НА АТАКСІЮ-ТЕЛЕАНГІЄКТАЗІЮ

Атаксія-телеангіектазія (А-Т, синдром Луї-Бар) — це важке аутосомно-рецесивне захворювання, що характеризується прогресуючими ураженнями нервової системи, мозочковою атаксією, шкірною та очною телеангіектазією, комбінованим імунодефіцитом зі схильністю до розвитку синопульмонарних інфекцій. Для А-Т також характерні чутливість до опромінення, множинні вади розвитку органів, схильність до виникнення онкологічних захворювань [1, 2].

Атаксія-телеангіектазія є клінічно та генетично гетерогенним захворюванням, оскільки показана наявність кількох комплементаційних груп. Чотири з них (A, C, D, E) були картовані в локусі 11q22-23 і виявилися пов'язаними з мутаціями в гені *ATM*. Даний ген має довжину 150 000 п. н. та складається з 66 екзонів [3, 4].

На сьогоднішній день описано більше 100 мутацій в понад 300 родинах. 70% призводять до вкорочення *ATM* білка. Решта 30% припадає на міссенс-мутації та невеликі делеції чи інсерції, що не порушують рамки зчитування. У гені описано 88 поліморфізмів з невизначеною функцією. Поліморфні варіанти зустрічаються надзвичайно рідко, і ген *ATM* вважається одним з найбільш консервативних серед аутосомних генів. Мутації зустрічаються по всій довжині гена без помітних «гарячих точок». Для більшості мутацій показаний ефект засновника. Велика кількість алельних варіантів гена *ATM* зумовлює те, що більшість пацієнтів з А-Т є компаундними гетерозиготами. Це суттєво ускладнює молекулярну діагностику та популяційний скринінг.

А-Т виявлена по всьому світу. Середня частота випадків А-Т становить 1 на 100 000 новонароджених (за іншими даними, 1 на 40 000), а частота гетерозигот по мутантних алелях *ATM* становить 1,4–2% [4–6].

У зв'язку з клінічною гетерогенністю виділяють 4 типи пацієнтів з А-Т. У хворих першого типу спостерігається класичне захворювання з маніфестаціями, описаними нижче. Хворі другого типу не мають деяких клінічних ознак А-Т, але в них виявлена радіочутливість. Хворі третього типу мають класичні ознаки захворювання, але не чутливі до дії радіації. Хворі четвертого типу мають лише поодинокі ознаки А-Т і не виявляють радіочутливості. Пацієнти з нетиповими формами атаксії зустрічаються рідко [7, 8].

Проблема діагностики АТ в Україні є надзвичайно актуальним питанням як з точки зору превентивних заходів та допомоги практичній медицині, так і при визначенні реальних частот розповсюдження А-Т. Метою цієї роботи було проведення молекулярно-генетичного аналізу мутацій гена *ATM* у пацієнтів з підозрою синдрому Луї-Бар.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження були зразки ДНК, виділені з клітин периферійної крові пацієнтів з підозрою синдрому Луї-Бар, які обстежувались у Львівському медико-генетичному центрі та Львівській обласній дитячій спеціалізованій клінічній лікарні. Виділення та очищення ДНК з лейкоцитів периферійної крові проводили методом висолювання. Дослідження екзонів 24, 42, 43, 50, 54 гена *ATM*, що містять сайти мутацій 7636del9nt (codon 2546 екзону 54), 6095G→A (codon 2003 екзону 43), IVS53–2A→C (codon 2544del 159nt екзону 54), 7010delG→T (кодон 2337), 5932G→T (codon 1973del88nt екзону 42), 3214G→T (codon 1026del207nt екзону 24), проводили за допомогою ПДРФ аналізу [9, 10].

Продукти ампліфікації візуалізували шляхом проведення електрофорезу в 2% агарозному гелі, який містив бромистий етидій, та сканували на ультрафіолетовому трансілюмінаторі «ECX-15.M» (VILBERLOURMAT, Франція). Результати сканування агарозних гелів знімали цифровою камерою «GelImager» (HELICON, Росія). Обробку зображень здійснювали на комп'ютері за допомогою програм Adobe Photoshop CS та Gel Explorer 2.0.

© ТРЕТЯК Б. І., МАКУХ Г. В., КІЦЕРА Н. І., КОСТЮЧЕНКО Л. В., АКОПЯН Г. Р.

Результати та обговорення

Проведено молекулярно-генетичне дослідження шести мутацій гена *ATM* у 70 пробандів з підозрою на атаксію-телеангіектазію, діагностовану на підставі клінічних даних. У пацієнтів клінічно спостерігали порушення ходи (98%), атаксію (74), очні телеангіектазії (75%), плями типу «кави з молоком» (30%), підвищений рівень альфафетопротеїну (82%).

Для молекулярно-генетичної діагностики нами було вибрано 6 поширених мутацій: 7636del9nt (кодон 2546 екзона 54), 6095G→A (кодон 2003 екзона 43), IVS53–2A→C (кодон 2544del 159nt екзона 54), 5932G→T (кодон 1973del88nt екзона 42), 3214G→T (кодон 1026del207nt екзона 24) та 7010delG→T (кодон 2337 екзона 50) (рис.).

Мутація IVS53–2A→C змінює інваріантний сайт сплайсингу в положенні –2 від екзона 54, що призводить до делеції цього екзона з кДНК. Молекулярно-генетична діагностика мутації IVS53–2A→C ґрунтувалася на тому, що дана мутація зумовлює втрату сайту дії для ендонуклеази рестрикції AluI. ПДРФ аналіз мутації IVS53–2A→C (codon 2544del159nt екзона 54) проводився з використанням рестриктази AluI. За відсутності мутації із ПЛР-продукту розміром 110 пар нулеотидів утворювалися фрагменти 70 та 40 п.н., тоді як за наявності мутації ПЛР-фрагмент не розщеплювався (рис.).

Для детекції мутації 7636del9nt (codon 2546 екзона 54) використовувалися ті самі праймери, що були розроблені для детекції IVS53–2A→C. 7636del9nt призводить до втрати сайту розщеплення для рестриктази FspI, тому у здорових індивідів після розділення в 3% агарозному гелі спостерігаються два фрагменти розміром 78 і 32 п.н., у гомозиготних носіїв мутації 7636del9nt спостерігається один фрагмент розміром 110 п.н., а гетерозигот — три фрагменти розмірами 110, 78, 32 п.н.

Мутація 5932G→T (codon 1973del88nt екзона 42) зумовлює появу стоп-кодону (GAA [Glu] rTAA [stop]) в екзоні 42. Трансверсія G→T створює новий сайт розщеплення для рестриктази MseI. ПДРФ аналіз мутації 5932G→Tcodon 1973del88nt екзона 42, проводився з використанням рестриктази MseI. За відсутності мутації ПЛР-продукт розміром 232 п.н. розщеплюється з утворенням фрагментів 199 та 33 п.н., тоді як за наявності мутації утворюються фрагменти розміром 159, 40 та 33 п.н.

Мутація 6095G→A зумовлює заміну в екзоні 43 останнього нуклеотиду G на A, що призводить до делеції 43 екзона з кДНК та втрати сайту розщеплення для рестриктази FspI. ПДРФ аналіз мутації 6095G→A (codon 2003 екзона 43) проводився з використанням рестриктази FspI. За відсутності мутації ПЛР-продукт розміром 301 п.н. розщеплюється рестриктазою FspI на фрагменти 239 та 62 п.н., тоді як за наявності мутації ПЛР-продукт не розщеплюється (рис.).

Мутація 3214G→T (codon 1026del207nt екзона 24) зумовлює появу стоп-кодону (GAA [Glu] — TAA [stop]) в екзоні 24. У кДНК спостерігалися різні форми мРНК, в яких внаслі-

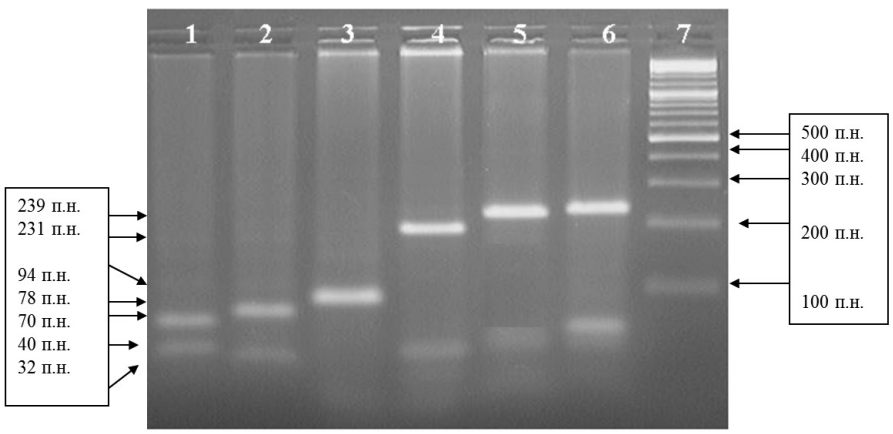


Рис. Електрофореограма ділянки ДНК, що містить фрагменти гена *ATM*, 2,5% агарозний гель: 1– генотип N/N за мутацією 7636del9nt (codon 2546 екзона 54); 2 — генотип N/N за мутацією IVS53–2A→C (codon 2544del 159nt екзона 54); 3 — генотип N/N за мутацією 3214G→T (codon 1026del207nt екзона 24); 4 — генотип N/N за мутацією 5932G→T (codon 1973del88nt екзона 42); 5 — генотип N/N за мутацією 7010delG→T (codon 2337екзона 50); 6 — генотип N/N за мутацією 6095G→A (codon 2003 екзона 43); 7 — маркери молекулярної ваги 100 п.н.

док порушення сплайсингу екзони 23 і 24 були делетовані, тому у таких мРНК відновлювалася правильна рамка зчитування. ПДРФ аналіз мутації 3214G→T (codon 1026del207nt екзона 24) проводився з використанням рестриктази MseI. За наявності мутації після дії рестриктази ПЛР-продукту розміром 94 п.н. утворювалися фрагменти 71 та 23 п.н., тоді як за відсутності мутації ПЛР-продукт не розщеплювався (рис.).

Результати молекулярно-генетичного аналізу шести вище перерахованих мутацій гена *ATM* представлені у табл. У 62-х з обстежених пробандів не виявлено досліджуваних мутацій гена *ATM*. У жодного пробанда не встановлено гомозиготне носійство цих мутацій. У ході молекулярно-генетичного обстеження ми виявили 8 пробандів, що були гетерозиготними носіями одного з досліджуваних мутантних алелей. Зокрема, по одному пробанду були гетерозиготами за мутаціями IVS53–2A→C та 3214G→T гена *ATM*. Гетерозиготне носійство мутації 5932G→T гена *ATM* встановлено у 2 пробандів, що склало 2,86%. А з найвищою частотою (5,71%) зустрічався гетерозиготний генотип за мутацією 6095G→A гена *ATM*, який був виявлений у чотирьох пробандів.

Отже, молекулярно-генетичне дослідження мутацій гена *ATM* дозволило нам виявити поодинокі випадки мутантних алелей гена *ATM*. А саме, 8 пробандів були гетерозиготними носіями тієї чи іншої з шести досліджуваних мутацій, що склало 11,43% від загальної кількості обстежених пробандів. Проте, зважаючи на низьку частоту А-Т у популяції, досліджувана вибірка хворих є невеликою. Для гена *ATM* є характерною велика кількість мутацій, частоти яких різняться у різних популяціях та етнічних групах. Спектр досліджуваних нами мутацій був вибраний відповідно до мутацій, які є поширеними у слов'ян. Проте не виключено, що для нашої популяції є характерними інші мутації гена *ATM*. Зважаючи на вищенаведене, доцільним є визначити спектр та частоти поширення мутацій гена *ATM* в Україні і відповідно до отриманих результатів ввести у протокол практичної молекулярно-генетичної діагностики найбільш інформативні мутації. Для цього необхідно провести секвенування гена *ATM* у пацієнтів з А-Т із неідентифікованими алелями та визначити поширеності мутацій, не досліджуваних у цій роботі.

Висновки

1. Проведено молекулярно-генетичне дослідження мутацій 7636del9nt (кодон 2546 екзона 54), 6095G→A (кодон 2003 екзона 43), IVS53–2A→C (кодон 2544del 159nt екзона 54), 5932G→T (кодон 1973del88nt екзона 42), 3214G→T (кодон 1026del207nt екзона 24) та 7010delG→T (кодон 2337 екзона 50) гена *ATM* у 70 пробандів.

2. У дослідній групі у 8 пробандів встановлено гетерозиготне носійство мутацій гена *ATM*: по одному пробанду — гетерозиготи за мутаціями IVS53–2A→C та 3214G→T, 2 пробанди (2,86%) — гетерозиготи за мутацією 5932G→T та 4 пробанди (5,71%) — гетерозиготи за мутацією 6095G→A.

Таблиця

Молекулярно-генетичне дослідження мутацій гена *ATM*

Назва мутації (локалізація)	Генотип				
	N/N		N/M		M/M
	N	%	N	%	
7636del9nt (54 екзон)	70	100	0	0	Не виявлено
IVS53-2A→C (54 екзон)	69	98,57	1	1,43	
5932G→T (42 екзон)	68	97,14	2	2,86	
7010delG→T (50 екзон)	70	100	0	0	
6095G→A (43 екзон)	66	94,29	4	5,71	
3214G→T (24 екзон)	69	98,57	1	1,43	

Примітки: N — відсутність відповідної мутації, M — мутація у відповідній ділянці.

3. Зважаючи на велику кількість мутацій гена *ATM*, частоти яких різняться у різних популяціях та етнічних групах, вважаємо доцільним проведення секвенування гена *ATM* у пацієнтів з А-Т та визначення спектру та частоти поширення інших мутацій гена *ATM* в Україні для підвищення інформативності практичної молекулярно-генетичної діагностики атаксії-телеангіектазії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Schaffner C., Idler I., Stilgenbauer D., Lichter P. Mantle cell lymphomais characterized by inactivation of the ATM gene // Medical Sciences.— 2000.— 93, N 2.— P. 1223–1245.
2. Stumm M., Sperling K., Wegner R.-D. Noncomplementation of radiation-induced chromosome aberrationsin ataxia-telangiectasia/ataxia-telangiectasia-variant heterodikaryons // (Letter) Am. J. Hum. Genet.— 1997.— 60.— P. 1246–1251.
3. Taylor A., Byrd P. Molecular pathology of ataxia telangiectasia // Journal of Clinical Pathology.— 2005.— 58.— P. 1009–1015.
4. Yuille M., Condie A., Hudson C., Bradshaw P., Stone E., Matutes E., Catovsky D., Houlston R. *ATM* mutation sarerare in familial chronic lymphocytic leukemia // Blood.— 2002.— 100, N 2.— P. 603–609.
5. Ball L., Xiao W. Molecular basis of ataxia telangiectasia and related diseases // Acta Pharmacologica Sinica.— 2005.— N 8.— P. 897–907.
6. Tauchi H., Matsuura S., Kobayashi J., Sakamoto S., Komatsu K. Nijmegen breakage syndrome gene, NBS1, and molecular links to factors for genome stability // Oncogene.— 2002.— 21 (58).— P. 8967–8980.
7. Boultwood J. Ataxia telangiectasia gene mutations in leukaemia and lymphoma // Journal of Clinical Pathology J Clin Pathol.— 2001.— 54.— P. 512–516.
8. Saviozzi S., Saluto A., Taylor A. M. R., Last J. I. L., Trebini F., Paradiso M. C., Grosso E., Funaro A., Ponzio1 G. A late onset variant of ataxia-telangiectasia with a compound heterozygous genotype, A8030G/7481insA // Journal of Medical Genetics.— 2002.— 39.— P. 57–61.
9. Taylor A. M. R., Byrd P. J. Molecular pathology of ataxia telangiectasia // Journal of Clinical Pathology.— 2005.— N 58.— P. 1009–1015.
10. Milhan Telatar, Sharon Teraoka, Zhijun Wang, Helen H. Chun, Ataxia-Telangiectasia: Identification and Detection of Founder-Effect Mutations in the ATM Gene in Ethnic Populations // Am. J. Hum. Genet.— 1998.— 62.— P. 86–97.

TRETYAK B.[1], MAKUKH H.[1], KITSERA N.[1], KOSTIUCHENKO L.[2], AKOPYAN H.[1]

[1] Institute of Hereditary Pathology of the Ukrainian National Academy of Medical Sciences, Ukraine, 79000, Lviv, Lysenko str., 31-a, e-mail: irynej@ukr.net

[2] Western Ukrainian Specialized Children's Medical Centre Lviv, Ukraine, Dnisterska str., 27

THE MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF COMMON ATM GENE MUTATIONSAMONG PATIENTS WITH ATAXIA-TELANGIECTASIASUSPECTION

The ***aim*** of this study was to conduct of molecular genetic analysis of *ATM* gene mutations in patients with ataxia-telangiectasia suspection. ***Methods.*** DNA was isolated from the peripheral blood cells. DNA was subjected to polymerase chain reaction, RFLP-analysis and electrophoresis in 2% agarose gel. ***Results.*** Molecular genetic testing of ATM gene mutations 7636del9 nt (codon 2546 exon 54), 6095G→A (codon 2003 exon 43), IVS53–2A→C (codon 2544del 159nt exon 54), 5932G→T (codon 1973del88nt exon 42), 3214G→T (codon 1026del207nt exon 24) та 7010 delG→T (codon 2337 exon 50) were performed in 70 probands. In the experimental group was found that 8 probands were heterozygous carriers of *ATM* gene mutations: one proband — heterozygotes by the mutations IVS53–2A→C and 3214G→T, 2 probands (2.86%) — heterozygotes by the mutation 5932G→T and 4 probands (5.71%) — heterozygotes by the mutation 6095G→A. ***Conclusions.*** The sequencing of whole *ATM* gene among patients with unidentified mutations are required to determine the frequency of distribution of other *ATM* mutations in Ukraine for implementation for practical molecular genetic diagnosis of ataxia-telangiectasia.

Keywords: ataxia-telangiectasia, mutations of *ATM* gene.

УДК 575.15

УТЕВСКАЯ О. М.[1], ДИБИРОВА Х. Д.[2], ЧУХРЯЕВА М. И.[2, 3], АГДЖОЯН А. Т.[3], АТРАМЕНТОВА Л. А.[1], БАЛАНОВСКАЯ Е. В.[2], БАЛАНОВСКИЙ О. П.[2, 3]

[1] Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина,
Украина, 61022, г. Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: outevsk@yandex.ua
[2] ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»,
Россия, 115478, г. Москва, Москворечье, 1
[3] Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
Россия, 119991, г. Москва, Губкина, 3

ЗАПАДНОЕВРОПЕЙСКИЕ И ЗАПАДНОАЗИАТСКИЕ ВАРИАНТЫ ГАПЛОГРУППЫ R1b В УКРАИНСКИХ ПОПУЛЯЦИЯХ

Гаплогруппа R1b, определяемая SNP-маркером M269, является одной из наиболее характерных для Европы гаплогрупп Y-хромосомы. Ее частоты максимальны на западе и севере субконтинента и достигают в некоторых популяциях 80% и более (Франция, Британские о-ва) [1, 2]. На востоке Европы эта гаплогруппа встречается значительно реже, однако ее частоты остаются значительными.

Несмотря на частотный пик в Западной Европе, R1b предположительно имеет азиатское происхождение. Из Юго-Западной Азии в Европу носители R1b-M269 проникли, вероятнее всего, через Анатолию [3]. Ранее предполагали, что R1b появилась в Европе еще в палеолите [4], однако недавние исследования свидетельствуют скорее о неолитическом распространении [1]. В пределах Западной Европы эффект основателя привел к формированию локальных вариантов этой гаплогруппы [2]. В настоящее время существует целый ряд хорошо изученных SNP-маркеров, маркирующих субгруппы R1b с известным географическим распространением — как с юго-западноазиатским, так и с западноевропейским [2, www.isogg.org] (рис. 1).

В украинских популяциях R1b-M269 входит в пятерку наиболее частых гаплогрупп и составляет от 2,2 до 9,4% от всех линий Y-хромосомы [2, 5–7]. Присутствие R1b в украинском генофонде может быть результатом миграции ее носителей как из Западной Европы, так и из Турции, Балканского региона, Кавказа или даже Центральной Азии. В данной работе мы предприняли попытку разграничить вклад восточных и западных миграций в украинский пул R1b Y-хромосом с использованием данных по микросателлитному разнообразию.

Маркеры (слева) и классификация гаплогрупп (справа) приведены в соответствии с ISOGG 2015 [www.isogg.org]. Данные о географическом распространении субгрупп взяты из [2].

Варианты M269 (xL23) и L23 (xM412) распространены преимущественно в Передней Азии (синонимичное название этого региона — «Юго-Западная Азия» в русскоязычной литературе и «West Asia» в англоязычной литературе).

Рис. 1. Фрагмент филогенетического дерева гаплогруппы R1b

© УТЕВСКАЯ О.М., ДИБИРОВА Х.Д., ЧУХРЯЕВА М.И., АГДЖОЯН А.Т., АТРАМЕНТОВА Л.А., БАЛАНОВСКАЯ Е.В. БАЛАНОВСКИЙ О.П.

Материалы и методы

Материалом для исследования были 90 образцов ДНК из популяций украинцев, относящихся к Y-хромосомной ветви R-M343. Образцы ДНК были собраны в 13 областных популяциях у коренных украинцев — неродственных между собою мужчин.

Гаплогруппы Y-хромосомы R1b, R1b1a и R1b1a2 были определены генотипированием на соответствующие SNP-маркеры M343, P297 и M269 с использованием TaqMan зондов (Applied Biosystems) методом ПЦР в реальном времени (7900HT, Applied Biosystems) и подтверждены предикцией по STR-гаплотипу. STR-гаплотипы получены в ходе генотипирования 17 микросателлитных локусов набора Y-filer PCR Amplification Kit (Applied Biosystems): DYS19, DYS385a, DYS385b, DYS389a, DYS389b, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635, GATAH4. Классификация гаплогрупп Y-хромосомы приведена в соответствии с ISOGG 2015 [www.isogg.org]. Номенклатура микросателлитных локусов дана в соответствии с сертификацией U. S. National Institute of Standards and Technology [www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/multiplx.htm].

Гаплотипы 83 украинских образцов и 993 гаплотипов из работы [2] использованы для построения общей медианной сети гаплотипов гаплогруппы R1b-M269. Медианная сеть построена в программе Network 4.6 (режим Reduce Median) по данным о полиморфизме 8 STR локусов Y-хромосомы: DYS19, DYS389a, DYS389b, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS439. Кластеры, выявленные на медианной сети, проверялись на специфичность: 1) по географической принадлежности образцов; 2) по географическому ареалу субгаплогрупп, к которым они относятся (для всех гаплотипов из работы [2] был известен их субвариант R1b-M269). Рассчитывалась доля украинских образцов в каждом кластере и оценивался вклад европейских и азиатских субвариантов в общий пул украинских R1b-M269 Y-хромосом. В качестве меры микросателлитного разнообразия использовалась средняя дисперсия, рассчитанная по 8-ми STR локусам.

Результаты и обсуждение

По результатам генотипирования из 90 украинских образцов ДНК, принадлежащих ветви R-M343, 89 образцов были отнесены к гаплогруппе R-M269 и 1 образец определен как R-P297 (xM269). Среди изученных образцов не было обнаружено вариантов M343* и M73 («корневых» гаплогрупп, не относящихся ни к одной из тестируемых субгаплогрупп в их пределах). Частоты гаплогруппы R1b1a2-M269 в разных популяциях варьировали от 3,4 до 12,7%, в среднем по Украине составляя 7,4%. Четких географических градиентов в распределении частот по украинским популяциям выявлено не было.

STR-гаплотипы украинских образцов были использованы для выявления субкластеров в пределах R-M269. Для этого была построена медианная сеть гаплотипов R-M269 (рис. 2), основу которой составили гаплотипы, опубликованные в [2], исследованные одновременно и по SNP-маркерам, и по STR-маркерам. Данные по каждому образцу [2] включали следующую информацию:

1) страна;

2) SNP-маркер, подтверждающий принадлежность образца к конкретной гаплогруппе Y-хромосомы (L2, L20, M529, L23, L48, M222, M269, M412, M73/M478, S116, U106, U152, U198) (рис. 1);

3) STR-гаплотип (8 локусов Y-хромосомы: DYS19, DYS389a, DYS389b, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS439).

На полученной медианной сети выделяются два высокоспецифичных кластера, обозначенные α и β. Суммарная доля гаплотипов, принадлежащих «юго-западноазиатским» гаплогруппам

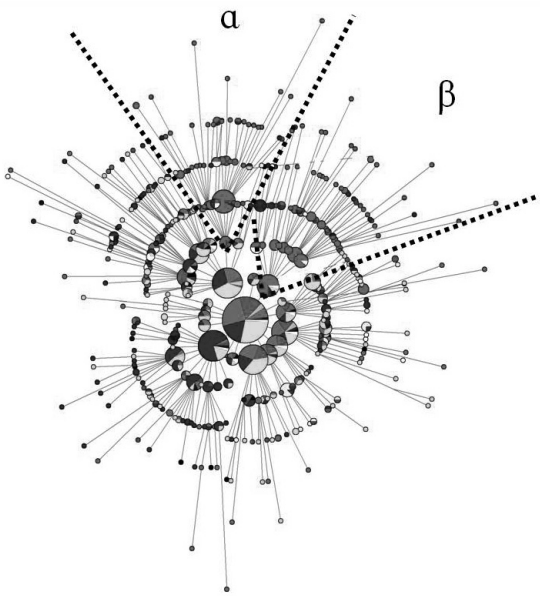


Рис. 2. Медианная сеть гаплотипов R-M269

M269 (xL23) и L23 (xM412), составляет в них 94,1%. Географически бóльшая часть гаплотипов относится к Турции, Башкирии, Кавказскому региону и Южной Европе (Италия, Украина, Греция). Остальная часть сети, лежащая вне кластеров α и β, на 95,6% состоит из образцов, относящихся к «западноевропейской» гаплогруппе M412 и ее субветвям. Географически она представляет Северную, Западную и Центральную Европу (табл. 1).

Из всех украинских гаплотипов одна треть (28 из 83) попала в «юго-западноазиатские» кластеры, две трети (55 из 83) оказались в «западноевропейской» части сети.

Построена в программе Network 4.6 (в режиме Reduce Median) по данным о 1076 8-локусных STR-профилях Y-хромосомы: DYS19, DYS389a, DYS389b, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS439. Каждый круг сети соответствует гаплотипу или группе одинаковых гаплотипов; размер круга пропорционален числу гаплотипов. Один шаг линий соответствует одному мутационному событию.

Кластеры α и β обособлены от остальных гаплотипов мутационным шагом 12↔13 в локусе DYS393: гаплотипам этих кластеров свойственны аллели 11 и 12, тогда как для остальной части медианной сети характерны аллели 13, 14 и 15.

Анализ частотного распределения аллелей локуса DYS393 в разных гаплогруппах Y-хромосомы (рис. 3) показал, что у «юго-западноазиатских» вариантов R-L23* и R-M269* основным аллелем является DYS393=12 (почти у 90% гаплотипов), тогда как у гаплогрупп «западноевропейской» ветви R-M412 основным аллелем является DYS393 = 13 (более чем у 90% гаплотипов). Таким образом, STR-маркер DYS393 позволяет дифференцировать мажорную европейскую гаплогруппу R1b-M269 на юго-западноазиатские (аллели 12 и ниже) и западноевропейские (аллели 13 и выше) субварианты.

Частотные распределения аллелей локуса DYS393 в азиатских и европейских популяциях (рис. 4) соответствуют спектру и частотам встречающихся в них гаплогрупп: в Юго-Западной

Таблица 1

Характеристика кластеров медианной сети R1b-M269

Характеристика	α-кластер	β-кластер	Остальная сеть
Всего гаплотипов	104	146	826
Гаплотипов украинцев	11	17	55
Гаплотипов азиатских и кавказских популяций	62	59	36
Гаплотипов европейских популяций (без украинцев)	31	70	735
«Юго-западноазиатские» гаплогруппы			
Количество L23* гаплотипов (без украинцев)	78	105	31
Количество M269* гаплотипов (без украинцев)	8	18	3
Доля западноазиатских гаплогрупп L23* и M269*	0,9247	0,9535	0,0441
«Западноевропейские» гаплогруппы			
Количество M412 гаплотипов (без украинцев)	7	6	737
Доля западноевропейских гаплогрупп M412	0,0753	0,0465	0,9559

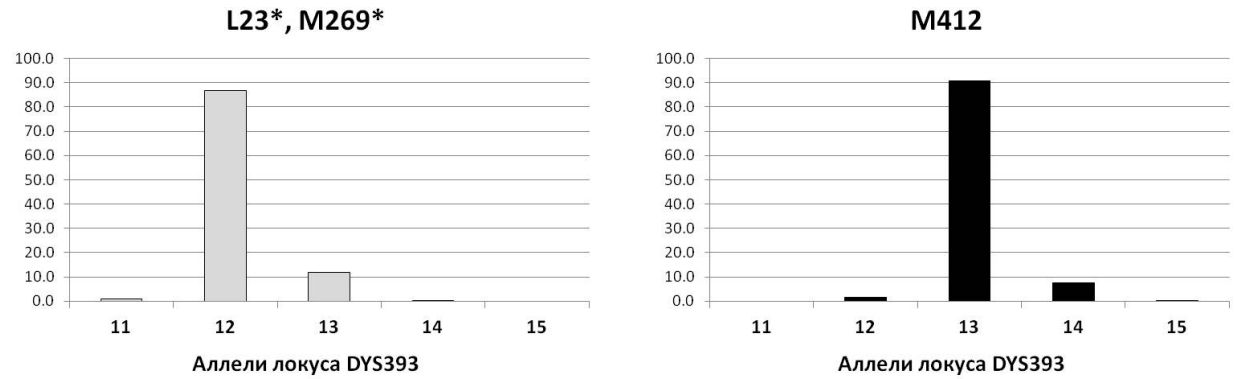


Рис. 3. Частотное распределение аллелей локуса DYS393 Y-хромосомы среди «юго-западноазиатских» (L23*, M269*) и «европейских» (M412) гаплогрупп

Азии преобладает DYS393 = 12 (76%) в Западной Европе — DYS393 = 13 (81%).

Украинские образцы по локусу DYS393 занимают промежуточное положение между азиатскими и европейскими популяциями (рис. 4): доли аллелей DYS393 = 12 и DYS393 = 13 составляют 34 и 56% соответственно.

Общее микросателлитное разнообразие R1b-M269, вычисленное как средняя дисперсия по 8-ми исследованным STR-локусам (табл. 2), постепенно повышается в направлении от Северной Европы к Центральной и Южной, достигая сравнительно высоких значений в Юго-Восточной Европе, Турции и на Кавказе. Учитывая известную филогеографию R1b-M269, высокое микросателлитное разнообразие R1b-M269 на границе Европы и Азии скорее всего соответствует вторичной зоне смешения разных линий, давно разделившихся и эволюционировавших независимо друг от друга. Данных по другим, более восточным областям Юго-Западной Азии, было недостаточно для данного анализа. Низкое микросателлитное разнообразие в Башкирии свидетельствует о недавнем эффекте дрейфа генов.

Выводы

Показано, что STR-маркер DYS393 с точностью выше 90% позволяет дифференцировать мажорную европейскую гаплогруппу R1b-M269 на юго-западноазиатские (аллели 12 и ниже) и западноевропейские (аллели 13 и выше) субварианты.

Среди украинских Y-хромосом, относящихся к линии R1b-M269, встречаются как западноевропейские, так и юго-западноазиатские субварианты в примерном соотношении 2:1. Данный вывод подтверждается распределением украинских STR-гаплотипов в обеих частях медианой сети — «европейской» и «азиатской».

Относительно высокое значение микросателлитного разнообразия, полученное для Украины, также может свидетельствовать о смешении разных линий R1b-M269 в Северном Причер-

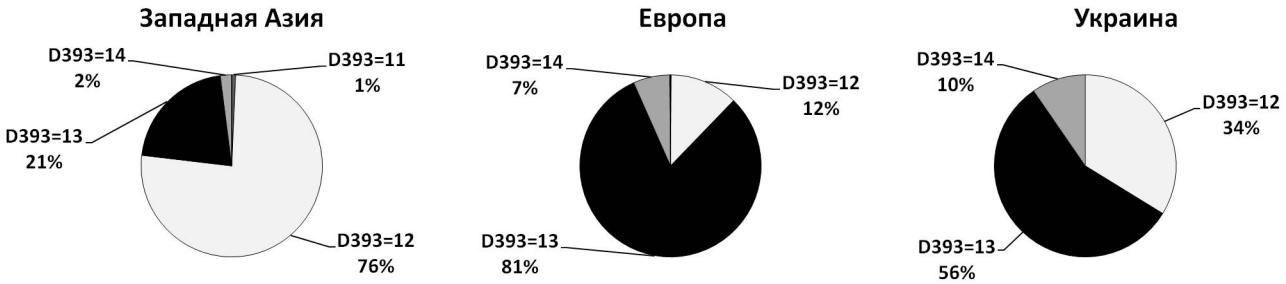


Рис. 4. Частотное распределение аллелей локуса DYS393 Y-хромосомы в юго-западноазиатских и европейских популяциях

Таблица 2

Микросателлитное разнообразие R1b-M269 в разных популяциях

Страна	Объем выборки	Дисперсия	Страна	Объем выборки	Дисперсия
Северная Европа			*Южная и Юго-Восточная Европа*		
Эстония	17	0.3024	Словения	17	0.3851
Швеция	15	0.2976	Украина	83	0.3495
Англия	73	0.2610	Румыния	32	0.3246
Ирландия	81	0.2578	Франция	68	0.3040
Дания	40	0.2323	Италия	105	0.2581
Нидерланды	44	0.2100	Греция	24	0.1936
Центральная Европа			*Юго-Западная Азия, Кавказ, Приуралье*		
Венгрия	22	0.2998	Турция	77	0.3605
Польша	25	0.2929	Кавказ	34	0.3523
Германия	140	0.2908	Башкирия	38	0.1032
Швейцария	83	0.2900			
Словакия	45	0.2654			
Чехия	9	0.2431			

номорье. Учитывая географическое положение Украины, а также общую филогеографию линии R1b-M269, можно предположить, что **присутствие азиатских и европейских вариантов R1b в украинском Y-хромосомном генофонде является результатом разных миграций — западных (из Западной Европы) и восточных (из Анатолии, с Кавказа)**. Вопрос о времени этих демографических событий остается открытым.

Исследование поддержано грантом ДФФД України ДФ53/071, Программой «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН, грантами РНФ 14-14-00827 и РФФИ 13-04-01711.

ЛИТЕРАТУРА

1. Balaresque P., Bowden G. R., Adams S. M., Leung H. Y., King T. E., Rosser Z. H., Goodwin J., Moisan J. P., Richard C., Millward A., Demaine A. G., Barbujani G., Previderè C., Wilson I. J., Tyler-Smith C., Jobling M. A. A predominantly neolithic origin for European paternal lineages // PLoS Biology.— 2010.— 8 (1).
2. Myres N. M., Rootsi S., Lin A.A, Järve M., King R. J., Kutuev I., Cabrera V. M., Khusnutdinova E. K., Pshenichnov A., Yunusbayev B., Balanovsky O., Balanovska E., Rudan P, Baldovic M., Herrera R. J., Chiaroni J., Di Cristofaro J., Villems R., Kivisild T., Underhill P. A. A major Y-chromosome haplogroup R1b Holocene era founder effect in Central and Western Europe // Eur. J. Hum. Genet.— 2011.— 19 (1).— P. 95–101.
3. Cinnioğlu C., King R., Kivisild T., Kalfoğlu E., Atasoy S., Cavalleri G. L., Lillie A. S., Roseman C. C., Lin A. A., Prince K., Oefner P. J., Shen P., Semino O., Cavalli-Sforza L.L., Underhill P. A. Excavating Y-chromosome haplotype strata in Anatolia // Hum. Genet.— 2004.— 114 (2).— P. 127–148.
4. Semino O., Passarino G., Oefner P. J., Lin A. A., Arbuzova S., Beckman L. E., De Benedictis G., Francalacci P., Kouvatsi A., Limborska S., Marcikiae M., Mika A., Mika B., Primorac D., Santachiara-Benerecetti A.S., Cavalli-Sforza L.L., Underhill P. A. The genetic legacy of Paleolithic Homo sapiens sapiens in extant Europeans: a Y-chromosome perspective // Science.— 2000.— 290 (5494).— P. 1155–1159.
5. Battaglia V., Fornarino S., Al-Zahery N., Olivieri A., Pala M., Myres N. M., King R. J., Rootsi S., Marjanovic D., Primorac D., Hadziselimovic R., Vidovic S., Drobnic K., Durmishi N., Torroni A., Santachiara-Benerecetti A.S., Underhill P. A., Semino O. Y-chromosomal evidence of the cultural diffusion of agriculture in Southeast Europe // Eur. J. Hum. Genet.— 2009.— 17 (6).— P. 820–830.
6. Varzari A., Kharkov V., Nikitin A. G., Raicu F., Simonova K., Stephan W., Weiss E. H., Stepanov V. Paleo-Balkan and Slavic Contributions to the Genetic Pool of Moldavians: Insights from the Y Chromosome // PLoS One.— 2013.— 8 (1): e53731.
7. Mielnik-Sikorska M., Daca P., Woźniak M., Malyarchuk B. A., Bednarek J., Dobosz T., Grzybowski T. Genetic data from Y chromosome STR and SNP loci in Ukrainian population // Forensic Sci. Int. Genet.— 2013.— 7 (1) — P. 200–203.

UTEVSKA O.M.[1], DIBIROVA KH.D.[2], CHUKHRAEVA M.I.[2, 3], AGDZHOYAN A.T.[3], ATRAMENTOVA L.A.[1], BALANOVSKA E.V.[2], BALANOVSKY O.P.[2, 3]

[1] V.N. Karazin Kharkiv National University,
Ukraine, 61022, Kharkiv, Svobody sq., 4, e-mail: outevsk@yandex.ua

[2] Research Centre for Medical Genetics,
Russia, 119991, Moscow, Gubkin str., 3

[3] Vavilov Institute for General Genetics,
Russia, 115478, Moscow, Moskvorechie, 1

WEST EUROPEAN AND WEST ASIAN VARIANTS OF THE HAPLOGROUP R1b IN UKRAINIAN POPULATION

Aims. We studied the contribution of the West European and West Asian variants of Y-chromosomal haplogroup R1b into Ukrainian gene pool. ***Methods.*** The Y-STR profiles of R1b haplotypes with known variant affiliation were used to define the affiliation of Ukrainian haplotypes. ***Results.*** Locus DYS393 differentiates R1b-M269 haplotypes into West Asian (M269 (xL23), L23 (xM412), alleles 12 and lower) and West Eurpean (M412, alleles 13 and higher) with accuracy above 90%. Ukrainian STR haplotypes were distributed between Asian and European parts of the median network in the ratio 1:2. The frequency distribution of DYS393 alleles in Ukrainians was intermediate between those of Asian and European populations. ***Conclusion.*** Our results indicate mixing of the different R1b lineages in the contact zone between Asia and Europe. The presence of Asian and European subhaplogroups R1b in Ukrainian populations is caused by the migratory flows from west and east.

Keywords: Y-chromosome, haplogroup, STR markers, haplotype, Ukrainians.

УДК 575. 164

ФЕДОТА А. М.[1], РОЩЕНЮК Л. В.[2], АДМАКИНА А. В.[1], СОЛОДЯНКИН А. С.[3]

[1] Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина МОН Украины, Украина, 61077, г. Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: afedota@mail.ru

[2] Харьковский областной клинический кожно-венерологический диспансер № 1, Украина, 61000, г. Харьков, ул. Карла Маркса, 17, e-mail: okkvd1@gmail.com

[3] ННЦ Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины, Украина,61023, г. Харьков, ул. Пушкинская, 83, e-mail: alex_solod@mail.ru

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ С677Т И А1298С ГЕНА *MTHFR* У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ

Метилентетрагидрофолатредуктаза (*MTHFR*, Methylenetetrahydrofolate reductase, 1p36.3, OMIM 607093) расположена в локусе p36.3 длинного плеча 1-й хромосомы. *MTHFR* играет ключевую роль в метаболизме фолиевой кислоты. Наиболее изученными SNP гена *MTHFR* являются однонуклеотидные полиморфизмы С677Т и А1298С. У гомозигот по полиморфному аллелю Т в позиции 677 гена *MTHFR* отмечается термолабильность фермента и снижение его активности до 70% от среднего значения, полиморфный вариант С в позиции 1298 в гомозиготном состоянии снижает активность *MTHFR* до 60%, что приводит не только к нарушению метаболизма фолатов и процессов метилирования в клетке, но и избыточному накоплению гомоцистеина в плазме крови [5, 12–13, 16]. У дигетерозигот отмечается депрессия функции фермента [5]. В настоящее время известно, что гипергомоцистеинемия является фактором риска развития ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, атеросклероза, атеротромбоза, осложнений беременности [7, 17], приводящих к врожденным порокам развития [11], предраковых и раковых состояний колоректальной области [14–15]. Поскольку комбинации генотипов по полиморфным вариантам позиций 677 и 1298 гена *MTHFR* могут приводить к снижению активности фермента и гипергомоцистеинемии в различной степени, представляется актуальным проанализировать распределение генотипов по рассматриваемым SNP у больных псориазом [2–4].

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы периферической крови 201 больного с различными формами псориаза, находящегося на диспансерном учете в ХОККВД № 1. От всех участников исследования или их родственников было получено информированное согласие на участие в данной работе. Выделение ДНК проводилось с помощью наборов для экстракции «ДНК Diatom DNA Prep 100» («Isogene Lab. Ltd.». Для полиморфного варианта С677Т реакция амплификации проведена с использованием наборов «GenPak MTHFR PCR test» («Isogene Lab.Ltd») на термоциклере BIOMETRA T3000 по стандартной методике. Генотипирование полиморфизма А1298С проводилось методом ПДРФ, с использованием однонуклеотидных праймеров [8] и эндонуклеазы рестрикции MboII. Электрофоретический анализ проведен с помощью наборов для электрофореза производителя «АмплиСенс» в 2% и 3% агарозном геле. Маркером молекулярной массы служила ДНК Ladder M50.

Оценка равенства рядов распределения проведена с помощью критерия χ^2 на уровне значимости 0,05 и 0,001 [1].

Результаты и обсуждение

Анализ полиморфных вариантов гена *MTHFR* как возможных предикторов для развития псориаза показал, что частоты аллелей полиморфизмов С677Т и А1298С у больных псориазом составили: $P_C = 0{,}719$, $P_T = 0{,}281$ и $P_A = 0{,}667$, $P_C = 0{,}333$, соответственно.

На основании частот анализируемых алелей получено теоретическое число генотипов для панмиксной популяции.

Структура популяции соответствует соотношению Харди-Вайнберга, фактическое распределение генотипов статистически значимо не отличается от теоретически ожидаемого при равновесии (табл. 1, 2) для полиморфных вариантов С677Т ($df = 2$, $\chi^2_{ст} = 5{,}99$, $\chi^2_{ф} = 3{,}04$, $p > 0{,}05$) и А1298С ($df = 2$, $\chi^2_{ст} = 5{,}99$, $\chi^2_{ф} = 3{,}54$, $p > 0{,}05$) гена *MTHFR*.

При условии, что полиморфные аллели исследуемых позиций внутри одного гена не являются сцепленными, следует ожидать, что ана-

© ФЕДОТА А. М., РОЩЕНЮК Л. В., АДМАКИНА А. В., СОЛОДЯНКИН А. С.

Таблица 1

Распределение генотипов СС, СТ, ТТ по полиморфному варианту С677Т гена *MTHFR* у больных псориазом

Распределение	ТТ		СТ		СС	
	кол-во	%	кол-во	%	кол-во	%
Фактическое	11	5,5	91	45,3	99	49,3
Теоретическое	8	7,9	98	40,4	95	51,7

Таблица 2

Распределение генотипов АА, АС, СС по полиморфному варианту А1298С гена *MTHFR* у больных псориазом

Распределение	АА		АС		СС	
	кол-во	%	кол-во	%	кол-во	%
Фактическое	43	43	47	47	9	10
Теоретическое	48	38	44	56	7	6

Таблица 3

Частоты генотипов по полиморфным вариантам С677Т и А1298С гена *MTHFR* у больных псориазом

Генотип	Частота генотипа	Количество наблюдений		Статистики
		теоретически	фактически	
ТТ СС	0,002	6	0	
ТТ АС	0,003	12	0	
ТТ АА	0,095	6	9	
СТ СС	0,032	12	3	df = 8, χ^2ст = 26,12,
СТ АС	0,316	24	30	χ^2ф = 44,0
СТ АА	0,200	12	19	p < 0,001
СС СС	0,053	6	5	
СС АС	0,168	12	16	
СС АА	0,147	6	14	

лизируемая выборка будет равновесной по всем независимым комбинациям.

Анализ рядов распределения генотипов больных по полиморфизмам С677Т и А1298С показал статистически значимую разницу между теоретически ожидаемыми частотами и фактическими (df = 8, χ^2ст = 44,0, χ^2ф = 26,12, p < 0,001) (табл. 3).

Подобные отклонения от равновесия могут означать, что носители одних генотипов, вероятно, обладают селективным преимуществом, других, например ТТСС, ТТАС,— пониженной адаптивностью, и их отсутствие может быть обусловлено действием отбора. Например, исследователями показано [10], что хотя полиморфные варианты гена *MTHFR* вносят вклад в развитие кардиоваскулярной патологии, являются фактором риска развития артериальной гипертензии, участвуют в патогенезе левожелудочковой систолической дисфункции (*LVSI*), гетерозиготы по обеим аллелям СТ АС менее склонны к развитию этой патологии, и авторы заключают, что протективность этого генотипа может являться примером молекулярного гетерозиса.

Полученная информация о частотах аллелей и генотипов по исследуемому гену может быть использована для анализа структуры популяции и процессов, которые в ней происходят, поскольку в различных популяциях, этнических группах и климатогеографических зонах эти параметры неодинаковы. Среди некоторых групп населения и в разных этнических группах генотипы [9], влияющие на обмен гомоцистеина, могут встречаться с частотой до 20%, поскольку нарушения метаболизма могут корректироваться пищевыми фолатами. Супрессия доступности фолиевой кислоты, наблюдаемая при курении, может еще больше усилить вклад отдельных генотипов по полиморфным вариантам гена *MTHFR* в развитие гипергомоцистеинемии [5], что важно учесть при работе с больными псориазом.

Вывод

Генетический анализ полиморфных вариантов С677Т и А1298С гена *MTHFR,* являющихся факторами риска развития нарушений с широким спектром клинических симптомов, показал актуальность их исследования у больных псориазом, что будет продолжено в следующих работах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атраментова Л. О., Утєвська О. М. Статистичні методи в біології.— Харків, 2007.— 288 с.
2. Генетический паспорт — основа индивидуальной и предиктивной медицины / Под ред. В. С. Баранова.— СПб: Изд-во Н-Л, 2009.— 528 с.
3. Горовенко Н. Г., Ольхович Н. В., Россоха З. І., Пічкур Н. О., Кир'яченко С. П. Вплив поліморфізму С677Т гена MTHFR на фолатний статус та рівень гомоцистеїну в сироватці крові у дітей з когнітивними розладами // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики.— К.— Луганськ, 2010.— С. 61–70.
4. Гречанина Е. Я., Гусар В. А. Распространенность полиморфизмов С677Т MTHFR и А66G MTRR генов системы фолатного цикла в популяциях восточной Украины // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики.— К.— Луганськ, 2010.— С. 91–97.
5. Родзинский В. Е., Иткес А. В., Галина Т. В., Карпова Е. В., Хотайт Г. Я. Мяндина Г. И. Корреляция различных форм гестоза с генотипом по гену GPIIIα β-цепи интегрина // Акушерство и гинекология.— 2001.— № 6.— С. 53–57.
6. Рыжко П. П., Федота А. М., Воронцов В. М. Генодерматозы: буллёзный эпидермолиз, ихтиоз, псориаз.— Харьков: Фолио, 2004.— 334 с.
7. Чорна Л. Б., Макух Г. В., Акопян Г. Р., Заставна Д. В., Прокопчук Н. М. Аналіз поліморфних варіантів генів MTHFR, MTR, MTRR та мутацій генів FV // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.— 2011.— Вип. 13, № 947.— С. 118–124.
8. Armitage P., Berry G. Statistical methods in medical research. 3rd ed.— Blackwell Scientific Publications, 1994.— 620 p.
9. Bagheri M., Rad I. A., Omrani M. D., Nanbaksh F. C677T MTHFR and A1298C Mutations in the Methylentetrahydrofolate Reductase Gene in Patients with Recurrent Abortion from the Iranian Azeri Turkish // In. J. of Fert. And Ster.— 2010.— N 3.— P. 134–139.
10. Strauss E., Supinski W, Gluszek J. Pawlak A. L. Compound heterozygosity of MTHFR (677Ct/1298Ac) protects, both normotensive and hypertensive males with cad, against the left ventricular systolic heart insufficiency // J. Hypertension.— 2010.— 28.— P. 344.
11. Doolin M.-T., Barbaux S., McDonnell M., Hoess K., Whitehead A. S., Mitchell L. E. Maternal genetic effects, exerted by genes involved in homocysteine remethylation, influence the risk of spina bifida // Am. J. Hum. Genet.— 2002.— N 71.— P. 1222–1226.
12. Ioannidis J. P., Ntzani E. E., Trikalinos T. A. 'Racial' differences in genetic effects for complex diseases // Nat. Genet.— 2004.— N 36 (12).— P. 1243–1244.
13. Guttormsen A. B., Ueland P. M., Nesthus I., Nygard D., Schneede J., Vollse S. E., Refsum H. Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (>or = 40 micromol/liter). The Hordaland Homocysteine Study // J. Clin. Invest.— 1996.— N 98 (9).— P. 2174–2183.
14. Martin D. N., Boersma B. J., Howe T. M., Goodman J. E. Association of *MTHFR* gene polymorphisms with breast cancer survival BMC // Cancer.— 2006.— № 6.— P. 257.
15. Sazci A., Ergul E., Bayulkem K. Association of the C677T and A1298C polymorphisms of methylentetrahydrofolat reductase gene in patients with essencial tremor in Turkey // Mov. Disord.— 2004.— 19.— P. 1472–1476.
16. Tatarskyy P., Kucherenko A., Livshits L. Allelic polymorphism of F2, F5 and MTHFR genes in population of Ukrain // Cytology and genetics.— 2010.— 44.— N 3.— P. 129–133.
17. Zetterberg H., Regland B., Palmér M., Ricksten A. Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos // Eur. J. Hum. Genet.— 2002.— N 10 (10).— P. 578–579.

FEDOTA A.M.[1], RASCHELYUK L.B.[2], ADMAKINA A.B.[1], SOLODYANKIN A.S.[3]

[1] V.N. Karazina Kharkiv National University,
Ukraine, 61022, Kharkiv, Svoboda str., 4, e-mail: afedota@mail.ru

[2] Kharkiv regional clinical skin and venereal diseases dispensary № 1,
Ukraine, 61000, Kharkiv, Karl Marx str., 17, e-mail: okkvd1@gmail.com

[3] National Scientific Centre «Institute an experimental and clinical of veterinary medicine»,
Ukraine, 61023, Kharkiv, Pushkinska str., 83, e-mail: alex_solod@mail.ru

ANALYSIS OF POLYMORPHIC VARIANTS C677T AND A1298C OF *MTHFR* GENE IN PATIENTS WITH PSORIASIS

***Aim*.** Analysis of DNA samples for the study of psoriasis patients SNP C677T and A1298C gene methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*). ***Methods*.** Genealogical analysis of 201 probands and relatives was carried out. Genomic DNA of 201 patients was analyzed by polymerase chain reaction. Testing statistical hypotheses about the association studied genotypes with disease and evaluation of equality of distribution series conducted using $\chi 2$ test at a significance level of 0.05, 0.01 and 0.001. ***Results*.** Population structure corresponds to the correlation of the Hardy-Weinberg balance, the actual distribution of genotypes was not significantly different from the theoretically expected at balance C677T polymorphisms ($df = 2$, $st = 5.99$, $f = 3.04$, $p > 0{,}05$) and A1298C ($df = 2$, $st = 5.99$, $f = 3.54$, $p > 0.05$). Analysis of the distribution series genotype frequencies for polymorphisms C677T and A1298C *MTHFR* gene in patients showed a statistically significant difference between the theoretically expected and actual frequencies ($F = 44.0$, $p < 0.001$). ***Conclusion*.** The sample of patients with psoriasis shows deviations from balance by combinations of genotypes that are analyzed in the positions of the C677T and A1298 gene *MTHFR*. Such deviation from balance may mean that some genotypes carriers probably have a selective advantage, others — low adaptability.

Keywords: psoriasis, folic acid, homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase.

УДК 577.2

ШВАЧКО Л. П., ШУМЕЙКО І. С., ТЕЛЕГЄЄВ Г. Д.
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Україна, 03680, м. Київ, вул. Заболотного, 150, e-mail: l.shachko@ukr.net

СТАН ДНК-МЕТИЛЮВАННЯ ГЕНА ГЛУТАТІОН-S-ТРАНСФЕРАЗИ P1 (GSTP1) У ХВОРИХ НА РАК СЕЧОСТАТЕВОЇ СИСТЕМИ

Глутатіон-S-трансфераза P1 (GSTP1) виконує ключову роль у процесі блокування розвитку оксидативного стресу шляхом глутатіон-SH-залежної коньюгації ксенобіотиків, мутагенів, канцерогенів та є багатофункціональним антиоксидантним ферментом, який захищає клітину від дії генотоксичних чинників та апоптозу. Зниження глутатіону є одним з ключових факторів канцерогенезу за пригнічення експресії гена *GSTP1* [1, 2].

GSTP1 — основна ізоформа глутатіон-S-трансферази, яка експресується у всіх типах клітин людини, за винятком гепатоцитів [3]. Разом з тим, зміни в експресії гена *GSTP1* характерні для багатьох типів пухлин, причому залежно від типу пухлини спостерігається як пригнічення, так і підсилення його експресії у порівнянні з нормальними клітинами [4]. Відомо, що пригнічення експресії гена *GSTP1* пов'язується з епігенетичним механізмом, що становить значний інтерес в перебігу онкологічної прогресії [5].

5'-промоторна ділянка гена *GSTP1* характеризується наявністю CpG-острівця. Так, ділянка на проміжку від –100 до +300 bp відносно старту ініціації містить 72% C+G нуклеотидів, при цьому вміст CpG-динуклеотидів сягає 9,2%, що вказує на присутність такого CpG-острівця у промоторній ділянці гена *GSTP1*, який у нормі характеризується конститутивним ДНК гіпометилюванням CpG-динуклеотидів за активного функціонування промотору [6].

Основним механізмом епігенетичних порушень, що супроводжують прогресію сечостатевої онкопатології, такої як рак простати [6, 7] та рак нирки [8, 9], є аберантне гіперметилювання CpG-промотору гена *GSTP1*. Рак простати та рак нирки — одні з розповсюджених на сьогоднішній день онкопатологій сечостатевої системи людини, тому дослідження стану метилювання промотору гена *GSTP1* має бути актуальним біологічним маркером для підвищення специфічності ранньої молекулярно-генетичної діагностики даних захворювань [10, 11].

До теперішнього часу сучасні методи діагностики і прогнозування раку сечостатевої системи залишаються доволі ускладненими, з урахуванням біопсії. Пошук неінвазивних методів на зразках ДНК, виділеної з пухлино-асоційованих клітин сечі, може пов'язуватися з епігенетичним аналізом стану метилювання гена *GSTP1* [11].

Метою роботи є визначення стану метилювання ДНК промотору гена *GSTP1* на зразках сечі та периферійної крові хворих на рак сечостатевої системи.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були як зразки периферійної крові умовно здорових донорів (n = 6), так і зразки нічної сечі від хворих на рак нирки (n = 10), рак сечового міхура (n = 8) та рак простати (n = 5) з Національного інституту раку.

Виділення тотальної ДНК проводили за стандартним протоколом (безфенольний метод). Концентрацію зразків ДНК вимірювали на приладі Nanodrop 2000 (Termo Scientific, USA) та нормували до 800 нг/мкл. Проводили бісульфітну конверсію геномних ДНК за допомогою стандартного Epic JET Bisulfite Conversion Kit (Termo Scientific, Литва) відповідно до протоколу.

Для метил-специфічної ПЛР (МС-ПЛР) бісульфітно модифікованої ДНК були синтезовані метил-специфічні праймери до неметильованої ділянки промотору гена *GSTP1*: 5'-GATTTGGGAAAGAGGGAAAGG-3' (прямий) та 5'-CTAAAAACTCTAAACCCCATCC-3' (зворотний)), продуктом яких є амплікон за розміром 310 п.н. Контролем на МС-ПЛР слугував ген лужної фосфатази за використанням праймерів до неметильованої ділянки промотору:

5'-GGTAAAGATAAAATAGGAGATGTGT-3' (прямий) та 5'-CCCTACCAAAAACAAAACT AAAAAC-3' (зворотний) з відповідним продуктом ампліфікації 175 п.н.

Результати МС-ПЛР аналізували за допомогою елетрофорезу в 3% агарозному гелі з TAE буфером (40 мМ трис-ацетат; 1 мМ ЕДТА; pH 7,6). Детекцію продуктів МС-ПЛР проводили за допомогою етидій бромідного розчину (EtBr

© ШВАЧКО Л. П., ШУМЕЙКО І. С., ТЕЛЕГЕЄВ Г. Д.

0,01 мг/мл) з подальшим аналізом електрофореграм за допомогою денситометрії в програмі *TotalLab v. 2.01*.

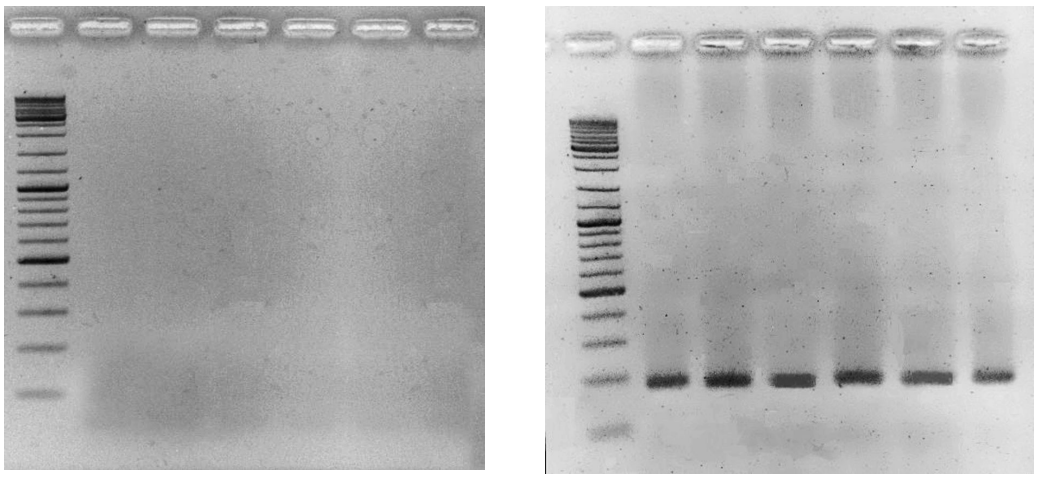
Результати та обговорення

Фізіологічно, CpG-острівець, що входить до складу промотора гена *GSTP1* на проміжку від –100 до +300 bp, є неметильованим та активно транскрибується у геномі (5, 6). Ключовим механізмом репресії транскрипції гена *GSTP1* є епігенетичне аберантне ДНК-метилювання його CpG-промотору (7, 10, 11). Універсальним методом аналізу епігенетичного ДНК-метилювання є бісульфітна модифікація ДНК, принцип якої полягає в послідовній хімічній конверсії залишків неметильованого цитозину до урацилу у складі CpG-динуклиотидів [12].

Нами проведено дослідження стану аберантного ДНК-метилювання промотору гена *GSTP1* у хворих на рак сечостатевої системи: рак нирки (n = 10), рак сечового міхура (n = 8) та рак простати (n = 5). Після бісульфітної модифікації геномних ДНК проводили метил-специфічну ПЛР (МС-ПЛР) за використання праймерів до неметильованого промотору гена *GSTP1*. Це надало нам можливість виявити чи не виявити специфічну ампліфікацію фізіологічно неметильованого стану промотору гена *GSTP1* у досліджуваних хворих на рак сечостатевої системи, як на зразках нічної сечі, так і периферійній крові.

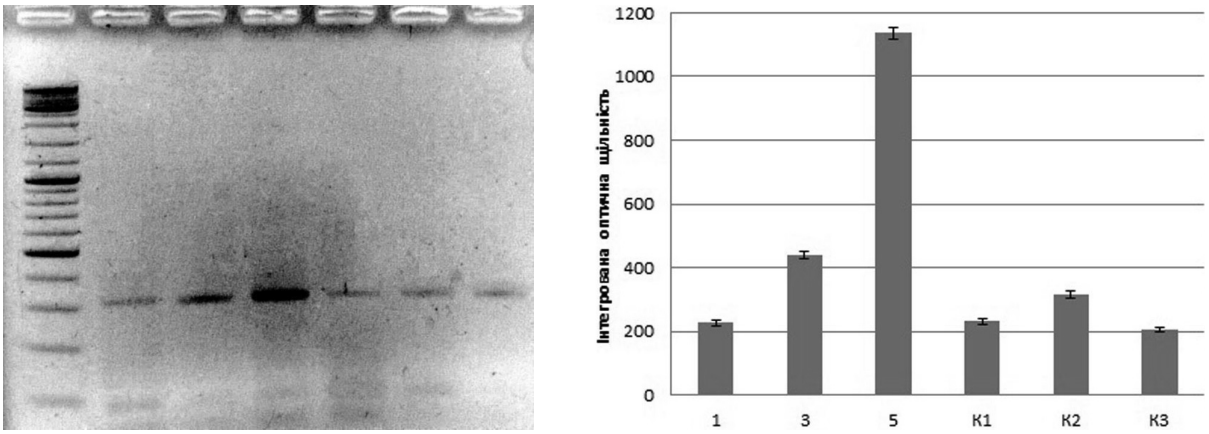
На рис. 1, А представлені результати дослідження, де показана відсутність продукту специфічної ампліфікації гена *GSTP1* (310 п.н.) у хворих на рак нирки (1, 2), рак сечового міхура (3, 4) та рак простати (5, 6) на зразках нічної сечі, що вказує на аберантно метильований стан CpG-промотору гена *GSTP1* і, як наслідок, репресію його транскрипції, виявлену у таких хворих. Навпаки, вибраний нами контрольний ген лужної фосфатази (*AlPh*) не зазнавав аберантного метилювання свого CpG-промотору відповідно до специфічності проведеного МС-ПЛР аналізу (рис. 1, Б).

На жаль, клітинний пул сечі умовно здорових донорів був недостатнім для отримання необхідної концентрації ДНК у подальшому аналізі. Щоб показати специфічність аберантного метилювання промотору гена *GSTP1* саме на зразках сечі, що містить канцер-асоційовані клітини, нами було проаналізовано зразки периферійної крові досліджуваних хворих на рак сечостатевої системи у порівнянні з фізіологічними контролями (К1, К2 — плацента, К3 — пуповинна кров). Як видно з рис. 2, А, на відміну від сечі, в лімфоцитах периферійної крові має місце продукт ампліфікації, 310 п.н., що вказує на неметильований стан промотору гена *GSTP1* у хворих на рак нирки (1), рак сечового міхура (3) та рак простати (5) у порівнянні з фізіологічними контролями (К1, К2 — плацента, К3 — пуповинна кров). Отримані результати свідчать про те, що периферійна кров імовірно не може використовуватися для діагностичного прогнозування гена *GSTP1* у хворих на рак сечостатевої системи. В той же час, можна відзначити, що у хворого під номером 5 на рак простати може мати місце персоніфіковано



А Б

Рис. 1. А. Стан аберантного ДНК-метилювання промотору гена *GSTP1* за відсутністю продукту ампліфікації до неметильованої ділянки (310 п.н.) у хворих на рак нирки (1, 2), рак сечового міхура (3, 4) та рак простати (5, 6) на зразках нічної сечі. **Б.** Продукт ампліфікації до неметильованої ділянки промотору гена лужної фосфатази *AlPh* (175 п.н.) у хворих на рак нирки (1, 2), рак сечового міхура (3, 4) та рак простати (5, 6) на зразках нічної сечі



А Б

Рис. 2. А. Стан ДНК-метилювання промотору гена *GSTP1* за МС-ПЛР на зразках периферійної крові у хворих на рак нирки (1), рак сечового міхура (3) та рак простати (5) у порівнянні з контролем (К1, К2 — плацента, К3 — пуповинна кров). **Б.** Денситограма відносного рівня ампліфікації гена *GSTP1* на зразках крові пацієнтів на рак сечостатевої системи (1 — рак нирки; 3 — рак сечового міхура; 5 — рак простати) та фізіологічних контролів (К1, К2 — плацента; К3 — пуповинна кров)

вищий рівень активності системи детоксикації за рівнем транскрипції гена *GSTP1* (у 3,5 разу), порівнюючи з фізіологічним контролем (рис. 2, А).

Таким чином, як видно з рис. 2, на зразках периферійної крові досліджуваних хворих на рак сечостатевої системи, на відміну від зразків нічної сечі (рис. 1), має місце транскрипція гена *GSTP1*, який не інгібується за механізмом епігенетичного аберантного ДНК-метилювання CpG-промотору. Отже, діагностичним та прогностичним об'єктом для раку сечостатевої системи за аберантним метилюванням промотору гена *GSTP1* може бути лише нічна сеча.

Висновки

Проведено диференційний аналіз стану аберантного ДНК-метилювання промотору гена *GSTP1* на зразках нічної сечі та периферійної крові за допомогою бісульфітної модифікації та метил-специфічної ПЛР у хворих на рак сечостатевої системи (нирки, сечового міхура, простати). Отримані результати можуть мати діагностичне та прогностичне значення в системі неінвазивної діагностики раку нирки, простати та сечового міхура на зразках нічної сечі.

ЛІТЕРАТУРА

1. Gyoyao W. Glutathione metabolism and its implication for health // The journal of nutrition.— 2004.— 134 (3).— P. 489–492.
2. Hayes J. D., Flanagan J. U., Jowsey I. R. Glutathione transferases // Annu Rev Pharmacol Toxicol.— 2005.— 45.— P. 51–88.
3. Eaton D. L. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology // Toxicological sciences.— 2007.— 49.— P. 156–164.
4. Слончак А. М., Оболенська М. Ю. Структура і функції глутатіон-S-трансферази P1 // Український біологічний журнал.— 2009.— 1.— С. 5–13.
5. Millar D. S., Ow2 K.K., Paul C. L., Russell P. J., Molloy P. L., Clark S. J. Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase p (GSTP1) gene in prostate cancer // Oncogene.— 1999.— 18.— P. 1313–1324.
6. Bernardini S., Miano R., Iori R., Finazzi-Agro E., Palmieri G., Ballerini S., Angeloni C., Orlandi A., Bellincampi L., Cortese C., Federici G. Hypermethylation of the CpG in the promotor region of the GSTP gene in prostate cancer: a useful diagnostic and prognostic marker // Clin Chim Acta.— 2004.— 350 (1–2).— P. 181–188.
7. Bastian P. J., Ellinger J., Schmidt D., Wernert N., Wellmann A., Müller S. C., von Rücker A. GSTP1 hypermethylation as a molecular marker in the diagnosis of prostate cancer: is there correlation with clinical stage // Eur J Med Res.— 2004.— 9 (11).— P. 523–527.
8. Dulaimi E., Ibanez de Caceres I., Uzzo R. G., Al-Saleem T., Greenberg R. E., Polascik T. J., Babb J. S., Grizzle W. E., Cairns P. Promoter Hypermethylation Profile of Kidney Cancer // Clin Cancer Res.— 2004.— 10.— P. 3972–3979.

9. Battagli C., Uzzo R. G., Dulaimi E. Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from kidney cancer patients // Cancer Res.— 2003.— 63.— P. 8695–8699.
10. Cao D. L., Yao X. D. Advances in biomarkers for early diagnosis of prostate cancer // Chin J Cancer.— 2010.— 29 (2).— P. 220–233.
11. Gonzalgo M. L., Pavlovich C. P., Lee S. M. Prostate cancer detection by GSTP1 methylation analysis of postbiopsy urine specimens // Clin Cancer Res.— 2003.— 9 (7).— P. 2673–2677.
12. Clark S. J., Statham A., Stirzaker C., Molloy P. L., Frommer M. DNA methylation: Bisulphite modification and analysis // Nature Protocols.— 2006.— 1.— P. 2353–2364.

SHVACKO L.P., SHUMEIKO I.S., TELEGEEV G.D.

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 150, e-mail: l.shvachko@ukr.net

DNA-METHYLATION STATUS OF GLUTATION-S-TRANSFERATHE P1 GENE (GSTP1) IN THE UROGENITAL MALIGNANCIES

Aims. Epigenetic changes are observed in different types of cancers and can offer a suitable markers for diagnostic uses. The changes in glutathione-S-transferase P1 gene (GSTP1) expression may be involved in the initiation and progression of urogenital malignancies and are often caused by an aberrant DNA-methylation of its CpG-island-promoter. The purpose of current study was to analyze DNA-methylation status of *GSTP1* promoter using genomic DNAs from the cancer-associated night urea cells from the patients with kidney, bladder and prostate tumors. ***Methods*.** Genomic DNA was extracted from the blood and night urea samples from the urogenital malignancy patients and healthy samples (placenta, fetal blood). Bisulfite conversion of genomic DNA with following methylation-specific PCR were used to DNA methylation *GSTP1* promoter study. ***Results.*** We have shown that *GSTP1* CpG-island-promoter is aberrantly hypermethylated in genomic DNA, extracted from the night urea of patients with urogenital malignancies (kidney, bladder, prostate tumors). In contrast, in the peripheral blood of these cancer patients and healthy controls *GSTP1* CpG-promoter really retained physiological unmethylated state. ***Conclusions.*** Aberrant *GSTP1* promoter DNA-methylation may be used as an available biomarker for the development of non-invasive diagnostic of urogenital malignancies in the urea biosamples.

Keywords: GSTP1 gene, DNA-methylation, urogenital malignancies, DNA bisulfite-methylation-specific PCR.

УДК 575.224;616.28-008.14

ШУБИНА-ОЛЕЙНИК О. А.[1], СИНЯВСКАЯ М. Г.[1], ЛЕВАЯ-СМОЛЯК А. М.[2], МЕРКУЛОВА Е. П.[3], ДАНИЛЕНКО Н. Г.[1]

[1] Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: Oleinik.Olga@yahoo.co.uk
[2] Белорусский государственный медицинский университет,
Республика Беларусь, 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83
[3] Белорусская медицинская академия последипломного образования,
Республика Беларусь, 220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3, e-mail: info@belmapo.by

СПЕКТР МУТАЦИЙ ЯДЕРНОГО ЛОКУСА DFNB1 У ПАЦИЕНТОВ С НЕСИНДРОМАЛЬНОЙ СНТ, ЖИТЕЛЕЙ БЕЛАРУСИ

Нарушение слуха (глухота) является этиологически гетерогенным заболеванием, причины возникновения которого можно разделить на две большие группы: генетически обусловленная и приобретенная. В настоящее время с наследственной патологией связывают более половины (50%) случаев врожденной СНТ (сенсоневральная тугоухость) [1]. Среди генетически обусловленной тугоухости в целом аутосомно-рецессивные варианты несиндромальной СНТ (DFNB) являются наиболее частыми и составляют более 70% всей наследственной несиндромальной патологии слуха [2–3].

Около 50% аутосомно-рецессивных форм наследственной несиндромальной тугоухости в различных популяциях связанно с локусом DFNB1, картированным на длинном плече 13-й хромосомы (13q11-q12) [4]. Локус DFNB1 содержит два гена — GJB2 и GJB6, оба кодируют белки-коннексины [1]. Данные белки формируют межклеточные контакты между соседними клетками, образуя структуру из шести белковых субъединиц — коннексон. Коннексоны обеспечивают обмен ионов и малых молекул, в тканях улитки — прежде всего рециркуляцию ионов K+ [5, 6]. Основной пул мутаций локуса DFNB1 приходится на ген GJB2, кодирующий белок коннексин 26. В настоящее время в гене GJB2 уже описано более 150 патогенных мутаций, а также ряд полиморфных однонуклеотидных замен, роль которых в патогенезе потери слуха пока неясна [7]. Особенностью мутаций гена GJB2 является то, что их спектр и частота значительно варьируют в различных популяциях. Наиболее распространенной мутацией гена GJB2 среди европейцев (кавказоиды) является рецессивная делеция 35delG (делеция одного из пяти гуанинов в позиции с 30 по 35). По разным оценкам, её частота составляет до 70–90% от всех патогенных мутаций в данном гене [8]. В гетерозиготном состоянии 35delG встречается у 0,5–4,5% нормально слышащих жителей различных стран Европы и европейского населения США и Канады. В результате такой высокой частоты носительства данной мутации вероятность браков между гетерозиготными нормально слышащими носителями достаточно велика. Показано, что почти 80% детей с врожденной патологией слуха имеют слышащих родителей. Кроме делеции 35delG, в различных европейских популяциях встречаются гораздо реже другие мутации GJB2: 167delT, 235delC, 313–314delAA, однако частота каждой из них не превышает 1–2% от всех выявляемых мутаций. В то же время, часть этих мутаций являются мажорными в неевропейских популяциях. Например, делеция 167delT является доминирующей среди евреев ашкенази, а мутация 235delC преобладает среди японских, китайских, монгольских и алтайских пациентов с несиндромальной СНТ.

Одной из проблем при диагностике генетически обусловленных нарушений слуха является тот факт, что 10–50% пациентов с СНТ — носители только одного мутантного аллеля в гене GJB2. В исследованиях, проведенных на выборках пациентов из различных этнических групп, было показано, что крупная делеция del (GJB6-D13S1830), приводящая к выпадению участка или всего гена GJB6, является причиной нарушения слуха у значительной части пациентов — гетерозигот по мутациям в GJB2 [9].

Распространение большинства мутаций локуса DFNB1, вызывающих нарушение слуха, имеет неоднородный популяционный характер. В связи с этим существует необходимость изучения молекулярно-генетических основ наследственного заболевания в конкретной

© ШУБИНА-ОЛЕЙНИК О. А., СИНЯВСКАЯ М. Г., ЛЕВАЯ-СМОЛЯК А. М., МЕРКУЛОВА Е. П., ДАНИЛЕНКО Н. Г.

популяции и/или этнической группе. Такой подход способствует разработке оптимального для данного региона алгоритма диагностики генетических факторов, вызвавших раннюю потерю слуха. Значительная часть исследованных в связи с несиндромальной СНТ белок-кодирующих генов экспрессируется в клетках внутреннего уха, а выявленные в этих генах мутации приводят к периферической тугоухости. Поэтому для нарушений слуха, подтвержденных на молекулярном уровне, показана кохлеарная имплантация. Подобная манипуляция при своевременном проведении в раннем детстве позволяет ребенку приобрести речевые навыки и полноценно общаться с окружающими. Поэтому разработка эффективных методов молекулярной диагностики была и остается актуальной как в медицинском, так и в социальном отношении.

Целью нашего исследования являлось определение спектра мутации локуса DFNB1 у белорусских пациентов с диагнозом «несиндромальная СНТ» для разработки алгоритма молекулярно-генетической диагностики причин врожденной или ранней (долингвальной) потери слуха у жителей Беларуси.

Материалы и методы

Пациенты

Ядерные мутации, приводящие к тугоухости, определялись у 391-го ребенка с сенсоневральной СНТ II, III и IV степени по ВОЗ, подтвержденной методом тональной пороговой аудиометрии. Все дети — учащиеся специальных школ для детей с ослабленным слухом, жители трех регионов Беларуси: Запад (Гродно, Пинск), Восток (Бобруйск), Центр (Минск).

Поиск мутации в гене GJB2

Определение мутаций 35delG (GJB2), IVS1+1G>A (GJB2) проводили методом ПЦР-ПДРФ анализа [10]; определение крупной делеции 309 т.п.н. del (GJB6-D13S1830) в локусе DFNB1 осуществлялось методом мультиплексной ПЦР [10]. Результаты амплификаций оценивались в 2% агарозном геле, результаты ПДРФ анализа — в 7% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием гелей раствором бромистого этидия и регистрацией с помощью документирующей системы GelDoc (Bio-Rad, США) в УФ-излучения (длина волны 312 нм).

Для выявления изменений нуклеотидной последовательности гена GJB2 проводили SSCP-анализ (метод оценки конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК): проводили ПЦР со специальными праймерами для получения фрагмента гена GJB2 размером 554 п.н., который исследовали на изменение подвижности в 20% полиакри-ламидном геле (ПААГ) в ходе SSCP анализа [11].

Для определения последовательности нуклеотидов в образцах ДНК с отличиями по SSCP осуществляли секвенирование по Сенгеру с применением набора реактивов ABI Dye Terminator, version 1 (Applied Biosystems) с последующим анализом на приборе 3500 ABI (Applied Biosystems, США). Полученные хроматограммы анализировали с помощью программы Chromas version 2 (Technelysium).

Результаты и обсуждение

Мутация 35delG гена GJB2

Первым этапом исследования являлся прицельный поиск у 391 пациента с СНТ наиболее частой для европейцев мутации — делеции 35delG в гене GJB2. В результате данная мутация выявлена в гомозиготном состоянии у 178 пациентов (46%), в гетерозиготном у 52 пациентов (13%). У 162-го пациента (41%) данная мутация не выявлена. Общая частота мутантного аллеля 35delG в исследованной группе пациентов составила 51,7%. Таким образом, у исследованных пациентов с СНТ мутация 35delG гена GJB2 является мажорной, т.е. представляет собой основную генетическую причину несиндромальной сенсоневральной тугоухости. Результат, полученный для пациентов, жителей Беларуси, согласуется с аналогичными данными, полученными для выборок пациентов как из европейских стран, так и для пациентов из США, Канады и Австралии европейского происхождения [12–14]. Во всех случаях основной причиной несиндромальной потери слуха является мутация 35delG гена GJB2.

Не смотря на то, что у значительной части больных с СНТ удалось установить причину потери слуха, для пациентов, у которых мажорной мутации выявлено не было (162 человека), а также для ее гетерозиготных носителей (51 человек), вопрос о причинах тугоухости все еще оставался невыясненным. Для данной группы пациентов был проведен SSCP анализ 2-го кодирующего экзона гена GJB2, с последующим секвенированием образцов с отличиями по

SSCP; поиск мутации IVS1+1G>A (1-й экзон гена GJB2) и протяжённой делеции del (GJB6-D13S1830) в локусе DFNB1.

Спектр мутаций гена GJB2

Секвенирование позволило установить спектр мутаций 2-го экзона гена GJB2 у пациентов с СНТ, жителей Беларуси. Среди 32 пациентов с генотипом 35delG/N вторая мутация выявлена для 28 человек; две мутации в гене GJB2 определены для четырех пациентов с СНТ с генотипом N/N. Всего определено 7 различных мутаций гена GJB2 (312del14 (7%), 235delC (1,3%), 167delT (1,5%), I82M (0,5%), V27I (0,5%), V37I (0,25%) и E114G (0,25%)). Мутация IVS1+1G>A выявлена у семи исследованных пациентов (1,8%). Частота делеции del (GJB6-D13S1830) в исследованной выборке белорусских пациентов составила 0,76% (3 пациента). Полученные результаты представлены в табл.

Второй по частоте патогенной мутации гена GJB2 в исследованной выборке белорусских пациентов с СНТ является делеция 312del14: она выявлена у 27 пациентов с СНТ различной степени тяжести. У двадцати пациентов данная делеция присутствовала в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией 35delG (35delG/312del14). Гомозиготный вариант мутации 312del14 выявлен у двух пациентов с тяжелой потерей слуха (IV степень). У 5 белорусских пациентов с СНТ делеция 312del14 была единственным выявленным мутантным аллелем гена GJB2 (N/312del14). Данная делеция 14 пар оснований в позиции 312–325 была ранее выявлена у жителей стран Восточной Европы, в том числе среди пациентов с СНТ, жителей России и Польши [15, 16].

Третьей по частоте в выявленном спектре мутаций гена GJB2 является однонуклеотидная замена IVS1 +1 G>A (1,8%). Данная замена часто обнаруживается у пациентов из стран Восточной Европы — носителей одного мутантного аллеля в гене GJB2 [15]. Кроме того, мутация IVS1+1G>A является основной причиной несиндромальной потери слуха у жителей Монголии и Якутии [17, 18]. Среди пациентов с СНТ, жителей Беларуси, выявлено семь пациентов с мутацией IVS1+1G>A.

У шести пациентов мутация IVS1+1G>A находилась в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией 35delG (IVS1+1G>N/35delG). Один из семи пациентов являлся носителем гетерозиготного варианта мутации 312del14 в гене GJB2. Степень потери слуха у носителей мутации IVS1+1G>A варьировала: от средней степени тяжести до полной потери слуха.

Таблица

Частоты мутаций локуса DFNB1 в выборке пациентов, жителей Беларуси с несиндромальной СНТ

Генотип	Количество пациентов с мутациями (% от общего числа пациентов)
	Общее число пациентов: 391
35delG/35delG	178/45,5%
35delG/312del14	20/5,1%
IVS1+1G>A/35delG	6/1,53%
35delG/del (GJB6-D13S1830)	3/0,77%
312del14/312del14	2/0,51%
35delG/235delC	3/0,77%
167delT/235delC	2/0,51%
35delG/I82M	2/0,51%
35delG/167delT	2/0,51%
IVS1 +1 G> A/312del14	1/0,26%
35delG/V27I+E114G	1/0,26%
N/35del G	14/3,6%
N / 312del14	4/1, 02%
N /167delT	2/0,51%
N/V27I	1/0,26%
N/V37I	1/0,26%
Всего носителей GJB2 мутаций:	242/62%

У белорусских пациентов также были выявлены мутации 235delC и 167delT, характерные для населения Алтая, Средней Азии и евреев ашкенази, соответственно. Доля остальных четырех нуклеотидных замен, выявленных в исследованной группе, не превышает 0,5 %.

Спектр мутаций локуса DFNB1 в выборке пациентов с СНТ, проживающих на территории Беларуси, в целом сходен с таковым в соседних странах (Россия, Польша), однако характеризуется рядом особенностей, которые отражены в представленной работе.

Выводы

Проведенное нами комплексное исследование позволило выявить молекулярно-генетические дефекты в локусе DFNB1 и объяснить причину СНТ у 241 пациента из 391, что составило более 60 % всей выборки. У остальных 150 человек причина потери слуха либо не связана с генетическими аномалиями, либо они могут быть носителями редких мутаций в других локусах, исследование которых требует современных высокопроизводительных методов экзомного секвенирования, пока недоступного для повседневной практики. На основе полученных в работе результатов рекомендуется при проведении молекулярно-генетической диагностики причин несиндромальной потери слуха у жителей Беларуси начинать поиск с мутации 35delG (GJB2), затем определять у всех, кроме гомозигот по 35delG, две частые для пациентов с СНТ, жителей Беларуси, мутации в гене GJB2: делеции 312del14 и транзиции IVS1+1G>A. Если вышеперечисленные мутации у пациента отсутствуют или определены в гетерозиготном состоянии, рекомендуется проведение секвенирования 2-го экзона гена GJB2 и детекция делеции 309 т.п.н. del (GJB6-D13S1830) в локусе DFNB1.

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ-БРФФИ «Сравнительный анализ вклада мутаций гена GJB2 в возникновение нейросенсорной тугоухости у жителей Беларуси и ряда регионов Сибири (Россия)» 2014–2016, договор № Б14Р-081.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smith R. J.H., Shearer A.E, Michael S. H., Van Camp G. Deafness and hereditary hearing loss overview [Electronic resource].— GeneReviews. Seattle (WA), 1993–2014.— Mode of access: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301607.— Date of access: 26.02.2015.
2. Van Camp G. Willems P., Smith R. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity // Am. J. Hum. Genet.— 1997.— 60, N 4.— P. 758.
3. Morton N. E. Genetic epidemiology of hearing impairment // Ann. N.Y. Acad Sci.— 1991.— 630, N 1.— P. 16–31.
4. Maw M.A., Allen-Powell D.R., Goodey R.J., Stewart I.A., Nancarrow D.J., Hayward N.K., Gardner R.J. The contribution of the DFNB1 locus to neurosensory deafness in a Caucasian population // Am. J. Hum. Genet.— 1995.— 57, N 3.— P. 629–635.
5. Maeda S., Nakagawa S., Suga M., Yamashita E., Oshima A., Fujiyoshi Y., Tsukihara T. Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution // Nature.— 2009.— 458, N 7238.— P. 597–602.
6. Dermietzel R., Hwang K., Spray S. The gap junction family: structure, function and chemistry // Anat. Embryol. (Berl).— 1990.— 182, N 6.— P. 517–528.
7. Hilgert N., Smith R., Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? // Mutat Res.— 2009.—681, N 2.— P. 189–196.
8. Salvinelli F., Casale M., D'Ascanio L., Firrisi L., Greco F., Baldi A. Hearing loss associated with 35delG mutation in Connexin-26 (GJB2) gene: audiogram analysis // J. Laryngol. Otol.— 2004.— 118, N 01.— P. 8–11.
9. Del Castillo I., Moreno-Pelayo M.A., Del Castillo F.J., Brownstein Z., Marlin S., Adina Q., Cockburn D.J., Pandya A., Siemering K.R., Chamberlin G.P., Ballana E., Wuyts W., Maciel-Guerra A.T., Alvarez A., Villamar M., Shohat M., Abeliovich D., Dahl H.H., Estivill X., Gasparini P., Hutchin T., Nance W.E., Sartorato E.L., Smith R.J., Van Camp G., Avraham K.B., Petit C., Moreno F. Prevalence and Evolutionary Origins of the del (GJB6-D13S1830) Mutation in the DFNB1 Locus in Hearing-Impaired Subjects: a Multicenter Study // Am. J. Hum. Genet.— 2003.— 73, N 6.— P. 1452–1458.
10. Tóth T., Kupka S., Esmer H., Zeissler U., Sziklai I., Zenner H.P., Blin N., Pfister M. GJB2 mutations in patients with non syndromic hearing loss from Northeastern Hungary // Hum. Mutat.— 2004.— 23, N 6.— P. 631–632.
11. Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Sekya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1989.— 86, N 8.— P. 2766–2770.

12. Wu B. L., Lindeman N., Lip V., Adams A., Amato R. S., Cox G., Irons M., Kenna M., Korf B., Raisen J., Platt O. Effectiveness of sequencing connexin 26 (GJB2) in cases of familial or sporadic childhood deafness referred for molecular diagnostic testing // Genet. Med.— 2002.— 4, N 4.— P. 279–288.
13. Huculak C., Bruyere H., Nelson T. N., Kozak F. K., Langlois S. V37I connexin 26 allele in patients with sensorineural hearing loss: evidence of its pathogenicity // Am. J. Medical. Genet.— 2006.—140, N 22.— P. 2394–2400.
14. Dahl H. H., Tobin S. E., Poulakis Z., Rickards F. W., Xu X., Gillam L., Williams J., Saunders K., Cone-Wesson B., Wake M. The contribution of GJB2 mutations to slight or mild hearing loss in Australian elementary school children // J. Med. Genet.— 2006.— 43, N 11.— P. 850–855.
15. Близнец Е. А., Галкина В. А., Матющенко Г. Н., Кисина А. Г., Маркова Т. Г., Поляков А. В. Изменения в гене коннексина 26-GJB2 — при нарушениях слуха у российских пациентов: результаты многолетней молекулярной диагностики наследственной несиндромальной тугоухости // Генетика.— 2012.— 48, № 1.— С. 110–121.
16. Wiszniewska J., Wiszniewski W., Bal J. The principles of molecular diagnosis of recessive forms of prelingual non-syndromic hearing loss // Med. Wieku. Rozwoj.— 2002.— 6, N 4.— P. 309–318.
17. Tekin M., Xia X. J., Erdenetungalag R., Cengiz F. B., White T. W., Radnaabazar J., Dangaasuren B., Tastan H., Nance W. E., Pandya A. GJB2 mutations in Mongolia: complex alleles, low frequency, and reduced fitness of the deaf // Ann. Hum. Genet.— 2010.— 74, N 2.— P. 155–164.
18. Barashkov N. A., Dzhemileva L. U., Fedorova S. A., Teryutin F. M., Posukh O. L., Fedotova E. E., Lobov S. L., Khusnutdinova E. K. Autosomal recessive deafness 1A (DFNB1A) in Yakut population isolate in Eastern Siberia: extensive accumulation of the splice site mutation IVS1+1G>A in GJB2 gene as a result of founder effect // J. Human. Genet.— 2011.— 56, N 9.— P. 631–639.

SHUBINA-OLEINIK O.[1], SINIAUSKAYA M.[1], LEVAYA-SMALIAK A.[2], MERKULAVA E.[3], DANILENKO N.[1]

[1] Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus,
Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27, e-mail: Oleinik.Olga@yahoo.co.uk

[2] Belarusian State Medical University,
Belarus, 220116, Minsk, Dzerzhinski ave., 83

[3] Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education,
Belarus, 220013, Minsk, Brovki str., 3, e-mail: info@belmapo.by

SPECTRUM OF DFNB1 LOCUS MUTATIONS AMONG BELARUS PATIENTS WITH NON-SYNDROMIC HEARING LOSS

Aims. The genetic nature of sensorineural hearing loss (SNHL) has so far been studied for many ethnic groups in various parts of the world. Among the different subtypes of autosomal recessive non-syndromic hearing impairment, DFNB1 locus is remarkable for its high frequency in most populations. Here we present the results of study of DFNB1 mutations among 391 young patients with non-syndromic SNHL in order to develop an algorithm of molecular genetic diagnosis of hearing loss for people in Belarus. ***Methods.*** The PCR-RFLP method was used for detection of three mutations: 35delG and IVS1+1G>A both in GJB2 gene as well as deletion del (GJB6-D13S1830) in DFNB1 locus. For analysis of the GJB2 coding exon SSCP followed by sequencing was carried out. ***Results.*** We have found that 35delG GJB2 mutation is the main cause of hearing defects in 391 Belarusian patients with SNHL. This point deletion has been detected in 53 % of the patients with SNHL. The 312del14 and IVS1+1G>A GJB2 were respectively the second and the third most frequent mutations in the Belarus patients cohort. Conclusions. Mutations in DFNB1 locus is the main reason of congenital non-syndromic hearing loss in Belarus: about 60 % of all SNHL cases connected to them. Based on the results obtained the recommendations for molecular genetic testing of the causes of non-syndromic hearing loss in Belarus were suggested.

Keywords: Non-syndromic hearing loss, DFNB1 locus, GJB2 gene, mutation frequencies.

UDC 575.224

LYLO V. V.[1], KARPOVA I. S.[1], KOTSARENKO K. V.[1], MACEWICZ L. L.[1], RUBAN T. A.[1], DZIUBA G. V.[2], LUKASH L. L.[1]

[1] Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: lukash@imbg.org.ua

[2] Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str., 64, e-mail: avdziuba@gmail.com

ISOLECTINS FROM *SAMBUCUS NIGRA* FLOWERS AND THEIR EFFECT ON *MGMT* AND P53 PROTEINS AMOUNT IN HUMAN CELLS *IN VITRO*

Lectins are carbohydrate binding proteins with wide spectrum of functions. Among the most significant known functions of lectins there are those involved in cell signaling, intercellular interactions, induction of cell cycle arrest and apoptosis, etc., and especially their participation in different defence mechanisms. Nowadays, lectins are in the focus of attention as natural compounds modulating drug sensitivity of tumor cells [1].

The main role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) in the restore of primary DNA damages caused by alkylating compounds is well established [2]. Another key player in the system of cell defence from xenobiotics is an oncosupressor p53 [3]. There are some papers demonstrating the interrelation between these two proteins [4]. For example, it was shown [5] that MGMT induction by ionizing radiation did not occur in p53-deficient mice; the *MGMT* level was also shown to be lower in ovarian tumors with a wild type p53 than in tumors with a mutant one. Authors supposed that p53 downregulated the basal *MGMT* expression. On the contrary, in [6] the stable transfection of a *MGMT*-negative human cell line having a wild type *TP53* with a vector encoding *MGMT* was shown to increase p53 expression.

In our previous works [7, 8] the influence of *S. nigra* flower lectins on mutagenesis in mammalian cells *in vitro* was demonstrated. And in our other works [9, 10] the *S.nigra* bark lectin was shown to modulate *MGMT* gene expression in concentration dependent manner in human cells *in vitro*. However influence of lectins on DNA repair system is still one of the poorest studied phenomenon.

The aim of this work was to characterise *S. nigra* flower isolectins in the aspect of their effect on *MGMT* and p53 protein amount in a cell culture in order to reveal putative protective and anticancer potentials of these biologically active substances.

Materials and methods

In the experiments the standard line of larynx carcinoma cells Hep-2 was used. Total cell amount was estimated by direct counting in a hemocytometer. Different preparations of *S. nigra* lectins were used: a commercial bark lectin SNA-I (Lectinotest, Lviv, Ukraine) and two isolectins (named P1 and P2) obtained from water extracts of dried flowers by a modified method of isoelectric focusing [11] with resulting precipitation with 50% ethanol. Hemagglutinating activity (HAA) was estimated by adding 2% suspension of native human erythrocytes to serial two fold dilutions of the lectins in microtiter plates [12]. The lowest concentration of the lectin where the HAA was still observed was estimated. The carbohydrate specificity of these isolectins was tested with 7 sugars by inhibition of HAA. The Hep-2 cell culture was treated with lectins in a concentration 20 μg/ml during 8h with 16h postincubation. Conditions of cell treatment and protein extract obtaining were described previously [13]. SDS electrophoresis of the proteins was performed in a 12% polyacrylamide gel by the Laemmli method [14]. The total protein concentration was determined by the Bradford method [15]. Changes of MGMT and p53 amounts in cells were detected by Western blot analysis. Monoclonal antibodies against human *MGMT* (clone 23.2, isotype IgG2b, Novus Biologicals, USA) and p53 (clone BP53-12, Sigma, USA) were used in Western blot analysis with β-actin and stained membrane dencitometry as loading controls [16]. In our previous works [13, 17] it was revealed that used monoclonal anti-MGMT antibodies detected not only a *MGMT* protein at ≈24 kDa but also a protein at ≈48 kDa which was named MARP (anti-Methyltransferase Antibody Recognizable Protein). Statistical analysis was performed using Origin 8.1.

© LYLO V. V., KARPOVA I. S., KOTSARENKO K. V., MACEWICZ L. L., RUBAN T. A., DZIUBA G. V., LUKASH L. L.

Table

Carbohydrate specificity of *S.nigra* flower isolectins P1, P2 and P3

Sugar	Minimal HAA concentration, mM		
	P1	P2	P3
Ramnose	25.000	—	100
Galactose	<0.006	0.781	0.7812
Galactosamin	<0.006	0.781	0.7812
Lactose	<0.006	0.781	1.5625

Results and discussion

Fractions obtained by isoelectrofocusing of *S. nigra* flower extracts were divided into three groups according to their pI: cathodic (pH 1-2), intermedial (pH≈5) and anodic (pH>9). All these groups showed hemagglutinating activity that is the evidence of lectin presence. The major lectin component P1 was concentrated in a zone of pH about 5, two minor components P2 and P3 migrated to a cathode and an anode respectively. The preparations were ranged according to the minimal HAA concentration: P2 (6.5 μg/ml) >P1 (31.2 μg/ml) >P3 (125 μg/ml). Some differences in carbohydrate specificity were observed as well (see tab.).

P1 demonstrated very high specificity to Gal, GalNac and Lac with inhibition concentration under 6μM while such specificity of P2 and P3 was about 100 times lower (781 μM).

We studied proliferation of mammalian Hep-2 cell after the treatment with *S. nigra* lectin preparations (fig. 1). P3 was not included into further experiments by technical reasons.

The cell proliferation activity was not significantly changed after pretreatment with these lectins (20 μg/ml), but the opposite tendency was observed in the case of different *S. nigra* flower isolectins. Lectin concentration 20 μg/ml was chosen in accordance with our previous studies [9] where the enhancing effect of 20 μg/ml of *S. nigra* lectin SNA-I on *MGMT* gene expression was shown.

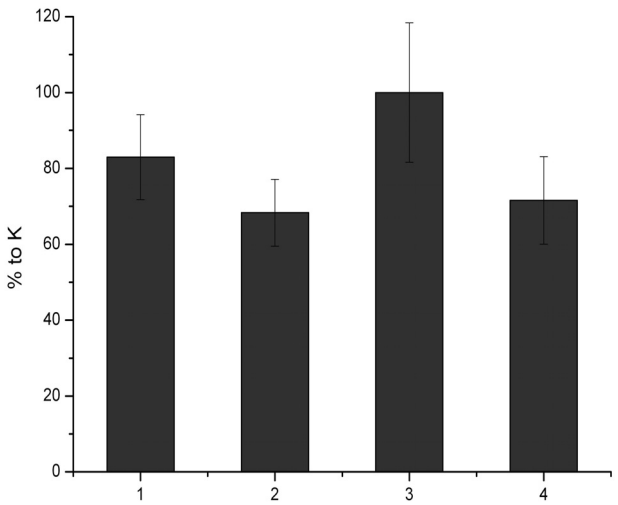


Fig. 1. Total cell number after pretreatment with *S.nigra* lectin preparations: 1 — intact control; 2 — P1; 3 — P2; 4 — SNA-I

Isolectins from *S. nigra* flowers demonstrated the same tendency of their influence on both the MGMT and MARP amount, but the severity of this effect depended on preparation used (fig. 2). At the same time, the p53 level was reduced under rhe P2 and SNA-I treatments.

Under the major isolectin P1 treatment the MGMT amount increased considerably exceeding the control level about 1/3 that is comparable with the effect of the commercial preparation SNA-I. It is interesting that the preparation P2 was even more effective in stimulation of MGMT expression (a half over the control level). In the case of MARP the similar tendency was shown but with much lover severity.

In the work [18] MGMT was shown to perform not only repair but also regulatory functions. As to MARP we assumed earlier [19] this protein to participate in the repair of cellular DNA damages caused by the action of complex alkyl groups. Different responce of MGMT and MARP on lectin effect may be the result of their involvement in different cellular signalling pathways.

At the same time *S.nigra* lectins demonstrated the opposite to MGMT and MARP tendency of their influence on the p53 level: isolectin P2 and SNA-I a little bit reduced the p53 amount. It is known that p53 and *MGMT* participate in cell defence particularly against O6-methylating drugs and radiation which are used in tumor therapy [20]. Lectins are known as regulators of many fundamental functions, but the mechanisms of their action on repair processes are still poorly understood. Obtained results give us the reason to suppose that exogenic *S.nigra* flower isolectins (which are highly specific to galactose) may use the own lectin-dependent regulatory pathways of a host organism, especially those which galectins

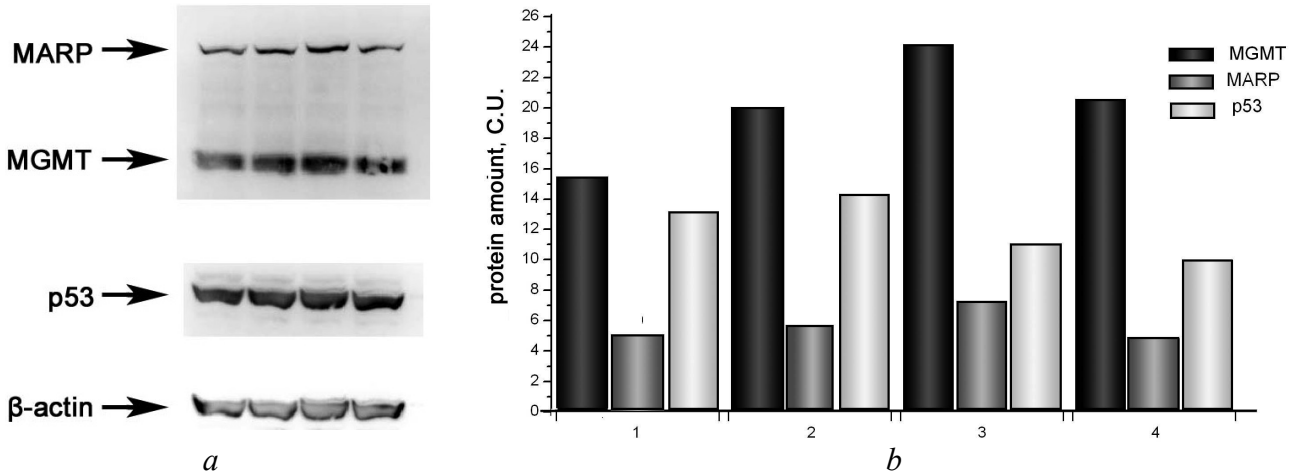


Fig. 2. Effect of *S. nigra* flower isolectins and bark lectin on the amount of MGMT, MARP and p53 protein in human cells *in vitro* (*a* – results of Western blot-analysis; *b* — results of densitometry of signal, corrected with the loading control): 1 — intact control; 2 — P1; 3 — P2; 4 — SNA-I

use [21]. Another suggestion based on data obtained is that *MGMT* was a primary lectin target, and p53 level changes were the consequence of the MGMT modulation.

It is assumed that the various lectins isolated from the same source may be elements of a same regulatory system [22] which may be sinergic, autonomic or antagonistic. That's why the studying of *S.nigra* flower isolectins having various physicochemical properties and carbohydrate specificity was the issue of our special interest. In fact, isolectins P1 and P2 with different pI and affinity to galactose demonstrated different effect on levels of all the proteins studied.

Conclusions

Variety of molecular forms of *S.nigra* flower lectins may explain the differences of their effects we observed. All lectins studied enhanced the amount of *MGMT* and, in a less extend, MARP proteins in human cell culture, but the minor P2 preparation being more efficient. Effect of lectins on p53 amount was opposite, and was observed only after cell treatment with P2 and SNA-I preparations.

It is supposed that *S. nigra* flower isolectins may use the own lectin-dependent regulatory pathways of mammalian cells. *MGMT* is likely to be the primary target of lectins, and the p53 level may be affected as a result of *MGMT* modulation.

LITERATURE

1. Ferriz-Martinez R.A., Torres-Artega I.C., Blanco-Labra A., Garcia-Gasca T. The role of plant lectins in cancer treatment / New Approaches in the Treatment of Cancer (ed. by C. Vazquez et al.).— NY.: Nova Sci, 2010.— P. 71–90.
2. Kaina B., Fritz G., Coquerelle T. Contribution of O6-alkylguanine and N-alkylpurines to the formation of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, and gene mutations: new insights gained from studies of genetically engineered mammalian cell lines // Environ. Mol. Mutagen.— 1993.— 22.— P. 283–292.
3. Ozaki T., Nakagawara A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers // Cancers (Basel).— 2011.— 3, N 1.— P. 994–1013.
4. Grombacher T., Eichhorn U., Kaina B. p53 is involved in regulation of the DNA repair gene O^6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) by DNA damaging agents // Oncogene.— 1998.— 17, N 7.— P. 845–851.
5. Hengstler J.G., Tanner B., Möller L., Meinert R., Kaina B. Activity of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in relation to p53 status and therapeutic response in ovarian cancer // Int. J. Cancer.— 1999.— 84.— P. 388–395.
6. Patyka M., Abdulkarim B., Xu Y., Sabri S. Cross-talk between the O (6) -Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and p53 in glioblastoma multiforme. // Molecular Cancer Therapeutics.— 2013.— 12, Suppl. 11.— C2–C2.
7. Lukash L.L., Karpova I.S., Miroshnichenko O.S., Tikhonova T.N., Lylo V.V., Man'ko V.G., Sukhorada E.M., Golynskaia E.L. The effect of the lectin from Sambucus nigra inflorescences on spontaneous and alkylating agent-induced mutagenesis in mammalian somatic cells // Cytol. Genet.— 1997.— 31, N 5.— P. 52–60.
8. Karpova I.S., Lylo V.V., Macewicz L.L., Kotsarenko K.V., Palchykovska L.G., Ruban T.O., Lukash L.L. Lectins of Sambucus Nigra as Biologically Active and DNA-protective Substances // Acta Hort. (ISHS).— 2015.— N 1061.— P. 93–102.

9. Macewicz L. L., Lylo V. V., Karpova I. S., Kotsarenko K. V., Ruban T. A., Lukash L. L. Plant and animal lectines as modulators of MGMT and MARP gene expression in vitro // Factors in experimental evolution of organisms.— 2014.— 15.— P. 260–264.
10. Lylo V. V., Karpova I. S., Kotsarenko K. V., Macewicz L. L., Ruban T. O. Lukash L. L. Lectins of *Sambucus nigra* in Regulation of Cellular DNA-protective Mechanisms. // Acta Hort. (ISHS).— 2015.— N 1061.— P. 103–108.
11. Sova O. Autofocusing — a method for isoelectric focusing without carrier ampholytes // J. Chromatography.— 1985.— 320.— P. 15–22.
12. Lutsyk M. D., Panasyuk E. N., Antonyuk V. A. Methods of lectine carbohydrate specificity investigation (the manual).— Lvov, 1983.— 22 p.
13. Lylo V. V. Matsevich L. L. Kotsarenko E. V. Babenko L. A., Kornelyuk A. I., Sukhorada E. M., Lukash L. L. Activation of gene expression of the O 6-methylguanine-DNA-transferase repair enzyme upon the influence of EMAP II cytokine in human cells *in vitro* // Cytol. Genet.— 2011.— 45, N 6.— P. 373–378.
14. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.— 1970.— N 227.— P. 680–685.
15. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // Anal. Biochem.— 1976.— 72.— P. 248–254.
16. Aldridge G. M., Podrebarac D. M., Greenough W. T., Weiler I. J. The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single protein controls in semi-quantitative immunoblotting // Journal of Neuroscience Methods.— 2008.— 172, N 2.— P. 250–254.
17. Kotsarenko K. V., Lylo V. V., Macewicz L. L., Babenko L. A., Kornelyuk A. I., Ruban T. A., Lukash L. L. Change in the MGMT Gene Expression under the Influence of Exogenous Cytokines in Human Cells *in vitro* // Cytol. Genet.— 2013.— 47, N 4.— P. 202–209.
18. Chahal M., Xu Y., Lesniak D., Graham K., Famulski K., Christensen J. G., Aghi M., Jacques A., Murray D., Sabri S., Abdulkarim B. MGMT modulates glioblastoma angiogenesis and response to the tyrosine kinase inhibitor sunitinib // Neuro Oncol.— 2010.— 12, N 8.— P. 822–833.
19. Kotsarenko K. V., Lylo V. V., Ruban T. P., Macewicz L. L., Kornelyuk A. I., Chernykh S. I., Lukash L. L. Influence of EMAP II, IFN-α2b and its medicinal preparations on the MGMT protein amount in human cells *in vitro* // Biopolym Cell.— 2014–30, N 6.— P. 448–453.
20. Bocangel D., Sengupta S., Mitra S., Bhakat K. K. p53-Mediated down-regulation of the human DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) via interaction with Sp1 transcription factor // Anticancer Res.— 2009.— 29, N 10.— P. 3741–3750.
21. Rapoport E. M., Kurmyshkina O. V., Bovin N. V. Mammalian galectines: structure, carbohydrate specifity and functions // Biokhimija.— 2008.— 73 (4).— P. 483–497.
22. Lakhtin V. M., Afanasiev S. S., Aleshkin V. A., Nesvizhskij U. V., Lakhtin M. V., Shubin V. V., Cherepanova Yu. V., Pospelova V. V. Classification of the lectins as universal regulatory molecules in biological systems // Proc. Russ. Acad. Med. Sci.— 2009.— N 3.— P. 36–42.

LYLO V.V.[1], KARPOVA I.S.[1], KOTSARENKO K.V.[1], MACEWICZ L.L.[1], RUBAN T.A.[1], DZIUBA G.V.[2], LUKASH L.L.[1]

[1] Institute of Molecular Biology and Genetics NASU,
Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 150, e-mali: lukash@imbg.org.ua

[2] Taras Shevchenko National University of Kyiv,
Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str., 64, e-mail: avdziuba@gmail.com

ISOLECTINS FROM *SAMBUCUS NIGRA* FLOWERS AND THEIR EFFECT ON MGMT AND P53 PROTEINS AMOUNT IN HUMAN CELLS *IN VITRO*

Aim. To characterise *S.nigra* flower isolectins in the aspect of their effect on MGMT and p53 proteins amount. ***Methods.*** Lectin preparations P1, P2 and P3 with defferent pI were obtained by isoelectric focusing. The Hep-2 cells were treated with *S. nigra* lectins: P1, P2, and a commercial SNA-I. Changes of protein amounts were detected by Western blot analysis. ***Results.*** Isolectins were characterized accoding to their carbohydrate specificity. They increased MGMT amount with different severity. p53 level under the P2 and SNA-I treatments reduced. These lectins were shown to effect the amount of MARP protein as well. ***Conclusions.*** All lectins studied enhanced the amount of MGMT and MARP proteins. Effect of lectins on p53 amount was the opposite. MGMT is supposed to be the primary target of lectin action which uses own lectin-dependent regulatory pathways of mammalian cells, and p53 level may be affected as a result of MGMT modulation.

Keywords: *Sambucus nigra* lectins, protein level, MGMT, MARP, p53, human cell culture.

УДК 61-057.4(082)«19/20»

ПІСКУН Р.П., ХЛЄСТОВА С.С., ГРИНЧАК Н.М.
Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова,
Україна, 21000, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, e-mail: piskyn2006@mail.ru

ПРО НАУКОВУ ДІЯЛЬНІСТЬ У ГАЛУЗІ БІОЛОГІЇ ТА МЕДИЦИНИ ВИДАТНИХ ВЧЕНИХ XIX–XX СТ. — ВИХІДЦІВ З УКРАЇНИ

Історію біології та медицини, як і історію суспільства, творить народ. Проте є люди, яким належить особлива роль у розвитку медичної та біологічної наук, люди, які не тільки вміли глибоко вникати в суть явищ, узагальнювати нагромаджені людством знання, а й зуміли своїм палаючим серцем освітити найтемніші та найнебезпечніші стежини на тернистому шляху науки. Історія вітчизняної науки знає багато славних вчених, якими по праву пишається український народ. Імена видатних вчених, яких ми хочемо представити, подарували українському народу великі знання та досвід, наукові пошуки нового та корисного, безмежну любов до своєї землі та людини, самовіддане служіння своїй Вітчизні.

Тому мета нашого дослідження — пригадати видатні імена та дати наукової діяльності вчених України XIX–XX століть, які народились і здобули освіту в Україні, які збагатили своїми науковими досягненнями біологічну та медичну науки України та віддали своє тіло українській землі.

Результати та обговорення

До таких видатних вчених належить біолог та патолог Мечников Ілля Ілліч. Народився 15 травня 1845 року в селі Іванівці (нині село Панасівка Харківської обл.). Закінчивши із золотою медаллю гімназію, вступає на природничий відділ Харківського університету. У 1864 році, складаючи іспити достроково, закінчує університет за два роки та у 19-річному віці за свій кошт їде за кордон. Повернувшись, захищає в 1867 році дисертацію та здобуває ступінь доктора зоології. З 1870 по 1882 рік, ставши професором, завідував кафедрою зоології та порівняльної анатомії Новоросійського університету. З 1886 по 1887 рік завідував організованою ним Одеською бактеріологічною станцією. Основні наукові роботи присвячені еволюційній ембріології, мікробіології, імунології та геронтології. Перші дослідження присвячені порівняльній ембріології. Показав спільність у ембріональному розвитку хребетних та безхребетних тварин і довів їх філогенетичну спорідненість. Детально вивчив питання про ранні етапи розвитку багатоклітинних організмів. У 1871 році став засновником теорії зародкових листків, а у 1886 році створив теорію походження багатоклітинних організмів. Один з основоположників еволюційної порівняльної ембріології (1865–1876 рр.). Ці дослідження стали величезним науковим внеском у еволюційне вчення. У 1882 році Мечников Ілля Ілліч відкрив явище фагоцитозу, а у 1883 році на основі цього явища створив фагоцитарну теорію імунітету та у 1892 році теорію порівняльної патології запалення. Є одним з основоположників вітчизняної мікробіології. При проведенні дослідів на собі та своїх співробітниках довів, що саме холерний вібріон є збудником азіатської холери. Вчений проводив класичні дослідження з вивчення експериментального сифілісу, черевного тифу та туберкульозу. Провів новаторські работи щодо з'ясування ролі мікробних асоціацій та антагонізму мікробів в інфекційному процесі. Створив вчення про цитотоксини [2]. У 1908 році вченому було присвоєно Нобелівську премію з фізіології та медицини. В останні роки свого життя Мечников приділяв велику увагу вивченню проблеми довголіття. Проблему старості, довголіття, смерті Мечников підніс на рівень загальнофілософських питань, підходив до них не тільки як природознавець, а й як великий гуманіст. Вчений виховав цілу плеяду вітчизняних учених, серед них Д.К. Заболотного, Л.О. Тарасевича, І.Г. Савченка, Г.Н. Габричевського, П.В. Циклінську (першу російську жінку — професора-мікробіолога) та ін. Не можна назвати жодного відомого російського вченого в галузі мікробіології і епідеміології кінця XIX — початку XX ст., який

© ПІСКУН Р.П., ХЛЄСТОВА С.С., ГРИНЧАК Н.М.

би не вчився у Мечникова. «Моя лабораторія відкрита для всіх учених, які бажають працювати, які здатні працювати, тут вони в себе»,— писав Мечников. І. І. Мечников належить до тих великих людей науки, які не лише відкривають нові факти, а й дають у науці нові ідеї, що й після їхньої смерті впливають на напрям наукових досліджень. Лише після Великої Жовтневої соціалістичної революції на батьківщині належно було відзначено пам'ять її великого сина. Ім'я Мечникова присвоєно університетам, науково-дослідним інститутам, лікарням. Він гаряче любив свою батьківщину, тяжко переживав її лихоліття. Помер видатний біолог 16 травня 1916 року [4].

Видатний патологоанатом, бактеріолог та епідеміолог Високович Володимир Костянтинович народився 28 січня 1854 року в місті Гайсині Вінницької області. У 1895 році закінчив Харківський університет. З 1895 року — професор кафедри патологічної анатомії Київського університету. З 1900 року почав працювати у Київському бактеріологічному інституті. Основні наукові праці присвячені етіології та патогенезу низки інфекційних хвороб. Один із засновників вчення про ретикулоендотеліальну систему. У 1882 році вперше показав, що фібробласти і блукаючі клітини сполучної тканини походять із гістіоцитів. У 1886 році виявив здатність ендотеліальних клітин судин та блукаючих клітин сполучної тканини захоплювати введені в кров бактерії. У 1889 році науково обгрунтував придатність вбитих бактерій для вакцинації проти сибірської виразки та у 1896 році — проти чуми. У 1896 році першим встановив аглютиногенні властивості сироватки крові хворих, які видужували після чуми. Запропонував ряд заходів щодо попередження холери [1]. Організатор експедицій з боротьби з епідеміями холери та чуми в Україні. Голова Київського товариства лікарів. Помер Високович В. К. 26 травня 1912 року.

Залишив після себе добрі спогади вчений-хірург Волкович Микола Маркіянович, який народився 8 грудня 1858 року в Черкаській області. У 1882 році закінчив Київський університет. З 1882 по 1922 рік працював на кафедрі госпітальної хірургії цього ж університету, а у 1902 році здобув звання професора. Одночасно з 1893 по 1903 рік завідував хірургічним відділенням Олександрівської лікарні в місті Києві. З 1922 року завідував науково-дослідницькою кафедрою хірургії Київського відділення Народного комісаріату освіти України. У 1928 році — академік Академії наук України. Основні наукові праці присвячені вивченню зобу, риносклероми, апендициту, жовчнокам'яної хвороби, пошкодженням кісток і суглобів. Одним із перших в Україні здійснив складні операції черевної порожнини. У 1911 році описав симптоми хронічного апендициту, які згодом були названі його ж іменем (м'язовий симптом Волковича). Розробив методи лікування переломів кісток, застосував шину, яка також була названа його славетним ім'ям (шина Волковича). Запропонував низку нових методів пластичних операцій, створив вітчизняну школу хірургів. У 1908 році став засновником Київського наукового хірургічного товариства і його безсмертним головою. Помер видатний хірург 11 липня 1928 року [5].

Великий внесок у розвиток мікробіології, епідеміології, імунології та теорії інфекції зумів зробити Гамалія Микола Федорович, який народився 5 лютого 1859 року в місті Одесі. У 1880 році закінчив Новоросійський університет в Одесі та у 1883 році Військово-медичну академію в Петербурзі. У 1886 році разом з І. І. Мечниковим організував в Одесі першу бактеріологічну станцію та вперше в країні здійснив тут вакцинацію людей проти сказу. У 1901–1902 роках керував протиепідемічними заходами під час епідемії чуми в Одесі. З 1899 по 1908 рік — директор створеного за його ініціативи Бактеріологічного інституту в Одесі. Основні наукові роботи присвячені етіології та профілактиці ряду захворювань, а саме сказу та холері, розробці питань загальної патології, імунології, бактеріофагії. У 1886 році вчений удосконалив пастеровський метод запобіжних антирабічних щеплень, висунув припущення про існування прихованих форм інфекції та виявив, що чуму великої рогатої худоби викликає вірус, що фільтрується. У 1898 році відкрив речовини, які руйнують бактерії (бактеріолізини). У 1908 році довів, що воші є переносниками висипного тифу, та обґрунтував способи приготування вакцини проти висипного тифу. Вперше виявив роль корабельних щурів у розповсюдженні чуми. Розробив та впровадив вакцину проти холери та віспи. Розробив низку санітарно-профілактичних заходів боротьби проти чуми, холери, висипного та поворотного тифів, грипу тощо. В 1910 році він перший виявив значення дезінсекції (знищення комах) для ліквідації висипного та поворотного тифів. З 1939 року був

представником, потім поважним представником Всесоюзної спілки мікробіологів, епідеміологів і інфекціоністів. У своїх працях він виступав як послідовник-матеріаліст, прихильник еволюційної теорії. Він виховав багато кадрів українських мікробіологів. За наукові досягнення у 1943 році йому було присуджено Державну премію. Гамалія М. Ф. є автором понад 300 робіт. В останні роки життя вчений розглядав питання загальної імунології, вірусології, вивчав віспу, грип, інтенсивно розглядав проблему специфічного лікування туберкульозу. В 1942 році ним було запропоновано метод профілактики грипу шляхом обробки слизової оболонки носа препаратами олеїнової кислоти. Помер Микола Федорович Гамалія 29 березня 1949 року [2].

Видатний вчений-мікробіолог, патоморфолог та антрополог академік Академії наук України Омельченко Федір Захарович народився 21 листопада 1865 року на Сумщині. У 1890 році закінчив Київський університет та залишався там працювати до 1893 року. З 1918 по 1924 рік працював лікарем-мікробіологом у Київському гарнізонному госпіталі. З 1920 по 1924 рік працював директором Мікробіологічного інституту Академії наук України, який він організував, та одночасно з 1922 по 1924 рік перебував на посаді професора та ректора Київського ветеринарно-зоотехнічного інституту. Основні наукові роботи присвячені медичній мікробіології, патологічній анатомії та антропології. З 1890 по 1891 рік досліджував вплив рослинних ефірних олій на збудників черевного тифу, туберкульозу та сибірської виразки, а також вивчав мінливість мікроорганізмів та морфологію спірохет. Розробив спосіб лікування спірильозу сільськогосподарських тварин. Досліджував антропологічний тип слов'ян; запропонував нову систему антропологічних вимірювань. З 1920 по 1924 рік брав участь у складанні російсько-українського медичного словника. Залишив цей світ видатний вчений-мікробіолог, патоморфолог та антрополог 4 січня 1924 року [5].

Видатний анатом Воробйов Володимир Петрович народився 27 липня 1876 року в місті Одесі. У 1903 році закінчив Харківський університет. З 1910 року очолював кафедру анатомії Харківського жіночого медичного інституту, а з 1917 по 1921 рік — кафедру анатомії Харківського університету. З 1921 по 1937 рік завідував кафедрою анатомії Харківського медичного інституту й одночасно керував українським інститутом експериментальної медицини. Основні наукові праці присвячені розвитку вивчення про цілісність організму, вивченню впливу діяльності органів на їх морфогенез, розробив макро- та мікроскопічний методи дослідження тканин тіла людини, який дозволяє об'єднати анатомічні та гістологічні методи. Засновник стереоморфології. Склав карту вегетативних нервових вузлів та сплетінь внутрішніх органів. Розробив метод вшитих електродів для вивчення периферійної нервової системи в умовах хронічного дослідження. Склав оригінальний атлас «Анатомії людини» в 5-ти томах (1938–1942 рр.). Організував у Харкові єдиний у світі Музей становлення людини. Є одним із засновників функціональної анатомії. У 1934 році — академік Академії наук України. Помер видатний анатом 31 жовтня 1937 року [1].

Видатний патофізіолог Богомолець Олександр Олександрович народився в місті Києві 24 травня 1881 року. У 1906 році закінчив Новоросійський університет в Одесі. Працював там на кафедрі патологічної фізіології. В 1911 році стажувався в Сорбоні (Франція). У 1929 році йому було присвоєно звання академіка Академії наук України. У 1930 році його призначили президентом Академії наук України, де він пробув до 1946 року. У 1934 році став організатором та директором інституту клінічної фізіології Академії наук України. Основні наукові праці присвячені питанням патофізіології, ендокринології, вегетативної нервової системи, онкології, вченню про конституційні типи людей, проблемам довголіття [1]. Стверджував, що виникнення, лікування та летальність захворювання залежать не тільки від причини, яка викликала це захворювання, але й здатності організму до супротиву — його реактивності, пов'язаної зі станом нервової системи та сполучної тканини. Створив вчення про фізіологічну систему сполучної тканини, запропонував для посилення її функції при низці захворювань антиретикулярну, цитотоксичну сироватку (АЦС), яка широко використовувалася в період Великої Вітчизняної війни для прискорення зрощення переломів та загоєння ран. Ініціатор і керівник робіт із консервування крові. Один із основних організаторів науки в Україні. Здійснив реорганізацію структури Академії наук України. Замість кафедр і комісій створив мережу науково-дослідницьких інститутів. Заклав

основи геронтології, створив вітчизняну школу патофізіологів. Є автором посібника «Патологічна фізіологія», який виданий в 5-ти томах (1935–1937 рр.). Його ім'я присвоєно інституту фізіології Академії наук України, а також його ім'я носить Київський національний медичний університет. Помер видатний патофізіолог 19 липня 1946 року [2, 3].

Видатний фізіолог Нагорний Олександр Васильович народився 1 вересня 1887 року в місті Харкові. У 1912 році закінчив Харківський університет. Після закінчення університету залишився там працювати на кафедрі фізіології людини та тварин, а з 1924 року — завідувачем кафедри та директором Інституту біології Харківського університету. Основні його наукові праці присвячені віковій фізіології та біохімії. Вчений детально досліджував процеси дегідратації тканин. Обґрунтував концепцію про поступове структурування протоплазми в процесі старіння. У 1954 році довів, що нервова система зберігає функціональну повноцінність значно довше, ніж багато інших системи організму [4]. Член Українського товариства фізіологів, біохіміків та фармакологів. З 1946 року голова Харківського відділення Українського фізіологічного товариства. Помер видатний фізіолог Нагорний О. В. 11 травня 1953 року [2].

Видатний епідеміолог Громашевський Лев Васильович народився 13 жовтня 1887 року у місті Миколаєві. У 1912 році закінчив Новоросійський університет в Одесі. З 1918 по 1927 рік завідував кафедрою епідеміології та одночасно був ректором Одеського медичного інституту. З 1928 по 1931 рік перебував на посаді директора Дніпропетровського санітарно-бактеріологічного інституту. З 1931 по 1933 рік — директор Центрального інституту епідеміології та мікробіології, а з 1931 по 1948 рік завідував кафедрою епідеміології Центрального інституту вдосконалення лікарів. Одночасно з 1941 по 1945 рік працював головним епідеміологом України. З 1951 по 1963 рік завідував кафедрою епідеміології Київського медичного інституту. З 1960 по 1970 рік перебував на посаді замісника директора, а з 1971 року призначений науковим консультантом Київського інституту епідеміології, мікробіології та паразитології. Основні наукові праці присвячені вивченню епідеміології висипного та черевного тифів, холери, дизентерії, гепатиту; вирішенню загальнотеоретичних питань епідеміології. Громашевський Л. В. активно займався науково-організаційною діяльністю. Розробив вчення про механізми передачі інфекції. Обґрунтував роль мух у розповсюдженні кишкових інфекцій та розкрив деякі причини сезонних спалахів цих захворювань. Створив класифікацію інфекційних хвороб за патогенетичними ознаками. У 1967 році — Герой Соціалістичної Праці. Пішов з життя видатний епідеміолог України 1 травня 1980 року [1].

Видатний вчений-патофізіолог Альперін Данило Євсейович народився 15 грудня 1894 року в місті Харкові. У 1917 році закінчив Харківський університет. З 1919 року працював асистентом на кафедрі патофізіології Харківського медичного інституту, а з 1929 року — завідувачем цієї ж кафедри. З 1923 по 1954 рік керував відділом патофізіології Українського психоневрологічного інституту та одночасно з 1935 по 1941 рік відділом Українського інституту експериментальної медицини. Основні наукові роботи видатного вченого присвячені патофізіології нервової системи та нейрогуморальній регуляції, питанням патогенезу алергічних реакцій. У 1928 році Альперін Д. Є. встановив вплив нервової системи на проникненість судин та тканин, а також роль медіаторів при порушенні рефлекторної діяльності нервової системи. Показав роль хімічних факторів та нервового збудження в патогенезі низки захворювань. У 1935 році він встановив десенсибілізуючу та протизапальну дію екстрактів гіпофізу, а у 1951 році — роль аденіннуклеотидів у патогенезі запалення. Є автором посібника «Патологічна фізіологія», який був виданий у 1938 році. У 1939 році удостоєний звання Почесного члена Міжнародного антиревматичного товариства та Члена-кореспондента Академії наук України. Помер видатний патофізіолог Альперін Д. Є. 24 серпня 1968 року [5].

Видатною постаттю в історію ввійшов відомий фізіолог Богач Петро Григорович, який народився 30 січня 1918 року в селі Соколівка Хмельницької області. У 1937 році закінчив Ніжинський педагогічний інститут. З 1939 року працював у Київському університеті. З 1952 по 1971 рік і з 1979 року він директор інституту фізіології тварин при Київському університеті. У 1964 році був призначений завідувачем кафедри біофізики, а з 1973 року завідував кафедрою фізіології людини та тварин цього ж університе-

ту. З 1972 по 1981 рік — проректор Київського університету. З 1978 по 1981 рік — академік Академії наук України та одночасно Академічний секретар відділення біохімії, фізіології і теоретичної медицини Академії наук України. Основні його наукові праці присвячені вивченню центральних і периферичних механізмів регуляції діяльності травного апарату, фізіології гіпоталамусу та надгіпоталамічних структур мозку, електрофізіологічних властивостей гладких м'язів і біофізики м'язових скорочень. Отримав дані про рефлекторну регуляцію моторної діяльності шлункового тракту [4], виявив гіпоталамічні механізми регуляції жовчоутворення, жовчовиділення та всмоктування. Дослідив конформаційні властивості використання різних протеїнових кормів, синтетичних амінокислот, небілкових азотистих речовин та вітамінів. Приділяв значну увагу проблемі мінерального харчування тварин, впливу мікроелементів (кобальту, міді, марганцю) на їх розвиток. Запропонував ряд рекомендацій і розробив інструкції з харчування сільськогосподарських тварин, раціонального використання, вдосконалення технології хімічного консервування кормів. Пішов з життя 23 червня 1981 року.

Висновки

Таким чином, ми прагнули надати достовірну інформацію про життєвий та науковий шлях вчених, узагальнити, деталізувати та систематизувати викладений вище матеріал, для того щоб імена видатних вчених України XIX–XX століть у галузі біології та медицини якомога довше залишалися у наших серцях, щоб наше сучасне покоління XXI століття оцінило науковий вклад вчених минулих століть, прагнуло бути корисним сучасному суспільству та дивувати його новітніми науковими досягненнями. Ми завдячуємо видатним вченим України всім серцем та душею за їх внесок у науку, бо вони заслуговують на пам'ять та пошану за неоціненний вклад у біологічну та медичну науки.

ЛІТЕРАТУРА

1. Медицина в Україні. Медична біографістика. Випуск 1. Друга половина XIX століття. Літери А-К. Біобібліографічний словник.— К.: СПД Коляда О. П., 2005.— 616 с.
2. Медицина в Україні. Медична біографістика. Випуск 2. Друга половина XIX — початок XX століття. Літери А-С. Біобібліографічний словник.— К.: СПД Коляда О. П., 2012.— 520 с.
3. Мороз І. В., Мороз Л. І. Учені-біологи України: додаток // Словник-довідник з біології.— К., 2001.— С. 350–377.
4. Наука — це поєднання досвіду і пошуків нового [Текст]: [до 20-річчя Нац. академії мед. наук України] // Ваше здоров'я.— 2013.— 22 берез. (№ 11/12).— С. 6–7.
5. Сердюк А. Наукова діяльність завжди була, є і буде нашим основним завданням [Текст]: [бесіда з Президентом НАМН України А. Сердюком] / А. Сердюк; [кор.] С. Тернова // Ваше здоров'я.— 2013.— 19 квіт. (№ 15/16).— С. 8–9.

PISKUN R.P., CHLESTOVA S.S., GRYNCHAK N.M.

Vinnytsia National Pirigov Memorial Medical University,
Ukraine, 21000, Vinnytsia, Pirogov str., 56, e-mail: piskyn2006 @mail.ru

SCIENTIFIC ACTIVITY OF OUTSTANDING SCIENTISTS OF UKRAINE OF XIXth–XXth CENTURY IN THE FIELD OF BIOLOGY AND MEDICINE

Aims. The History of national science in the field of biology and medicine knows a lot of famous scientists, Ukrainian people are justifiably proud of. The names of prominent scientist presented in the article, gave Ukrainian people great knowledge and experience, scientific research of something new and useful, boundless love to a person, selfless service to Motherland. ***Methods.*** The purpose of our research is to remember the prominent names and dates of scientific activity of Ukrainian scientists of XIXth–XXth century, that were born in Ukraine, got education there, enriched biological and medical science of Ukraine by their scientific achieve ments and were buried in Ukrainian land. ***Conclusions.*** So, we aimed to give reliable information about the vital and scientific way of scientists, to generalize, to detalize and systematize the above mentioned, in order to remain in our hearts names of prominent scientists of Ukraine of XIXth–XXth century in the field of biology and medicine as long as possible. We want our today's generation of XXIstcentury to value the scientific contribution of past centuries and try to be useful for the modern society and surprise it with the newest scientific achievements. This, we are grateful to outstanding Ukrainian scientists all heatedly, as they deserve to be in mind forever for their invaluable contribution in the field of medical and biological science.

Keywords: famous scientist, field of biology, field of medicine.

УДК 579.61

ЧЕНЬ І. Б., ГУМЕНЮК Г. Б.
Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Україна, 46027, м. Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2, e-mail: irynachen@mail.ru

І. І. МЕЧНИКОВ: ЖИТТЯ І НАУКОВА ДІЯЛЬНІСТЬ
До 170-річчя від дня народження

Президент АН УРСР академік О. О. Богомолець, відкриваючи 1945 року ювілейну сесію Академії наук, присвячену 100-річчю від дня народження вченого, відзначав: «І. І. Мечников, зоолог за фахом, розробив інший бік дуже важливої для медицини проблеми — вчення про боротьбу організму з інфекцією; він розкрив перед нами фактори, що визначають перебіг і результат інфекційного захворювання, і значною мірою сприяв відкриттю шляхів, ідучи якими, наука, зрештою, зуміє забезпечити людині нормальне довголіття. Серед праць, написаних І. І. Мечниковим, є одна, що має назву «Засновники сучасної медицини: Пастер, Лістер і Кох». До цих трьох великих імен вдячне людство, по справедливості, має додати четверте ім'я — Іллі Ілліча Мечникова» [1].

Ілля Ілліч Мечников — один з найвидатніших учених зі світовим ім'ям — народився 15 травня 1845 р. в селі Іванівка Куп'янського повіту Харківської губернії (тепер село Панасівка Дворічанського району Харківської області) в родині дворянина Іллі Івановича Мечникова. Дитячі та юнацькі роки провів в Україні. Тут він жив, вчився і виростив крила для могутніх злотів у науковій і творчій діяльності [2].

Здібності Іллі Мечникова до наукових досліджень проявилися дуже рано. З дитинства він цікавився природою та прагнув пізнати її таємниці: вивчав рослини, збирав гербарії, ловив і досліджував комах і риб, читав багато книг з природознавства [3]. Бажання поділитися своїми відкриттями настільки переповнювало хлопця, що він почав читати «лекції» місцевим дітлахам, «а щоб «студенти» не розбіглися,— згадував І. І. Мечников,— я платив їм по дві копійки» [1].

Початкову освіту Ілля здобув у гувернанток. У 1856 р. після вступних екзаменів І. І. Мечников прийнятий відразу до другого класу Харківської гімназії. Навчаючись у п'ятому класі, організував у гімназії «Союз науки», члени якого повинні були робити реферативні доповіді на наукові теми. З майбутньою діяльністю остаточно визначився у 15 років, коли прочитав у російському перекладі роботу німецького зоолога Г. Г. Бронна «Класи і порядки тваринного царства». Під час навчання у шостому класі гімназії відвідував лекції з фізіології людини при Харківському університеті. Під керівництвом професора І. П. Щелкова ознайомився з основами гістології. У 16 років І. І. Мечников написав критичну рецензію на посібник з геології професора І. Ф. Леваковського. Рецензія була опублікована в одному з наукових журналів. Складаючи випускні іспити в гімназії, І. І. Мечников дивував педагогів зрілістю свого наукового мислення [2].

З золотою медаллю у 1862 р. закінчив гімназію і без іспитів вступив на природниче відділення фізико-математичного факультету Харківського університету [3].

У студентські роки на основі проведених спостережень за інфузоріями підготував статтю «Деякі факти із життя інфузорій» і відправив її в науковий журнал «Бюлетень Московського суспільства дослідників природи». «Він був втішений згодою редактора помістити цю статтю, але знайшов, що зробив помилкові висновки, прийнявши явище дегенерації за розмноження. Зразу написав в редакцію, щоб зупинити друк. Так ця перша стаття і не побачила світ»,— писала згодом дружина Іллі Ілліча Ольга Миколаївна Мечникова.

Під час навчання в університеті студент І. І. Мечников прочитав книгу Ч. Дарвіна «Походження видів» і виконав чотири наукові роботи під керівництвом професора фізіології І. П. Щелкова: дві — про скорочення стебла інфузорії, одну — про новий вид червів із роду Diplogaster і одну — про паразитизм в інфузорій.

Тімірязєв К. А. писав: «На початку 60-х років у Петербурзі почали поширюватися чутки про появу в Харкові Wunderkind'е, який мало не на гімназійній лавці навчився володіти мікроскопом і навіть друкується в іноземних журналах» [2].

І. І. Мечников закінчив університет з відзнакою за два роки і відправився досліджувати морську фауну на острів Гельголанд у Північному

© ЧЕНЬ І. Б., ГУМЕНЮК Г. Б.

морі. А вже у вересні 1864 р. успішно виступив на з'їзді природодослідників в м. Гіссен (Німеччина). Почав працювати в лабораторії німецького зоолога професора Р. Лейкарта і відкрив складний цикл розвитку (чергування поколінь) у паразитичних нематод [3, 4].

У 1865 р. І. І. Мечников переїжджає в Неаполь, працює з зоологом О. О. Ковалевським і вивчає розвиток морських безхребетних. Досліджуючи багату фауну Середземного моря, молоді вчені дійшли висновку, що ембріональний розвиток безхребетних підлягає тим самим законам, що і розвиток вищих хребетних тварин. Як у хребетних, так і у безхребетних розвиток зародка відбувається з яйцеклітини з утворенням трьох зародкових листків. Кожен листок служить джерелом гомологічних органів і тканин у різних видів тварин [3].

Слід зазначити, що на той час в ембріології було невирішеним питання про спільність походження безхребетних і хребетних тварин, а також систематичне положення деяких груп організмів (покривники, губки, кишковопорожнинні, головоногі молюски та ін.).

Роботи О. О. Ковалевського і І. І. Мечникова заклали основи нової науки — еволюційної ембріології, а вчені отримали у 1867 р. премію К. Бера (присуджувалася за праці з ембріології).

На основі отриманих за кордоном результатів досліджень І. І. Мечников захистив магістерську дисертацію на тему «Історія ембріонального розвитку Sepiola» (1867 р.) і докторську дисертацію на тему «Історія розвитку Nebalia» (1868 р.) у Петербурзькому університеті [5].

У 1870–1882 рр. Ілля Ілліч очолював кафедру зоології і порівняльної анатомії Новоросійського університету в м. Одесі та викладав зоологію. 25-річний професор І. І. Мечников вражав слухачів своєю довершеністю. Предмет викладав, значно розширюючи рамки звичайного університетського курсу, заряджаючи аудиторію глибоким проникненням у тему лекції, ерудицією, асоціативним мисленням [1].

В університеті в цей час працювали такі талановиті вчені, як фізіолог І. М. Сєченов, зоологи В. В. Заленський і О. О. Ковалевський, ботаніки Л. С. Цинковський і І. П. Бородін, фізик Н. Я. Умов і ін. Природничий факультет в Одесі став чи не найкращим у Росії [6].

Восени 1882 р. І. І. Мечников вирушив у м. Мессіна (Італія). Досліджував внутрішньоклітинне травлення у губок, медуз і морських зірок. Зробив припущення про захисну функцію клітин внутрішньоклітинного травлення у високоорганізованих організмів. Це припущення підтвердив експериментально: вводив у тіло личинки морської зірки колючку троянди і через деякий час спостерігав скупчення блукаючих клітин навколо неї. Блукаючі клітини назвав фагоцитами. Так, на основі досліджень внутрішньоклітинного травлення у безхребетних відкрив явище фагоцитозу та створив фагоцитарну теорію.

У журналі «Русская медицина» за 1883 р. була надрукована стаття «Про чудесні властивості блукаючих клітин». Пізніше в м. Одесі на з'їзді лікарів і природодослідників І. І. Мечников зробив доповідь на тему « Цілющі сили організму» [3, 4].

Відкриття явища фагоцитозу та створення на його основі фагоцитарної теорії імунітету — найважливіше досягнення вченого. Він встановив, що у кожного живого організму є свої захисні клітини — фагоцити (у людини — лейкоцити). І захворювання, за його визначенням, починається з боротьби між фагоцитами і хвороботворними мікробами. То була настільки нетрадиційна ідея, що її мало хто з дослідників міг одразу сприйняти. Вже пізніше видатний патофізіолог Є. О. Татаринов зазначав, що «фагоцитарна теорія імунітету, яка базується на блискучому, синтетичному вивченні процесів живлення, запалення та інфекції, а також тварин різного рівня еволюційного розвитку, не тільки не втратила свого значення, а й перетворилася на вчення, що міцно ввійшло в наукове мислення біологів та лікарів. Фагоцитарна теорія визнана всіма, ми мислимо образами мечниковської доктрини» [1].

Розроблені на той час Л. Пастером принципи отримання вакцин і методи вакцинації широко застосовувалися, але механізм їх дії залишався невідомим. І. І. Мечников з'ясував, що при введенні кролику вірулентної культури сибірської палички тварина гинула, а при введенні штучно ослабленої культури — видужувала. Введення вакцинованим кроликам навіть смертельної дози сибірської палички не спричиняло їх загибель. На основі цих дослідів зробив висновок, що несприйнятливість до інфекції полягає у «привчанні фагоцитів до боротьби з мікробами» [3]. «Гадаю, ви на правильному шляху»,— так відгукнувся всесвітньо відомий Л. Пастер про дослідження І. І. Мечникова [1].

У 1886 р. І. І. Мечников разом з М. Ф. Гамалією заснував першу в Росії (і другу в світі) бактеріологічну станцію (нині — Одеський науково-дослідний інститут вірусології та мікробіології ім. І. І. Мечникова), яка мала займатися виготовленням вакцин, щепленням проти сказу тощо.

Під керівництвом І. І. Мечникова на станції проводилися підготовка молодих лікарів, виготовлення та вдосконалення способів отримання вакцин проти різних інфекційних захворювань і вивчення біологічних методів боротьби зі шкідниками сільського господарства [3]. Він об'єднав навколо станції молодих працівників, які згодом стали видатними вченими-мікробіологами (Д. К. Заболотний, Л. А. Тарасевич, П. Н. Діатропов, Я. Ю. Бардах та ін.) [6].

У 1888 р. І. І. Мечников на запрошення Л. Пастера переїхав у Париж і організував лабораторію в Пастерівському інституті. В його лабораторії працювали бельгійський імунолог і бактеріолог Ж. Борде (Нобелівська премія, 1919 р.), український імунолог О. М. Безредка (після смерті І. І. Мечникова завідував лабораторією), український мікробіолог Д. К. Заболотний, який розробив метод програмної імунізації проти холери і запропонував заходи щодо її профілактики [1].

Приділяючи основну увагу питанням патології, І. І. Мечников створив цикл статей, присвячених мікробіології і епідеміології холери, чуми, черевного тифу, туберкульозу [5].

Робота І. І. Мечникова в Інституті Пастера — це період плідної праці і загального визнання. У 1892 р. вийшла праця І. І. Мечникова «Лекції з порівняльної патології запалення», в якій узагальнено результати багаторічного вивчення фагоцитозу.

У 1900 р. на міжнародному конгресі у Парижі Ілля Ілліч, впевнений у правоті своїх висновків, представив підсумки досліджень з фагоцитарної теорії імунітету і приступив до завершення написання головної праці «Несприйнятливість до інфекційних захворювань». В ній виклав результати досліджень за останні двадцять років і остаточно оформив вчення про імунітет, засноване на порівняльному спостереженні механізму цього явища і його еволюції на всіх рівнях тваринного світу, а також описав всі етапи боротьби за правоту своєї теорії, розібрав зауваження, розглянув теорії імунітету інших вчених і дав загальний опис сучасного положення питання. Ця книга — жива картина тривалої та істотної частини наукової діяльності І. І. Мечникова [3, 4].

У подальшій науковій діяльності І. І. Мечников повністю перейшов до питань медицини. Він сказав, що вважає себе «зоологом, що заблукав у медицині». Ілля Ілліч звернувся до дослідження причин старіння. Еволюційний аналіз онтогенезу тварин закономірно привів його до висновку, що можливі механізми довголіття людини слід шукати в тому напрямі, що і причини довголіття тварин. Він вірив, що за допомогою науки людина може перемогти протиріччя людської природи і забезпечити собі щасливе існування. Ці філософські погляди виклав у книгах «Етюди про природу людини» (1903 р.) й «Етюди оптимізму» (1907 р.).

Видатний вчений розвиває свою теорію довголіття, де на прикладах із тваринного світу обговорюються питання здорового і довготривалого життя, адаптації до старіння і природної смерті. Питання про людську природу, про сенс життя і смерті привели його до створення своєрідного «оптимістичного світогляду», заснованого на теорії «ортобіозу», тобто правильного життя, на вивченні людської природи і на встановленні засобів до виправлення її дисгармонії. Він стверджував, що з передчасною старістю потрібно і можна боротися. Він вважав, що старість і смерть у людини наступають передчасно. Особливу роль у процесі передчасного старіння відводив мікробам кишкової флори, що отруюють організм своїми токсинами. І тільки біфідо- і лактобактерії абсолютно не шкідливі та володіють виключною користю, проявляючи антагонізм, пригнічуючи патогенні й умовно-патогенні мікроорганізми кишечника [4].

Ідея І. І. Мечникова про можливість застосування одних мікроорганізмів для припинення розвитку інших дала надзвичайно важливі результати у двох напрямах: по-перше, використання з лікувальною метою антибіотиків, що є продуктами розвитку мікроорганізмів і грибів. Завдяки антибіотикотерапії вдалося врятувати життя мільйонів людей; по-друге, упровадження у медичну практику медикаментів, що містять сапрофіти (лакто-, біфідобактерин тощо), дало змогу значно інтенсифікувати лікування дисбактеріозу, гострих і хронічних ентеритів, колітів, панкреатитів та інших захворювань шлунково-кишкового тракту [1].

Заслуга вченого полягає і в тому, що він вивів проблему вивчення старості з традиційної медико-гігієнічної площини на широку дорогу еволюційно-біологічних досліджень. Його ідеї про необхідність науково обґрунтованих правил індивідуального життя людини актуальні і сьогодні. Вони стали важливою передумовою формування геронтології як науки.

До філософських праць І. І. Мечникова належать статті, зібрані у книзі «Сорок років пошуку раціонального світогляду» (1913 р.). У цій книзі він зібрав всі свої роботи загального характеру, починаючи від статей про «дисгармонії» в людській природі. Вся ця серія робіт наочно ілюструє його шлях від песимізму раннього періоду до яскравого матеріалістичного оптимізму зрілого віку.

Отже, основними науковими працями, що знаменують головні досягнення і етапи діяльності І. І. Мечникова, стали: «Ембріологічні дослідження над медузами» (1886 р.), «Лекції про порівняльну патологію запалення» (1892 р.), «Несприйнятливість до інфекційних хвороб» (1903 р.), «Етюди про природу людини» (1903 р.), «Етюди оптимізму» (1907 р.), «Сорок років пошуку раціонального світогляду» (1913 р.).

Останні праці І. І. Мечникова присвячені історії біологічних наук в особі її видатних представників. Сюди належать статті у «Віснику Європи» і книга «Засновники сучасної медицини: Пастер, Лістер і Кох» (1915 р.). У передмові до цієї книги, що написана в перші місяці першої світової війни, Мечников рекомендує спрямувати воєнний запал «не на війну проти людей, а проти ворогів у вигляді великої кількості видимих і невидимих мікробів» [4].

І. І. Мечникова обрано членом багатьох академій і наукових співтовариств, зокрема почесним членом Петербурзької академії наук (1902 р.). З 1905 р. він працює заступником директора Інституту Пастера. А у 1908 р. Іллі Мечникову і Паулю Ерліху присуджено Нобелівську премію за дослідження в галузі імунології. Професор Є. О. Татаринов цілком об'єктивно стверджує, що «весь прогрес імунології лежить на фундаменті основних загальних понять, у формуванні яких І. І. Мечникову належить одне з найперших місць» [1, 5].

У 1915 р. відомий у всьому світі Інститут Луї Пастера і все європейське суспільство урочисто відзначили 70-річчя нашого славетного співвітчизника Іллі Ілліча Мечникова. Директор цього інституту Еміль Ру у листі-привітанні, високо оцінюючи заслуги ювіляра перед світовою наукою, зазначив: «В Парижі, як і в Одесі, Ви запалили вогонь, який видно здалека. Інститут Л. Пастера багато в чому завдячує Вам» [5].

Помер І. І. Мечников 15 липня 1916 р. у Парижі.

Український народ шанобливо зберігає пам'ять про свого земляка, вченого світового виміру. Його іменем названі вулиці Києва, Одеси, Харкова, Дніпропетровська, інших міст України. Харківський інститут мікробіології та імунології й Одеський університет удостоєні імені І. І. Мечникова. Національний банк України у 2005 р. ввів в обіг ювілейну монету номіналом 2 гривні, присвячену 160-річчю від дня народження Іллі Ілліча Мечникова.

Підсумовуючи наукову і творчу діяльність всесвітньовідомого вченого І. І. Мечникова, який народився і зростав в Україні, виділимо її ключові аспекти. Вчений зробив значний внесок у розвиток зоології, мікробіології, ембріології, імунології. Автор п'яти фундаментальних відкриттів: теоретичне і практичне обґрунтування внутрішньоклітинного травлення; розкриття суті запалення; створення фагоцитарної теорії імунітету; вчення про антибіотики; розвиток концепції довголіття. Створив потужну наукову школу. В його лабораторії в Інституті Пастера знайшли путівку в науку біологи і медики світового рівня [1].

ЛІТЕРАТУРА

1. Чекман І. С. Україно, обітована земле мого серця! Нобелівські лауреати — вихідці з України // Вісник НАН України. — 2006. — № 1. — С. 44–53.
2. Иваненко М. О., Климова Е. М., Кузьменко Е. В. И. И. Мечников. Формирование научного мировоззрения в детские и юношеские годы // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». — 2011. — 24 (63), № 1. — С. 40–51.
3. Галушка Р. А., Кучма И. Ю., Глазунова Л. И. И. И. Мечников — основатель современной микробиологии и иммунологии [Електронний ресурс] // Annals of Mechnikov Institute. — 2011. — № 1. — С. 64–67. — Режим доступу: http:// imiamn.org.ua /journal.htm.

4. Галушка Р. А., Кучма И. Ю., Глазунова Л. И. Научная деятельность И. И. Мечникова за рубежом [Електронний ресурс] // Annals of Mechnikov Institute.— 2011.— № 2.— С. 65–69.— Режим доступу: http://imiamn.org.ua/journal.htm.
5. Петрюк П. Т., Кучма И. Ю., Резник В. И. Илья Ильич Мечников: биографические, научные и психиатрические аспекты (к 165-летию со дня рождения) [Електронний ресурс] // Annals of Mechnikov Institute.— 2010.— № 2.— С. 53–62.
6. Зайцева Н. В. Педагогическая деятельность И. И. Мечникова в Новороссийском университете: своеобразие подхода к процессу обучения студентов [Електронний ресурс] // «Образование и общество».— Режим доступу: http://jeducation.ru/6_2009/102.html.

CHEN I.B., HUMENIUK H.B.

V. Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University,
Ukraine, 46027, Ternopil, M. Kryvonosa str., 2, e-mail: irynachen@mail.ru

I.I. MECHNIKOV: LIFE AND SCIENTIFIC WORK. TO THE 170th ANNIVERSARY OF HIS BIRTH

The article focuses on the life, scientific and creative work of the outstanding scholar I. I. Mechnikov who was born and grew up in Ukraine. It highlights his main achievements and discoveries such as substantiation of intracellular digestion, formulation of phagocytic theory of immunity, identification of the essence of inflammation, doctrine of antibiotics, development of the concept of longevity. The contribution of his works to the development of zoology, embryology, microbiology, immunology, gerontology is revealed. His fundamental scientific works are examined.

Keywords: I. I. Mechnikov, phagocytic theory of immunity, scientific works.

НАУКОВЕ ВИДАННЯ

ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

ФАКТОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ

FACTORS IN EXPERIMENTAL EVOLUTION OF ORGANISMS

Збірник наукових праць

ТОМ 16

Технічний редактор *М. С. Чабан*
Комп'ютерна верстка *І. В. Шмушковича*
Коректори: *К. С. Мірзамухамедова, Г. М. Руденко*
Художнє оформлення *А. М. Голєва*

Підписано до друку 21.08.2015. Формат $60\times84^{1}/_{8}$. Папір офс.
Гарнітура «Таймс». Друк офс. Ум. друк. арк. 33,5 Обл.-вид. арк. 35,9
Наклад 300 прим. Зам. 570.

ТОВ-Видавництво «ЛОГОС».
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 201 від 27.09.2000 р.
01030, Київ-30, вул. Богдана Хмельницького, 10, тел. 235-6003